



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Heloisa da Silveira Paro Pedro

Diversidade clínica, epidemiológica e genética do
Mycobacterium tuberculosis na região Noroeste paulista

São José do Rio Preto
2015

Heloisa da Silveira Paro Pedro

Diversidade clínica, epidemiológica e genética do
Mycobacterium tuberculosis na região Noroeste paulista

Tese de Doutorado apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Castiglioni

São José do Rio Preto
2015

Diversidade clínica, epidemiológica e Genética do
Mycobacterium tuberculosis na região Noroeste paulista

Tese de Doutorado apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Lilian Castiglioni
FAMERP - São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari
FAMERP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan
UNESP - Araraquara

Profa. Dra. Daisy Nakamura Sato
American Society for Microbiology do ASM LAb CAp Program -
São Paulo

Profa. Dra. Margarete Gotardo de Almeida
FAMERP/UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
08 de maio de 2015

Pedro, Heloisa da Silveira Paro.

Diversidade clínica, epidemiológica e genética do
Mycobacterium tuberculosis na região Noroeste paulista / Heloisa da
Silveira Paro Pedro. – São José do Rio Preto, 2015
141 f. : il.

Orientador: Lilian Castiglioni
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Epidemiologia molecular. 3. Tuberculose -
Diagnóstico. 4. *Mycobacterium tuberculosis* - São José do Rio Preto,
Região de (SP) I. Castiglioni, Lilian. II. Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616-036.22

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

RESUMO

Diversidade clínica, epidemiológica e Genética do *Mycobacterium tuberculosis* na região Noroeste paulista

A tuberculose é considerada um problema prioritário de saúde pública. Há cada vez mais evidências de que, a variação das cepas de *M. tuberculosis* tem um papel importante no resultado da infecção por tuberculose. No presente estudo, além de descrever os aspectos sociodemográficos, clínico-epidemiológicos e bacteriológicos da tuberculose e relacionar com a distribuição de resistência aos fármacos antituberculose, também objetivou-se avaliar a diversidade dos genótipos de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando as técnicas de Spoligotiping (*Spacer Oligonucleotide Typing*) e MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-variable-number tandem repeats*). Com relação à resistência aos fármacos, as culturas de MT e os testes de sensibilidade mostram que cepas de pessoas que fizeram tratamento de TB anterior ou infectados pelo HIV apresentaram mais resistência os fármacos quando comparados aos que não apresentavam essas características ($p < 0,05$). Os casos resistentes, em sua maioria, são de origem pulmonar e apresentam baciloscopia positiva. A análise molecular mostrou que das 377 amostras com perfis completos para 14 loci MIRU-VNTR, os loci 10, 16, 23, 26, 27, 31, 39 e 40 tiveram um alto poder discriminatório (≥ 0.6), os loci 2, ETRB e Mtub21 foram moderadamente discriminatórios (≥ 0.3) e loci 4, 20 e 24, baixo poder discriminatório (< 0.3). Dos 250 isolados de *M. tuberculosis* analisados por spoligotyping, 92 diferentes padrões foram observados e diferentes famílias foram identificadas: Haarlem (H), Latin American and Mediterranean (LAM), T Family, *undesigned* (U), S lineage e X Family. Significativa variabilidade genética foi observada nos isolados de *M.*

tuberculosis circulantes na região Noroeste Paulista quando analisados por *spoligotyping* e MIRU-VNTR.

Palavras chaves: *Mycobacterium tuberculosis*; diagnóstico; perfil epidemiológico; perfil molecular.

ABSTRACT

Clínical, epidemiological and Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in the northwestern region of Sao Paulo State

Tuberculosis is considered a high priority public health problem. There is increasing evidence that the variation in *Mycobacterium tuberculosis* strains play an important role in the outcome of infections by tuberculosis. Apart from describing sociodemographic, clinical, epidemiological and bacteriological aspects of tuberculosis (TB) and correlating the distribution of resistance to antituberculosis drugs, one objective of this study was to evaluate the diversity of the genotypes of *M. tuberculosis* isolates using the Spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) and MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units variable-number tandem repeats) techniques. With respect to drug resistance, cultures of *M. tuberculosis* and susceptibility tests showed that strains from people previously submitted to TB treatment or infected with HIV have more resistance to drugs compared to those without these characteristics ($p < 0.05$). Resistant cases are mostly pulmonary *M. tuberculosis*, and have positive smear test results. Molecular analysis showed that of the 377 samples, 14 MIRU-VNTR loci had complete profiles; the 10, 16, 23, 26, 27, 31, 39 and 40 loci had high discriminatory power (≥ 0.6) the 2, ETRB and Mtub21 loci were moderately discriminatory (≥ 0.3) and 4, 20 and 24 loci had low discriminatory power (< 0.3). Ninety-two different patterns were observed in the 250 *M. tuberculosis* isolates analyzed by spoligotyping and different families were identified as Haarlem (H), Latin American and Mediterranean (LAM), T Family, undesignated (U), S lineage and X Family. Significant genetic variability was observed in *M. tuberculosis* isolates circulating in the northwestern region of Sao Paulo State when analyzed by spoligotyping and MIRU-VNTR.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; diagnostics; health Profile;
molecular profile

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São José do Rio Preto (SP), na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) de Bauru (SP) e na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro (RJ), sob a orientação da Profa. Dra. Lilian Castiglioni.

Ao meu marido, Carlos, aos meus filhos, Murilo e Isabella, aos meus pais, Armando e Mariana, e a meus irmãos, pelo amor e apoio incondicionais, em todas as etapas deste trabalho.

Agradecimento especial à Prof.a Dra. Lílian Castiglioni por sua valiosa orientação e também pelo carinho, dedicação, delicadeza e amizade. Minha gratidão sincera por fazer parte deste estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me tem iluminado o caminho e o caminhar, passo a passo, diante de qualquer desafio.

Agradeço a oportunidade de trabalhar, ao longo dos anos, com o diagnóstico da tuberculose, doença negligenciada, de sofrimento e estigma para todos os que dela sofrem. Esse foi o melhor presente que ganhei com a minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), nas pessoas da Profa. Dra. Cláudia Maria Carareto, sua Coordenadora; da Profa. Dra. Ana Elisabete Silva, sua Vice-Coordenadora, e da Dra. Lílian M. Ravazzi, incentivadora de primeira hora desta pesquisa e docente do Programa; nas pessoas, também, da Sra. Rosemar de Carvalho Brena, supervisora da Seção da Pós, e das Sras. Silvia Emiko Kazama e Silvia Mara Vicentini de Carvalho, bem como dos Srs. Alex Antônio dos Santos, Mauro Kasuo Miasaki, Felipe da Cunha Ferreira, Víctor Novaes Rufino e Luís Otávio Silva Rodrigues, servidores públicos dessa Seção; nas pessoas, igualmente, das Sras. Luciane Passoni e Gislaine Gameiro, servidoras da Biblioteca do câmpus de São José do Rio Preto.

Agradecimento especial à disponibilidade e incentivo de várias pessoas que apoiaram e contribuíram em todas as etapas para que este trabalho se tornasse viável e possível: Susilene Maria Tonelli Nardi, Ida Maria Foschiani Baptista, Amanda Juliane Finardi, Eloise Moraes e Rosângela Siqueira Oliveira. Que cada um saiba que, de alguma forma, por caminhos e razões que nem sempre podem ser explicados, foi responsável por esta importante e de certa forma, inesperada conquista, nessa fase de minha vida.

Ao Instituto Adolfo Lutz (CLR-IAL) de São José do Rio Preto, na pessoa de Margarida Georgina Bassi, sua Diretora e demais funcionários, pelo incentivo, apoio, amizade e mãos estendidas em todos os momentos de minha jornada profissional e pessoal, em especial às parceiras Maria Izabel Ferreira Pereira e Maria do Rosário Assad Goloni, do Laboratório de Micobactérias, pelo suporte técnico e amizade durante toda vida profissional.

Às amigas Denise Fusco Marques, Elisabete Cardiga Alves Rodrigues, Érica Valessa Ramos Gomes, Fernanda Modesto Tolentino, Gisele Aparecida Remeli,

Inara Siqueira de Carvalho Teixeira, Ivete Aparecida Zago Castanheira de Almeida, Jacqueline Tanury Macruz Peresi, Janaína Olher Martins Montanha, Juliana Klinder Figueiredo, Maria de Fátima Domingues Neves, Maria do Rosário Assad Goloni, Maria do Rosário Vigeta, Maria Izabel Ferreira Pereira, Maria Teresa de Bortoli Gomes, Naiara Cristina Ule Belotti, por tornarem nossos dias mais leves e agradáveis durante o trabalho.

Ao IAL de São Paulo, em sua Unidade Central, na pessoa do Dr. Hélio Hehl Caiaffa Filho, seu Diretor Geral, e das pesquisadoras Érica Chimara, Lucilaine Ferrazoli e Rosângela Siqueira Oliveira, pelo renovado suporte técnico e ininterrupto incentivo ao progresso da ciência em geral e ao desta pesquisa, em particular.

À direção do ILSL de Bauru e à Pesquisadora Ida Foschiani Baptista pelo incentivo e viabilização da realização deste trabalho em todas as etapas percorridas.

À FIOCRUZ do Rio de Janeiro, em especial a Harrison Magdinier Gomes e Philip Noel Suffys, do Laboratório de Biologia Molecular, pela acolhida e suporte técnico.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC), de Ananindeua, Pará (PA), na pessoa de Ricardo Luiz Dantas Machado, pelo apoio recebido.

Ao Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) XXIX de São José do Rio Preto, em especial à Nilza Gomes de Souza, pelo acesso e colaboração aos bancos de dados de notificação de tuberculose.

À Secretaria Municipal de Saúde de São José do Rio Preto, pelo apoio a esta pesquisa.

À FAMERP de São José do Rio Preto, na pessoa da Prof. Dra. Lílian Castiglioni pela viabilização desta pesquisa.

Aos membros da Comissão Examinadora, pela atenção dispensada à análise desta tese e pela disponibilidade de integrá-la.

A todos os membros da minha família, pela ajuda incondicional, nos momentos alegres e nas horas difíceis.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Teixeira de Andrade,
professor de Português e cronista brasileiro
(1946-2008).

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGMPT64** - teste imunocromatográfico para *Mycobacterium tuberculosis*
- AIDS** - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
- AFB** - *Acid Fast Bacillus*
- AST** - *Antibiotic Susceptibility Testing*
- BAAR** - Bacilo Álcool-Ácido Resistente
- MGIT 960** - meio de cultura para teste de sensibilidade automatizado
- BCG** - Bacilo *Calmette-Guérin*
- BD** - *Becton and Dickinson*
- CMt** - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- EUA** - Estados Unidos da América
- CAS** - família do Leste Africano-Indiana
- CTAB** – *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- DOTS** - Tratamento Diretamente Observado
- DR** - *Direct repeat*
- DRS XV** - Divisão Regional de Saúde
- DST** - Doença Sexualmente transmissível
- EAI** - família do Leste Africano-Indiana da linhagem Indo-Oceânica
- EMB** - etambutol
- Et** - etionamida
- ETR** - repetições exatas *in tandem*, identificadas pelas letras de A a E (ETRA, ETRB, etc.)
- GeneXpert/RIF** - Teste molecular rápido de resistência à rifampicina
- GVE** - Grupo de Vigilância Epidemiológica
- H** - família *Haarlem* da linhagem filogeográfica Euro-Americana
- HGI** - índice de *Hunter-Gaston*
- HIV** - Vírus da Imunodeficiência Adquirida humana
- HIV/TB** - Coinfecção *HIV/tuberculosis*
- HIV/AIDS** - Infecção HIV e AIDS

H37Rv-ATCC - cepa-padrão de *Mycobacterium tuberculosis* virulenta

IS - Elementos ou Sequências de Inserções

IS 6110 - Elemento ou Sequência de Inserção 6110 do *Mycobacterium tuberculosis*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INH - isoniazida

LAM - família Latino-Americana da linhagem filogeográfica Euro-Americana

MDR-TB - Multidrogarresistência

MIRU-VNTR - *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeats*

Mt - *Mycobacterium tuberculosis*

MST - *Minimum Spanning Tree*

NJ - *Neighbor Joining*

OR - *Odds ratio*

pb - pares de base

PCT - Programa de Controle da Tuberculose

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PNB - *p-nitrobenzoic acid*

PRODESP - Companhia de Processamento de Dados do Estado de São Paulo

PZA - pirazinamida

RIF - rifampicina

RFLP-IS6110 - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

S - família S da linhagem filogeográfica Euro-Americana

SBPT - Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia

SD - desvio-padrão

ST - *Shared Type*

SIT - *Shared International Type*

SITVITWEB - Banco de dados internacional do *Institut Pasteur de la Guadeloupe* - França

SITVIT2 - versão atualizada da base de dados SpolDB4.0

SJRP - São José do Rio Preto

SM - estreptomicina

SpoIDB4.0 - versão do banco de dados internacional do *Institut Pasteur de La Guadeloupe* - Fr

STD/AIDS - Doença Sexualmente transmissível/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

T - família T da linhagem filogeográfica Euro-Americana

TB - Tuberculose

TB/HIV - coinfeção *Mycobacterium tuberculosis*/Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana

TE - Tampão EDTA

TBWEB - Sistema *on-line* de notificação de pacientes com tuberculose do Estado de São Paulo pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE)

TSA - Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

U - *Undesignated*

UBS - Unidade Básica de Saúde

USF - Unidade de Saúde da Família

UPA - Unidade de Pronto Atendimento

UPGMA - *Unweighted Pair Group Arithmetic Averages*

V - volts

W/Beijing - família do Leste Asiático

WHO/OMS - World Health Organization/Organização Mundial da Saúde

X - família X da linhagem filogeográfica Euro-Americana

XDR-TB - *extensively drug resistant*

ZN - *Ziehl - Neelsen*

LISTA DE FIGURAS

Figura1 Taxa estimada de tuberculose em 2012.....	23
Figura2 <i>Spoligotyping</i> – Genotipagem de <i>M. bovis</i> , <i>Mt H37Rv</i> e isolado X de <i>Mt</i>	28
Figura3 Cromossomo hipotético de um isolado X de <i>M. tuberculosis</i> e genotipagem de <i>M. bovis</i> -BCG, <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e isolados X, utilizando as técnicas de RFLP-IS 6110 e MIRU-VNTR.....	30
Figura4 Representação esquemática das seis linhagens principais de <i>M. tuberculosis</i> e respectivas famílias.....	34

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	20
1. Aspectos gerais da tuberculose	20
2. Epidemiologia da tuberculose	23
3. Métodos moleculares de diferenciação do <i>Mt</i>	25
4. Aplicação das técnicas de genotipagem em estudos populacionais	32
II. JUSTIFICATIVA	36
III. OBJETIVOS	39
Objetivo geral	39
Objetivos específicos	39
IV. CAPÍTULOS.....	40
ARTIGO 1.....	41
Panorama atual da tuberculose.....	42
ARTIGO 2.....	77
Clinical and epidemiological profiles of individuals with drug-resistant tuberculosis....	78
ARTIGO 3.....	86
Caracterização genética entre isolados do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> na região Noroeste Paulista	87
V. DISCUSSÃO GERAL.....	105
VI. CONCLUSÕES	112
VII. REFERÊNCIAS	114
VIII. ANEXO	140

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos gerais da tuberculose

Embora passível de prevenção, tratamento e mesmo de cura (WHO, 2013), a tuberculose (TB) é doença bacteriana crônica, infectocontagiosa, de distribuição universal, que se destaca por continuar a se constituir em grave problema de Saúde Pública, em âmbito mundial, e, também, por ter, no comprometimento da função pulmonar, sua principal forma clínica — responsável pelo acometimento, no mundo, de cerca de 80% dos indivíduos infectados que padecem dessa doença (WHO, 2013).

As medidas atuais de controle globais da doença não foram suficientes para interromper a transmissão e erradicar a TB, e o risco de progressão entre os contatos infectados tem permitido a perpetuação da doença entre a população mundial (WHO, 2013). Tal ineficácia faz não só subsistirem o risco tanto de progressão da doença entre os contatos infectados, quanto o risco de perpetuação da TB entre a população mundial (MAULÉN, 2011), como permite inferir, ainda, que, para ser controlada, a TB exija o desenvolvimento de estratégias, mais do que somente de Saúde Pública, também do ponto de vista humanitário e socioeconômico (WHO, 2013).

Dentre os vários fatores envolvidos na patogênese da TB, verificam-se variáveis ambientais, socioeconômicas e comportamentais, típicas da sociedade contemporânea, como a disseminação de práticas, tais como a do etilismo, a do tabagismo, a da adição ao consumo de drogas ilícitas, a do uso indiscriminado e, por vezes, abusivo de antibióticos e a do abandono do tratamento. Além dessas variáveis e dos componentes genéticos individuais de cada doente, observam-se, também, variáveis biológicas, como a pré-existência de outras doenças de base, tais como o diabetes, a hipertensão arterial e, a principal delas, a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA, ou *AIDS*, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) (CORREA; GÓMEZ; ANAYA et al., 2004). Disso, há de se ressaltar, como bastante relevante para a prevalência das altas taxas de TB na atualidade, o surgimento, dentre o agente causador da moléstia, de cepas do bacilo resistentes aos medicamentos que deveriam combatê-la, o que, sem dúvida, dificulta o tratamento da doença (WHO, 2011; SAID et al., 2012; WHO, 2013).

O agente etiológico da TB (*Mt*) é uma bactéria aeróbica estrita, em forma de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), imóvel, com diâmetro de 0,2 a 0,6 micrômetro (μm) e comprimento de 1,0 a 4,0 μm , sem cápsula, nem esporos, e, ainda, sem a produção de toxinas (WAYNE; KUBICA, 1986; LAW; ZUMLA, 2011).

Taxonomicamente pertencente à família *Mycobacteriaceae* e à ordem *Actinomycetales* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005), o gênero *Mycobacterium* exige um período que costuma variar de quatro a oito semanas, para a reprodução, em meios artificiais de cultura, de colônias visíveis (KRITSKI et al., 2000; DUCATI et al., 2006).

Dotada de complexa estrutura lipídica, a parede celular do *Mt* é constituída, em sua porção externa, por ácidos micólicos, os quais, além de formarem camada resistente à água, tornam o bacilo capaz de sobreviver a ambientes e a situações adversos, como o ressecamento, o uso de desinfetantes e ao tratamento com certos antibióticos (COLE et al., 1998; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Atribuídas ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMt), as seguintes espécies — *Mt*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinipedii* — que apresentam sequências altamente conservadas e similares de Ácido Desoxirribonucleico (*DNA - Desoxyribonucleic Acid*), em uma proporção que chega a cerca de 99%. Diferem essas espécies, entretanto, quanto à sua distribuição geográfica, sua patogenicidade e seus hospedeiros (SOLA, 2003; ALMEIDA, 2009). Estudos recentes têm atribuído ainda outras espécies ao CMt — *M. mungi*, *M. orygis* e *M. chimpanzee* (VAN INGEN et al., 2012; COSCOLLA et al., 2013).

O sequenciamento genético do CMt permitiu o conhecimento da estrutura biológica do bacilo, que apresenta genoma circular, teor de guanina e de citosina de 65,6% (COLE et al., 1998) e tamanho variável, conforme a espécie, de 4 a 7 milhões de pares de bases (pb) (HOMOLKA et al., 2008). A cepa de referência do *Mt*, a ATCC H37 RV 27294, apresenta 4.411.529 pb.

O genoma do CMt é descrito, ainda, como rico em elementos ou sequências de inserção (*IS*, do inglês *Insertion Sequences*) e em sequências repetidas e o complexo *Mt* pode ser diferenciado das outras micobactérias, por apresentar sequências genéticas IS 6110 (COELHO; MARQUES, 2006).

A principal fonte de transmissão da TB pulmonar é de pessoa para pessoa, e sua infecção costuma ocorrer, principalmente, durante a tosse, a fala ou o espirro quando o indivíduo contaminado libera, no ar, incontáveis gotículas infectantes (BRASIL, 2011), as quais, ao serem inaladas pelo indivíduo saudável e ao atingirem o interior dos macrófagos alveolares, dão início ao ciclo de replicação do *Mt* no organismo são. O bacilo, embora não produza toxinas, tão logo se encontra envolvido pelos macrófagos dos alvéolos dos pulmões saudáveis, ativa um mecanismo que inibe, por meio dos sulfolipídeos, a fusão das vesículas fagocíticas com os lisossomos, impedindo, desse modo, sua eliminação. A bactéria induz, então, a produção de citocinas e de quimiocinas, provocando, nos pulmões, o início de uma resposta inflamatória, que faz com que macrófagos, linfócitos, monócitos e outras células do sistema imunológico migrem para o local da infecção e constituam um granuloma (TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007; MONTENEGRO, 2013).

Em cerca de 95% dos casos, ou seja, em sua vasta maioria, o sistema imunológico do hospedeiro competente impõe-se, súbito, à infecção primária, levando à formação do granuloma caseoso, o qual não só contém o bacilo, como controla, ainda, sua proliferação, no organismo recém-infectado. No entanto, no caso específico do *Mt*, considerado um agente patogênico hábil na criação e na manutenção de um estado de latência, com opção de recuperação no futuro (GLICKMAN; JACOBS JUNIOR, 2001; WHO, 2010), costuma nem sempre ocorrer essa sobreposição imediata do sistema imunológico do bacilo relativamente à infecção primária: esta não cede, portanto, de imediato, à superioridade do sistema imunológico do bacilo invasor, e, por fatores ainda desconhecidos, o *Mt* conserva, ao longo da infecção primária, a habilidade ou de replicar-se de imediato ou de, alternativamente, estabelecer infecção persistente, para, só no futuro, acionar uma possível reativação (MAULÉN, 2011).

O diagnóstico precoce do *Mt* faz-se por exame direto, por cultura/ tipificação, e por teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Quanto mais cedo diagnosticar-se o *Mt*, mais se estará contribuindo para a interrupção do seu ciclo de transmissão e para o controle e a cura da TB (KENT; KUBICA, 1985; BRASIL, 2008; PARRISH; CARROLL, 2011).

2. Epidemiologia da tuberculose

Em todo o mundo, só no ano de 2012, cerca de 8,6 milhões de pessoas — com uma variação de 8,3 a 9,0 milhões de indivíduos — desenvolveram TB, o que resulta em uma proporção de 125 casos, em cada 100 mil habitantes. No mesmo ano, também em nível mundial, foram a óbito, em razão dessa doença, 1,3 milhão de pessoas. Dos 8,6 milhões de casos de indivíduos infectados com o bacilo da TB, estima-se que de 1,0 a 1,2 milhão sejam pessoas soropositivas para o vírus causador da *AIDS*, o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) e 0,5 milhão sejam crianças (WHO, 2013).

Apesar de a maioria dos casos notificados de TB, no ano de 2012, ter sido registrada em países localizados nos continentes asiático e africano (Figura 1), dados epidemiológicos apontam que, no mundo, 82% dos casos de TB concentram-se em 22 países (WHO, 2013), dos quais o Brasil ocupa a 16ª posição, em número absoluto de casos registrados da doença, e a 22ª colocação, quando considerado o coeficiente de incidência da TB (BRASIL, 2014).

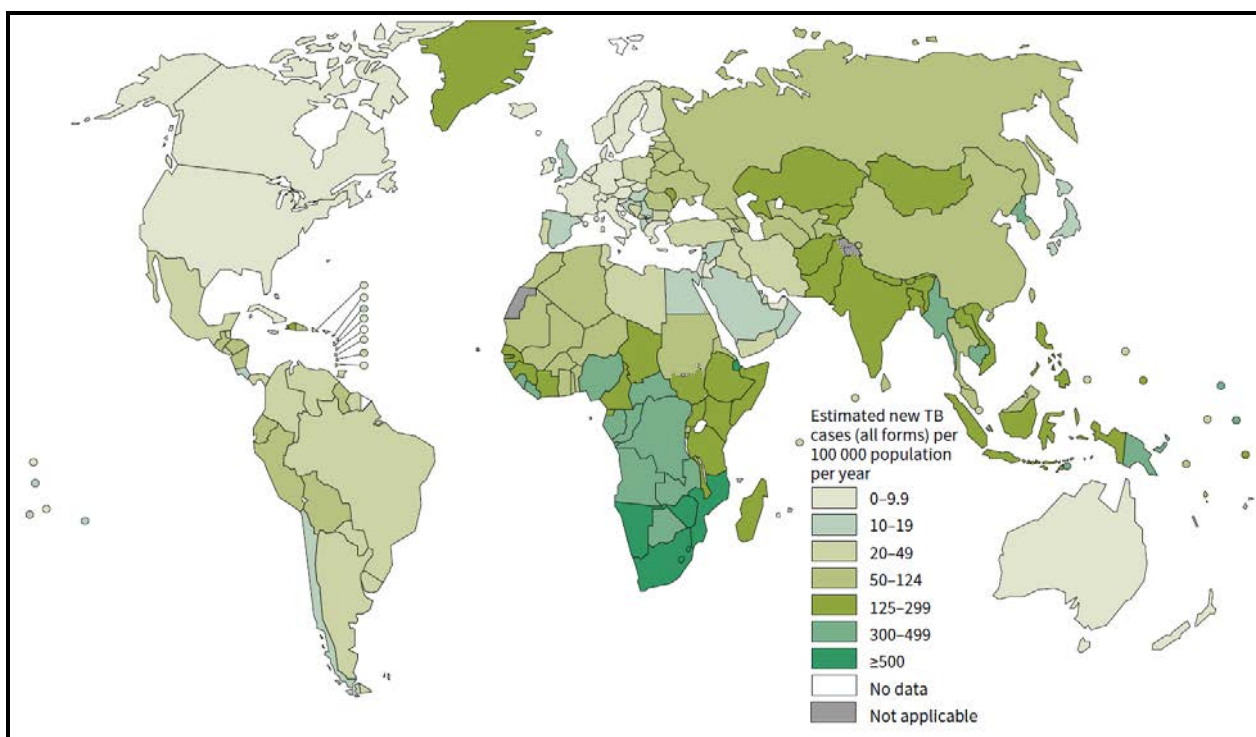


Figura 1. Taxa estimada de casos novos de TB, por 100 mil habitantes, em 2013 (WHO, 2014).

No continente americano, o Brasil e o Peru foram responsáveis por notificar 49% do total de casos da doença (WHO, 2012). Internamente, dos 71.123 casos novos de TB diagnosticados no Brasil, em 2013, com um coeficiente nacional de incidência estimado em 35,4 para cada 100 mil habitantes, verificou-se que a maior parte das notificações proveio dos grandes centros urbanos nacionais, e, de forma heterogênea, de diferentes partes do país, dentre as quais as regiões Norte, Sudeste e Nordeste foram aquelas que apresentaram os mais altos coeficientes de incidência, para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2013).

Já, em termos de Estados da Federação, aqueles com as maiores taxas de incidência da doença foram o Rio de Janeiro (RJ), Pernambuco (PE), o Acre (AC) e o Rio Grande do Sul (RS) (BRASIL, 2014).

No país, a doença tem como fontes predisponentes, em geral, à má alimentação; ao abuso do álcool, do tabaco e de outras drogas; e à deficiência de infraestrutura pública dos espaços urbanos mais periféricos, onde se encontram moradias precárias e redes de abastecimento de água e de esgotamento sanitário inexistentes, situação típica de aglomerados urbanos não atendidos pelo poder público (BRASIL, 2012). Tal contexto social faz com que, no Brasil, a TB seja considerada a quarta causa de morte, por doenças infecciosas, e a primeira *causa mortis*, entre indivíduos portadores de *AIDS* (BRASIL, 2012; BARBOSA; LEVINO, 2013).

De notificação compulsória no país (BRASIL, 2011), os casos de TB comunicados às autoridades de saúde permitiram, dentre as 27 unidades da Federação (26 Estados e o Distrito Federal, DF), fossem classificados, como prioritários para o controle nacional da doença, 290 Municípios brasileiros (BRASIL, 2011; LOPES et al., 2013), os quais passaram a receber subsídios públicos, para o controle da TB.

Em 2011, só no Estado de São Paulo (SP), foram notificados 19.550 casos da doença (SÃO PAULO, 2012), e, dentre essa população de indivíduos com TB, observou-se um número relativamente alto, tanto de pacientes multirresistentes (1.056 casos, no ano de 2007), quanto de pacientes com *HIV* (12%) (MARTINS et al., 2013).

Um dos 17 Departamentos Regionais de Saúde (DRS) em que, na área da Saúde, a Secretaria Estadual de Saúde divide, administrativamente, o Estado, o Departamento Regional de Saúde de São José do Rio Preto corresponde ao da 15ª

Região (DRS XV); compõe-se de dois Grupos de Vigilância Epidemiológica (GVEs), os GVEs 29 e 30, e responde pelo atendimento a 102 municípios da Região de abrangência*. No período em que se realizou este estudo, entre os anos de 2009 e 2013, no âmbito dos GVEs 29 e 30, expediram-se 1.579 notificações de pacientes tratados de TB (Município: 794 sujeitos e Região: 785).

Em relação aos dados epidemiológicos da TB, o principal município que foi objeto de estudo neste trabalho, diagnosticou no ano de 2012, cento e dezenove casos novos de TB e a taxa de co-infecção TB/HIV foi de 13% (SÃO PAULO, 2015). Publicações sobre o tema revelam em 2009, o coeficiente de incidência em São José do Rio Preto foi de 23,1 casos da doença, por 100 mil habitantes, e taxa de coinfeção de TB e AIDS, de 23% — acima das médias estadual e nacional. Ainda com relação ao ano de 2009, para este Município, os dados de desfecho do tratamento da TB mostram que a taxa de cura foi de 77,7%; o abandono do tratamento, de 6,8%, e o óbito, em razão da doença, de 15,5% — abaixo dos parâmetros considerados recomendáveis (SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, 2009; PONCE et al., 2013).

3. Métodos moleculares de diferenciação do *Mt*

Nas últimas décadas, as técnicas de genotipagem das cepas de *Mt* têm possibilitado compreender a estrutura populacional do bacilo, sua dinâmica da

* Na divisão administrativa da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo (SP), é de atribuição do Departamento Regional de Saúde de São José do Rio Preto (DRS XV) o atendimento aos seguintes 102 Municípios, por ordem alfabética: 1) Adolfo, 2) Álvares Florence, 3) Américo de Campos, 4) Aparecida d'Oeste, 5) Ariranha, 6) Aspásia, 7) Bady Bassitt, 8) Bálamo, 9) Cardoso, 10) Catanduva, 11) Catiguá, 12) Cedral, 13) Cosmorama, 14) Dirce Reis, 15) Dolcinópolis, 16) Elisiário, 17) Embaúba, 18) Estrela d'Oeste, 19) Fernandópolis, 20) Fernando Prestes, 21) Floreal, 22) Gastão Vidigal, 23) General Salgado, 24) Guapiaçu, 25) Guarani d'Oeste, 26) Ibirá, 27) Icém, 28) Indiaporã, 29) Ipiruá, 30) Irapuã, 31) Itajobi, 32) Jaci, 33) Jales, 34) José Bonifácio, 35) Macaubal, 36) Macedônia, 37) Magda, 38) Marapoama, 39) Marinópolis, 40) Mendonça, 41) Meridiano, 42) Mesópolis, 43) Mira Estrela, 44) Mirassol, 45) Mirassolândia, 46) Monções, 47) Monte Aprazível, 48) Neves Paulista, 49) Nhandeara, 50) Nipoã, 51) Nova Aliança, 52) Nova Canaã Paulista, 53) Nova Granada, 54) Novais, 55) Novo Horizonte, 56) Onda Verde, 57) Orindiúva, 58) Ouroeste, 59) Palestina, 60) Palmares Paulista, 61) Palmeira d'Oeste, 62) Paraíso, 63) Paranapuã, 64) Parisi, 65) Paulo de Faria, 66) Pedranópolis, 67) Pindorama, 68) Pirangi, 69) Planalto, 70) Poloni, 71) Pontalinda, 72) Pontes Gestal, 73) Populina, 74) Potirendaba, 75) Riolândia, 76) Rubineia, 77) Sales, 78) Santa Adélia, 79) Santa Albertina, 80) Santa Clara d'Oeste, 81) Santa Fé do Sul, 82) Santa Rita do Oeste, 83) Santa Salete, 84) Santana da Ponte Pensa, 85) São Francisco, 86) São João das Duas Pontes, 87) São João de Iracema, 88) São José do Rio Preto, 89) Sebastianópolis do Sul, 90) Tabapuã, 91) Tanabi, 92) Três Fronteiras, 93) Turmalina, 94) Ubarana, 95) Uchoa, 96) União Paulista, 97) Urânia, 98) Urupês, 99) Valentim Gentil, 100) Vitória Brasil, 101) Votuporanga e 102) Zacarias.

transmissão na comunidade, suas variações genéticas, bem como as possíveis relações filogenéticas entre as várias cepas conhecidas do *Mt*. Desse modo, tem sido possível tratar de questões cruciais de Saúde Pública (CHOI et al., 2011; OELEMANN et al., 2011), como a elucidação da história natural de uma epidemia de TB e a identificação dos esforços mais efetivos para o controle da doença (GENCER; SHINNICK, 2005).

Das técnicas de tipagem molecular dos membros do CMt, as mais utilizadas são a de Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (*RFLP*, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorfism*) *IS* 6110 (*RFLP-IS* 6110), a das *Unidades Repetitivas Intercaladas Micobacterianas* (*MIRUs*, do inglês *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) em Repetições em *Tandem* de Número Variável (*VNTRs*, do inglês *Variable Number Tandem Repeats*) (*MIRUs-VNTRs*) e a da “spoligotipagem” (*spoligotyping*) (SUPPLY et al., 2000; MAZARS et al., 2001; SANTOS; KIPNIS; KIPNIS, 2007).

Utilizando um fragmento de inserção *IS* 6110, exclusivo do CMt, Van Embden e colaboradores publicaram, em 1993, um protocolo-padrão, logo aceito internacionalmente, para a tipagem de isolados de *MT* pelo método *RFLP*. O fragmento *IS* 6110 é um transpóson que se repete, várias vezes, no genoma da micobactéria (KREMER et al., 1999), com uma sequência de 1.361 pb, que, entre os diferentes isolados, tem mostrado uma sequência bastante conservada (SANTOS; KIPNIS; KIPNIS, 2007). O método tem, por base, a digestão do *DNA* genômico bacteriano, por enzimas de restrição, as endonucleases, que geram fragmentos de diferentes comprimentos, os quais, por sua vez, são separados em gel de agarose e, a seguir, hibridizados por uma sonda de *DNA* (THIERRY et al., 1990). A diferença na localização e no número de cópias dessa sequência de inserção é o que define o polimorfismo entre os isolados. Na espécie *Mt*, especificamente, o número de cópias dessa sequência de inserção é, com frequência, alto, conferindo à espécie elevado poder discriminatório (DEVALLOIS et al., 1998).

Na década de 90, a metodologia do *RFLP* foi considerada padrão-ouro para a tipificação das cepas de *Mt* (GIBSON et al., 2008) e, desde então, vem sendo adotada, com sucesso, para rastrear a transmissão da TB, em surtos; para confirmar, em

laboratório, a contaminação cruzada; para identificar os fatores de risco da doença, entre populações de pacientes com TB, e, não menos importante, para investigar a dinâmica de transmissão do bacilo, nas mais diversas populações (VAN EMBDEN et al., 1993; SMALL et al., 1994; GENCER; SHINNICK, 2005). Ao mesmo tempo, porém, nos isolados com baixo número de cópias de *IS* 6110 (com número menor do que de seis cópias), essa metodologia apresenta uma diminuição do poder discriminatório e requer não somente um *DNA* com alto grau de pureza e de concentração, como, ainda, um intenso trabalho laboratorial (BEHR et al., 1999), sendo necessária a utilização de outros métodos complementares de genotipagem.

Dessa forma, tem havido uma tendência mundial de substituição dessa técnica, por outras, de execução mais prática e fácil. Para contornar essas limitações associadas ao *RFLP-IS* 6110, desenvolveram-se métodos de tipagem molecular baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). Dentre as propostas de novas metodologias para a tipagem molecular das cepas de *Mt*, estão a técnica de *spoligotyping* e de *MIRUs-VNTRs* (COWAN et al., 2005).

Baseada na amplificação de um único *locus*, por *PCR*, a técnica de tipagem molecular de *spoligotyping* é rápida, de fácil execução e baseada no polimorfismo das regiões de Repetição Direta (*DR*, do inglês *Direct Repeat*), presentes exclusivamente no genoma de micobactérias do CMt (Figura 2). A micobactéria possui uma região cromossômica distinta contendo múltiplas regiões com 36 pb, intercaladas por sequências espaçadoras, diferentes e não repetitivas de *DNA*, de tamanho variável, entre 35 e 41 pb (BRUDEY et al., 2006).

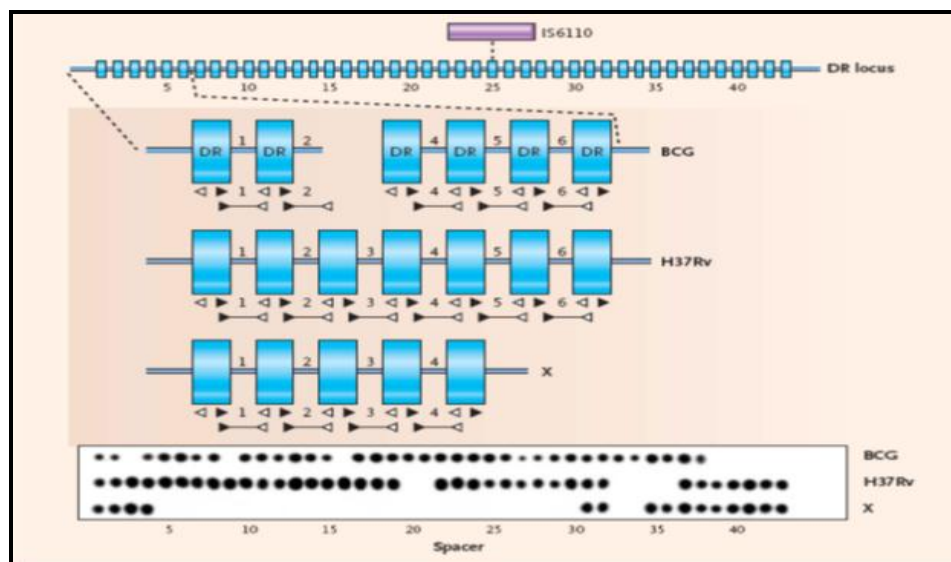


Figura 2. *Spoligotyping* (BARNES; CAVE, 2003). Genotipagem de *M. bovis*-BCG, *M. tuberculosis* H37Rv e isolado X de Mt, utilizando a técnica de *Spoligotyping*, evidenciando nos retângulos as regiões direct repeat (DR) do Mt.

A técnica *Spoligotyping* consiste na detecção desses espaçadores (cerca de 43), na região DR do genoma das cepas de Mt (MATHEMA et al., 2006), espaçadores esses que podem ser representados por um código binário, positivo ou negativo, sendo positivo o código com a presença de espaçador na membrana hibridizada e, negativo, aquele com a ausência de espaçador nessa membrana (MOSTRÖM et al., 2002). Os isolados de Mt de amostras clínicas variam, de acordo com o número de DRs e, ainda, de acordo com a presença ou com a ausência das sequências espaçadoras (KAMERBEEK et al., 1997).

A técnica de *spoligotyping* testa, simultaneamente, até 43 amostras, com base na reação de PCR. Após a PCR, é realizada a hibridização, em uma membrana que contém oligonucleotídeos ligados covalentemente, específicos para cada uma das 43 diferentes sequências espaçadoras (KAMERBEEK et al., 1997).

Utilizada na identificação e na diferenciação dos membros do CMt, essa metodologia de *spoligotyping* pode ser uma alternativa de tipagem de amostras com poucas cópias de IS 6110 e pode ser, também, um método secundário de genotipagem, para *screening* de um grande número de isolados, já que fornece respostas rápidas, na

investigação epidemiológica (KREMER et al., 2005a; KREMER, 2005b; BRUDEY et al., 2006).

Os “espologotipos” comuns a mais de um isolado são designados Perfis Compartilhados (*STs*, do inglês *Shared Types*) e, de acordo com o Banco de Dados Internacional *SITVITWEB*, têm-lhes sido atribuído, individualmente, um número chamado de Perfil Internacional Compartilhado (*SIT*, do inglês *Shared International Type*) (SOLA et al., 2001; DEMAY et al., 2012; INSTITUT PASTEUR DE LA GUADELOUPE, 2015). Os *SITs* são, então, agrupados em famílias e subfamílias.

Tal banco de dados descreve o armazenamento de 7.105 *STs*, representando um total de 62.582 isolados clínicos provenientes de 153 países, agrupados em 2.740 *SITs* e em 4.364 padrões órfãos. O banco torna possível fazer análises e comparações genéticas e epidemiológicas dos diferentes perfis gerados por *spoligotyping* do *CMT* (BRUDEY et al., 2006; MALASPINA, 2009; DEMAY et al., 2012).

Outra proposta de tipagem molecular adotada por vários grupos de pesquisadores é a técnica *MIRU-VNTR* (SUPPLY et al., 2000; SUPPLY et al., 2006; OELEMANN, 2007a; OELEMANN et al., 2011). Na década de 90, Supply et al. (2000) identificaram, no genoma do *Mt*, elementos repetitivos, as *MIRUs*, similares às sequências de minissatélites, descritas no genoma humano.

As regiões de *VNTRs*, no genoma micobacteriano, são compostas por 40 a 100 pb de sequências repetitivas, chamadas *MIRUs*, sendo algumas idênticas e outras ligeiramente variáveis, em sequência e em comprimento, os quais podem ser denominados, de acordo com sua localização no genoma bacteriano (BARNES; CAVE, 2003) (Figura 3).

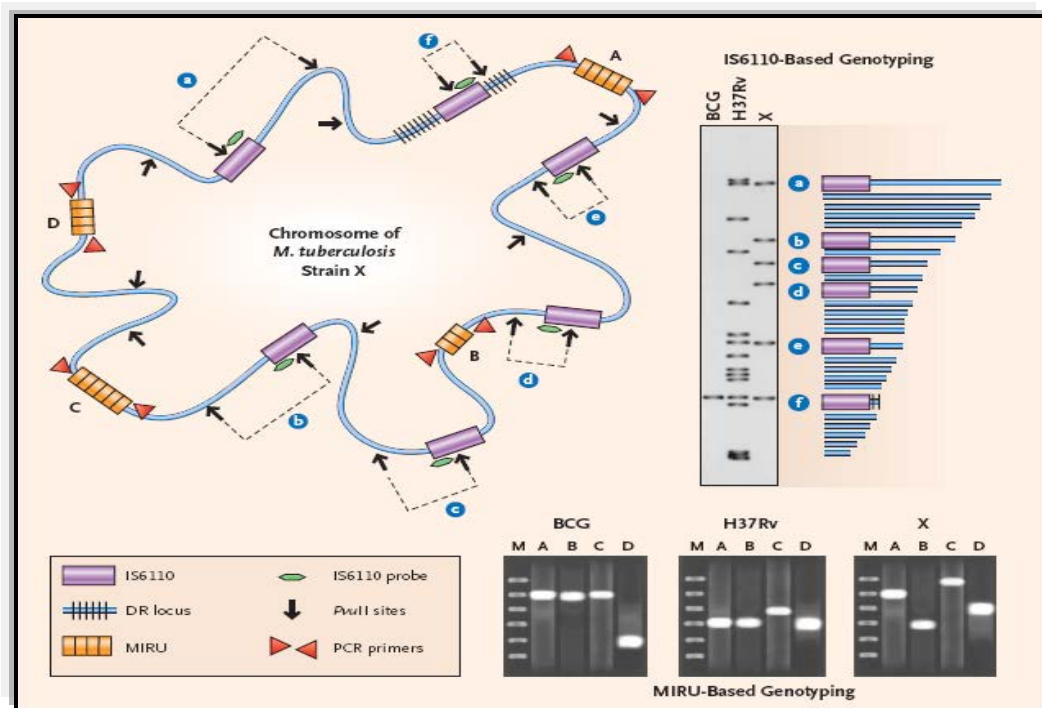


Figura 3. Cromossomo hipotético de um isolado X de *Mt* e genotipagem de *M. bovis*-BCG, *M. tuberculosis* H37Rv e isolados X, utilizando as técnicas de *RFLP-IS* 6110 e *MIRU-VNTR* (BARNES; CAVE, 2003).

Exemplificando, na nomenclatura variável para os *VNTRs*, identificaram-se, pelas letras de A a E, cinco Repetições Exatas *in Tandem* (*ETRs*, do inglês *Exact Tandem Repetitions*) (FROTHINGHAM e MEEKER-O' CONNELL, 1998). Denominado *Queens University of Belfast (QUB)*, nome do local de sua descoberta, esse conjunto de *loci* contém sequências de repetições perfeitas ou quase perfeitas, seguidas de repetições parciais, de diferentes comprimentos: *QUB* 11a, *QUB* 11b, *QUB* 26, *QUB* 1895, *QUB* 3336, *QUB* 3232, *QUB* 18, *QUB* 5 e *QUB* 4156 (SUPPLY et al., 2006).

Com base em seu comprimento, sequência nucleotídica e organização, as *MIRUs* são classificados, ainda, em três tipos principais, os tipos I, II e III. As sequências do tipo I contêm aproximadamente 77 pb; já as *MIRUs* dos tipos II e III apresentam um intervalo (*gap*) de 24 pb e de 15 pb, nas extremidades 3' e 5' das sequências do tipo I, respectivamente. Já as *MIRUs* mistas do tipo III e II, que contêm ambos os tipos de intervalos, foram encontradas, por exemplo, nos *loci* 8 e 20 (SUPPLY et al., 1997).

Nessa técnica, primeiramente é realizada *PCR*, utilizando-se, para tanto, de diferentes pares de iniciadores (um para cada uma das 12 *MIRUs-VNTRs*), para a

determinação do número de repetições em cada *locus*. Depois, por eletroforese em gel de agarose, é determinado o tamanho do amplificado (com o peso molecular estabelecido em pb), e são comparados os achados, com marcadores de tamanho molecular, para que, então, possa-se deduzir o número presente de repetições em sequência, de cada *locus*. Para a interpretação dos resultados, utiliza-se tabela de alelos que relaciona o peso molecular obtido, com o número de alelos repetidos em cada *locus*. O resultado final das *MIRUs-VNTRs* é um código numérico, que corresponde ao número de repetições do *locus* alvo e que serve como uma impressão digital do respectivo isolado (BEER et al., 2012). O Banco de Dados Internacional *SITVITWEB*, citado anteriormente, armazena um total de 2.379 perfis de *MIRUs* de isolados clínicos, de 87 países de origem dos pacientes (DEMAY et al., 2012).

Inicialmente, esse método teve, por base, a amplificação, pela *PCR*, de um sistema com 12 *loci* (*MIRUs* 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40) dos 41 *loci* identificados no genoma do *Mt*, com condições de amplificação específicas de cada *locus* descritas por Mazars et al., em 2001. Após estudos, em 2006, Supply et al. fizeram a proposta de utilização de 24 *loci*, como ferramenta de alta resolução, em estudos filogenéticos. As *MIRUs* propostas incluem os 12 sistemas já descritos e os recém-inseridos *Mtub* 04, *ETRC*, *ETRA*, *Mtub* 30, *Mtub* 39, *QUB* 4156, *QUB* 11b, *Mtub*21, *QUB* 26, *Mtub* 29, *ETRB*, *Mtub*34 (SUPPLY et al., 2000; COWAN et al., 2005; SUPPLY et al., 2006; OELEMANN et al., 2007a). Alguns autores relatam que, na discriminação de isolados de *Mt*, em relação ao conjunto dos 12 *loci* originalmente sugeridos, o sistema com 24 *loci* demonstrou maior confiabilidade, com resultados altamente reprodutíveis e fáceis de serem trocados entre laboratórios (NOGUTI et al., 2010; PEREIRA et al., 2013). Já segundo outros estudos, o sistema de 15 *loci* vem apresentando um maior poder de discriminação, entre os isolados de *Mt*, o que tem levado a concluir que esse tipo de estratégia pode ser útil, na genotipagem do bacilo (ALONSO-RODRIGUES et al., 2008; LIU et al., 2014).

Nos Estados Unidos da América (EUA), as duas técnicas, de *spoligotyping* e de *MIRU-VNTR*, foram colocadas como metodologias de primeira linha, na discriminação de isolados clínicos em larga escala, consistindo, assim, em poderosas ferramentas de

estudo da epidemiologia, da filogenia e da adaptabilidade dos bacilos da tuberculose, de acordo com o seu genótipo (KAMERBEEK et al., 1997; SUPPLY et al., 2006).

Assim sendo, por se tratar de técnicas rápidas, fáceis de executar e pouco onerosas, a utilização, em pesquisa epidemiológica e filogenética, de técnicas moleculares, individualmente e, sobretudo, associadas, constitui ferramenta primordial, para traçar perfis exclusivos das linhagens das cepas, quanto à sua identidade e às características, e, até mesmo, para aprofundar o conhecimento de informações, como seu local de origem e sua virulência, e é essencial, para controlar as transmissões da TB.

4. Aplicação das técnicas de genotipagem em estudos populacionais

A possibilidade de aplicar técnicas de biologia molecular em estudos epidemiológicos somados aos de epidemiologia clássica, tem trazido contribuições significativas para o entendimento das relações entre os microorganismos e as doenças infecciosas.

As técnicas moleculares ajudam a estratificar e a refinar os dados, fornecendo não só um melhor entendimento da patogênese da doença em nível molecular, mas também, medições mais sensíveis e específicas, que facilitam as atividades epidemiológicas, incluindo a vigilância das doenças, a investigação de surtos, a identificação da transmissão de padrões e de fatores de risco entre casos aparentemente díspares, a caracterização da interação patógeno-hospedeiro (FOXMAN; RILEY, 2001).

O uso de métodos moleculares, principalmente aqueles baseados em reações da *PCR*, tem proporcionado grande impulso nos estudos da epidemiologia molecular do *Mt*. Além disso, mostram que a técnica de *MIRU-VNTR* tem poder discriminatório similar ao da técnica *RFLP-IS 6110* e que tal poder discriminatório pode ser aumentado, se combinada a aplicação da técnica da *MIRU-VNTR* com aquela do *spoligotyping* (KREMER et al., 2005a; MATHEMA et al., 2006; ALLIX-BÉGUEC; FAUVILLE-DUFAUX; SUPPLY, 2008).

Embora, com relação à sua sequência de *DNA* o *CMt* seja relativamente homogêneo, o aumento do número de espécies e de linhagens genéticas específicas revelou variações de elementos genéticos repetitivos móveis, as quais têm sido

exploradas, como marcadores, para fins de epidemiologia ou de identificação de estirpes, em nível de espécie (LAZZARINI et al., 2007).

Estudos epidemiológicos também têm apontado que a distribuição genotípica do CMt é altamente estruturada quanto às áreas geográficas particulares de ocorrência e quanto à população humana e à etnia passíveis de serem afetadas, o que permitiu dividir o CMt, em seis grandes linhagens filogeográficas mundiais, cujo nome reflete essa associação geográfica: primeiramente, a linhagem Indo-Oceânica (EAI); depois, a linhagem do Leste Asiático, incluindo a chamada Pequim (W/Beijing); a seguir, a linhagem Leste Africano-Indiana (CAS); em quarto lugar, a linhagem Euro-Americana; depois, a linhagem da África Ocidental ou *Mycobacterium africanum* I, e, finalmente, a linhagem da África Ocidental ou *Mycobacterium africanum* II (GAGNEUX et al., 2006; DOU et al., 2008; DOU; HUANG; SU 2011; COLL et al., 2014).

Os padrões de *spoligo*typing permitem o agrupamento das diferentes cepas de *Mt*, em famílias (subespécies) epidemiologicamente importantes (MOSTRÖM et al., 2002). Uma das principais famílias é a família Latino-Americana e Mediterrânea (LAM), que pertence à linhagem Euro-Americana e que é dividida em subfamílias de LAM1 a LAM10 (MENDES, 2010) e, também, em famílias menores, S, T e X (Figura 4), sendo a mais heterogênea das seis linhagens (GAGNEUX et al., 2006). A família dominante no Brasil e na América têm sido a Euro-Americana (OELEMANN et al., 2011; PITONDO-SILVA et al., 2013; SANTOS et al., 2013) e as linhagens T e H (MALASPINA, 2009; NOGUTI, 2010; VON GROLL et al., 2010).

Algumas das principais famílias de *Mt* foram caracterizadas por perfis “spoligotípicos”, da seguinte forma: Beijing, ausência de espaçadores de 1 a 34; EAI, ausência de espaçadores de 29 a 32 e 34, e presença de, pelo menos, um espaçador de 1 a 30; Haarlem, ausência de espaçadores 31 e de 33 a 36, e presença de, pelo menos, um espaçador de 1 a 30; LAM, ausência de espaçadores de 21 a 24 e de 33 a 36, e presença de, pelo menos, um espaçador de 1 a 30; X, ausência de espaçadores 18 e de 33 a 36; T, ausência de espaçadores de 33 a 36, e presença de, pelo menos, um espaçador de 1 a 30 e de separadores 9 ou 10, e 31, e presença de, pelo menos, um espaçador de 21 a 24 (FERDINAND et al., 2004).

Uma das linhagens mais conhecidas e estudadas da espécie de *Mt* são as cepas da linhagem *W/Beijing*, pertencentes à família Leste-Asiática, que, se comparadas às outras famílias, dentro de certos espaços geográficos, apresentam características específicas, como a capacidade de causar a TB, a facilidade de transmiti-la e a resistência a múltiplas drogas (REED et al., 2009). O *spoligotyping* é, atualmente, o método padrão-ouro, para a identificação e a classificação de cepas Beijing (SUN et al., 2008).

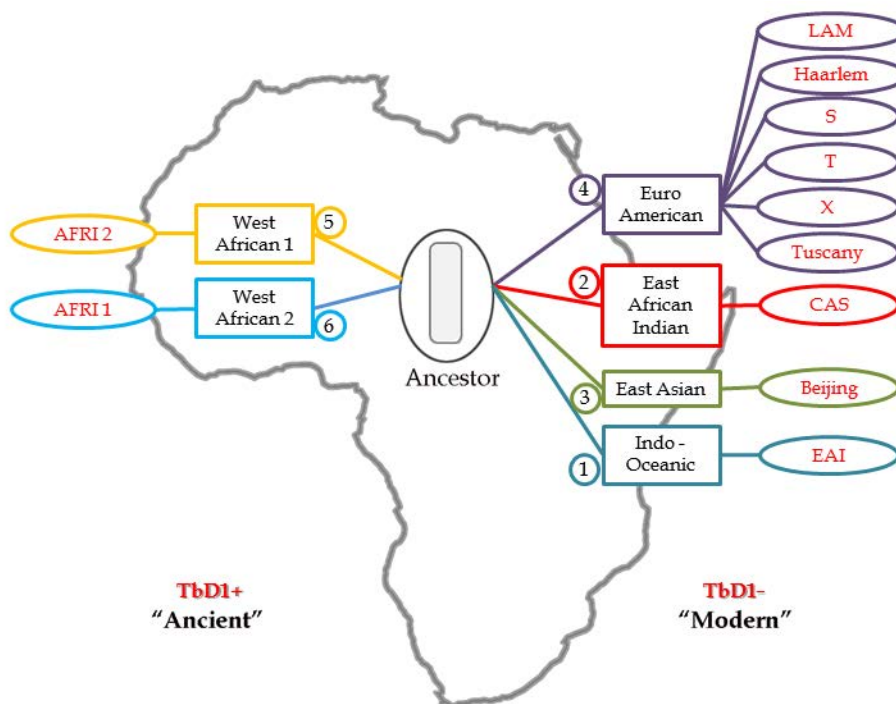


Figura 4. Representação esquemática das seis principais linhagens de *Mt* e respectivas famílias, com quadros indicando linhagens e círculos, famílias *spoligotypes* (ZAMBRANO et al., 2012).

II. JUSTIFICATIVA

O presente estudo foi idealizado, com a finalidade de caracterizar e de compreender a estrutura populacional dos isolados de *Mt*, na Região Noroeste do Estado de São Paulo (SP), já que se sabe que estudos de marcadores genéticos têm contribuído para o entendimento da dinâmica da doença, quanto à sua epidemiologia, transmissão e história natural.

Situado na Região Noroeste paulista e distante cerca de 450 km da capital estadual, o Município de São José do Rio Preto, que tem, por coordenadas geográficas, 20° 49'11'' na latitude sul e 49° 22'46'' na longitude oeste (SÃO JOSÉ RIO PRETO, 2013), apresenta uma população de 408.258 habitantes, de acordo com o censo populacional de 2010, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2010; população estimada 2014: 415.769 hab. <http://www.cve.saude.sp.gov.br/indicador.htm>). A cidade de São José do Rio Preto, de médio porte (população entre 100 mil e 500 mil habitantes), é sede não só do Município, como, ainda, da 8ª Região Administrativa do Estado (que, por sua vez, subdivide-se em 96 municípios)** e, também, do DRS XV (abrangendo 102 Municípios). É considerada uma cidade que é tida como centro de referência na prestação de serviços da área da Saúde, atendendo não só a todos os 102 Municípios abrangidos pela DRS XV, bem como, aos Municípios integrantes de Estados da Federação,

** Na divisão administrativa do Estado de São Paulo, por região administrativa, São José do Rio Preto sedia a 8ª Região Administrativa, formada pelos seguintes 96 Municípios, por ordem alfabética: 1) Adolfo, 2) Álvares Florence, 3) Américo de Campos, 4) Aparecida d'Oeste, 5) Aspásia, 6) Ariranha, 7) Bady Bassitt, 8) Bálsamo, 9) Cardoso, 10) Catanduva, 11) Catiguá, 12) Cedral, 13) Cosmorama, 14) Dirce Reis, 15) Dolcinópolis, 16) Elisiário, 17) Estrela d'Oeste, 18) Fernandópolis, 19) Floreal, 20) Guapiaçu, 21) Guaraci d'Oeste, 22) Ibirá, 23) Icém, 24) Indiaporã, 25) Ipiruá, 26) Irapuã, 27) Itajobi, 28) Jaci, 29) Jales, 30) José Bonifácio, 31) Macauba, 32) Macedônia, 33) Magda, 34) Marapoama, 35) Marinópolis, 36) Mendonça, 37) Meridiano, 38) Mesópolis, 39) Mira Estrela, 40) Mirassol, 41) Mirassolândia, 42) Monções, 43) Monte Aprazível, 44) Neves Paulista, 45) Nhandeara, 46) Nipoã, 47) Nova Aliança, 48) Nova Canaã Paulista, 49) Nova Granada, 50) Novais, 51) Novo Horizonte, 52) Onda Verde, 53) Orindiúva, 54) Ouroeste, 55) Palestina, 56) Palmares Paulista, 57) Palmeira d'Oeste, 58) Paulo de Faria, 59) Paraíso, 60) Paranapuã, 61) Parisi, 62) Planalto, 63) Pedranópolis, 64) Pindorama, 65) Poloni, 66) Pontalinda, 67) Pontes Gestal, 68) Populina, 69) Potirendaba, 70) Riolândia, 71) Rubineia, 72) Sales, 73) Santa Adélia, 74) Santa Albertina, 75) Santa Clara do Oeste, 76) Santa Fé do Sul, 77) Santa Rita d'Oeste, 78) Santa Salete, 79) Santana da Ponte Preta, 80) São Francisco, 81) João das Duas Pontes, 82) São José do Rio Preto, 83) Sebastianópolis do Sul, 84) Tabapuã, 85) Tanabi, 86) Três Fronteiras, 87) Turmalina, 88) Ubarana, 89) Uchoa, 90) União Paulista, 91) Urânia, 92) Urupês, 93) Valentim Gentil, 94) Vitória Brasil, 95) Votuporanga, 96) Zacarias.

limítrofes ao de SP, quais sejam, os Estados de Minas Gerais (MG), de Goiás (GO) e do Mato Grosso do Sul (MS). No cenário nacional, a cidade é tida, ainda, como prioritária no Programa de Controle da Tuberculose, por causa da alta taxa de pacientes com TB e, também, com exame sorológico positivo para o *HIV* (SÃO PAULO, 2008; VENDRAMINI et al., 2010).

O presente estudo — que é pioneiro nessa região do país — é de interesse da Saúde Pública, pois, a partir da caracterização da diversidade genética dos isolados de *Mt*, permite traçar o perfil das cepas circulantes, com a possibilidade de, por similaridade genética, agrupar as cepas de *Mt* isoladas dos pacientes, avaliando, assim, não só a presença ou a ausência de cepas predominantes, como, também, a resistência dessas cepas aos fármacos.

Dessa forma, pretende-se que este estudo possa permitir um melhor entendimento da TB, com possíveis casos relacionados e com a identificação dos vínculos de transmissão da doença, para fomentar respostas rápidas aos programas de controle em todas as instâncias governamentais para que se possa estabelecer estratégias e ações de controle nos programas de vigilância epidemiológica.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Caracterizar a diversidade genética de isolados de *Mt* na Região Noroeste Paulista, utilizando as técnicas moleculares *spoligotipying* e *MIRUs-VNTRs*.

Objetivos específicos

- Agrupar, por similaridade genética, os isolados de *Mt*, com a finalidade de identificar focos de transmissão da doença.
- Avaliar a presença de perfis genéticos de *Mt* predominantes na Região Noroeste paulista.
- Descrever os aspectos sociodemográficos e clínico-epidemiológicos entre os pacientes estudados.
- Verificar o *status* da resposta antimicrobiana de *Mt* aos fármacos que compõem a poliquimioterapia antituberculose.

Artigo 1: Revisão (submetido à Revista Hansenologia Internationalis e outras doenças infecciosas)

Panorama atual da tuberculose

Current status of tuberculosis

Heloisa da Silveira Paro Pedro^{1,2}; Susilene Maria Tonelli Nardi¹; Amanda Juliane Finardi^{3,4}; Eloise Brasil de Moraes^{3,4}; Rosângela Siqueira Oliveira⁵; Maria Izabel Ferreira Pereira¹; Ricardo Luiz Dantas Machado^{2,7}; Lilian Castiglioni^{2,8,9}

1- Núcleo de Ciências Biomédicas - Instituto Adolfo Lutz – IAL, Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

2- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP – Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

3- Divisão de Pesquisa e Ensino - Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru, São Paulo, Brasil

4- Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP – Campus de Botucatu-SP. Faculdade de Medicina de Botucatu- Departamento de Doenças Tropicais

5- Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses - Instituto Adolfo Lutz Central – IAL, São Paulo, Brasil

6- Departamento de Parasitologia - Instituto Evandro Chagas/Serviço de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Belém, Pará, Brasil

7- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São Paulo, Brasil

8- Centro Universitário de São José do Rio Preto - UNIRP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

Resumo

Mesmo após 133 anos desde a descoberta do *Mycobacterium tuberculosis*, a tuberculose continua ser uma das principais causas de morte por doenças infecciosas no mundo, principalmente em países em desenvolvimento. O objetivo deste estudo foi mostrar aspectos relevantes da doença visando uma atualização literária e a busca de um olhar mais atento à problemática da tuberculose no cenário atual. Foram utilizados 133 artigos advindos das bases *LILACS*, *MEDLINE/PUBMED*, *SCielo*, *Paho*, Biblioteca Cochrane, *WHOLIS*, *IBECs* e *Scopus*, com as principais palavras-chaves selecionadas em terminologia em saúde encontradas no DECS. As espécies pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* compartilham cerca de 99% de identidade do DNA, com sequências altamente conservadas, mas diferem na distribuição geográfica, patogenicidade e hospedeiros. O mecanismo de resistência clinicamente significativo para rifampicina é uma mutação do gene *rpoB*, que codifica o alvo desse antibiótico. Há grandes avanços no diagnóstico da TB, com novos instrumentos de biologia molecular e testes rápidos, mas ainda não substituem os métodos clássicos bacteriológicos, apesar de suas conhecidas limitações. Atualmente, a associação de métodos moleculares, principalmente aqueles baseados em reações da PCR tem proporcionado grande impulso nos estudos da epidemiologia molecular do MT. Embora haja uma diminuição do número de casos no mundo, dentre os desafios da doença estão a necessidade de pesquisas na área, envolvimento político para solucionar as questões sociais atribuídas à TB, treinamento permanente dos profissionais e monitoramento de vigilância dos casos para eliminar a doença no cenário mundial.

Palavras-chave: tuberculose pulmonar, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, técnicas de laboratório clínico, biologia molecular.

Abstract

Even 133 years after the discovery of *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis continues to be one of the main causes of death due to infectious diseases worldwide, especially in developing countries. The objective of this study was, after a survey of recent publications, to show issues relevant to the disease and to take a closer look at the tuberculosis problem in the current scenario. A total of 133 articles were found in the

LILACS, MEDLINE/PubMed, SciELO, Paho, Cochrane Library, WHOLIS, IBECs and Scopus databases using the main keywords selected from health terminology of MeSH. Species belonging to the *M. tuberculosis* complex have highly conserved sequences and share about 99% DNA identity, but differ in their geographic distribution, pathogenicity and host. The clinically significant mechanism of rifampicin resistance is due to a mutation of the *rpoB* gene which encodes the target of the antibiotic. Great advances in the diagnosis of tuberculosis have occurred, with new molecular biology tools and rapid tests, but without replacing classical bacteriological methods, despite their known limitations. Recently, the association of molecular methods, especially based on PCR, has provided great impetus in molecular epidemiology studies of *M. tuberculosis*. Although the number of cases in the world has decreased, among the challenges are the need for further research, political involvement to solve social issues linked to tuberculosis, permanent training and the surveillance of cases in order to eliminate the disease on the world stage.

Keywords: pulmonary tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, clinical laboratory techniques, molecular biology

Introdução

Doença bacteriana crônica, infectocontagiosa e de distribuição universal prevalente, a tuberculose (TB) exige, para o seu controle no mundo, o desenvolvimento de estratégias sob os aspectos humanitários, econômicos e de Saúde Pública¹.

São fatores limitantes desse controle a ausência de um teste diagnóstico de baixo custo, a longa duração do tratamento, a falta de uma vacina efetiva e o surgimento, em países de poucos recursos econômicos da TB resistente^{2,3}. Como responsáveis pela doença, apontam-se, ainda, os fatores ambientais, os fatores sociais, os componentes genéticos dos indivíduos⁴⁻⁶, a imunidade e doenças associadas³.

No final dos anos 70 do século XX, em razão da constatação de dados epidemiológicos favoráveis relativos à TB, a Organização Mundial da Saúde (OMS) começava a preparar, para a erradicação da doença, um programa a ser implementado

na década seguinte⁷. Entretanto, no início dos anos 80, a então recém-descrita Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*), causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus, HIV*), modificou a história natural da TB, reconduzindo esta doença ao *status* de ameaça à Saúde Pública, mesmo em países desenvolvidos^{8,9}. Ainda, segundo a OMS³, as maiores taxas de coinfeção de TB e de *AIDS* (TB/*HIV*) aparecem no continente africano (44%) e, em seguida, no americano (17%). A infecção com HIV aumenta consideravelmente o risco de progressão para a TB sendo a principal causa de morte entre pessoas com HIV^{1,10}.

A transmissão da TB é maior em locais de grande contingente de população como em grandes centros urbanos e em populações de instituições fechadas como asilos e presídios, onde há também populações vulneráveis. Tratar as pessoas privadas de liberdade, refugiados, pessoas vivendo em situação de rua e outras populações mais vulneráveis é um dos pilares da estratégia *Stop-TB* da Organização Mundial de Saúde (*Global Plan to Stop TB – 2006-2015*), que visa otimizar o alcance das metas globais para eliminação da doença¹¹⁻¹³.

As estratégias dos planos de eliminação da doença e dos programas de cooperação internacional têm contribuído, ainda, para a capacitação de recursos humanos e para o fortalecimento de instituições dos países participantes, pela transferência de conhecimentos e de equipamentos e, também, pela busca de uma melhor qualidade com as boas práticas laboratoriais e dos serviços¹². Instituições como a *Foundation for Innovative New Diagnostics* (FIND), *Stop TB Partnership's World Health Organization* (WHO), *Bill & Melinda Gates Foundation* dentre outras, têm contribuído para o desenvolvimento e otimização de métodos diagnósticos da TB em países de recursos limitados¹⁴.

A existência da TB foi registrada em esqueletos de múmias do Antigo Egito e em esqueleto de uma múmia pré-colombiana no Peru^{15,16}. Estudo recente avança que a história da TB teria sido traçada por evidências de restos humanos derivados de sítios arqueológicos no mundo todo, com possível origem no norte da Europa, há quase oito mil anos¹⁷.

O agente etiológico causador da TB, o *Mycobacterium tuberculosis* (MT) foi identificado em 1882, pelo pesquisador e bacteriologista alemão Robert Koch (1843-1910), sendo esta descoberta um marco fundamental do conhecimento da doença¹⁸. Surpreende o fato de que, mesmo após 133 anos de pesquisas, desde então, a doença continue a ser uma ameaça, principalmente em países em desenvolvimento^{16,19} e uma das principais causas de morte por doenças infecciosas no mundo.

A TB faz parte do rol das doenças negligenciadas, um grupo de afecções transmissíveis, cujo tratamento é inexistente, precário ou desatualizado^{20,21}.

Diante destes fatores, há necessidade de investimentos em conhecimentos e em pesquisas para acelerar o progresso da eliminação da TB¹. Nesse sentido, esta revisão de artigos científicos publicados sobre aspectos relevantes da doença tem, por objetivo, apontar algumas nuances da doença visando uma atualização literária e a busca de um olhar mais atento à problemática da tuberculose no cenário atual.

Material e método:

A busca pela literatura deu-se por meio da realização de pesquisa exploratória bibliográfica, na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), e a pesquisa das palavras-chave incluiu artigos integrantes das bases de dados da Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), do Sistema *Online* de Pesquisa e de Análise da Literatura Médica (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online, MEDLINE/PubMed*), Biblioteca Eletrônica e Científica *Online* (*Scientific Electronic Library Online, SciELO*), Organização Pan-Americana da Saúde (*Pan American Health Organization, PAHO*), Biblioteca Cochrane, Sistema de Informação da Biblioteca da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization Library Information System, WHOLIS*), Índice Bibliográfico Espanhol de Ciências da Saúde (*IBECS*), e Elsevier *Scopus*. O conjunto das fontes pesquisadas integra artigos científicos, publicados em revistas nacionais e internacionais.

Partindo-se da terminologia em Saúde, encontrada nos Descritos em Ciências da Saúde (DECs), selecionaram-se as principais palavras-chave, que foram pesquisadas de forma associada ou não, empregando-se, quando necessário, os boleadores AND, OR e \$, nas palavras-chave seguintes: TB pulmonar, *Mycobacterium*

tuberculosis, diagnóstico, Técnicas de Laboratório Clínico, transmissão, quimioterapia combinada, meios de cultura, resistência a medicamentos; Biologia Molecular.

Para ampliar a busca nos sítios eletrônicos oficiais de universidades, de bancos de dissertações de mestrado e de teses de doutorado, no *Scholar Google* e em órgãos governamentais, foram ainda utilizados os termos seguintes: *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number (MIRU-VNTR)* e *Spoligotyping*.

A busca resultou na inclusão de 133 estudos com cerne na problemática da TB, incluindo publicações originais, portarias, manuais, teses e demais investigações baseadas em evidências científicas e/ou de caráter investigativo epidemiológico-operacional, nas línguas portuguesa, espanhola e inglesa. Livros, manuais, artigos e outros documentos impressos fizeram parte da metodologia, com o propósito de sustentar teoricamente esta revisão, sendo a referência científica mais antiga a de 1985, e as mais atuais, as de 2015. Com vistas a conferir um caráter mais didático ao texto, optou-se por dividi-lo nos tópicos seguintes, que abordam os aspectos gerais da TB: epidemiologia; etiologia; transmissão, sintomatologia e prevenção; tratamento e resistência; aspectos socioeconômicos; diagnóstico laboratorial e uso de técnicas de Biologia Molecular para o estudo de perfil molecular.

Aspectos gerais da tuberculose

1. Epidemiologia

No ano de 2012, cerca de 8,6 milhões de pessoas desenvolveram TB, e 1,3 milhões delas morreram da doença, incluindo 320 mil mortes entre os pacientes coinfetados com TB e com o *HIV*¹.

A maioria dos casos de TB ocorridos em 2012 está em países localizados na Ásia (58%) e na África (27%); menores proporções de casos ocorreram na região leste do Mediterrâneo (8%), na Europa (4%) e nas Américas (3%). Índia, China, África do Sul, Indonésia e Paquistão ocupam, respectivamente, as primeiras posições em países com os maiores em números de casos da doença¹. No entanto, dados epidemiológicos mostram que 82% dos casos de TB do mundo estão concentrados em 22 países do globo (por ordem alfabética): Afeganistão, África do Sul, Bangladesh, Brasil, Camboja,

China, Etiópia, Filipinas, Índia, Indonésia, Quênia, Moçambique, Mianmar, Nigéria, Paquistão, República Democrática do Congo, República Unida da Tanzânia, Rússia, Tailândia, Uganda, Vietnã e Zimbábue¹. A última avaliação dos 22 países com alta carga sugere que as taxas de incidência estão caindo na maioria deles²². Em número absoluto de casos, o Brasil ocupa a 16ª posição, mas cai para a 22ª posição, se for considerado o coeficiente de incidência¹⁰.

Nas Américas, o Brasil e o Peru notificaram 49% do total de casos do continente ²³. Nesse contexto, o Brasil diagnosticou 71.123 casos novos de TB em 2013, perfazendo um coeficiente de incidência de 35,4/100 mil habitantes. Em sua maioria, tais casos ocorrem nos grandes centros urbanos brasileiros e de forma heterogênea nas diferentes unidades da federação¹⁰, que somam 27 divisões do território, entre Estados e Distrito Federal. Comparados os anos de 2003 e de 2013, o país apresentou, em dez anos, uma redução de 20,4% nas ocorrências. Apesar da queda significativa de casos de TB no intervalo de uma década e apesar dos esforços empregados para o controle da TB pulmonar no Brasil, persiste como preocupante o número de casos da doença no País, seja considerado como um todo ou, apenas por regiões. Quando analisadas as regiões brasileiras, para o ano-base de 2013, verifica-se que as Regiões Norte, Sudeste e Nordeste, apresentam os mais altos coeficientes de incidência por 100 mil habitantes¹⁰.

No Brasil, a doença afeta, principalmente, as periferias ou aglomerados urbanos e, geralmente, mostra-se associada às más condições de moradia e de alimentação, à falta de saneamento básico, ao abuso do álcool, tabaco e de outras drogas²³. A TB tem sido considerada como a quarta causa de morte por doença infecciosa no País, sendo a maior causa em indivíduos portadores de *AIDS*^{23,24}. No Brasil, de conformidade com os dados fornecidos pelo MS¹⁰, os moradores de rua do país representam a população mais vulnerável à TB, com um risco de contraírem a infecção da ordem de 44 vezes maior que a população em geral, seguidos das pessoas com *HIV/AIDS*, que têm risco 35 vezes maior, em seguida, está a população carcerária, com risco 28 vezes maior, e, por fim, a população indígena, com risco três vezes maior.

São duzentos e noventa os municípios considerados prioritários para o controle da TB, dentre os 5.565 Municípios atualmente existentes no País^{16,25}, e a doença está

entre as doenças de notificação compulsória da Portaria do Ministério da Saúde (MS) de número (nº) 104, datada de 25 de janeiro de 2011¹⁶. É fundamental que a informação seja introduzida com qualidade nos sistemas de vigilância, para que possam ser identificados os grupos populacionais que necessitem de ações de intervenção²⁶.

O Estado de São Paulo notificou 19.550 casos em 2011²⁷, e necessita de atenção devido ao alto número de pacientes multiresistentes (1.056 casos, em 2007) e alta prevalência de HIV (12%) em pacientes com TB²⁸.

2. Etiologia

O *MT* é uma bactéria aeróbia estrita, em forma de bacilo, álcool-ácido-resistente (BAAR), imóvel, medindo de 0,2 a 0,6 µm de diâmetro por 1,0 a 4,0 µm de comprimento, que não possui cápsula, nem esporos e que não produz toxinas^{29,2}.

Muitas características do bacilo da TB, como a álcool-ácido resistência, a resistência aos fármacos, a patogenicidade e a taxa de crescimento lento, estão relacionadas à estrutura lipídica complexa da parede celular. A parede é formada, em sua porção externa, por ácidos micólicos, que formam uma camada cérea, resistente à água, o que torna o bacilo capaz de sobreviver a situações adversas, como o ressecamento e a administração de algumas drogas antimicrobianas^{30,31}. A coloração mais comum utilizada é a de *Ziehl-Neelsen (ZN)*³². Uma característica importante é o agrupamento dos bacilos, de modo a formarem ramos alongados e tortuosos, conhecidos como cordas, devido à presença de ésteres de trealose-dimicolato 6,6' trealose³³.

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMt) é constituído pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinipedii*, que compartilham cerca de 99% da identidade do *DNA*, apresentando sequências altamente conservadas, mas diferem na distribuição geográfica, na patogenicidade e nos hospedeiros^{34,35}. Em estudos recentes, outras espécies têm sido atribuídas ao CMt: *M. mungi*; *M. orygis*; *M. chimpanzee*^{36,37}.

O genoma é circular e apresenta teor de guanina e de citosina da ordem de 65,6%³⁰, seu tamanho variando, de espécie para espécie, de 4 a 7 milhões de pares de

bases (pb)³⁸, sendo que a cepa de referência *MT* H37Rv - ATCC 27294 apresenta 4.411.529 pb.

Também é característico do genoma ser rico em Elementos de Inserção (IS) e em sequências repetidas, podendo o Complexo *M. tuberculosis* (CMT) ser diferenciado, das outras micobactérias, pela presença das sequências genéticas IS6110³³.

3. Transmissão, sintomatologia e prevenção

A TB pulmonar é transmitida no contato interpessoal: a inalação de aerossóis expelidos por indivíduos bacilíferos constitui a principal fonte de infecção, principalmente durante a tosse, a fala ou o espirro, que os liberam no ar, sob a forma de gotículas infectantes¹⁶.

A principal forma clínica da TB é caracterizada pelo comprometimento pulmonar, acometendo de 80 a 85% dos casos^{16,39} uma vez que o *MT* tem predileção pelos pulmões e é a principal forma de transmissão e manutenção da cadeia de transmissão⁴⁰.

Mesmo sendo a TB uma doença contagiosa, para o bacilo não é fácil encontrar condições favoráveis, intrínsecas ao hospedeiro ou ao ambiente, que lhe possibilitem invadir o organismo e estabelecer a doença, de forma ativa⁴¹.

Na maioria dos casos (95%), o sistema imunitário do hospedeiro competente controla a infecção primária, formando o granuloma caseoso, o qual não só contém o bacilo, mas controla, ainda, sua proliferação. O *MT* é considerado, no entanto, como um agente patogênico hábil na criação e na manutenção de um estado de latência que incluiu a opção de recuperação no futuro^{42,43}. Fatores que influenciam na habilidade inicial de o *MT* replicar-se ou, alternativamente, de estabelecer infecção persistente, para possível reativação, ainda são desconhecidos⁴⁴.

Os sintomas clássicos da TB pulmonar são: tosse persistente, produtiva ou não, com muco e, eventualmente, com sangue; febre vespertina; sudorese noturna; perda de apetite e emagrecimento^{2,16}. Já a TB extrapulmonar pode afetar qualquer órgão do organismo humano, apresentando manifestações clínicas multiformes, dependendo da origem étnica, da idade, da presença ou da ausência de doença subjacente, do genótipo do *MT* e do *status* imunológico⁴⁵. Na TB extrapulmonar, os sintomas variam,

de acordo com os órgãos atingidos, podendo acometer, dentre outros, os rins, os ossos e as meninges, em função das quais se expressará clinicamente. Podem ocorrer, assim sendo, outros sinais e sintomas, além da tosse prolongada, e tais sinais adicionais devem ser valorizados na investigação individualizada, principalmente nas regiões com maior número de casos notificados^{16, 46}.

A vacina disponível (BCG) para a TB pulmonar apresenta baixa eficiência (variável entre 0 a 80%). Apesar dos contínuos esforços para se desenvolver vacinas mais eficazes contra a TB, uma nova vacina ainda não foi aprovada⁴⁷.

4. Tratamento e resistência

O tratamento adequado da TB consiste na administração combinada de drogas, de modo a evitar o desenvolvimento de resistência medicamentosa, a prevenir complicações tardias e o óbito, a diminuir a transmissão e a assegurar a cura da doença. A esses princípios, soma-se a Estratégia do Tratamento Diretamente Observado (*Directly Observed Treatment Strategy, DOTS*), como tática fundamental a ser adotada, para o sucesso do tratamento¹⁶. A *DOTS* constitui mudança significativa na forma de administrar os medicamentos, com o profissional treinado passando a observar, desde o início do tratamento e até a cura da doença, a tomada da medicação pelo paciente¹⁶.

Com vistas a conter o aumento da Tuberculose Multidrogarresistente (*MDR-TB*), o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) reviu o sistema vigente de tratamento da TB no País, introduzido em 1979. Tal mudança baseou-se nos resultados preliminares do segundo Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos da Poliquimioterapia da TB (2007/2008), que mostrou o aumento da resistência primária à isoniazida (INH), de 4,4% para 6,0%, e consistiu na introdução do etambutol (EMB), como o quarto fármaco a ser administrado, na fase intensiva do tratamento, a qual compreende os dois primeiros meses do chamado Esquema Básico, com doses fixas e combinadas dos quatro medicamentos (RIF/INH/pirazinamida (PZA)/EMB), reunidas em um único comprimido. Na fase de manutenção do tratamento, que dura quatro meses, usa-se um comprimido contendo a associação da RIF com a INH^{16,48,49,50}. O Esquema Básico é indicado para todos os casos novos de todas as

formas de TB pulmonar e extrapulmonar, para todos os casos de reincidência e de retratamento por abandono, com exceção da TB meningocéfálica⁴⁶.

Para todos os casos de retratamento, devem ser solicitados cultura, identificação e Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA), iniciando-se o tratamento com o Esquema Básico, até obterem-se os resultados desses exames¹⁶.

Para casos de falência do Esquema Básico, o tratamento é composto por medicamentos de segunda linha, com cinco fármacos na primeira fase (estreptomina, etambutol, ofloxacina, pirazinamida e terizidona) as quais serão ministradas ao longo de seis meses, e, posteriormente, devendo ser ministradas, durante 12 meses da fase de manutenção do tratamento, três drogas, o etambutol, a ofloxacina e a terizidona⁴⁶.

Problema crescente, a MDR-TB tornou-se preocupação global^{16,28,51}. Mundialmente, em 2012, cerca de 450 mil pessoas desenvolveram MDR-TB, com estimativa anual de 170 mil mortes, mas existe uma grande diferença entre o número estimado de casos e o número diagnosticado e tratado⁵².

No Brasil, a última pesquisa nacional de *M. tuberculosis* resistente às drogas constatou que os casos de MDR-TB representaram uma estimativa de 0,90% dentre todos os casos de TB notificados, recentemente¹⁶. No entanto, segundo a Organização Mundial de Saúde, o Brasil faz parte dos cinco países (Afeganistão, Brasil, República do Congo, Indonésia e Federação Russa), com alta carga de TB e de MDR-TB que ainda possuem apenas dados parciais sobre a resistência e que devem, em razão disso, considerar a realização, a curto prazo, de levantamentos de casos de TB com resistência a drogas em todo o País, para melhor compreender o ônus da MDR-TB e, com isso, poder orientar o planejamento dos serviços de diagnóstico e de tratamento¹.

O *MT* é naturalmente resistente a muitos antibióticos, trazendo dificuldade ao tratamento. Essa resistência é devida, principalmente, ao fato de o envelope da célula ser altamente hidrofóbico, agindo como se fosse uma barreira permeável. Muitos determinantes de resistência potenciais, porém, são também codificados no genoma³⁰. Com o sequenciamento do genoma, torna-se cada vez mais acessível a disponibilização de uma tecnologia que detecte a resistência genotípica simultânea à rifampicina e isoniazida e fármacos de segunda linha⁵², mas para projetar ensaios de

resistência baseados em testes moleculares rápidos, é necessário desvendar toda a base genética da resistência aos antibióticos⁵³.

Dentre os desafios para alcançar o controle global da TB resistente à múltiplas drogas estão a identificação precoce dos casos, o tratamento não tóxico, de baixo custo, a minimização da transmissão e a vigilância epidemiológica eficaz⁵².

Os casos monorresistentes são considerados aqueles com resistência a, pelo menos, um antibiótico utilizado na poliquimioterapia para a TB e são o tipo mais comum de ocorrência. Os casos multirresistentes de MDR-TB são os que apresentam resultados de TSA resistente a, pelo menos, à INH e à RIF, os dois principais fármacos utilizados no tratamento da doença e a polirresistência, é a resistência a dois ou mais fármacos, exceto à RIF e à INH. (BRASIL, 2011). A resistência denominada XDR-TB (*extensively drug resistant*) é definida como sendo o de resistência à INH e à RIF, acrescido de resistência a uma fluoroquinolona e, pelo menos, a um agente de segunda linha injetável (amicacina, canamicina e/ou capreomicina)^{16,52}.

A aquisição de resistência a antimicrobianos em micobactérias é um evento aleatório, resultante de mutações espontâneas. É denominada de Resistência Natural, quando surge, naturalmente, no processo de multiplicação do bacilo e independe de contato prévio do bacilo com o fármaco. Já a Resistência Primária verifica-se em pacientes que se infectaram com bacilos previamente resistentes. Por fim, a Resistência Adquirida, também chamada de Resistência Pós-Primária ou de Resistência Secundária, verifica-se em pacientes com TB inicialmente sensível, que se torna resistente, após a exposição aos medicamentos. As principais causas do surgimento da Resistência Adquirida são o uso de esquemas inadequados de tratamento, o uso irregular do esquema terapêutico por má adesão ou a simples falta temporária de medicamentos, o que acaba, nos três casos, por privar o paciente da regularidade do seu seguimento¹⁶.

A história do tratamento de TB anterior continua a ser o risco mais importante para a resistência. No entanto, em pacientes *HIV* positivos, devido à interação dinâmica entre o *HIV* e a TB e apesar de ainda não estar completamente elucidada a relação da MDR-TB com o *HIV*, sabe-se que tal associação é de grande importância para a saúde pública, uma vez que tem sido associada com surtos de MDR-TB em ambientes

institucionais, como hospitais e penitenciárias⁵⁴.

A RIF é um antibiótico valioso para o tratamento de micobactérias, e se usado em combinação adequada evita o aparecimento de resistência. O mecanismo de resistência clinicamente significativo é definido por meio de uma mutação identificada na região do gene *rpoB*, que codifica o alvo de RIF⁵⁵.

A vigilância global e local da resistência do MT é essencial para os programas de controle da TB, com grandes implicações na saúde pública para a TB multiresistente, uma vez que estas informações são importantes para evitar novas transmissões⁵².

5. Aspectos Socioeconômicos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) assinala como uma das principais causas para a gravidade contemporânea global da TB, a desigualdade social e suas implicações, o envelhecimento da população, os grandes movimentos migratórios e a piora na qualidade dos programas de controle da doença⁵⁶⁻⁵⁸.

Na sociedade atual, a desigualdade social é fenômeno desencadeado pela má distribuição de renda, com a conseqüente diferença de acesso às variáveis econômicas, educacionais, de saúde e de segurança, que geram desigualdade em vários níveis para a população⁵⁹.

Apesar de ser curável, existe um impacto na qualidade de vida da pessoa com TB. Estudos sobre a qualidade de vida dessa população não são tão frequentes; alguns resultados, porém, apontam para conseqüências físicas, psicológicas e sociais⁶⁰. Uma doença, como a TB, pode significar mudança na qualidade de vida e nas relações pessoais e profissionais, haja vista que a doença e os medicamentos podem causar apatia, levando a uma menor disposição para o bom desempenho das atividades cotidianas⁶⁰. Os profissionais de saúde que atuam nos serviços de atendimento a TB precisam estar atentos à importância da qualidade de vida do paciente e à necessidade de, por parte deles, de uma melhor compreensão das vivências daqueles que são acometidos pela doença, visto que a falta de aderência ao tratamento pode ser desencadeada pela falta de proximidade desses indivíduos com aqueles que lhes prestam o cuidado e os assistem do ponto de vista técnico^{61,62}.

Para a manutenção da qualidade de vida dos sujeitos que contraem essa complexa doença é preciso investigar e dar atenção a fatores socioeconômicos, estigma, discriminação. Deve-se, também, tentar combinar o tratamento, preferencialmente, com a vida familiar, o trabalho e as atividades sociais do indivíduo com TB⁶³. Oferecer ao usuário a baciloscopia, os exames complementares e a medicação não garantem atendimento com equidade, conforme preconizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A integralidade do atendimento pode colaborar para a redução do estigma do doente e pode, igualmente, prover ações assertivas para o tratamento, em especial nos casos de desigualdades socioeconômicas⁶⁴.

Há de se considerar, também, os sistemas inadequados de saúde⁶⁴, muitas vezes sem um assistente social disponível⁶³. Para o controle da doença, é preciso organizar serviços para o diagnóstico e o tratamento, além de haver maior flexibilidade das equipes quanto ao tratamento diretamente administrado⁶² e de melhorar a coleta das variáveis sociais nos sistemas de registro da TB⁶⁵, objetivando, com tal procedimento, a busca de soluções consonantes com os recursos a serem disponibilizados em cada comunidade.

O deslocamento crescente de pessoas no mundo, devido à globalização, pode afetar o controle de TB nos países receptores de imigrantes, por causa do aumento das fontes de infecção. É de fundamental importância a avaliação da incidência de TB entre os imigrantes, segundo seu país de origem⁶⁶. Quando chegam ao destino, eles podem tornar-se vulneráveis, devido à situação econômica, às diferenças culturais e linguísticas, à falta de conhecimentos sobre o acesso à assistência social e à saúde e às dificuldades com moradia no novo país, ocasionando problemas de ordem física, psicológica e social, o que pode acarretar piora nas condições de saúde e a diminuição da imunidade⁶⁷.

No Brasil, um exemplo bastante claro desse tipo de adversidade pode ser visto junto à população de imigrantes bolivianos em algumas Subprefeituras do Município de São Paulo, uma vez que seu país de origem apresenta alta incidência de TB⁶⁸. Clandestinos, eles se constituem em habitantes de segunda classe, que não têm acesso às facilidades dos imigrantes legais, tornando-se, assim, mais facilmente expostos, muitas vezes, a condições degradantes de trabalho na indústria de

confeções, que lhes impõe carga horária abusiva, a ser cumprida em ambiente adverso, em lugares, como porões, nos quais há, geralmente, pouca luminosidade e quase nenhuma ventilação⁶⁹, aumentando o risco do acometimento de doenças respiratórias e facilitando sua transmissão⁷⁰. Dessa forma são necessárias políticas públicas específicas para o monitoramento e manutenção de sua saúde⁷¹.

6. *Diagnóstico laboratorial*

Diagnóstico bacteriológico

A capacidade inadequada de diagnóstico da TB, de forma rápida e precisa, continua a ser um obstáculo para o controle global da doença¹⁶.

O diagnóstico precoce das micobactérias faz-se por exame direto, cultura, tipificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos, o que contribui para a interrupção do seu ciclo de transmissão e para o controle e a cura da doença⁷²⁻⁷⁶.

Embora os laboratórios desempenhem um papel fundamental no tratamento de TB, apenas 57% dos 4,6 milhões de casos novos de TB pulmonar, notificados em todo o mundo, em 2012, foram bacteriologicamente confirmados, por meio de um método diagnóstico recomendado pela OMS (baciloscopia/cultura). Além disso, os 5,7 milhões de pacientes com incidência de TB, entre os casos novos da doença e aqueles em que a doença se apresenta de forma recidiva, diagnosticados e notificados em 2012, representam apenas 66% dos 8,6 milhões de casos de TB globalmente estimados. A diferença reflete tanto a subnotificação de casos de TB diagnosticados, quanto a incapacidade de diagnosticá-los de maneira rápida e eficaz, incapacidade esta, em parte, atribuída à falta de estrutura laboratorial de muitos países¹.

Do ponto de vista epidemiológico, a **baciloscopia** direta do escarro é fundamental, uma vez que determina as mais importantes fontes da infecção: os indivíduos bacilíferos¹⁶. Por tratar-se de exame não invasivo, rápido e econômico, é o método preconizado para o diagnóstico da TB pulmonar⁴⁰, permitindo a visualização microscópica do bacilo, por meio de coloração específica Ziehl Neelsen (ZN)⁷⁷. Outra técnica utilizada é a da fluorescência com auramina, que apresenta acurácia semelhante e que, segundo alguns autores, aumentaria a sensibilidade da microscopia, em relação ao ZN^{78,79}, mas que, em casos positivos, precisa de confirmação, pelo ZN^{47,80,81}. Em regiões carentes, como a África, a auramina tem sido largamente

utilizada, com os microscópios com lâmpadas de Diodo Emissor de Luz (*Light Emitting Diode, LED*), uma alternativa recente, recomendada pela OMS⁸², para a substituição do microscópio convencional de fluorescência, que utiliza lâmpada de Vapor de Mercúrio (*Mercury Vapor Lamp, MVP*). Os microscópios com *LED* fornecem uma fonte de luz de custo menor, com vida útil de 150 mil horas, sem risco potencial de toxicidade⁸³ e sem o comprometimento das vantagens operacionais da técnica tradicional. A desvantagem, de acordo com Hãnscheid (2008)⁸⁴, é que esses microscópios, por serem monoculares, podem levar à fadiga ocular. Em dois estudos^{83,85}, não foram encontradas diferenças de sensibilidade da fluorescência, por microscópio com *MVP* relativamente àquele com *LED*, e, no estudo conduzido por Alfred et al. (2014)⁸⁵, observou-se que houve diminuição da especificidade da técnica de coloração por auramina, com microscopia de *LED*, em relação à coloração por *ZN*.

A sensibilidade da baciloscopia é baixa, variando entre 60 a 80%, conforme o volume, o tratamento prévio da amostra e o número de campos examinados^{16,86}. Assim sendo, pode apresentar resultados falso-negativos, em espécies paucibacilares, e/ou falso-positivos, pela presença de bacilos mortos, evidenciados na coloração³⁵. No entanto, ainda é um exame muito utilizado no Brasil, dada a escassez de recursos, em grande parte do território nacional, para outros exames de alta complexidade.

O isolamento de micobactérias, a partir de espécimes clínicos, é o padrão-ouro, por ser técnica mais sensível e por permitir a identificação da espécie e o Teste de Sensibilidade (TS) aos medicamentos utilizados no tratamento da TB. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a **cultura** do escarro pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença¹⁶, sendo que o método apresenta especificidade acima de 98%³.

As células de *MT* multiplicam-se muito lentamente em laboratório e necessitam de três a oito semanas de incubação, em meios artificiais sólidos, os mais usados sendo aqueles à base de ovo, como o Löwenstein-Jensen e o Ogawa-Kudoh⁷³.

No final da década de 90 do século passado, o sistema de cultura líquida, *Bactec® MGIT® 960 Mycobacteria Growth Indicator Tube* (Becton & Dickinson, Baltimore, Maryland, EUA) passou a ser utilizado, tanto para o isolamento, quanto para a detecção de resistência a drogas, apresentando tempo médio de sete dias de

detecção do bacilo causador da doença (BRASIL, 2010)⁴⁰, monitorando-se a incubação por sistema informatizado^{73,74}.

A **tipificação** do *MT* é realizada, segundo características fenotípicas, a presença do fator corda por microscopia corada por *ZN*⁷³ e o teste imunocromatográfico rápido AG MPT-64, que é um imunoensaio cromatográfico para a identificação qualitativa do CMt, que utiliza o anticorpo monoclonal MPTP-64. Este *kit* pode ser utilizado para a identificação rápida do CMt, em combinação com sistemas de cultura sólida (colônia e fluido de condensação) e de cultura líquida, com sensibilidade de 98,6% e com especificidade de 100%⁸⁷.

O **TSA** é uma ferramenta recomendada pelo PNCT, para avaliar a resistência do bacilo frente aos fármacos, para detectar falência de tratamento e para monitorar a resistência primária e/ou adquirida, contribuindo, desta forma, para a interrupção do ciclo de transmissão de resistência e, também, para o controle e a cura da doença^{16,72-74}. Os testes de sensibilidade aos quimioterápicos utilizados no tratamento são importantes para a prescrição dos antimicrobianos adequados, que reduzem a possibilidade de falha terapêutica e, portanto, contribuem para a melhora do quadro clínico¹⁶.

O método utilizado no Brasil é o das proporções, que utiliza concentrações fixas das drogas, e o sistema detecta resistência das cepas a determinadas drogas, utilizando a proporção crítica de 1%, associado ao sistema automatizado *MGIT*® 960 (Becton & Dickinson, Baltimore, Maryland, EUA; BRASIL, 2008)⁷³, com algumas modificações sugeridas por Giampaglia et al. (2007)⁸⁸. A incubação é realizada por, no mínimo, cinco e, no máximo, 12 dias, com frascos contendo as drogas. A leitura, programada para ser realizada a cada hora, é automaticamente interrompida, a partir do índice final de crescimento obtido no tubo controle, com posterior emissão de relatório final, no aparelho supracitado^{74,89,90}.

Os fármacos de primeira linha utilizados para a realização do TSA são: SM, RIF, INH, EMB e PZA¹⁶.

Outros métodos laboratoriais

Na última década, os testes imunológicos também têm sido empregados no diagnóstico da TB. Alguns exemplos são a adenosinadeaminase e a replicação de bacteriófagos, mas eles apresentam limitações. Devido à baixa especificidade e sensibilidade e à falta de valor clínico¹⁷, ainda não são recomendados, para o diagnóstico de TB, pelos programas oficiais no país⁴⁰.

Dentre os testes moleculares, o *PCR* em tempo real destaca-se, por sua rapidez, tendo seu resultado liberado em de uma hora e meia a duas horas depois da extração do *DNA*, com baixo risco de contaminação, devido ao fato de, para fazê-lo, utilizar-se apenas um tubo de ensaio. No entanto, esse teste apresenta, como desvantagens, a necessidade de recorrer-se a equipamentos e a reagentes de custo elevado, além de dispor de profissional especializado em Biologia Molecular⁴⁰.

Em 2010, recomendou-se o uso do teste molecular rápido *GeneXpert*® *MTB/RIF* (Cepheid, Sunnyvale, Califórnia, EUA), para o diagnóstico da TB pulmonar e da resistência à RIF, em adultos. Trata-se de método de amplificação de ácidos nucleicos, que permite a detecção simultânea de *MT* e a triagem de resistência à RIF, por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - *PCR*) em tempo real, que identifica corretamente 97,6% dos pacientes com resistência à RIF, sensibilidade muito melhor do que da baciloscopia e semelhante à da cultura, fornecendo resultados em menos de duas horas, sem necessitar de tratamento da amostra¹. Essa tecnologia molecular deve ser cada vez mais utilizada em levantamentos de resistência a medicamentos, para simplificar a logística e, assim, reduzir a carga de trabalho dos laboratórios, além de reduzir o custo da triagem inicial por sistemas convencionais¹, mas ela ainda não substitui a microscopia convencional, nem o cultivo do microorganismo, necessários para monitorar o tratamento e a detecção de resistência a outras drogas¹⁷.

Vários países já estão usando, ou, para breve, planejam usar o *GeneXpert*® *MTB/RIF*, como ferramenta de triagem, na resistência à droga, pois a resistência à RIF é o mais importante indicador de *MDR-TB*, com implicações clínicas graves para os pacientes afetados. Como a maior parte desses métodos não se faz disponível, na atualidade, em países nos quais a TB é altamente endêmica, estima-se que apenas

10% dos atuais casos de *MDR-TB* sejam diagnosticados em todo o mundo e que apenas a metade deles recebam tratamento adequado⁹¹.

Devido às novas metodologias disponíveis, a OMS, em 2013, revisou e modificou a definição de caso de TB, do ponto de vista bacteriológico, baseando-se na utilização dos testes rápidos, como o geneX-pert, sendo considerado, caso novo todo paciente cuja amostra biológica apresentar-se positiva na baciloscopia, na cultura ou no método rápido, como o *GeneXpert*® MTB/RIF¹.

7. Uso de Técnicas de Biologia Molecular para o estudo de perfil molecular

O desenvolvimento e o aprimoramento do uso de técnicas de genotipagem de cepas de *MT*, nas últimas décadas, têm possibilitado a compreensão da estrutura populacional e da dinâmica de transmissão desse patógeno na comunidade, sendo frequentemente aplicadas tais técnicas, para compreender as variações genéticas e as possíveis relações filogenéticas entre as várias cepas de *MT*, o que permite esclarecer questões cruciais para a saúde pública^{92,93}.

As técnicas mais utilizadas para estudos de tipagem molecular de membros do CMT são RFLP-IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) e *Spoligotyping*⁹⁴.

Utilizando um fragmento de inserção IS6110, no ano de 1993, Van Embden e colaboradores⁹⁵, publicaram um protocolo-padrão, aceito internacionalmente, para a tipagem de isolados de *MT*. O fragmento IS6110 é um transpóson que se repete, várias vezes (em geral, de uma a 25 repetições), dentro do genoma da micobactéria⁹⁶, com uma sequência de 1.361 pb que se tem mostrado bastante conservada entre os diferentes isolados⁹⁴. O método tem, por base, a digestão do *DNA* genômico bacteriano por enzimas de restrição chamadas de endonucleases, que geram fragmentos de diferentes comprimentos, os quais são separados em gel de agarose e são, a seguir, hibridizados por uma sonda de *DNA*⁹⁷. A diferença na localização e no número de cópias dessa sequência de inserção é o que define o polimorfismo entre os isolados. Na espécie *MT*, o número de cópias dessa sequência de inserção é frequentemente alto, conferindo à espécie elevado poder de discriminação⁹⁸. Com excelente poder

discriminatório, essa metodologia foi considerada, na década de 90 do século XX, padrão-ouro para a tipificação de cepas de *MT*⁹⁹.

Desde então, a genotipagem baseada em IS6110 vem, com sucesso, sendo utilizada, para rastrear a transmissão da TB, em surtos; para confirmar, em laboratório, a contaminação cruzada da doença; para identificar os fatores de risco da doença entre as populações de pacientes com TB e para investigar a dinâmica da transmissão da TB em populações^{95,100,101}.

No entanto, esse método apresenta inúmeras limitações, pois, na presença de isolados com baixo número de cópias de IS6110 (menos do que seis cópias), seu poder discriminatório diminui, sendo necessária a utilização de métodos complementares de genotipagem. A metodologia requer ainda *DNA* com alto grau de pureza e de concentração, aliado à exigência de um trabalho laboratorial intenso¹⁰².

Outra técnica de tipagem molecular, *Spoligotyping*, baseia-se na amplificação, por *PCR*, de um único *locus*. Trata-se de técnica rápida, de fácil execução, baseada no polimorfismo da região da região DR (*Direct Repeat*), presente exclusivamente no genoma de micobactérias do CMT. A micobactéria possui uma região cromossômica distinta, contendo múltiplas regiões de 36-pb (na região *DR*) intercaladas por sequências de *DNA* (35 a 41 pb) únicas de espaçadores¹⁰³.

O método *Spoligotyping* consiste na detecção desses espaçadores (cerca de 43) na região DR do genoma das cepas de *MT*¹⁰⁴. Os espaçadores podem ser representados por código binário, o qual pode ser positivo ou negativo, sendo considerado positivo, quando, na membrana hibridizada, há a presença de espaçador, e negativo, quando ausente o espaçador¹⁰⁵. Os isolados de *MT* de amostras clínicas variam, de acordo com o número de DRs, e variam, ainda, com a presença ou com a ausência das sequências espaçadoras¹⁰⁶.

Essa metodologia é utilizada na identificação e na diferenciação dos membros do CMT e pode ser uma alternativa de tipagem para as amostras com poucas cópias de IS6110. O poder discriminatório do *Spoligotyping* é menor, quando comparado ao do RFLP IS6110¹⁰⁶. Entretanto, vários grupos de pesquisadores reportaram que é um método secundário de genotipagem, que pode ser utilizado para rastreamento de um grande número de isolados, fornecendo respostas rápidas, na investigação

epidemiológica^{103,107,108}. Como pode superestimar as ligações epidemiológicas, é recomendado que tal metodologia, quando adotada, esteja associada a uma outra técnica¹⁰⁹.

Os “spoligotipos” comuns a mais de um isolado são designados como *Shared Types (ST)* e têm a si atribuído, individualmente, um número designado como *Shared International Type (SIT)*, de acordo com o banco de dados internacional do Instituto Pasteur de Guadalupe (*SITVITWEB*)¹¹⁰⁻¹¹². Os SITs são então agrupados em famílias e subfamílias.

Outra proposta de tipagem molecular utilizada por vários grupos de pesquisadores é o “*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeats*”- MIRU-VNTR^{93, 113-115}. Com efeito, na década de 90, Supply e colaboradores (2000)¹¹³ identificaram, no genoma do *MT*, elementos repetitivos, similares às sequências de minissatélites anteriormente descritas no genoma humano. Os minissatélites no genoma dos eucariotos superiores encontram-se dispersos, em milhares de cópias, com tamanhos que variam entre 10 e 100 pb, e muitos desses *loci* são hipervariáveis em seres humanos e em outros animais, recebendo a denominação de *Variable Number Tandem Repeats (VNTRs)*.

Dentro do genoma micobacteriano, as regiões de *VNTR* são compostas por 40 a 100 pb de sequências repetitivas, chamadas Unidades Repetitivas Intercaladas (MIRUs), sendo algumas idênticas e outras que variam ligeiramente em sequência e comprimento, os quais podem ser denominados de acordo com sua localização no genoma bacteriano¹¹⁶.

Este método teve por base, inicialmente, a amplificação, pela PCR, de um sistema com 12 (*MIRUs* 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40) dos 41 *loci* identificados no genoma do *MT*, com condições de amplificação específicas de cada *locus* descritas por Mazars et al. (2001)¹¹⁷.

Supply et al. investigaram, em 2006¹¹⁴, o poder de resolução, a estabilidade clonal e a aplicabilidade da técnica em estudos de epidemiologia molecular e, então, propuseram, como uma ferramenta de alta resolução para estudos filogenéticos, a utilização de 24 *loci*. Os *MIRUs* propostos incluem os 12 sistemas já descritos acima, mais os recém-inseridos Mtub 04, ETRC, ETRA, Mtub 30, Mtub 39, QUB 4156, QUB

11b, Mtub21, QUB 26, Mtub 29, ETRB e Mtub34. Todos esses locos exibem polimorfismos, em número de cópias, entre os isolados de *MT* não relacionados, de diversas origens geográficas, além de serem altamente estáveis, entre isolados com ligação epidemiológica^{113-115,118}.

Alguns autores relatam que, na discriminação de isolados de *MT*, o sistema com 24 locos demonstrou maior confiabilidade, em relação ao conjunto de 12 locos originalmente sugeridos, com resultados altamente replicáveis e fáceis de serem trocados entre laboratórios^{119,120}. Já em outros estudos, o sistema de 15 *loci* vem apresentando um maior poder de discriminação, entre os isolados de *MT*, concluindo que esse tipo de estratégia pode ser útil na genotipagem do bacilo da TB^{121,122}.

Atualmente, a associação de métodos moleculares, principalmente aqueles baseados em reações da PCR tem proporcionado grande impulso aos estudos da epidemiologia molecular do *MT*. A técnica de *MIRU*, quando aplicada, como primeira técnica de escolha de tipagem, associada com a técnica de *Spoligotyping*, tem apresentado, na grande maioria dos casos, excelente discriminação^{104,123}.

Embora o CMt seja considerado um táxon relativamente homogêneo, com relação à sua sequência de *DNA*, o aumento no número de espécies e de linhagens genéticas específicas revelou variações de elementos genéticos repetitivos, móveis. Essas diferenças têm sido exploradas, como marcadores, para fins epidemiológicos, ou para a identificação de estirpes, em nível de espécie, aumentando a compreensão da biodiversidade do *MT*, com relação à sua filogenia, às variações nas preferências geográficas, à virulência, à transmissibilidade, à resposta do hospedeiro, à resistência às drogas e à capacidade de induzir respostas imunes¹²⁴.

Estudos epidemiológicos têm apontado, também, que a distribuição genotípica do CMt é fortemente relacionada à área geográfica, à população humana e à etnia¹²⁵⁻¹²⁸. Tais estudos permitiram definir o CMt em seis grandes linhagens filogeográficas mundiais, as quais foram ainda subdivididas em famílias: a Indo-Oceanica (EAI); a Leste Asiática, incluindo Pequim (W/Beijing); a Leste Africano-Indiana (CAS); a Euro-americana (Latino-Americana e Mediterrânea ou LAM); a África Ocidental ou *Mycobacterium africanum* I e a África Ocidental ou *Mycobacterium africanum* II.

Os padrões de *spoligotyping* permitem agrupar diferentes cepas de MT, em famílias (subespécies) epidemiologicamente importantes¹⁰⁵. Uma das principais é a família LAM, que pertence à linhagem Euro-americana e é dividida em subfamílias, de LAM 1 a LAM 10¹²⁹. A superlinhagem Euro-Americana possui, ainda, outras famílias menores, a S, a T e a X e a Toscana. A família dominante no Brasil e na América, em geral, tem sido a Euro-Americana^{93,130,131}, em suas subfamílias, T e H^{119, 132,133}.

Considerações finais

Doença antiga e atual no contexto mundial, a TB merece atenção dos Poderes Públicos, por suas características de transmissibilidade, de necessidade de tratamento prolongado e de difícil adesão do paciente ao tratamento. Somam-se a esses fatores o advento da *AIDS* e a resistência às drogas, problemas globais que agravam a doença e complicam sua cura.

Em plena Era da Biologia Molecular, testes rápidos e microscopia por lâmpadas *LED*, a TB ainda apresenta forte estigma social e se encontra no rol das doenças negligenciáveis. Mesmo com os grandes avanços obtidos nos testes de diagnóstico da TB e apesar das conhecidas limitações dos métodos bacteriológicos clássicos, estes ainda se mostram a modalidade mais usual dentre os métodos de detecção da TB e seguem sendo muito utilizados para o diagnóstico da doença, principalmente em países com poucos recursos financeiros.

Para o desenvolvimento de ensaios de resistência baseados em testes moleculares rápidos ainda é necessário desvendar por completo a base genética da resistência aos antibióticos.

Embora a vacina atualmente disponível proteja das formas mais graves da doença, há a necessidade de uma forma mais efetiva de proteção contra a TB.

Houve, nos últimos anos, uma diminuição do número de casos no mundo todo, mas, dentre os desafios, ainda está a necessidade de pesquisas na área, de envolvimento político, de liderança estratégica e de treinamento permanente dos profissionais, além de monitoramento e vigilância dos casos, no sentido de eliminar a doença, ameaça de Saúde Pública mundial.

Os programas de cooperação internacional têm contribuído para a capacitação dos recursos humanos e para o fortalecimento das instituições dos países participantes do consórcio colaborativo, graças à transferência de conhecimentos técnicos e graças, ainda, à disponibilização de equipamentos visando ao desenvolvimento de estratégias transnacionais de eliminação da TB.

A presente revisão da literatura especializada não inclui todas as nuances relativas à TB, uma vez que seria impossível de fazê-lo neste espaço, diante das múltiplas facetas da doença. Embora apresente a limitação de não ter incluído todos os estudos concernentes aos temas aqui explorados, espera-se contribuir como uma abordagem geral dos temas relevantes sobre a doença, nos dias de hoje.

Referencias

1. World Health Organization - WHO. Library cataloguing-in-publication data. Global tuberculosis report 2013. Geneva: WHO; 2013.
2. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378(9785):57-72.
3. World Health Organization - WHO. Global tuberculosis control. WHO Report. Geneva: WHO; 2011.
4. Correa PA, Gómez LM, Anaya JM. Polimorfismo del TNF- α en autoinmunidad y tuberculosis. *Biomédica*. 2004;24(Supl 1):43-51.
5. Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:593-617.
6. Fernando SL, Britton WJ. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol Cell Biol*. 2006;84(2):125-37.
7. World Health Organization - WHO. WHO expert special programme on AIDS. Geneva: WHO; 1987.
8. Rodrigues JR AL, Ruffino-Netto A, Castilho EA. Distribuição espacial da co-infecção *M. tuberculosis*/HIV no Estado de São Paulo, 1991-2001. *Rev Saúde Pública*. 2006;40(2):265-70.
9. Ruffino-Netto, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(1):51-8.
10. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. O controle da tuberculose no Brasil:

avanços, inovações e desafios. Bol Epidemiol [Internet]. 2013 [citado em 2014 Out 15];44(2):[aproximadamente 13 p.]. Disponível em: <http://www.vigilanciaemsaude.ba.gov.br/sites/default/files/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>

11. World Health Organization - WHO. Global Tuberculosis Control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report. Geneva: WHO; 2009.

12. Organização Pan-Americana da Saúde. O apoio à implementação da Estratégia de Tratamento Diretamente Supervisionado (DOTS) para o combate à Tuberculose. Brasília (DF): Organização Pan-Americana da Saúde; 2010.

13. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Especial Tuberculose. Bol Epidemiol [Internet]. 2012 [citado em 2014 Out 10];43(1-12):[aproximadamente 12 p.]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/23/BE-2012-43-Mar--o---Especial-Tuberculose.pdf>

14. Rossetti ML. Avanços no diagnóstico da tuberculose. In: 2º Workshop da Rede TB [evento na Internet]; 2011; Rio de Janeiro: Universidade Gama Filho; 2011 [citado em 2014 Out 10]. Disponível em: http://www.redetb.org/attachments/1537_diagn%C3%B3stico-Maria-Lucia_Rossetti.pdf

15. Gonçalves BD. Perfil epidemiológico da exposição à Tuberculose em um Hospital Universitário: uma proposta de monitoramento da doença [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2009.

16. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2011.

17. Davies PDO, Gordon SB, Davies G, editors. Clinical Tuberculosis [Internet]. New York: CRC Press; 2014 [citado em 2014 Jan 12]. Disponível em: <https://app.box.com/s/naah0lr0u4fuszdq8kzkg2y24ri158yi>

18. Vieira DEO, Gomes M. Efeitos adversos no tratamento da tuberculose: experiência em serviço ambulatorial de um hospital-escola na cidade de São Paulo. J Bras Pneumol. 2008;34(12):1049-55.

19. Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList - 10 years after. Tuberculosis (Edinb). 2011;91(1):1-7.

20. Oliveira LSS. As doenças negligenciadas e nós [editorial]. Saúde Coletiva. 2009;28:40-1.

21. Santos FLA, Lyra MAM, Alves LDS, Silva KER, Rolim LA, Gomes TCBL, et al. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2012;33(1):37-47.

22. World Health Organization - WHO. Tuberculosis – Epidemiology, Population Surveillance. Data Interpretation, Statistical. WHO. Geneva: WHO; 2014.
23. World Health Organization - WHO. Global tuberculosis control. Geneva: WHO; 2012.
24. Barbosa EL, Levino A. Análise da coinfeção TB/HIV como fator de desenvolvimento da tuberculose multidroga resistente: uma revisão sistemática. Rev Pan-Amaz Saude. 2013;4(4):57-66.
25. Lopes RH, Menezes RMP, Costa TD, Queiroz AAR, Cirino ID, Garcia MCC. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose pulmonar: uma revisão integrativa. Rev Baiana Saúde Pública. 2013;37(3):661-71.
26. Duarte R, Carvalho A, Ferreira D, Saleiro S, Lima R, Mota M, et al. Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. Rev Port Pneumol. 2010;16(4):559-72.
27. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” [Internet]. São Paulo: CVE-SES/SP; 2012 [citado em 2014 Abr 15]. Divisão de controle da Tuberculose. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_tb.html
28. Martins MC, Giampaglia CM, Oliveira RS, Simonsen V, Latrilha FO, Moniz LL, et al. Population structure and circulating genotypes of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in São Paulo state, Brazil. Infect Genet Evol. 2013;14:39-45.
29. Wayne LG, Kubica GP. The mycobacteria. In: Sneath PHA, Sharpe ME, Holt JG. Bergey’s manual of systematic bacteriology. 8ª ed. Baltimore: Williams e Wilkins; 1986. p.1435-1437.
30. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998;393(6685):537-44.
31. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
32. Pfyffer GE, Palicova F. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Versalovic J, editor. Manual of clinical microbiology. 10th ed. Washington: ASM Press; 2011. p. 472–502.
33. Coelho FS, Marques EA. Tuberculose. Rev Hosp Univ Pedro Ernesto. 2006;5:25-6.
34. Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect Genet Evol. 2003;3(2):125-33.

35. Almeida EA. Sensibilidade de bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* as drogas antituberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2009.
36. Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(4):653–5.
37. Coscolla M, Lewin A, Metzger S, Maetz-Rennsing K, Calvignac-Spencer S, Nitsche A, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolate from a Wild Chimpanzee. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(6):969-76.
38. Homolka S, Post E, Oberhauser B, George AG, Westman L, Dafaie F, et al. High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. *BMC Microbiol*. 2008;8:103.
39. Pandolfi JR, Malaspina AC, Santos ACB, Suffys PN, Oellemann MAC, Valentini SR, et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2007;28(3):251-7.
40. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2010.
41. Stein CM. Genetic epidemiology of tuberculosis susceptibility: impact of study design. *PLoS Pathogens*, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e1001189, 2011.
42. Glickman MS, Jacobs Junior WR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn a discipline. *Cell*. 2001;104(4):477-85.
43. World Health Organization - WHO. Global Tuberculosis Control. Geneva: WHO; 2010.
44. Maulén NP. Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Med Chile*. 2011;139(12):1605-10.
45. Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Lan NT, Thuong NT, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2008;4(3):e1000034.
46. Conde MB, Souza MGR. Pneumologia e fisiologia: uma abordagem prática. São Paulo: Atheneu; 2009.
47. Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *J Bras Pneumol*. 2007;33(3):323-4.

48. Ministério da Saúde. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2009.
49. Divisão de Tuberculose. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil. Mudanças no tratamento da tuberculose. *Rev Saúde Publica*. 2010;44(1):197-9.
50. Paschualinoto AL, Ferro e Silva RR, Carmo AMS. Padrões de resistência a fármacos em pacientes com tuberculose pulmonar ial santo andré. *Rev Bras Ciênc Saúde*. 2012;10(31):67-70.
51. Said HM, Kock MM, Ismail NA, Baba K, Omar SV, Osman AG, et al. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. *BMC Infectious Diseases*. 2012;12:369.
52. Millard J, Ugarte-Gil C, Moore DA. Multidrug resistant tuberculosis. *BMJ*. 2015;350:h882.
53. Köser CU, Javid B, Liddell K, Ellington MJ, Feuerriegel S, Niemann S, et al. Comment. Drug-resistance mechanisms and tuberculosis drugs. www.thelancet.com. *Lancet*. 2015;385(9965):305-7.
54. Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A. Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review. *PLoS One*. 2009;4(5):e5561.
55. Goldstein BP. Resistance to rifampicin: a review. *J Antibiot*. 2014;67(9):625-30.
56. World Health Organization - WHO. Global tuberculosis control. WHO Report on the tuberculosis epidemic. Tuberculosis (TB) annual report-dots (directly observed treatment, short-course) – a breakthrough in tb control. Geneva: WHO; 1997.
57. World Health Organization - WHO. Guidelines for implementing collaborative TB and HIV programme activities. World Health Organization Stop TB. Department and Department of HIV/AIDS, 2003. Geneva: WHO; 2003.
58. World Health Organization - WHO. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning Financing, Geneva: WHO, 2006.
59. Camargo, Orson, <http://www.brasilecola.com/sociologia/classes-sociais.htm>, [consulta em 2015 Fev 12).
60. Farias SNP, Medeiros CRS, Paz EPA, Lobo AJS, Ghelman LG. Integralidade no cuidado: estudo da qualidade de vida dos usuários com tuberculose. *Escola Anna Nery*. 2013;17(4):749-754.

- 61.Sánchez M, Idaly A, Marínez C, Andrés O, Mesa R, Lida Y. Trabajadores de la salud y sus significados en torno a la adherencia al tratamiento de la tuberculosis. *Enfermería Global*. 2013;(31):86-108.
- 62.Monteiro S, Rodrigues V. A qualidade de vida da pessoa com tuberculose em regime de toma observada. *Acta Med Port*. 2011;24(S2):523-30.
- 63.Villa TS, Andrade RLP, Arakawa T, Magnabosco GT, Beraldo AA, Monroe AA, et al. Satisfação do usuário com os serviços de atenção à tuberculose em Ribeirão Preto, 2008. *Cad.Saúde Colet*. 2012;20(2):234-43.
- 64.Musayon Oblitas Y, Loncharich Vera N, Castillo Rios R, Saravia Portuguez A. Inequidad en personas que padecen de Tuberculosis. Estudio piloto en tres Centros de Salud de Lima (Perú). *Index Enferm [Internet]*. 2008 [citado em 2015 Fev 12];17(2):111-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4321/S1132-12962008000200007>
- 65.Quijano ED, Brugal MT, Pasarín I, Galdós-Tangís H, Caylà J, Borrel, C. Influencia de las desigualdades sociales, la conflictividad social y la pobreza extrema sobre la mortalidade por tuberculosis em la ciudad de Barcelona. *Rev Esp Salud Pública*. 2001;75(6):517-27.
- 66.Farah MG, Meyer HE, Selmer R, Heldal E, Bjune G. Long-term risk of tuberculosis among immigrants in Norway. *Intern J Epidemiol*. 2005;34(5):1005-11.
- 67.Carballo M. The challenge of migration and health. *International Centre for Migration and Health ICMH feature articles [Internet]*. 2007 [citado em 2015 Fev 21]; [aproximadamente 4 p.]. Disponível em: http://www.icmhd.ch/WebPDF/2007/WHA%20DISTRIBUTION%20ARTICLE%2018_05_2007formatted.pdf
- 68.Lindoso AAB, Waldman EA, Komatsu NK, Figueiredo SM, Taniguchi M, Rodrigues LC. Profile of tuberculosis patients progressing to death, city of São Paulo, Brazil, 2002. *Rev Saúde Pública*. 2008;42(5):641-8.
- 69.Silva SA. Bolivianos em São Paulo: entre o sonho e a realidade. *Estudos Avançados*. 2006;20(57):157-70.
- 70.Ianni AMZ, Quitério LAD. Promoção da saúde e meio ambiente no Programa de Saúde da Família: os casos da Barra Funda e Jardim Rio Claro, município de São Paulo. *Rev Saúde Soc*. 2004;13(1):81-91.
- 71.Martinez VN. Equidade em saúde: o caso da tuberculose na comunidade de bolivianos no município de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2010.
- 72.Kent PT, Kubica GP. Identification test techniques. In: *Public Health. Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1985.

- 73.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional Vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008.
- 74.Parrish NM, Carrol KC. Role of the Clinical Mycobacteriology Laboratory in Diagnosis and Management of Tuberculosis in Low-Prevalence Settings. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):772-6.
- 75.Bento J, Silva AS, Rodrigues F, Duarte R. Métodos diagnósticos em tuberculose. *Acta Med Port.* 2011;24:145-54.
- 76.Lafaiete RS, Souza FBA, Motta MCS. O atraso no diagnóstico da tuberculose. *J Res Fundam Care Online.* 2013;5(3):174-80.
- 77.Campos H. Diagnóstico da tuberculose. *Pulmão RJ.* 2006;15(2):92-9.
- 78.Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(9):570-81.
- 79.Salfinger M, Morris AJ. The role of the microbiology laboratory in diagnosing mycobacterial diseases. *Am J Clin Pathol.* 1994;101(4 Suppl 1):S6-13.
- 80.Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia . II Consenso Brasileiro de tuberculose. Diretrizes brasileiras para tuberculose. *J Bras Pneumol.* 2004;30(Supl1):S1-S55.
- 81.Lima SSS, Clemente WT, Palaci M, Rosa RV, Antunes CMF, Serufo JC. Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo. *Bras Pneumol.* 2008;34(12):1056-62.
- 82.World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data [Internet]. Genebra: WHO; 2011 [citado em 2014 Abr 14]. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement; [aproximadamente 16 p.]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501613_eng.pdf?ua=1
- 83.Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesseling AC, Beyers N, Wasserman E, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis.* 2008;47(2):203-7.
- 84.Hänscheid T. The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of Mycobacterium tuberculosis and Coccidia. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* 2008;102(6):520-1.

85. Alfred N, Lovette L, Aliyu G, Olusegun O, Meshak P, Jilang T, et al. Optimising Mycobacterium tuberculosis detection in resource limited settings. *BMJ Open*. 2014;4(3):004093.
86. Talip BA. The development of a rapid diagnostic system for difficult to culture human pathogens [tese]. Ulster: Faculty of Life and Health Sciences. University of Ulster; 2013.
87. Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 1999;37(11):3693-7.
88. Giampaglia CM, Martins MC, Vieira GB, Vinhas SA, Telles MA, Palaci M, et al. Multicentre evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11(9):986-91.
89. Kruuner A, Yates MD, Drobniowski FA. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):811-8.
90. Rüsç-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, Chadwick M, Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobial. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):688-92.
91. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, Von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2013;368(8):745-55.
92. Choi GE, Jang MH, Cho HJ, Lee SM, Yi J, Lee EY, et al. Application of single-nucleotide polymorphism and mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats analyses to clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *Korean J Lab Med*. 2011;31(1):37-43.
93. Cardoso Oelemann M, Gomes HM, Willery E, Possuelo L, Batista Lima KV, Allix-Béguec C, et al. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant Mycobacterium tuberculosis strain lineage from a high tuberculosis burden country. *PloS One*. 2011;6(3):e18256.
94. Santos LC, Kipnis APJ, Kipinis A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Patol Trop*. 2007;36(1):1-15.
95. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):406-9.
96. Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*. 1999;37(8):2607-18.

97. Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28(12):2668-73.
98. Devallois A, Horgen L, Sola C, Rastogi N. Molecular typing of mycobacteria. *Pathol Biol (Paris).* 1998;46(8):625-36.
99. Gibson AL, Huard RC, Gey van Pittius NC, Lazzarini LC, Driscoll J, Kurepina N, 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. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1259-67.
100. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med.* 1994;330(24):1703-9.
101. Gencer B, Shinnick TM. Molecular Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. *Am J Infect Dis.* 2005;1(1):5-11.
102. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet.* 1999;353(9151):444-9.
103. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology.* 2006;6:23.
104. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(4):658-85.
105. Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(11):694-704.
106. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):907-14.
107. Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, van Soolingen D. Use variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):314-20.
108. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutiérrez MC, Haas WH, Panaiotov S, et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5628-38.

109. Borsuk S, Dellagostin MM, Madeira Sde 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*. 2005;7(13):1338-44.
110. Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, Mokrousov I, Vincent V, Rastogi N. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3):390-6.
111. Institut Pasteur de la Guadeloupe. The SITVIT database [Internet]. [consulta em 2015 fev 15]. Welcome to SITVIT; [aproximadamente 1 p.]. Disponível em: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>
112. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. Sitvitweb--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):755-66.
113. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol*. 2000;36(3):762-71.
114. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(12):4498-510.
115. Oelemann MC, Fontes AN, Pereira MA, Bravin Y, Silva G, Degraive W, et al. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Community Health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(4):455-62.
116. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med*. 2003;349(12):1149-56.
117. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1901-6.
118. Cowan A, Earnest DL, Ligozio G, Rojavin MA. Omeprazole-induced slowing of gastrointestinal transit in mice can be countered with tegaserod. *Eur J Pharmacol*. 2005;517(1-2):127-31.
119. Noguti EN, Leite CQ, Malaspina AC, Santos AC, Hirata RD, Hirata MH, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Parana in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(6):779-85.

- 120.Pereira AM, Santos LC, Fernandes HB, Alves SLA, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. Análise molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes em Goiânia, Goiás, por meio de RFLP-Is6110 e do loci MIRU-VNTR. Rev Patol Trop. 2013;42(3):275-88.
- 121.Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Herránz M, Sanchez-Benitez M, Barroso P, INDAL-TB group, et al. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. BMC Microbiol. 2008;8:34.
- 122.Liu J, Tong C, Liu J, Jiang Y, Zhao X, Zhang Y, et al. First Insight into the Genotypic Diversity of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Gansu. Province, China. PLoS One. 2014;9(6):e99357.
- 123.Allix-Béguec 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. 2008;46(4):1398-406.
- 124.Lazzarini LC, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, 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. 2007;45(12):3891-3902.
- 125.Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(8):2869-73.
- 126.Dou HY, Tseng FC, Lu JJ, Jou R, Tsai SF, Chang JR, et al. Associations of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes with different ethnic and migratory populations in Taiwan. Infect Genet Evol. 2008;8(3):323-30.
- 127.Dou HY, Huang SC, Su IJ. Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan: A Model for Strain Evolution Linked to Population Migration. Int J Evol Biol. 2011; 937434.
- 128.Coll F, McNerney R, Guerra-Assunção JA, Glynn JR, Perdigão J, Viveiros M, et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Nat Commun. 2014;5:4812.
- 129.Mendes NH. Genotipagem por Spoligotyping e MIRU de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar [dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2010.
- 130.Pitondo-Silva A, Santos AC, Jolley KA, Leite CQ, Darini AL. Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Methods. 2013;93(1):42-8.

131.Santos ACB, Gaspareto RM, Viana BHJ, Mendes NH, Pandolfi JRC, Cardoso RF, et al. *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. *Int J Mycobacteriol.* 2013;2(3):156-65.

132.Malaspina AC. Genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis* utilizando RFLP e Spoligotyping em associação com MIRU para avaliar a epidemiologia molecular da tuberculose no município de Araraquara-SP [tese]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista; 2009.

133.Von Groll A, Martin A, Stehr M, Singh M, Portaels F, Silva PE, et al. Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. *PLoS One.* 2010;5(4):e10191.

Clinical and epidemiological profiles of individuals with drug-resistant tuberculosis

Heloisa da Silveira Paro Pedro^{1,2/+}, Susilene Maria Tonelli Nardi¹, Maria Izabel Ferreira Pereira¹, Rosângela Siqueira Oliveira³, Philip Noel Suffys⁴, Harrison Magdinier Gomes⁴, Amanda Juliane Finardi⁵, Eloise Brasil de Moraes⁵, Ida Maria Foschiani Dias Baptista⁵, Ricardo Luiz Dantas Machado^{2,6}, Lillian Castiglioni^{2,7,8}

¹Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto, Instituto Adolfo Lutz, São José do Rio Preto, SP, Brasil ²Departamento de Genética, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP, Brasil ³Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, Instituto Adolfo Lutz Central, São Paulo, SP, Brasil ⁴Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ⁵Divisão de Pesquisa e Ensino, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil ⁶Departamento de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas, Serviço de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Belém, PA, Brasil ⁷Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil ⁸Departamento de Biologia, Centro Universitário de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Drug-resistant tuberculosis (TB) is a growing global threat. Approximately 450,000 people developed multidrug-resistant TB worldwide in 2012 and an estimated 170,000 people died from the disease. This paper describes the sociodemographic, clinical-epidemiological and bacteriological aspects of TB and correlates these features with the distribution of anti-TB drug resistance. Mycobacterium tuberculosis (MT) cultures and drug susceptibility testing were performed according to the BACTEC MGIT 960 method. The results demonstrated that MT strains from individuals who received treatment for TB and people who were infected with human immunodeficiency virus were more resistant to TB drugs compared to other individuals ($p < 0.05$). Approximately half of the individuals received supervised treatment, but most drug-resistant cases were positive for pulmonary TB and exhibited positive acid-fast bacilli smears, which are complicating factors for TB control programs. Primary healthcare is the ideal level for early disease detection, but tertiary healthcare is the most common entry point for patients into the system. These factors require special attention from healthcare managers and professionals to effectively control and monitor the spread of TB drug-resistant cases.

Key words: tuberculosis - diagnosis - antimicrobial resistance

An inadequate capacity to quickly and accurately diagnose tuberculosis (TB) in developing countries (WHO 2011) and the growing threat of multidrug-resistant TB strains (MDR-TB) are global concerns (Said et al. 2012). Approximately 450,000 people developed MDR-TB worldwide in 2012, with an estimated 170,000 deaths annually. Most TB cases and deaths occurred in men, but this disease remains one of the top three causes of deaths in women worldwide (WHO 2013). The lack of low-cost testing, the long duration of treatment, the lack of an effective vaccine and the emergence of drug-resistant TB in low-income countries are limiting factors for disease control worldwide (Lawn & Zumla 2011).

The Brazilian National Tuberculosis Control Program (PNCT) recommends antibiotic susceptibility testing (AST) to evaluate bacilli resistance to anti-TB drugs, detect treatment failure and monitor the primary and/or acquired nature of resistance, which interrupts the transmission cycle of drug resistance to control and cure the

disease (MS/SVS/DVE 2008, 2011, Parrish & Carroll 2011). These strategies reduce the risk of drug-resistant TB and MDR-TB, which are particularly important in immunosuppressed individuals. AST is performed using the following first-line drugs: streptomycin (SM), rifampicin (RMP), isoniazid (INH), ethambutol (EMB) and pyrazinamide (PZA) (MS/SVS/DVE 2011).

Epidemiological features and disease control vary according to the geographic region. Therefore, knowledge of the characteristics of patients with drug-resistant TB is essential to develop therapeutic measures and establish policies to control the problem in Brazil (Melo et al. 2003).

This study identified the antimicrobial response of MT to the drugs that comprise anti-TB polychemotherapy to identify possible correlations between resistance and the sociodemographic and clinical-epidemiological features of patients.

MATERIALS AND METHODS

This cross-sectional study was conducted in a city located in the northern region of the state of São Paulo (SP) (coordinates: 20°49'11''S 49°22'46''W) with a population of 408,258 individuals (IBGE 2010) [estimated population in 2014: 415,769 individuals (SES/CVE/DCT 2008)]. This municipality is a priority in the PNCT because of the high incidences of TB and human immunodeficiency virus (HIV) (SES/CVE/DCT 2008, Vendramini et al. 2010, SMPGE 2013).

doi: 10.1590/0074-02760140316

Financial support: FAPERP

+ Corresponding author: hspedro@ial.sp.gov.br

Received 29 August 2014

Accepted 29 January 2015

The majority of the population in this study lives in a city with demographic and social indicators that are similar to developed countries. The United Nations Development Program considers a Human Development Index of 0.797 high and the levels of wealth, life expectancy and education are good (SMPGE 2013). The incidence of TB in 2009 was 23.1/100,000. The TB-HIV co-infection rate was 23% and the TB detection rate was 73.2%. Cure, dropout and mortality rates were 77.7%, 6.8% and 15.5%, respectively (SMSh 2009, Ponce et al. 2013).

The population of this study consisted of patients whose samples were cultured, identified and subjected to AST of MT between 2009-2013. Patients of both genders who were suspected of having TB that was subsequently confirmed using a positive acid-fast bacilli (AFB) smear or MT strain typing were included in the study.

Data were retrieved from the records of the regional reference laboratory for the Epidemiological Surveillance Groups (GVE) 29 and 30, which serve 102 municipalities in the region and an estimated population of 1,493,835 inhabitants [population of GVE 29: 1,237,177 and population of GVE 30: 256,658 (SES/CVE/DCT 2008)]. All cultures from GVE 30 were sent to the reference laboratory. Other laboratories also (2 hospitals and 3 laboratories from the private healthcare network) cultured samples from GVE 29. However, culture samples that were found positive in other laboratories and fulfilled the criteria established by the PNCT (SES-SP/CVE/DT 2002, MS/SVS/DVE 2008) were sent to the reference laboratory for typing and susceptibility testing.

Sociodemographic and clinical-epidemiological data were collected from the medical records of patients who received TB treatment in the Municipal Reference Centre for Tuberculosis Control and Government Health Clinics and were complemented by the TB Surveillance System of São Paulo State (TB-WEB) (SES/CCD/CVE/DCT 2008), which is a system that was developed as a joint venture between the State Department of Health and São Paulo State Data Processing Company. Collected data included gender, age, years of schooling, AFB smear and HIV test results, deprivation of liberty, use of alcohol, tobacco and illicit drugs, clinical presentation of the disease and details of previous TB treatment.

All subjects with positive MT complex samples for which AST was performed in the mycobacteria laboratory of the Regional Reference Laboratory during the study period were included.

Samples that were contaminated during strain identification or AST and samples with insufficient material to perform all tests were excluded.

Samples in the laboratory were used for the direct examination of AFB in smears stained using the Ziehl-Neelsen method. Bacilli were counted using a semiquantitative scale (score) according to the bacterial index as recommended by the Brazilian Ministry of Health (MS/SVS/DVE 2008).

Associated microbiota were eliminated from clinical specimens during culturing following the neutralisation and decontamination procedures of Petroff's method. The decontaminated material was inoculated in flasks containing MGIT 960 medium (Becton & Dickinson, USA) according to the manufacturer's instructions (Parrish & Carroll 2011).

Positive cultures were examined using AFB after subculture in Ogawa-Kudoh medium in a bacteriological incubator at 37°C to obtain colonies (Miller et al. 2002). MT was identified in grown colonies using the PNB growth inhibition method (medium with p-nitrobenzoic acid at 500 µg/mL) to identify colony morphology and confirm the presence of cord factor following the techniques recommended in the Manual of Tuberculosis Bacteriology (MS/SVS/DVE 2008).

Strains identified as MT were tested to assess their susceptibility to the antimicrobial drugs that comprise the polychemotherapy recommended by the Brazilian Ministry of Health: INH, RMP, SM and EMB (MS/SVS/DVE 2008). Susceptibility to PZA was performed separately using the pyrazinamidase test (Collins et al. 1997).

Susceptibility testing was performed using the BACTEC MGIT 960 system (Becton & Dickinson) following the manufacturer's instructions with some modifications as suggested by Giampaglia et al. (2007). Briefly, the turbidity of the MT inoculum was adjusted to McFarland scale 1. This suspension was diluted 1:5 and 1:100 using sterile distilled water. Then, 0.5 mL of the 1:5 inoculum was added to tubes containing BBL-MGIT 960 medium and the following drugs in the respective final concentrations were added: SM 1.0 µg/mL, INH 0.1 µg/mL, RMP 1.0 µg/mL and EMB 5.0 µg/mL. Simultaneously, the 1:100 suspension was used to inoculate a tube containing the culture medium without drugs (growth control tube).

The tubes were incubated for five and 12 days at 37°C in an automated MGIT 960 device (Becton & Dickinson). Readings were taken at hourly intervals during this period until the final growth index was attained in the growth control tube and a subsequent final report was issued (Kruuner et al. 2006, Rüsich-Gerdes et al. 2006, Parrish & Carroll 2011).

Patients resistant to at least one antibiotic in the polychemotherapy regimen for TB were classified as mono-resistant. Patients resistant to at least INH and RMP based on the AST were classified as MDR-TB and patients with resistance to two or more drugs, except for both RMP and INH, were classified as poly-resistant (MS/SVS/DVE 2011).

Patients were stratified based on AFB smear results (positive or negative), schooling (less than, equal to or more than 8 years of education) and age (15-45 years and older than 45 years) for statistical analyses.

Chi-square and Fisher's exact tests were used for statistical analyses and the odds ratio was used as a measure of association. A significance level of 5% was adopted.

The Research Ethical Committee of the Adolfo Lutz Institute in SP approved the study (protocol 079/2011).

RESULTS

The TB-WEB database identified 1,579 patients who received TB treatment in GVE 29 and 30 during the study period (municipal: 794 subjects; regional: 785 subjects). AFB smears (n = 887) and cultures (n = 151) were used as the diagnostic criteria for 1,038 of the patients registered in the TB-WEB system. There was no bacteriological confirmation for the remaining cases. The population of the current study included 84.1% (n =

TABLE I
Laboratory diagnostic results of clinical specimens from patients diagnosed with *Mycobacterium tuberculosis*^a

Tests	n (%)
Acid-fast bacilli smear	
Positive	221 (63.5)
Negative	127 (36.5)
Antibiotic susceptibility testing	
Susceptible	317 (91.1)
Resistant	
Mono-resistant (n = 23)	
INH	7 (2)
RMP	4 (1.1)
PZA	-
SM	12 (3.4)
EMB	-
Multidrug-resistant (n = 6)	
INH + RMP	2 (0.6)
INH + RMP + PZA	3 (0.9)
SM + INH + PZA + RMP	1 (0.3)
Poly-resistant (n = 2)	
SM + INH	2 (0.6)
Total	31 (8.9)

a: n = 348; EMB: ethambutol; INH: isoniazid; PZA: pyrazinamide; RMP: rifampicin; SM: streptomycin.

127/151) of TB cases confirmed by cultures and 24.9% (n = 221/887) of cases confirmed by AFB smears.

A total of 348 MT strains, isolated from 348 individuals, were subjected to AST. All of these patients were being treated in the Healthcare Services of the region.

The patients had a mean age of 38.8 years [standard deviation (SD) 3.6] and the majority (n = 295; 84.8%) were male. Stratification according to the TB-WEB system revealed that most patients had either four-seven years (36.4%) or eight-11 years (28.9%) of schooling, 18.4% of subjects were diagnosed with TB previously and 18.4% were HIV-positive. Alcoholism (27.6%), smoking (20.4%) and drug addiction (17%) were the other most commonly observed problems. Approximately 94% of cases were positive for pulmonary TB and 56% received supervised treatment or directly observed treatment, short-course.

Collected clinical samples sent to the laboratory included sputum (95.6%), bronchoalveolar lavage fluid (1.4%), gastric lavage fluid (1.2%), pleural fluid (0.6%), blood (0.6%), ascitic fluid (0.3%) and cerebrospinal fluid (0.3%). A total of 70.1% of the samples were used to diagnose TB and 29.9% were used for treatment control. The highest number of MT strains (33.6%) was identified in prisons, followed by primary (28.2%), tertiary (24.1%) and secondary healthcare institutions (12.9%). The lowest percentage of MT strains (1.2%) was identified in the private healthcare network.

A total of 317/348 (91.1%) of the analysed cases were susceptible to all tested drugs and 31/348 (8.9%) were resistant to one or more drugs used in TB treatment

regimens. Drug-resistance was distributed as follows: 23 strains were resistant to one drug used to treat TB; MDR-TB was observed in six strains and poly-resistance was observed in two strains (Table I).

Seven of the patients with any type of resistant strain were diagnosed at the primary healthcare level and 10 patients were diagnosed at the secondary healthcare level. Nine patients were diagnosed at the tertiary healthcare level. Three patients were diagnosed in closed institutions (prisons) and two patients were diagnosed in other institutions. AST was performed concomitant to TB diagnostic tests for 24 patients with resistant strains. All 31 MT isolates were obtained from pulmonary clinical specimens.

Table II describes the distribution of sociodemographic, epidemiological and clinical aspects associated with drug resistance. Patients most frequently appeared in the 15-45 year age group, who had less than eight years of schooling, with smear-positive pulmonary TB and who submitted to supervised treatment. Other features, such as the use of alcohol and tobacco and being deprived of liberty, were not positively associated with TB resistance.

Drug-resistant TB was positively associated with HIV infection and previous TB treatment (Table II).

Seven (7/31) patients with drug-resistant TB were also HIV-positive and received previous treatment. The most frequent resistance profile in these individuals was INH-mono-resistant TB (n = 3).

DISCUSSION

A further understanding of drug-resistant TB is essential to eradicate this disease worldwide. This study demonstrated the resistance of MT strains to TB poly-chemotherapy in a strategic region of SP. The rate of drug-resistance in the study area was lower than other parts of the country, but the study area lies where SP converges with the southern region of the states of Minas Gerais (MG) and Mato Grosso do Sul. The study area is the headquarters of the eighth São Paulo Administrative Region, which is an important centre for healthcare and other services (SMPGE 2013). Healthcare services are provided to the local population and the region of the states mentioned above and the state of Goiás (Gazeta et al. 2007). This region is also a distribution centre of illicit drugs to other states and it has a high rate of acquired immune deficiency syndrome (AIDS), which influences TB co-infections (Santos et al. 2009). Control measures need to be prioritised to contain the spread of resistant strains because of the geographical proximity to other Brazilian states and the intense migration of people seeking jobs.

The results of gender (Fandinho et al. 1999, Brito et al. 2004, Zaman et al. 2005, Mendes et al. 2007, Rozman et al. 2007, Vieira et al. 2007, Coelho et al. 2012, Micheletti et al. 2014), mean age (Teixeira et al. 2001, de Souza et al. 2006, Mendes et al. 2007, Rozman et al. 2007, Vieira et al. 2007, Marques et al. 2010, Coelho et al. 2012, Micheletti et al. 2014) and educational level (Brito et al. 2004, Vieira et al. 2007) were similar to other authors. These data demonstrate that TB mainly affects adult males with low educational levels (Baptista et al. 2002, Melo et al. 2003, Motta et al. 2009, Vendramini et al. 2010, Valença et al. 2012).

Co-infection with HIV is a challenge for the diagnosis and treatment of TB and disease control requires a global

TABLE II
Distribution of the main sociodemographic, epidemiological and clinical characteristics associated with drug resistance

Characteristic	Susceptible	Resistant	OR	95% CI	p	Total ^a
Gender						
Male	269	26	0.92	0.33-2.53	0.900	295
Female	48	5				53
						348
Age group (years)						
15-45	230	23	0.91	0.39-2.13	0.987	253
> 45	87	8				95
						348
Educational level ^a (years)						
< 8	164	12	1.04	0.39-2.64	1.000	176
≥ 8	105	8				113
						289 ^a
HIV ^a						
Negative	248	17	3.36	1.51-7.47	0.004	265
Positive	52	12				64
						329 ^a
AFB smear						
Negative	117	10	1.22	0.55-2.69	0.698	127
Positive	200	21				221
						348
Deprivation of liberty ^a						
No	174	21	0.33	0.12-0.91	0.035	191
Yes	124	5				129
						320 ^a
Alcoholism ^a						
No	225	20	1.30	0.58-2.90	0.526	245
Yes	86	10				96
						341 ^a
Tobacco smoking ^a						
No	246	23	1.16	0.48-2.84	0.813	269
Yes	64	7				71
						340 ^a
Drug addiction ^a						
No	256	28	0.32	0.07-1.41	0.133	284
Yes	56	2				58
						342 ^a
Clinical presentation						
Pulmonary	304	31	2.66	0.00-2.66	0.165	335
Extrapulmonary	13	-				13
						348
Previous TB treatment ^a						
No	259	14	5.66	2.57-12.47	< 0.001	273
Yes	49	15				64
						337 ^a
Type of treatment ^a						
Supervised	180	15	0.79	0.31-2.00	0.818	195
Self-administered	106	7				113
						308 ^a

^a: data not available at TB Surveillance System of São Paulo State; AFB: acid-fast bacilli; CI: confidence interval; HIV: human immunodeficiency virus; OR: odds ratio; TB: tuberculosis.

effort (Lawn & Zumla 2011, MS/SVS/DVE 2011, Müller et al. 2013, Zumla et al. 2013). The municipality in this study exhibited high co-infection rates compared to national and state levels (Vendramini et al. 2010). Therefore, this area is a priority for TB control. Anti-TB drug resistance was associated with HIV infection in this study. Approximately 40% of the drug-resistant strains were from patients living with HIV/AIDS, which suggests that special attention and healthcare measures should be targeted to this population. The World Health Organization (WHO) recommends that these patients undergo AST at the beginning of treatment and the standard WHO-recommended drug treatment should be adopted while awaiting the AST results. Rapid molecular tests should also be used to detect drug-resistant TB (CT/GTD 2009).

Most drug-resistant TB cases occur because of irregular treatment and treatment dropout. The current study demonstrated that previous TB treatment was associated with drug resistance, which was described previously (de Souza et al. 2006, Faustini et al. 2006, Hoffner et al. 2009, Wang et al. 2012, Al-Hajoj et al. 2013, Liu et al. 2013, Micheletti et al. 2014). Other factors, such as alcoholism and illicit drugs, were not associated with antibiotic resistance, but these factors contribute to the treatment dropout rate and noncompliance to treatment (MS/SVS/DVE 2011). Additionally, interactions with antiretroviral therapy may cause intolerance and toxic effects (Zumla et al. 2013). Smoking may also prolong treatment and overload the public healthcare system because smoking is associated with delayed sputum culture conversion and a higher recurrence rate (CT/GTD 2009). The economic impact should also be mentioned because the treatment of drug-resistant cases is more expensive than nondrug-resistant cases (Garcia 2003, de Souza et al. 2006). Drug-resistant TB is more difficult to treat because it may prolong the infectious period, reduce the odds of cure and result in increased transmission (French et al. 2008).

The high number of patients with resistant strains who exhibited positive AFB smears contributes to disease transmission. Notably, the percentage of patients with resistant strains at diagnosis may facilitate the spread of resistant MT, which could be a complicating factor for TB control programs and therapeutic regimens. These results suggest the need for a systematic monitoring of circulating strains. Approximately half of the individuals underwent supervised treatment, but most individuals had pulmonary cases that were used for diagnostic assessment. These cases were smear-positive and drug-resistant, which are complicating factors for control programs and require the attention of surveillance teams with rapid interventions, as stressed by the WHO (2011). This type of surveillance is essential to effectively monitor and control the spread of a global TB epidemic (Talip et al. 2013) and reduce the transmission of resistant strains (Marais et al. 2013).

The local healthcare network is composed of 13 Government Healthcare Clinics, 11 Family Healthcare Clinics, five Emergency Care Clinics, one Tuberculosis and Leprosy Outpatient Clinic, one Sexually Transmitted Disease/AIDS Outpatient Clinic and six hospitals (Ponce et al. 2013). However, more than half of the cases in this study were diagnosed at the tertiary level (i.e., in hospitals where the patient is usually diagnosed in a severe condi-

tion) or prisons, which are closed institutions with a high risk of TB transmission. Ponce et al. (2013) reported that approximately 40% of the cases were diagnosed at hospitals since 2000, which was after the decentralisation of TB control measures and investments in primary healthcare. The rate of total TB cases and drug-resistant cases in the current study (24.1%) was lower than the abovementioned study. However, MDR-TB (SM+INH+PZA+RMP) was detected in a young female healthcare professional who died quickly during the early treatment stage of the disease. The fact that she was a healthcare professional at a hospital is worrisome because there was a risk of transmission/exposure of this resistant strain to other professionals and patients of that hospital. The Centre for Epidemiological Surveillance (SES/CVE/DCT 2013) recommends that all TB cases in healthcare professionals be investigated quickly. Surveillance, hospital infection control and occupational healthcare services should be involved in these investigations because the Social Welfare Regulation of the Brazilian Ministry of Health (MS/SVS 1999) considers TB an occupational or work-related disease. Primary healthcare is the ideal level for early disease detection, but tertiary healthcare has been the entry point of patients into the system, which increases the risk of transmission and suggests that TB diagnosis is delayed. This fact requires special attention from healthcare managers and professionals.

Prisoners are at a greater risk of infections because of conditions that include overcrowding, poor air circulation, poor hygiene and sanitation, nutritional deficiency, high-risk behaviours, including alcohol abuse and illicit drug use and contact with other infectious diseases (Martin et al. 1994, Reyes & Coninx 1997, Lobacheva et al. 2007).

Notably, the results of this study indicate that resistance to anti-TB antibiotics was lower in liberty-deprived individuals than nondetainees. However, the WHO recommends that TB control policies should target prisons and long-term care facilities to minimise the risk of transmission by instituting changes in the organisation of the service, including training and a reorganisation of care. Local TB control programs should prioritise health surveillance measures to diagnose the disease at the primary healthcare level (MS/SVS/DVE 2011). Additionally, professionals working in governmental and nongovernmental institutions should discuss the need for more investment targeted at groups who are at highest risk for resistant MT strains (e.g., HIV-positive individuals, individuals in contact with patients with drug-resistant TB, homeless people and patients seen in hospitals and prisons without effective control measures) (Kritski 2010).

Studies in different regions of the states of Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Ceará, Mato Grosso, SP and MG reported variations in resistance levels in respiratory samples (Araújo et al. 2005, de Souza et al. 2006, Mendes et al. 2007, Rozman et al. 2007, Marques et al. 2010, Coelho et al. 2012, Micheletti et al. 2014). Resistance to any drug in the current study was detected in 8.9% of the cases, which is lower than the abovementioned values. MDR-TB cases are less common, but these cases are the most severe (Pereira 2012). The rates of MDR and poly-resistance in the current study were also identified in other studies in the state (Baptista et al. 2002, Rozman et al. 2007, Coelho et al. 2012).

The lack of complete information of some variables in the TB-WEB system hindered analyses in this study. Nevertheless, the information presented here is valuable for the management and prevention of drug-resistant TB in the study area and other areas of the country.

It is important to emphasise that knowledge of the molecular profiles of the strains that are circulating in the region and the implementation of rapid molecular tests for routine diagnosis will promote faster measures to control TB, particularly the transmission of TB strains that are resistant to currently available treatment drugs. Skills and resources are required for these tests, which are in accordance with the Stop TB Strategy towards eradication. These tests should be implemented particularly in developing countries, such as Brazil (Zumla et al. 2013).

The sociodemographic and clinical-epidemiological features of infections caused by MT revealed that most TB patients were working-age adult males with less than eight years of schooling. Pulmonary TB accounted for the majority of TB cases and more than half of the patients received supervised treatment. TB was diagnosed primarily in closed institutions or at the tertiary healthcare level.

High rates of resistance to TB treatment drugs were detected in individuals who were HIV-positive or who had previously received TB treatment. Alcoholism, smoking and drug addiction were not correlated with drug resistance. Resistance to anti-TB antibiotics was lower in liberty-deprived individuals than nondetainees.

The status of the antimicrobial response of MT to anti-TB polychemotherapy revealed that most of these patients were diagnosed at secondary and tertiary healthcare levels and closed institutions. The frequency of mono-resistant strains was higher in these patients, but the presence of patients with MDR-TB in hospitals requires closer attention.

The majority of patients with resistant strains had positive smears, which is a high risk factor for disease transmission that facilitates the spread of resistant MT strains.

REFERENCES

- Al-Hajoj S, Varghese B, Shoukri MM, Al-Omari R, Al-Herbwai M, Alrabiah F, Alrajhi AA, Abuljadayel N, Al-Thawadi S, Zumla A, Zignol M, Raviglione MC, Memish Z 2013. Epidemiology of antituberculosis drug resistance in Saudi Arabia: findings of the first national survey. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2161-2166.
- Araújo AK, Menezes EA, Santos CD, Cunha FA, Campelo CL 2005. Avaliação da resistência de drogas antituberculosas no estado do Ceará no período de 2000-2002. *Rev Bras Anal Clin* 37: 15-18.
- Baptista IMFD, Oelemann MC, Opromolla DVA, Suffys PN 2002. Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1147-1152.
- Brito RC, Gounder C, Lima DB, Siqueira H, Cavalcanti HR, Pereira MM, Kritski AL 2004. Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. *J Bras Pneumol* 30: 425-432.
- Coelho AGV, Zamarioli LA, Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA 2012. A study of multidrug-resistant tuberculosis in risk groups in the city of Santos, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 760-766.
- Collins CH, Grange JM, Yates MD 1997. Identification of species. In CH Collins, JM Grange, MD Yates (eds.), *Tuberculosis bacteriology: organization and practice*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, p. 69-97.
- CT/GTD - Comissão de Tuberculose, Grupo de Trabalho das Diretrizes para Tuberculose 2009. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J Bras Pneumol* 35: 1018-1048.
- de Souza MB, Antunes CMF, Garcia GF 2006. Perfil de sensibilidade e fatores de risco associados à resistência do *Mycobacterium tuberculosis* em centro de referência de doenças infecto-contagiosas de Minas Gerais. *J Bras Pneumol* 32: 430-437.
- Fandinho FCO, Kritski AL, Hofer C, Conde Jr H, Ferreira RMC, Silva MG, Fonseca LS 1999. Drug resistance patterns among hospitalized tuberculous patients in Rio de Janeiro, Brazil, 1993-1994. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 543-547.
- Faustini A, Hall AJ, Perucci CA 2006. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax* 61: 158-163.
- French CE, Glynn JR, Kruijshaar ME, Dithah IC, Delpech V, Abubakar I 2008. The association between HIV and antituberculosis drug resistance. *Eur Respir J* 32: 718-725.
- Garcia VD 2003. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* 9: 349-359.
- Gazetta CE, Vendramini SHF, Ruffino-Netto A, Oliveira MRC, Villa TCS 2007. Estudo descritivo sobre a implantação da estratégia de tratamento de curta duração diretamente observado no controle da tuberculose em São José do Rio Preto e seus impactos (1998-2003). *J Bras Pneumol* 33: 192-198.
- Giampaglia CMS, Martins MC, Vieira GB, Vinhas SA, Telles MA, Palaci M, Marsico AG, Hadad DJ, Fonseca LS, Kritski A 2007. Multicentre evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 11: 986-991.
- Hoffner S, Drobniewski F, Barrera L, van Soolingen D, Boulabhal F, Paramasivan CN, Kam KM, Mitarai S, Nunn P, Raviglione M 2009. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002-07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *Lancet* 373: 1861-1873.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2010. Cidades. Available from: ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1.
- Kritski AL 2010. Emergência de tuberculose resistente: renovado desafio. *J Bras Pneumol* 36: 157-158.
- Kruuner A, Yates MD, Drobniewski FA 2006. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44: 811-818.
- Lawn SD, Zumla AI 2011. Tuberculosis. *Lancet* 378: 57-72.
- Liu Q, Zhu L, Shao Y, Song H, Li G, Zhou Y, Shi J, Zhong C, Chen C, Lu W 2013. Rates and risk factors for drug resistance tuberculosis in northeastern China. *BMC Public Health* 13: 1171.
- Lobacheva T, Asikainen T, Giesecke J 2007. Risk factors for developing tuberculosis in remand prisons in St. Petersburg, Russia - a case-control study. *Eur J Epidemiol* 22: 121-127.
- Marais BJ, Mlambo CK, Rastogi N, Zozio T, Duse AG, Victor TC, Marais E, Warren RM 2013. Epidemic spread of multidrug-resistant tuberculosis in Johannesburg, South Africa. *J Clin Microbiol* 51: 1818-1825.
- Marques M, Cunha EAT, Ruffino-Netto A, Andrade SMO 2010. Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no estado de Mato Grosso do Sul, 2000-2006. *J Bras Pneumol* 36: 224-231.
- Martin V, Gonzales P, Caylà JA, Mirabent J, Cañellas J, Pina JM, Mirret P 1994. Case finding of pulmonary tuberculosis on admission to a penitentiary center. *Tuber Lung Dis* 75: 49-53.

- Melo FAF, Afiune JB, Neto JI, Almeida EA, Spada DTA, Antelmo ANL, Cruz ML 2003. Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 27-34.
- Mendes JM, Lourenço MC, Ferreira RMC, Fonseca LS, Saad MHF 2007. Resistência a drogas em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de amostras de escarro de pacientes ambulatoriais sintomáticos - Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. *J Bras Pneumol* 33: 579-582.
- Micheletti VCD, Moreira JS, Ribeiro MO, Kritski AL, Braga JU 2014. Tuberculose resistente em pacientes incluídos no II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos Antituberculose realizado em Porto Alegre, Brasil. *J Bras Pneumol* 40: 155-163.
- Miller N, Cleary T, Kraus G, Young AK, Spruill G, Hnatyszyn HJ 2002. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and Bact/Alert MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40: 4143-4147.
- Motta MSC, Villa TCS, Golub J, Kritski AL, Ruffino-Netto A, Silva DF, Harter RG 2009. Access to tuberculosis diagnosis in Itaboraí city, Rio de Janeiro, Brazil: the patient's point of view. *Int J Tuberc Lung Dis* 13: 1137-1141.
- MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde Brasil 1999. *Portaria/MS 1.339/1999, Regulamento da Previdência Social*, MS, Brasília.
- MS/SVS/DVE - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica Brasil 2008. *Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias*, MS/SVS/DVE, Brasília, 436 pp.
- MS/SVS/DVE - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica Brasil 2011. *Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil*, MS/SVS/DVE, Brasília, 284 pp.
- Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S 2013. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant. *Trends Genet* 29: 160-169.
- Parrish NM, Carroll KC 2011. Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. *J Clin Microbiol* 49: 772-776.
- Pereira AM 2012. *Georreferenciamento e genotipagem de Mycobacterium tuberculosis isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia - GO pelo método de MIRU-VNTR*, MsD Thesis, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 94 pp.
- Ponce MAZ, Wysocki AD, Scatolin BE, Andrade RLP, Arakawa T, Ruffino-Netto A, Monroe AA, Scatena LM, Vendramini SHF, Villa TCS 2013. Diagnóstico da tuberculose: desempenho do primeiro serviço de saúde procurado em São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica* 29: 945-954.
- Reyes H, Coninx R 1997. Pitfalls of tuberculosis programmes in prisons. *BMJ* 31: 1447-1450.
- Rozman LM, Santo AH, Rozman MA 2007. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas em pacientes HIV+ em cinco municípios da Baixada Santista, São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica* 23: 1051-1059.
- Rüsch-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, Chadwick M, Siddiqi S 2006. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobial. *J Clin Microbiol* 44: 688-692.
- Said HM, Kock MM, Ismail NA, Baba K, Omar SV, Osman AG, Hoosen AA, Ehlers MM 2012. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. *BMC Infect Dis* 12: 369.
- Santos MLSG, Ponce MAZ, Vendramini SHF, Villa TCS, Santos NSGM, Wysocki AD, Kuyumjian FG, Gazetta CE 2009. A dimensão epidemiológica da coinfeção TB/HIV. *Rev Lat Am Enfermagem* 17: 683-688.
- SES/CCD/CVE/DCT - Secretaria de Estado da Saúde/Coordenadoria de Controle de Doenças/Centro de Vigilância Epidemiológica Prof Alexandre Vranjac/Divisão de Controle da Tuberculose Brasil 2008. TB-WEB - Sistema Estadual de Notificação da Tuberculose. Available from: cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/DvTBC_TBWEB_2008.pdf.
- SES/CVE/DCT - Secretaria de Estado da Saúde/Centro de Vigilância Epidemiológica Prof Alexandre Vranjac/Divisão de Controle da Tuberculose Brasil 2008. TB em números. Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo. Available from: cve.saude.sp.gov.br/indicador.htm.
- SES/CVE/DCT - Secretaria de Estado da Saúde/Centro de Vigilância Epidemiológica Prof Alexandre Vranjac/Divisão de Controle da Tuberculose Brasil 2013. Relatório de oficina realizada nos dias 17 e 18 de junho/2013 com os GVEs e municípios para discussão dos casos de tuberculose ocorridos em profissionais de saúde e da educação. Available from: cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_tb.html.
- SES-SP/CVE/DT - Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo/Centro de Vigilância Epidemiológica Prof Alexandre Vranjac/Divisão de Tuberculose 2002. *Manual de orientação para coleta de amostras de escarro e outros materiais para baciloscopia e cultura para diagnóstico e controle da tuberculose*, SES-SP, São Paulo, 26 pp.
- SMPGE - Secretaria Municipal de Planejamento e Gestão Estratégica 2013. *Conjuntura econômica*, 28th ed., SMPGE, São José do Rio Preto, 91 pp.
- SMSH - Secretaria Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto 2009. *Controle de tuberculose ARE/VE. Situação da tuberculose em São José do Rio Preto*, SMSH, São José do Rio Preto.
- Talip BA, Sleator RD, Lowery CJ, Dooley JS, Snelling WJ 2013. An update on global tuberculosis (TB). *Infect Dis (Auckl)* 6: 39-50.
- Teixeira L, Perkins MD, Johnson JL, Keller R, Palaci M, Dettoni VV, Rocha LMC, Debanne S, Talbot E, Dietze R 2001. Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 5: 321-328.
- Valença MS, Rocha JZ, Ramis IB, Carrion LL, Madruga C, Macedo MB, Scaini CJ, Von Groll A, Silva PEA 2012. Improving tuberculosis control through the partnership between university and the health system. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 491-495.
- Vendramini SHF, Santos NSGM, Santos MLSG, Chiaravallotti-Neto F, Ponce MAZ, Gazetta CE, Villa TCS, Netto AR 2010. Análise espacial da co-infecção tuberculose/HIV: relação com níveis socioeconômicos em município do sudeste do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 536-541.
- Vieira RCA, Fregona G, Palaci M, Dietze R, Maciel ELN 2007. Perfil epidemiológico dos casos de tuberculose multirresistente do Espírito Santo. *Rev Bras Epidemiol* 10: 56-65.
- Wang X, Fu Q, Li Z, Chen S, Liu Z, Nelson H, Yang Q, Jia Z, Dye C 2012. Drug-resistant tuberculosis in Zhejiang Province, China, 1999-2008. *Emerg Infect Dis* 18: 496-498.
- WHO - World Health Organization 2011. Global tuberculosis control: WHO report 2011, WHO, Geneva, 246 pp.
- WHO - World Health Organization 2013. Global tuberculosis control: WHO report 2013, WHO, Geneva, 304 pp.
- Zaman K, Rahim Z, Yunus M, Arifeen S, Baqui A, Sack D, Hossain S, Banu S, Islam MA, Ahmed J, Breiman R, Black R 2005. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in selected urban and rural areas in Bangladesh. *Scand J Infect Dis* 37: 21-26.
- Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF 2013. Tuberculosis. *N Engl J Med* 368: 745-755.

Caracterização genética entre isolados do *Mycobacterium tuberculosis* na região Noroeste Paulista

Heloisa da Silveira Paro Pedro¹; Susilene Maria Tonelli Nardi¹; Maria Izabel Pereira Ferreira¹; Rosângela Siqueira Oliveira³; Amanda Juliane Finardi²; Eloise de Moraes² Philip Noel Suffys⁴; Harrison Magdinier Gomes⁴; Ida Maria Foschiani Dias Baptista²; Ricardo Luis Dantas Machado^{5,6}; Lillian Castiglioni⁵.

1- Núcleo de Ciências Biomédicas – Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São José do Rio Preto X/SP

2- Divisão de Pesquisa e Ensino - Instituto Lauro de Souza Lima- Bauru/SP

3- Centro de Laboratórios (CL)- Instituto Adolfo Lutz (IAL) - São Paulo/ SP

4- Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias – FIOCRUZ/RJ

5- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Campus de São José do Rio Preto/SP

6- Instituto Evandro Chagas, Belém (PA) Brasil.

Resumo

A proposta desse estudo foi caracterizar a diversidade genética de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* para um melhor entendimento da dinâmica da doença, utilizando *Spoligotyping* (*Spacer Oligonucleotide Typing*) e MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-variable-number tandem repeats*). Na análise das 377 amostras com perfis completos para 14 loci MIRU-VNTR, verificamos que os loci 10, 16, 23, 26, 27, 31, 39 e 40 tiveram um alto poder discriminatório (≥ 0.6), os loci 2, ETRB e Mtub21 foram moderadamente discriminatórios (≥ 0.3) e loci 4, 20 e 24 apresentaram baixo poder discriminatório (< 0.3). Dos 250 isolados de *M. tuberculosis* analisados por *spoligotyping*, 92 diferentes padrões foram observados. Com base nos *spoligotypes*, diferentes famílias foram identificadas: *Haarlem* (H), *Latin American and Mediterranean* (LAM), *T Family*, *undesigned* (U), *S lineage* e *X Family*. Significativa variabilidade genética foi observada nos isolados de *M. tuberculosis* circulantes na região da Noroeste Paulista quando analisados por *spoligotyping* e MIRU-VNTR, sendo observadas duas grandes subpopulações bem definidas. No entanto, não foram encontradas cepas predominantes de um município em específico. Devido ao impacto,

individual e coletivo da TB, este estudo tem a pretensão de continuar a contribuir para o entendimento da dinâmica regional de transmissão e, em médio prazo, num contexto onde outras investigações possam formalmente analisar a variação genética bacteriana sobreposta a atributos espaciais, étnicos, clínicos e socioeconômicos, visando a definição de novas estratégias de prevenção e controle da doença.

Palavras chaves: *Mycobacterium tuberculosis*; MIRU-VNTR; *Spoligotyping*; variabilidade genética

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de distribuição universal e continua sendo um grave problema de saúde pública mundial. Embora os avanços importantes no diagnóstico e tratamento continuem a ser realizados, ainda são necessários investimentos em pesquisas para eliminar a doença como uma ameaça para a saúde até 2050 (WHO, 2013). De acordo com a Organização Mundial de saúde, globalmente em 2012, cerca de 8,6 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1,3 milhões morreram da doença, incluindo 320 mil mortes entre os pacientes coinfectados com o vírus da imunodeficiência adquirida - HIV (WHO, 2013).

O Brasil diagnosticou 71.123 casos novos de tuberculose em 2013, com um coeficiente de incidência na ordem de 35,4/ 100.000 habitantes (BRASIL, 2013).

O município de São José do Rio Preto é sede da 8ª região administrativa do Estado de São Paulo, com 96 municípios e sede da Divisão Regional de Saúde (DRS XV) constituído por 102 municípios. É centro de referência na prestação de serviços de saúde, uma vez que atende todos os municípios da DRS XV e ainda outros Estados, tais como: Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. No contexto nacional é prioritária para o Programa de Controle da Tuberculose devido ao fato de apresentar alta taxa de pacientes com tuberculose e exame sorológico positivo para o HIV (SÃO PAULO, 2008; VENDRAMINI et al., 2010). Situa-se na região norte do Estado de São Paulo, a cerca de 430 Km da capital do Estado (IBGE, 2010; população estimada 2014: 415.769 hab. <http://www.cve.saude.sp.gov.br/indicador.htm>).

Métodos de genotipagem têm sido extensivamente aplicados em estudos de epidemiologia molecular da tuberculose em todo o mundo para compreender a

estrutura populacional dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt.*), com a finalidade de melhor compreender a dinâmica de transmissão da doença e a identificação de famílias de “*spoligo*types” e sua distribuição geográfica (NOGUTI et al., 2010; VALCHEVA et al., 2008; MENDES et. al, 2011). Vários métodos baseados em PCR foram desenvolvidos nos últimos anos, incluindo o “*Spoligo*typing” e o “*mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing* (MIRU-VNTR) (KAMERBEEK et al., 1997; BRUDEY et al., 2006; DONG et al., 2012).

O *Spoligo*typing é um método de tipagem rápido e oportuno no reconhecimento das linhagens do complexo *M. tuberculosis* com base na presença ou na ausência de algumas sequencias espaçadoras específicas na região DR (*Direct Repeat*) do genoma micobacteriano. Assim como o MIRU-VNTR, é um método fácil e rápido de se realizar e é considerado uma excelente alternativa ao método padrão ouro RFLP-IS6110, pois se baseia na variabilidade encontrada em 12 loci específicos intercalados ao longo do genoma micobacteriano. Recentemente, 15 ou 24 loci foram avaliados e aplicados em novas estratégias de tipagem visando melhor entendimento da epidemiologia molecular da tuberculose em diferentes países (SUPPLY et al., 2000; MAES et al., 2008; OELEMANN et al., 2007a; VALCHEVA et al., 2008; MAZARS et al., 2001; SUPPLY et. al, 2006; FRONTHINGHAM; O’CONNELL, 1998).

O uso de MIRU-VNTR aplicado como primeira linha como método de tipagem molecular de isolados de *M. tuberculosis* em combinação com *spoligo*typing, tem se mostrado adequado para discriminação dos isolados em uma grande maioria dos casos, incluindo estudos em larga escala (MENDES et. al, 2011)

O objetivo deste estudo foi caracterizar por meio de técnicas de genotipagem, a diversidade genética de isolados do *M. tuberculosis* de municípios da região Noroeste Paulista.

Material e métodos

Isolados Clínicos

De 01 de janeiro de 2009 e 31 de dezembro de 2013, um total de 390 isolados de *M. tuberculosis* foram obtidos de espécimes clínicos de pacientes com tuberculose, a partir dos exames realizados como parte da rotina diagnóstica do Laboratório de

referência regional de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz Central de São Paulo (protocolo nº 079/2011).

No laboratório o exame direto dos espécimes clínicos foi realizado pela escala semiquantitativa em cruces, conforme o índice baciloscópico recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008). A cultura foi realizada em frascos contendo o meio de cultura MGIT 960 (Becton & Dickinson –BD, Baltimore, EUA), todos os isolados de *M. tuberculosis* foram identificados de acordo com técnicas preconizadas no Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 2008) e o teste de sensibilidade, quando realizado foi efetuado por meio do método Bactec MGIT 960, segundo as instruções do fabricante com algumas modificações sugeridas por Giampaglia et al., 2007.

Os isolados de *M. tuberculosis* foram ressuspensos em tampão TE e inativados a 80° C por 20 minutos e em seguida o DNA cromossômico foi extraído pelo método de CTAB conforme descrito por Van Embden et al., 1993.

Métodos de tipagem molecular

Spoligotyping: um total de 250 isolados foram submetidos a metodologia realizada de acordo com o protocolo padrão descrito por KAMERBEEK et al., 1997. Os resultados foram inseridos em planilha Excel em um formato binário (0 = sem hibridação e 1 = hibridação) de 43 dígitos que representa os 43 espaçadores (BRUDEY et al., 2006).

MIRU-VNTR: um total de 390 isolados foram submetidos a amplificação para 14 *loci* MIRU-VNTR segundo protocolo descrito por Supply et al., 2000. Os fragmentos obtidos após a amplificação pela PCR produziram sequências de DNA com tamanho variável entre 51 a 77 pb. Foram incluídos controles positivos (DNA do *M. tuberculosis* H37Rv) e controles negativos (“mix-PCR” sem DNA). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 3% utilizando um marcador de 100 pb e a corrida eletroforética foi efetuada a 90 V por um período de 4 horas. O tamanho de cada fragmento de PCR foi determinado pela comparação visual com o marcador molecular e o alelo MIRU foi definido por uma matriz numérica segundo Mazars et al. (2001) e Supply et al. (2000).

Análise da genotipagem: Os perfis de “*spoligotypes*” foram comparados utilizando o banco de dados SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>) do Instituto Pasteur de Guadalupe, que é uma versão atualizada da base de dados SpolDB4.0 (BRUDEY et al., 2006). O *software Bionumerics* (versão 7.1, Applied Maths, Belgium) foi utilizado na análise “*spoligotyping*” e dos perfis de MIRU-VNTR por meio de um índice de matriz de similaridade “*Categorical values*”. Posteriormente, foram gerados dendrogramas e árvores filogenéticas utilizando os algoritmos: “*Unweighted Pair Group Arithmetic Averages*” (UPGMA), “*Neighbor-Joining*” (N-J) e “*Minimum Spanning Tree*” (MST). A avaliação do poder discriminatório dos métodos de tipagem foi realizado utilizando-se o índice de Hunter-Gaston (HGI) (HUNTER; GASTON 1988), sendo que a diversidade alélica de cada loci MIRU-VNTR foi definido como "altamente discriminatório" ($HGI > 0,6$), "moderadamente discriminatório" ($0,3 \leq HGI \leq 0,6$) e "pouco discriminatório" ($HGI < 0,3$) (SOLA et al., 2003). A Taxa de Agrupamento (*Clustering Rate*) foi calculada segundo a fórmula: $CR = (nc - c)/n$. Cálculo da taxa de agrupamento: onde n é o número total de casos no estudo, c é o número de genótipos representados por pelo menos dois casos, e nc é o número total de casos em clusters de dois ou mais pacientes (SUPPLY et al., 2006).

Resultados

População estudada

Foram identificadas, 390 cepas de *M. tuberculosis*, provenientes de 373 indivíduos oriundos de municípios da região Noroeste Paulista.

Dos 373 pacientes, 83% eram do sexo masculino e 17% do sexo feminino; 16,9% dos sujeitos tiveram TB no passado e 19,8% eram infectados pelo HIV. Além da infecção pelo HIV, as co-morbidades mais freqüentes foram o alcoolismo (29,2%), o tabagismo (23%) e a drogadição (13,4%). Cerca de 94% dos casos foram notificados como tuberculose pulmonar e 6% como tuberculose extra-pulmonar; 56,5% receberam tratamento supervisionado ou diretamente observado (*DOTS - Directly Observed Treatment Short-course*).

Spoligotyping

Dos 250 isolados de *M. tuberculosis*, 92 diferentes padrões de *spoligo*typing foram observados. Com base nos *spoligo*types, diferentes famílias foram identificadas: *Haarlem* (H), *Latin American and Mediterranean* (LAM), *T Family* (isolados de *M. tuberculosis* modernos), *undesignated* (U), *S lineage* e *X Family* com 36, 110, 48, 12, 2 e 5 isolados respectivamente.

Os padrões de *spoligo*typing de 244 isolados foram classificados de acordo com a base de dados SITVIT e destes, 62 tinham perfis únicos e 182 estavam divididos em 25 clusters de sublinhagens, sendo 4 clusters H, 12 LAM, 06 T, 2 U e 1 X. Um total de 3 clusters foram identificados pelo SIT como *órfãos*. Dentro de famílias e sublinhagens de acordo com o SPOLDB4, 213 isolados foram classificados, como LAM, T, H, U, X e S, com 51,5%, 22,5%, 16,9%, 5,7%, 2,4% e 1%, respectivamente. Um total de 34 isolados não foram identificados, 02 isolados foram ambíguos para LAM5/ LAM4 e 01 ambiguo T3/ X1.

Tipagem de MIRU-VNTR

Dos 390 isolados submetidos ao MIRU-VNTR, obtivemos um total de 377 com perfil completo para 14 loci avaliados. Não foram obtidos resultados para 13 amostras, sendo 5 amostras para 1 locus, 2 para 2 loci, 3 para 3 loci, 2 para 9 loci e 1 amostras para 4 loci. Na análise dos resultados do MIRU-VNTR dos 377 isolados, 19 (5%) estavam agrupados em clusters e 358 (95%) eram perfis únicos. A taxa de agrupamento (CR) do total de isolados testados pelos 14 loci foi de 0,026.

Nessa análise com perfis completos, verificamos utilizando “*Gaston Hunter Discriminatory Index*” ($h = 1 - \sum \chi_i^2$) que os loci 10, 16, 23, 26, 27, 31, 39, 40 tiveram um alto poder discriminatório (≥ 0.6), os loci 2, ETR-B e MTUB21 foram moderadamente discriminatórios (≥ 0.3) e os loci 4, 20 e 24 com baixo poder discriminatório (< 0.3), conforme quadro 1.

Dezenove isolados pertenciam a 9 clusters, sendo 1 cluster com 3 isolados e 8 com 2 isolados cada. O perfil de 21 isolados apresentou diferença em apenas um ou outro marcador com variação de uma única repetição, indicando maior similaridade entre as amostras.

Observamos que oito loci apresentaram alta diversidade (10, 16, 23, 26, 27, 31, 39, 40) e foram responsáveis por 57,2 % do poder discriminatório em relação aos 14 avaliados. Para o MIRU 24 que na população brasileira é invariável, observamos que um total de 92% das amostras tinha 1 cópia, 3,2% com 2 e 4,8% com 3 cópias.

Análise filogenética

A figura 1, mostra um *Minimum Spanning Tree* (MST) baseado nos 250 *spoligotypes*, com 3 grupos maiores pertencentes aos principais grupos genéticos LAM, T e H, com predomínio da família LAM.

Para visualizar a similaridade entre os genótipos definidos na população estudada, um MST foi construído, com base nos genótipos de 377 isolados de *M. tuberculosis* com a finalidade de melhor compreender a relação entre os genótipos e a origem geográfica dos isolados analisados.

As cores empregadas na figura 2 se referem ao local de origem do isolados, ou seja, os municípios da Noroeste Paulista. Assim, pode-se verificar a grande diversidade genética de *M. tuberculosis* com uma estrutura populacional formada por cepas estreitamente relacionadas e que podem ser observadas dentro de uma estrutura composta por duas grandes subpopulações aqui representadas por área 1 e 2.

Tanto na área 1 como na 2, os isolados estão divididos em 3 outros subgrupos com poucos *clusters* e genótipos muito similares entre os municípios de São José do Rio Preto, Riolândia, Catanduva, José Bonifácio e demais municípios. Em ambas as extremidades, não foi observado o predomínio de um perfil particular em um ou outro município. Os agrupamentos eram compostos por genótipos similares de vários municípios.

Discussão

Este é o primeiro estudo detalhado sobre a variabilidade genética e estrutura populacional dos isolados de *M. tuberculosis* na região Noroeste Paulista, que apresenta taxas de incidência relativamente alta para tuberculose. Com a finalidade de entender a dinâmica da doença, foram avaliados os isolados de *M. tuberculosis*

utilizando dois métodos de tipagem molecular baseado em PCR: *spoligotyping* e MIRU-VNTR.

Em um painel de 250 isolados avaliados por *spoligotyping* este estudo revelou 92 padrões distintos, sendo LAM, T *Family* e *Haarlem* as maiores famílias observadas com 90, 34 e 30 isolados respectivamente. Segundo Brudey et al. (2006), elas são as três famílias genóticas mais frequentes na África, América Central, América do Sul e Europa.

Outros grupos familiares também foram caracterizados nesse estudo, entre eles S, U e X. Todas essas famílias pertencem a linhagem Euro-Americana e são descritas em várias partes do mundo (LUIZ et al., 2013; MIRANDA et al., 2011).

A família LAM foi a mais frequente em nosso painel de amostras, sendo a subfamília LAM 9 a mais comum, que é prevalente em todas as Américas, Caribe, Europa e partes da África (LAZZARINI et al., 2008). A predominância da família LAM no Brasil foi confirmada em um estudo com isolados coletados no Rio de Janeiro, Porto Alegre e Belém. Segundo os autores a supremacia da família LAM provavelmente reflete o efeito do fluxo migratório da população do Sul da Europa e África para o Brasil (OELEMANN et al., 2007).

A análise dos isolados de *M. tuberculosis* por meio do MIRU-VNTR com 14 loci diferentes mostrou importante poder discriminatório. A maior diversidade alélica foi observada nos MIRUs loci 23, 39 e 40, corroborando com os dados observados Noguti et al. (2010). Interessante observar que MIRUs 23 e 39 em outras populações avaliadas apresentaram-se com baixo poder discriminatório (LIU et al., 2014).

O MIRU locus 24 é descrito como invariável em muitas populações inclusive a brasileira, ou seja, sempre com uma única cópia (NOGUTI et al., 2010; KOVALEV et al., 2005), no entanto em nosso estudo foram caracterizados isolados com 1, 2 e 3 cópias, evidenciando importante mudança no relógio molecular dos isolados dessa população, ocasionado por fatores ambientais, do hospedeiro e do próprio bacilo, mas que deverão ser investigados.

Uma grande diversidade genética de *M. tuberculosis* foi observada neste estudo. Poucos *clusters* foram observados, no entanto os isolados analisados compartilham genótipos com alta similaridade. Tanto na área 1 como na 2, é indiscutível a presença

maçica dos genótipos determinados pelos isolados de São José do Rio Preto e essa conformação sugere uma alta mobilidade populacional que contribui sobremaneira para o aumento da variabilidade genética dos isolados de *M. tuberculosis* presentes nessa região.

Em estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro, foi observado um maior número de grupos formados entre amostras oriundas da região central da cidade, considerada de maior movimentação populacional, apesar de nenhuma associação com características clínicas e epidemiológicas foi estabelecida entre os indivíduos pertencentes aos grupos definidos (OELEMANN et al., 2007b).

Extrapolando a mesma análise nesse estudo, o fluxo de genótipos que circulam na região Noroeste Paulista, por meio da associação de uma região específica da cidade com os municípios próximos que compartilham alta similaridade, sugere transmissão recente da tuberculose nestas áreas.

Assim, verificar a composição dos genótipos em nosso estudo, a partir de uma análise não tão estridente, pode colaborar na compreensão sobre as cadeias de transmissão da doença, pois segundo Warren et al. (2002), o rigor na definição dos grupos genéticos pode subestimar os níveis de agrupamento dentro de uma população específica.

A variabilidade genética observada nos isolados de *M. tuberculosis* circulantes na região da Noroeste Paulista quando analisados pela combinação de *spoligotyping* e MIRU-VNTR forneceram um satisfatório poder discriminatório reforçam a necessidade da ampliação das análises para todos os 24 loci MIRU-VNTR. Estudos dessa natureza tornam-se cada vez mais importantes para a rastreabilidade das relações entre os isolados, podendo colaborar para a interrupção da cadeia de transmissão e também para a definição de genótipos predominantes responsáveis pela disseminação da doença.

Devido à importância, individual e coletiva da TB, este estudo teve o objetivo de contribuir para o entendimento da dinâmica de transmissão da doença e, em médio prazo, num contexto com outras investigações, formalmente analisar a variação genética bacteriana sobreposta a atributos espaciais, étnicos, clínicos e

socioeconômicos visando a definição de novas estratégias de prevenção e controle da doença.

Referências Bibliográficas

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional Vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 436 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, DF, v. 44, n. 2, p. 1-13, 2013. Disponível em: <<http://www.vigilanciaensaude.ba.gov.br/sites/default/files/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2014.

BRUDEY, K. et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology**, London, v. 6, p. 23, 2006.

DONG, H. et al. Genetic Diversity of Mycobacterium tuberculosis Isolates from Tibetans in Tibet, China. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e33904, 2012.

FROTHINGHAM, R.; MEEKER-O'CONNELL, W. A. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. **Microbiology**, New York, v. 144, p. 1189-1196, 1998. Parte 5.

GIAMPAGLIA, C. M. et al. Multicentre evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 11, n. 9, p. 986-991, 2007.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 11, p. 2465-2466. 1988

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2010. Cidades. IBGE, 2014. Disponível em: < <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=354980>>. Acesso em: 15 out. 2014.

KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 4, p. 907-914, 1997.

KOVALEV, S. Y. et al. Genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping. [International Journal of Tuberculosis and Lung Disease](#), Paris, v. 9, n. 7, jul. p. 746-752, 2005.

LAZZARINI, L. C. et al. RDRio *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitary pulmonary disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 7, p. 2175-2183. 2008.

LIU, J. et al. First Insight into the Genotypic Diversity of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Gansu. Province, China. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e99357, 2014.

LUIZ, [R. dos](#) S. et al. Genotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 17, n. 3, p. 338-345, maio./jun. 2013.

MAES, M. et al. 24-locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, Edinburgh, v. 88, n. 5, p. 490-494, 2008.

MAZARS, E. et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 98, n. 4, p. 1901-1906, 2001.

MENDES, N. H. et al. 2011. Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil. **BMC Research Notes**, London, v. 4, n. 269, p.1-8, 2011, <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/269>.

MIRANDA, S. S. de. et al. Spoligotyping of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p. 267-273, maio. 2011.

NOGUTI, E. N. et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Parana in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 779-785, 2010.

OELEMANN, M. et al. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Community Health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v.102, n. 4, p.455-462, 2007a.

OELEMANN, M.C. et al. Assesment of an optimized Mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. **J Clin Microbiol.**, v.45, p. 691-697, 2007b.

OELEMANN, M.C.; HARRISON, M.G.; WILLERY, E. et. al. The Forest behind the Tree: Phylogenetic Exploration of a Dominant *Mycobacterium tuberculosis* Strain Lineage from a High Tuberculosis Burden Country. **PloS One**, v. 6, n. 3, 2011.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica, "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Tuberculose. **TBWEB versão 1.6**. São Paulo: CVE, 2008. Disponível em:

<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/DvTBC_TBWEB_2008.pdf>.

Acesso em: 15 out. 2014.

SOLA, C. et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRU-VNTR's: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p.125-133, 2003.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 3, p.762-771, 2000.

SUPPLY, P. et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 12, p. 4498-4510, 2006.

VALCHEVA, V. et al. Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3005-3011, 2008.

VAN EMBDEN, J. D. A. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.

VENDRAMINI, S. H. F. et al. Análise espacial da co-infecção tuberculose/HIV: relação com níveis socioeconômicos em município do sudeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, n. 5, p. 536-541, 2010.

WARREN, R. M., et al. Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin Microbiol.**, v. 40, n.4, p. 1277-1282, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global tuberculosis control, WHO report**
– executive summary. Geneva: WHO, 2013.

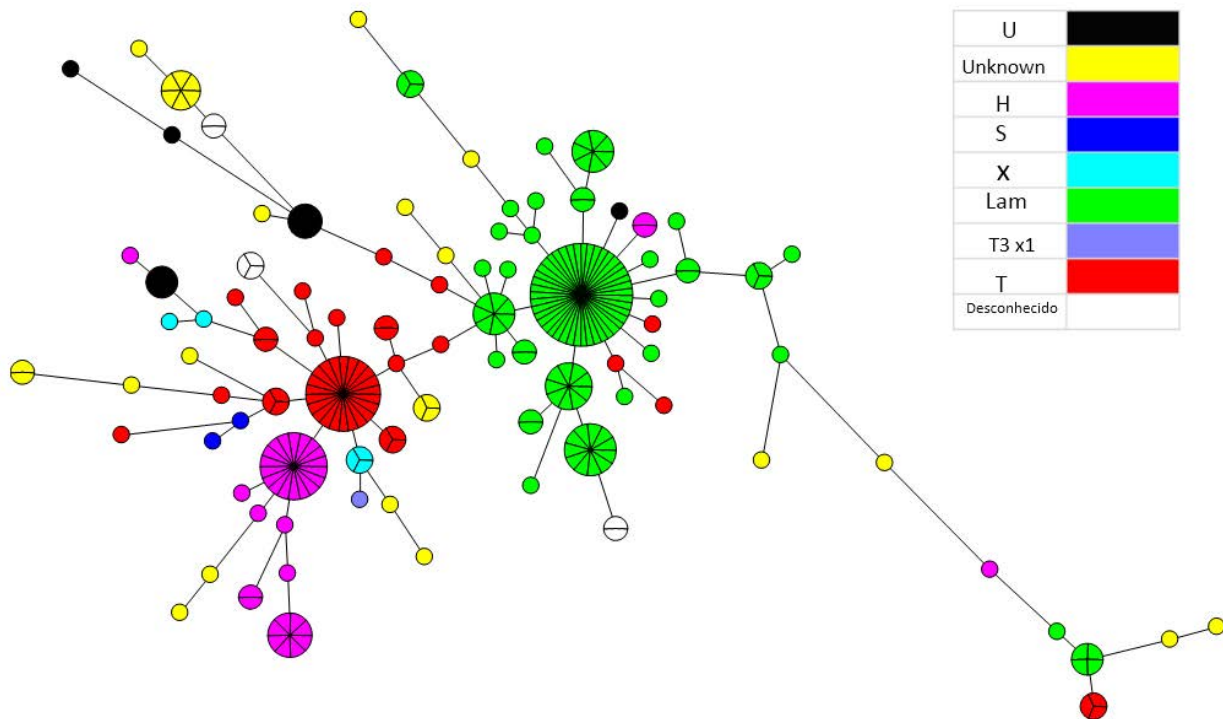


Figura 1. “*Minimum Spanning Tree*” (MST) ilustrando as relações evolucionárias entre os 250 “*spoligotypes*” de *M. tuberculosis* na região Noroeste Paulista.

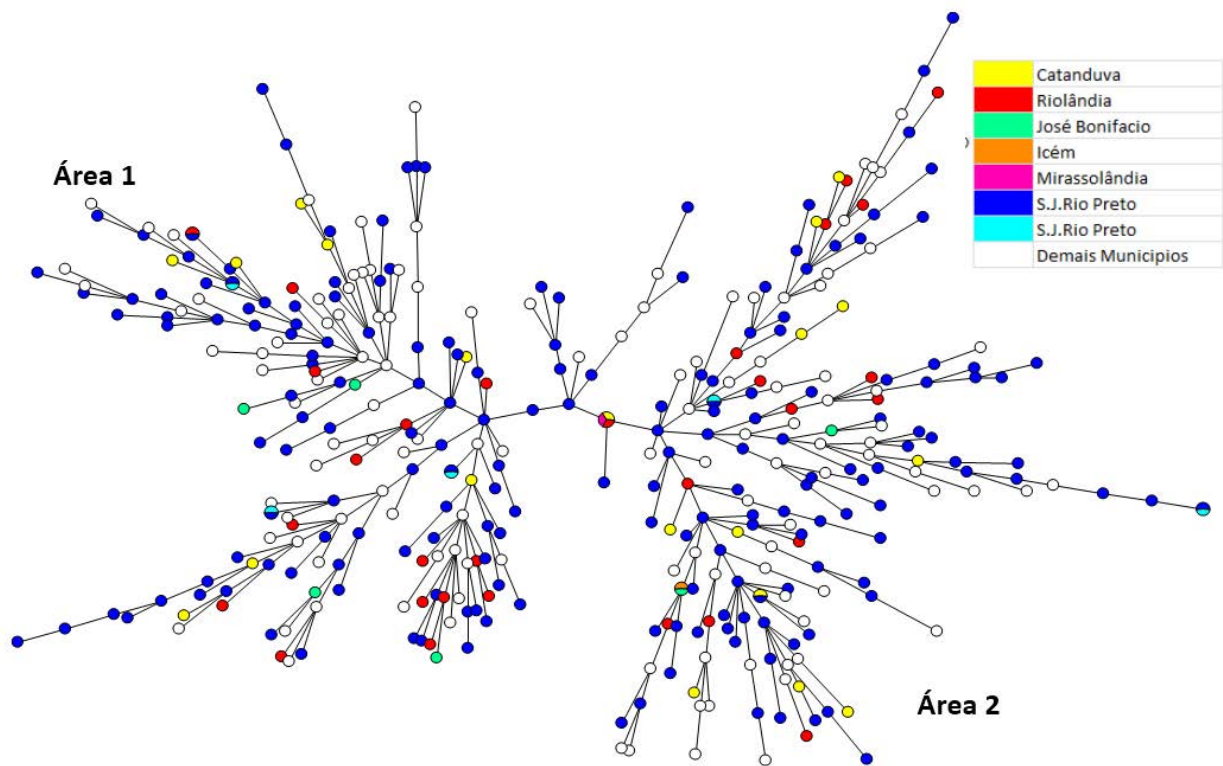


Figura 2. “*Minimum Spanning Tree*” (MST) construída com base nos genótipos dos 377 isolados de *M. tuberculosis* dos municípios da Noroeste Paulista utilizando 14 MIRU-VNTRs.

MIRU-VNTR	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	ETR-B	MTUB 21
Alelo														
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	135	45	21	146	353	5	347	0	122	65	138	106	102	12
2	242	318	79	119	24	24	12	28	81	137	189	72	260	123
3	0	14	109	82	0	52	18	112	159	149	50	104	15	219
4	0	0	116	30	0	76	0	113	8	26	0	53	0	23
5	0	0	36	0	0	112	0	92	7	0	0	30	0	0
6	0	0	5	0	0	93	0	30	0	0	0	5	0	0
7	0	0	0	0	0	9	0	2	0	0	0	6	0	0
8	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0	0
9	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
h	0,46	0,27	0,76	0,7	0,12	0,79	0,15	0,75	0,57	0,68	0,6	0,78	0,45	0,55

Quadro1: Diversidade alélica dos 14 loci MIRU-VNTR avaliados nos 377 isolados de *M. tuberculosis* dos municípios da região Noroeste Paulista. Diversidade alélica (h) definida como: $h = 1 - \sum \chi_i^2$, onde a χ_i é a freqüência do alelo no locus.

V. DISCUSSÃO GERAL

V. DISCUSSÃO GERAL

Nas últimas décadas, produto do esforço de inúmeros pesquisadores do mundo todo, investigações mais intensamente conduzidas acerca da TB e de sua etiologia possibilitaram que houvesse um aumento substancial da compreensão científica das bases moleculares do *Mt*. Estudos evidenciam que as cepas circulantes variam em termos de sua composição genômica e diferem em relação à virulência, distribuição geográfica e imunogenicidade. Revelam, ainda, que as interações entre patógeno e hospedeiro e a manifestação da doença indicam que a variação das cepas do patógeno deva desempenhar papel importante na TB e em seu resultado clínico, embora ainda não se conheça totalmente a extensão do impacto de tal diversidade patogênica (COSCOLLA; GAGNEUX, 2010).

Nos isolados avaliados por *spoligotyping*, este estudo revelou 92 padrões distintos, dos quais as famílias mais numerosas foram a LAM, a T *Family* e a *Haarlem*. Segundo Brudey et al. (2006), essas três são as famílias genotípicas mais frequentes na África, na América Central e do Sul, e na Europa. Entre os outros grupos familiares caracterizados neste estudo, estão o S, o U e o X. Todas essas famílias pertencem à linhagem Euro-Americana e foram descritas, também, em outras partes do mundo (LUIZ et al., 2013; MIRANDA et al., 2011).

No painel de amostras coletadas para o presente estudo, a família LAM foi a mais frequente, e a subfamília LAM 9, a mais comum, já que é prevalente não só em toda a América continental e no Caribe, mas também na Europa e em partes da África (LAZZARINI et al., 2008). Estudo feito com isolados coletados nas cidades do Rio de Janeiro (RJ), de Porto Alegre (RS) e de Belém (PA) confirmou a predominância da família LAM no Brasil, o que, segundo seus autores, refletiria, provavelmente, o fluxo imigratório, para o País, de expressiva população, oriunda do sul da Europa e de partes da África (OELEMANN et al., 2011).

A análise do isolados de *Mt*, por meio do MIRU-VNTR, com 14 *loci* diferentes, mostrou importante poder discriminatório. A maior diversidade alélica foi observada nos MIRUs de *loci* 23, 39 e 40, corroborando dados observados por Noguti et al. (2010). Interessante observar que, em outras populações avaliadas, os MIRUs de *loci* 23 e 39

apresentaram baixo poder discriminatório (Liu et al., 2014). Já os MIRUs de *loci* 10, 16, 26, 27 e 31 mostraram alta diversidade alélica.

O MIRU de *locus* 24, por sua vez, descrito em muitas populações, inclusive na brasileira, como invariável, ou seja, como caracterizado sempre com uma única cópia (KOVALEV et al., 2005; NOGUTI et al., 2010), mostrou-se, no presente estudo, isolado com uma, duas e três cópias, evidenciando, no relógio molecular dos isolados dessa população, ter ocorrido importante mudança, ocasionada, possivelmente, por fatores do ambiente, do hospedeiro e do próprio bacilo, o que deverá ser investigado.

Verificou-se, neste estudo, grande diversidade genética de *Mt*. E em que pese poucos *clusters* terem sido observados, os isolados efetivamente analisados compartilham genótipos de alta similaridade. Tanto na área 1 como na 2, mostra-se indiscutível a presença maçica dos genótipos determinados pelos isolados de São José do Rio Preto. Tal conformação sugere alta mobilidade populacional, o que contribui, sobremaneira, para o aumento da variabilidade genética dos isolados de *Mt* dessa região.

Quando observado os genótipos circulantes na região Noroeste paulista, por meio da associação de uma região específica da cidade de São José do Rio Preto com os Municípios que lhe são próximos, verifica-se que compartilham alta similaridade, o que sugere transmissão recente da TB, nessas áreas.

Analisados pela combinação de *spoligotyping* e de MIRU-VNTR, os isolados de *Mt* da região da Noroeste Paulista forneceram variabilidade genética de satisfatório poder discriminatório, reforçando a necessidade de que seja ampliada a análise para todos os 24 *loci* MIRU-VNTR. Estudos dessa natureza tornam-se, mais e mais importantes para a rastreabilidade das relações entre os isolados, colaborando, desse modo, para a interrupção da cadeia de transmissão e, ainda, para a definição dos genótipos predominantes, responsáveis pela disseminação da doença.

O conhecimento da dinâmica da transmissão da TB vem ao encontro da necessidade de compreender a doença, funcionando como significativa ferramenta para entender, ainda, a variabilidade do agente e, com isso, enfrentar a complexidade da patologia, obtendo um nível adequado de controle, em escala global.

Não menos relevante para a eliminação da TB é a compreensão da resistência de seu agente patogênico aos medicamentos ministrados para tratar a doença. Parte deste estudo evidencia a resistência de cepas do *Mt* às drogas utilizadas no tratamento da doença, em região estratégica do Estado de São Paulo, situada no noroeste paulista, em área de confluência do Estado de São Paulo com o leste do Estado do Mato Grosso do Sul, com o sul do Estado de Goiás e com o sudoeste do Estado de Minas Gerais.

Se comparado a outras partes do Brasil, que apresentam valores mais elevados de resistência das cepas do patógeno às drogas antiTB, o local onde foi realizado este estudo, é de particular importância, por abranger município, cuja sede, São José do Rio Preto, é não apenas cidade de porte médio e quase meio milhão de habitantes, além de capital regional da 8ª Região Administrativa paulista, mas que se destaca, também, como polo médico, industrial e de prestação de serviços (SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, 2013). O município é ainda, polo de prestação de serviços na área da Saúde, para usuários advindos do município, de outros municípios da região e, até mesmo, de outras Unidades da Federação (GAZETTA et al., 2007), além de apresentar elevado coeficiente de infecção por *AIDS*, o que interfere na coinfeção *HIV/TB* (SANTOS et al., 2009).

Devido à localização geográfica desse Município da Alta Araraquarense e devido, ainda, à intensa migração populacional em busca de todo tipo de serviço, especialmente de atendimento médico-hospitalar de referência, medidas de controle precisam ser priorizadas para conter a disseminação de cepas resistentes, especialmente em presídios e hospitais, evitando a propagação dessas estirpes.

Os resultados coletados nesse estudo, referentes ao sexo, à média de idade e à escolaridade dos pacientes infectados, reforçam que a TB atinge mais frequentemente pessoas do sexo masculino, adultas e de baixa escolaridade (FANDINHO et al., 1999; BRITO et al., 2004; COELHO et al., 2012; ROZMAN; SANTO; ROZMAN, 2007; ZAMAN et al., 2005; MICHELETTI et al., 2014; VIEIRA et al., 2007; MENDES et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2001; MARQUES et al., 2010; SOUZA; ANTUNES; GARCIA, 2006; DIAS BAPTISTA et al., 2002; MELO et al., 2003; VENDRAMINI et al., 2010).

A associação HIV/TB representa um desafio tanto para o diagnóstico quanto

para o tratamento da TB e exigem esforços globais no controle da doença (BRASIL 2011; LAWN; ZUMLA, 2011; ZUMLA et al., 2013). O município estudado apresenta altas taxas de co-infecção quando comparado ao país e ao estado (VENDRAMINI et al., 2010), recebendo a classificação de prioritário para a TB. Houve associação de resistência às drogas anti-tuberculose e infecção pelo HIV, fato requer atenção especial e ações de saúde para essa população.

A maior parte dos casos de resistência a medicamentos é desenvolvida por meio de tratamentos irregulares de TB e/ou por abandonos do tratamento. Os resultados deste estudo confirmaram essa premissa, apontando que pacientes com tratamento anterior tiveram associação com a resistência, do mesmo modo como descrito em outros estudos (FAUSTINI; HALL; PERUCCI, 2006; SOUZA; ANTUNES; GARCIA, 2006; HOFFNER et al., 2009; WANG et al., 2012; AL-HAJOJ et al., 2013; MICHELETTI et al., 2014). No entanto, muito embora tanto o alcoolismo, como a dependência de drogas sejam fatores que podem contribuir para o abandono do tratamento e/ou para o tratamento irregular da doença (BRASIL, 2011), assim como a terapia antirretroviral pode sê-lo, por sua interação poder causar intolerância e efeitos tóxicos ao paciente (ZUMLA et al., 2013), fatores como alcoolismo e drogadição não tiveram associação com a resistência antibiótica nos casos aqui analisados.

Embora quase metade dos indivíduos estudados tenha sido submetida a tratamento supervisionado, o fato de ser em sua maioria casos pulmonares, para elucidação diagnóstica, com a baciloscopia positiva e resistência são fatores complicadores para o programa e necessitam de atenção das esferas de vigilância com interferência rápida (WHO, 2011). Tal vigilância mostra-se fundamental, para o monitoramento eficaz do controle e propagação da tuberculose global (BALKIS, 2013) e para redução da transmissão de cepas resistentes (MARAIS et al., 2013).

Apesar de a atenção básica de saúde (Unidade Básica de Saúde) ser o nível ideal para a realização do diagnóstico precoce da doença, a atenção terciária (hospitais), vem sendo a porta de entrada dos doentes com TB e, também, local de risco para a transmissão da doença, o que foi confirmado por este estudo, já que mais da metade dos casos analisados foi diagnosticada ou no nível terciário de atendimento, nos hospitais — nos quais o doente é geralmente diagnosticado em estado grave da

doença — ou nos presídios — instituições fechadas e de alto risco para a transmissibilidade da TB. O perfil *MDR* SM+IHN+PZA+RMP em indivíduo jovem, do sexo feminino, profissional de saúde, que rapidamente foi a óbito, ainda no início do tratamento da doença é preocupante devido ao risco de transmissão e de exposição dessa cepa resistente a outros profissionais e pacientes do hospital em questão.

Para que se diagnostique a TB na atenção básica de saúde, devem as ações de vigilância em saúde ser priorizadas pelos Programas locais de Controle da Tuberculose (BRASIL, 2011), além de ser imperioso que os profissionais envolvidos discutam sobre a necessidade de mais investimento para atender os grupos de maior risco, que apresentem indivíduos com cepas *Mt* resistentes, com *HIV*, com contatos de TB resistentes, ou moradores de rua e pacientes atendidos em hospitais e prisões sem medidas efetivas de controle (KRITSKI, 2010).

Devido à superpopulação carcerária, à baixa circulação de ar, à falta do mínimo de condições sanitárias, à deficiência nutricional, ao comportamento de risco, a exemplo do abuso de álcool, do consumo de drogas ilícitas e da promiscuidade sexual por vezes encontrada, além do contato com outras doenças infecciosas, é reconhecida a maior vulnerabilidade e risco de infecção da população privada de liberdade em relação àquela dos não encarcerados (MARTIN et al., 1994; REYES; CONINX, 1997; LOBACHEVA; ASIKAINEN; GIESECKE, et al., 2007). Curiosamente, os resultados deste estudo apontam que, entre os indivíduos privados de liberdade, a resistência aos antibióticos antiTB foi menor do que aquela encontrada entre os não detentos. De qualquer forma, para minimizar o risco de transmissão da TB em presídios, a OMS preconiza o direcionamento de políticas públicas, de modo que se façam mudanças na organização do serviço, no treinamento dos profissionais e na reorganização do atendimento das penitenciárias.

No presente estudo, encontrou-se uma taxa de 8,9% de resistência a qualquer droga. E, embora a resistência a múltiplos medicamentos tenha sido menos frequente, sabe-se que esses são casos de maior gravidade (PEREIRA, 2012). Os padrões *MDR* e polirresistentes aqui encontrados também foram identificados em outros estudos no Estado (BAPTISTA et al., 2002; ROZMAN; SANTO; ROZMAN, 2007; COELHO et al., 2012).

A ausência de completude das informações de algumas variáveis no Sistema de Notificação –*TBWEB* foi fator que dificultou a análise, embora, a despeito disso, as informações aqui apresentadas sejam valorosas, para a gestão e prevenção de TB resistente não somente na área estudada, mas, ainda, em outras áreas do país.

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

A variabilidade genética observada nos isolados de *Mt* circulantes na região do Noroeste paulista é significativa, quando analisados por *spoligotyping* e por *MIRU-VNTR*.

Os perfis genéticos de *Mt* predominantes na região pertencem às famílias LAM, T *Family* e *Haarlem*, todas da linhagem Euro-Americana.

Ainda que poucos tenham sido os *clusters* observados, os isolados analisados compartilham genótipos com alta similaridade e com presença maciça dos genótipos determinados pelos isolados de São José do Rio Preto. Tal conformação sugere alta mobilidade populacional, o que, por sua vez, contribui, sobremaneira, para o aumento da variabilidade genética dos isolados de *Mt* presentes nessa região.

Em relação aos aspectos sociodemográficos e clínicoepidemiológicos da infecção por espécies do gênero *Mt* e resistência aos antibióticos:

A resistência aos fármacos ministrados no tratamento da TB é mais evidente em pessoas infectadas por *HIV* ou com tratamento anterior de TB. Características como alcoolismo, tabagismo e drogadição não apresentam associação quanto à resistência aos medicamentos. Entre os indivíduos privados de liberdade, a resistência aos antibióticos anti-TB é menor que aquela encontrada entre os não detentos.

VII. REFERÊNCIAS

VII. REFERÊNCIAS

ABE C.; HIRANO K.; TOMIYAMA T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 11, p. 3693-3697, 1999.

ALFRED, N. et al. Optimising *Mycobacterium tuberculosis* detection in resource limited settings. **BMJ Open**, London, v. 4, n. 3, p. e004093, 2014.

AL-HAJJOJ, S. et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance in Saudi Arabia: findings of the first national survey. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 5, p. 2161-2166, 2013.

ALLIX-BÉGUEC, 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*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n.4, p. 1398-1406, 2008.

ALMEIDA, E. A. **Sensibilidade de bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* as drogas antituberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial**. 2009. Tese (Doutorado)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALONSO, M. et al. Epidemiologia molecular em tempo real da tuberculose por genotipagem direta de baciloscopia positiva espécimes clínicos. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50 n. 5, p. 1755-1757, 2012.

ALONSO-RODRIGUEZ, N. et al. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. **BMC Microbiology**, London, v. 8, p. 34, 2008.

ARAÚJO, A. K. et al. Avaliação da resistência de drogas antituberculosas no estado do Ceará no período de 2000-2002. **Revista Brasileira de Análise Clínica**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 15-18, 2005.

BALKIS, A. T. **The Development of a Rapid Diagnostic System for Difficult to Culture Human Pathogens**. 2013. 278 f. Tese (Doutorado)-School of Biomedical Sciences. Faculty of Life and Health Sciences. University of Ulster, 2013.

BAPTISTA, I. M. et al. Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human Immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1147-1152, 2002.

BARBOSA, E. L.; LEVINO, A. Análise da coinfeção TB/HIV como fator de desenvolvimento da tuberculose multidroga resistente: uma revisão sistemática. **Revista Pan-Amazônica de Saude**, Levilândia, v. 4, n. 4, p. 57-66, 2013.

BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 349, n. 12, p. 1149-1156, 2003.

BEER, J. L. et al. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 3, p. 662-669, 2012.

BENTO, J. et al. Métodos diagnósticos em tuberculose. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. 1, p. 145-154, 2011.

BEHR, M. A. et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. **Lancet**, London, v. 353, n. 9151, p. 444-449, 1999.

BORSUK, S. et al. Molecular characterization of *mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. **Microbes Infect**, v. 7, n. 13, p. 1338-1344, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**: Especial Tuberculose, Brasília, DF, v. 43, p. 1-12, mar. 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/23/BE-2012-43-Mar--o---Especial-Tuberculose.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, DF, v. 44, n. 2, p. 1-13, 2013. Disponível em: <<http://www.vigilanciaemsaude.ba.gov.br/sites/default/files/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional Vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 436 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Panorama da Tuberculose no Brasil: Indicadores Epidemiológicos e Operacionais**. Brasília – DF. 2014. 92 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria/MS n.º 1.339/1999. **Regulamento da Previdência Social**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília DF: Ministério da Saúde, 2011. 284 p.

BRITO, R. C. et al. Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 30, p. 425-432, 2004.

BRUDEY, K. et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology**, London, v. 6, p. 23, 2006.

CAMARGO, O. **Desigualdade social**. Brasil Escola. Disponível em:
<<http://www.brasilecola.com/sociologia/classes-sociais.htm>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

CAMPOS, H. Diagnóstico da tuberculose. **Pulmão RJ**, Rio de Janeiro, v.15, n. 2, p. 92-99, 2006.

CARBALLO, M. **The challenge of migration and health**. International Centre for Migration and Health ICMH Feature Articles 2007. Disponível em:
<http://www.icmhd.ch/WebPDF/2007/WHA%20DISTRIBUTION%20ARTICLE%2018_05_2007formatted.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2015.

CAWS, M. et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 4, n. 3, p. e1000034, 2008.

CHOI, G. E. et al. Application of single-nucleotide polymorphism and mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats analyses to clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, Seoul, v. 31, n. 1, p. 37-43, 2011.

COELHO, A. G. V. et al. A study of multidrug-resistant tuberculosis in risk groups in the city of Santos, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** (Impresso), Rio de Janeiro, v. 107, p. 760-766, 2012.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. A. Tuberculose. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 25-26, jul. /dez. 2006.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, London, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

COLL, F. et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Nature Communications**, London, v. 5, p. 4812, 2014.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Identification of species. In: COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M.; YATES, M. D. (Ed.). **Tuberculosis bacteriology**: organization and practice. 2nd ed. Oxford: Butterworth- Heinemann, 1997. p. 69-97.

COMISSÃO DE TUBERCULOSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA PNEUMOLOGIA TISIOLOGIA.; Grupo de Trabalho das Diretrizes para Tuberculose da SBPT2. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

CONDE, M. B.; SOUZA, M. G. R. **Pneumologia e tisiologia**: uma abordagem prática. São Paulo: Atheneu, 2009.

CORREA, P. A.; GÓMEZ, L. M.; ANAYA, J. M. Polimorfismo del TNF- α en autoinmunidad y tuberculosis. **Biomédica**, Bogotá, v. 24, p. 43-51, 2004. Suplemento 1.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX S. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? Drug Discovery Today. **Disease Mechanisms**, Oxford, v. 7, n. 1, p. e43–e59, 2010.

COSCOLLA, M et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 19, n. 6, p. 969-976, 2013.

COWAN, A. et al. Omeprazole-induced slowing of gastrointestinal transit in mice can be countered with tegaserod. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 517, n.1-2, p. 127-131, 2005.

DAVIES, P. D. O.; GORDON, S. B.; DAVIES, G. (Ed.). **Clinical Tuberculosis**. 5th ed. New York: CRC Press; 2014. Disponível em:

<<https://app.box.com/s/naah0lr0u4fuszdq8kzkg2y24ri158yi>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

DEMAY, C. et al. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. Infection, **Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 755-766, 2012.

DEVALLOIS, A. et al. Molecular typing of mycobacteria. **Pathologie Biologie**, Paris, v. 46, n. 8, p. 625-636, 1998.

DIAZ DE QUIJANO, E. et al. Influence of social inequality, social unrest and extreme poverty on tuberculosis morbidity in the City of Barcelona. Revista Española de Salud Pública, Madrid, v. 75, n. 6, p. 517-527, 2001.

DONG, H. et al. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Tibetans in Tibet, China. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e33904, 2012.

DOU, H. Y. et al. Associations of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes with different ethnic and migratory populations in Taiwan. *Infection*, **Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 323-330, 2008.

DOU, H. Y.; HUANG, S. C.; SU, I. J. Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan: A Model for Strain Evolution Linked to Population Migration. **International Journal of Evolutionary Biology**, London, 2011, p. 937434, 2011.

DUARTE, R. et al. Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, Lisboa, v. 16, n. 4, p. 559-572, 2010.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.

FANDINHO, F. et al. Drug resistance patterns among hospitalized tuberculous patients in Rio de Janeiro, Brazil, 1993-1994. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 4, p. 543-547, 1999.

FARAH, M. G. et al. Long-term risk of tuberculosis among immigrants in Norway. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 34, n. 5, p. 1005-1011, 2005.

FARIAS, S. N. P. et al. Integralidade no cuidado: estudo da qualidade de vida dos usuários com tuberculose. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 749-754, 2013.

FAUSTINI, A.; HALL, A. J.; PERUCCI, C. A. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. **Thorax**, London, v. 61, n. 2, p. 158-163, 2006.

FERDINAND, S. et al. Data mining of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validates the clonal structure of spoligotyping-defined families. **Research Microbiology**, Paris, v. 155, n. 8, p. 647-654, 2004.

FERNANDO, S.L.; BRITTON, W. J. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 84, n. 2, p. 125-137, 2006.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 153, n. 12, p. 1135-1141, 2001.

FRENCH, C. E. et al. The association between HIV and antituberculosis drug resistance. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 32, n. 3, p. 718-725, 2008.

FROTHINGHAM, R.; MEEKER-O'CONNELL, W. A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. **Microbiology**, New York, v. 144, p. 1189-1196, 1998. Parte 5.

GAGNEUX, S. et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 103, n. 8, p. 2869-2873, 2006.

GARCIA DE VIEDMA, D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 349-359, 2003.

GAZETTA, C. E. et al. Estudo descritivo sobre a implantação da estratégia de tratamento de curta duração diretamente observado no controle da tuberculose em São José do Rio Preto e seus impactos (1998-2003). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 192-198, 2007.

GENCER, B.; SHINNICK, T. M. Molecular Genotyping os *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. **American Journal of Infectious Diseases**, New York, v. 1, n. 1, p. 5-11, 2005.

GIAMPAGLIA, C. M. et al. Multicentre evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 11, n. 9, p. 986-991, 2007.

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**, Washington, v. 46, n. 4, p. 1259-1267, 2008.

GLICKMAN, M. S; JACOBS JUNIOR, W. R. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: **Dawn a discipline**. Cell, Cambridge, v. 104, n. 4, p. 477-485, 2001.

GOLDSTEIN, B. P. Resistance to rifampicin: a review. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 67, n. 9, p. 625-630, 2014.

GONÇALVES, B. D. **Perfil epidemiológico da exposição à Tuberculose em um Hospital Universitário: uma proposta de monitoramento da doença**. 2009. Dissertação (Mestrado)-Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

HÄNSCHEID, T. The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Coccidia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 6, p. 520-521, 2008.

HILL, A. V. The immunogenetics of human infectious diseases. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 16, p. 593-617, 1998.

HOFFNER et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002–07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. **Lancet**, London, v.373, p. 1861-1873, 2009.

HOMOLKA, S. et al. High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. **BMC Microbiology**, London, v. 8, p. 103, 2008.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

IANNI, A. M. Z.; QUITÉRIO, L. A. D. Promoção da saúde e meio ambiente no Programa de Saúde da Família: os casos da Barra Funda e Jardim Rio Claro, município de São Paulo. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 81-91, 2004.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2010. Cidades. IBGE, 2014. Disponível em: < <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=354980>>. Acesso em: 15 out. 2014.

INSTITUT PASTEUR DE LA GUADELOUPE. **Welcome to SITVIT**. 2014. Disponível em: <<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>>. Acesso em: 31 nov. 2014.

KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 4, p. 907-914, 1997.

KENT, P. T.; KUBICA, G. P. Identification test techniques. In: PUBLIC HEALTH. **Mycobacteriology**: a guide for the level III laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1985.

KÖSER, C. U. et al. Drug-resistance mechanisms and tuberculosis drugs. **Lancet**, London, v. 385, n. 9965, p. 305-307, 2015. Disponível em: <Comment. Drug-resistance mechanisms and tuberculosis drugs>. Acesso em: 03/03/2015.

KOVALEV, S. Y. et al. Genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 9, n. 7, jul. p. 746-752, 2005.

KREMER, K. et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2607-2618, 1999.

KREMER, K. et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 11, p. 5628-5638, 2005b.

KREMER, K. et al. Use variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 1, p. 314-320, 2005a.

KRITSKI, A. L. Emergência de tuberculose resistente: renovado desafio. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 157-158, 2010.

KRITSKI, A. L. et al. **Tuberculose**: do ambulatório à enfermaria. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.

KRUUNER, A.; YATES, M. D.; DROBNIOWSKI, F. A. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *M. tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 811-818, 2006.

LAFAIETE, R. S.; SOUZA, F. B. A.; MOTTA, M. C. S. O atraso no diagnóstico da tuberculose. **Journal of Research Fundamental Care On Line**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 3, p. 174-180, 2013.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. *Lancet*, London, v. 378, p. 57-72, 2011.

LAZARINI, L. C. O. et al. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage That Is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 12, p. 3891–3902 Vol. 45, No. 12, 2007.

LAZZARINI, L. C. et al. RDRio *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitary pulmonary disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 7, p. 2175-2183. 2008.

LEW, J. M. et al. TubercuList - 10 years after. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, Edinburgh, v. 91, n. 1, p. 1-7, 2011.

LIMA, S. S. S. et al. Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, DF, v. 34, n. 12, p. 1056-1062, 2008.

LINDOSO, A. A. B, et al. Profile of tuberculosis patients progressing to death, city of São Paulo, Brazil, 2002. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 641-648, 2008.

LIU, J. et al. First Insight into the Genotypic Diversity of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Gansu. Province, China. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. e99357, 2014.

LOBACHEVA, T.; ASIKAINEN, T.; GIESECKE, J. Risk factors for developing tuberculosis in remand prisons in St. Petersburg, Russia – a case-control study. **European Journal of Epidemiology**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 121-127, 2007.

LOPES, R. H. et al. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose pulmonar: uma revisão integrativa. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 37, n. 3, p. 661-671, 2013.

LUIZ, R. dos S. et al. Genotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 17, n. 3, p. 338-345, maio./jun. 2013.

MAES, M. et al. 24-locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, Edinburgh, v. 88, n. 5, p. 490-494, 2008.

MALASPINA, A. C. **Genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis* utilizando RFLP e Spoligotyping em associação com MIRU para avaliar a epidemiologia molecular da tuberculose no município de Araraquara-SP**. 2009. 97 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Araraquara, 2009.

MARAIS, B. J. et al. Epidemic spread of multidrug-resistant tuberculosis in Johannesburg, South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 6, p. 1818-1825, 2013.

MARQUES, M. et al. Perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* no estado de Mato Grosso do Sul, 2000-2006. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 224-231, 2010.

MARTIN, V. et al. Case finding of pulmonary tuberculosis on admission to a penitentiary center. **Tuberculosis and Lung Disease**, Edinburgh, v. 75, n. 1, p. 49-53, 1994.

MARTINEZ, V. N. **Equidade em saúde**: o caso da tuberculose na comunidade de bolivianos no município de São Paulo. 2010. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARTINS, M. C. et al. Population structure and circulating genotypes of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in São Paulo state, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 14, p. 39-45, 2013.

MATHEMA, B. et al. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 4, p. 658-685, 2006.

MAULÉN, N. P. [Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*]. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v. 139, n. 12, p. 1605-1610, 2011.

MAZARS, E. et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 4, p. 1901-1906, 2001.

MELO, F. A. F. et al. Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 27-34, jan./fev. 2003.

MENDES, J. M. et al. Resistência a drogas em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de amostras de escarro de pacientes ambulatoriais sintomáticos – Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 33, n. 5, p. 579-582, 2007.

MENDES, N. H. **Genotipagem por Spoligotyping e MIRU de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado)-Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

MENDES, N. H. et al. 2011. Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil. **BMC Research Notes**, London, v. 4, n. 269, p.1-8, 2011, <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/269>.

MICHELETTI, V. C. D. et al. Tuberculose resistente em pacientes incluídos no segundo inquérito Nacional de Resistência aos fármacos Antituberculose realizado em Porto Alegre, Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 155-163, mar./abr. 2014.

MILLARD, J.; UGARTE-GIL, C.; MOORE, D. A. Multidrug resistant tuberculosis. **BMJ (Clinical research ed.)**, London, v. 350, p. h882, 2015.

MILLER, N. et al. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear- positive respiratory specimens and BacT/Alert MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 11, p. 4143-4147, 2002.

MIRANDA, S. S. de. et al. Spoligotyping of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p. 267-273, maio. 2011.

MONTEIRO, S.; RODRIGUES, V. A qualidade de vida da pessoa com tuberculose em regime de toma observada. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. S2, p. 523-530, 2011.

MONTENEGRO, L. M. L. **Avaliação da associação de polimorfismos de base única em região promotora de genes das citocinas fator de necrose tumoral alpha (TNF-alfa) e Interleucina-10 (IL-10) com a susceptibilidade ou resistência a tuberculose pulmonar.** 2013. 110 f. Tese (Doutorado)-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2013.

MOSTRÖM, P. et al. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 694-704, 2002.

MOTTA, M. C, et al. Access to tuberculosis diagnosis in Itaboraí city, Rio de Janeiro, Brazil: the patient's point of view. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 13, n. 9, p. 1137-1141, 2009.

MÜLLER, B. et al. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 29, n. 3, p. 160-169, 2013.

NOGUTI, E. N. et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Parana in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 779-785, 2010.

OBLITAS, Y. M. et al. Inequidad en personas que padecen de Tuberculosis. Estudio piloto en tres Centros de Salud de Lima (Perú). **Index de Enfermeria**, Granada, v. 17, n. 2, p. 111-115, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4321/S1132-12962008000200007>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

OELEMANN, M. C. et al. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Community Health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.102, n. 4, p.455-462, 2007a.

OELEMANN, M. C. et al. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with

spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 691-697, 2007b.

OELEMANN, M. C. et. al. The Forest behind the Tree: Phylogenetic Exploration of a Dominant *Mycobacterium tuberculosis* Strain Lineage from a High Tuberculosis Burden Country. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. e18256, 2011.

OLIVEIRA, L. S. S. As doenças negligenciadas e nós. **Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 40-41, 2009. Editorial.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **O apoio à implementação da estratégia de tratamento diretamente supervisionado (DOTS) para o combate à Tuberculose**. Brasília, DF: Organização Pan-Americana da Saúde, 2010.

PANDOLFI, J. R. et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n.3, p. 251-257, 2007.

PARRISH, N. M.; CARROL, K. C. Role of the Clinical Mycobacteriology Laboratory in Diagnosis and Management of Tuberculosis in Low-Prevalence Settings. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 3, p. 772-776, 2011.

PASCHUALINOTO, A. L.; FERRO E SILVA, R. R.; CARMO, A. M. S. Padrões de resistência a fármacos em pacientes com tuberculose pulmonar IAL Santo André. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 10, n. 31, p. 67-70, 2012.

PEREIRA, A. M. et al. Análise molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes em Goiânia, Goiás, por meio de RFLP-Is6110 e do loci MIRU-VNTR. **Revista de Patologia Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 3, p. 275-288, jul./set. 2013.

PEREIRA, A. M. **Georreferenciamento e Genotipagem de Mycobacterium**

tuberculosis isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia – GO pelo método de MIRU-VNTR. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

PFYFFER, G. E.; PALICOVA, F. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: VERSALOVIC, J. (Ed.) et al. **Manual of clinical microbiology**. 10th ed. Washington: ASM Press, 2011. p. 472–502.

PITONDO-SILVA, A. et al. Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 42-48, 2013. doi: 10.1016/j.mimet.2013.01.020. Epub 2013 Feb 10.

PONCE, M. A. Z. et al. Diagnóstico da tuberculose: desempenho do primeiro serviço de saúde procurado em São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 5, p. 945-954, maio. 2013.

REED, M. B. et al. Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1119-1128, 2009.

REYES, H.; CONINX, R. Pitfalls of tuberculosis programmes in prisons. **BMJ British Medical Journal**, London, v. 315, n. 7120, p. 1447-1450, 1997.

RODRIGUES JR, A. L.; RUFFINO-NETTO, A.; CASTILHO, E. A. Distribuição espacial da co-infecção *M. tuberculosis*/HIV no Estado de São Paulo, 1991-2001. **Revista de Saúde Publica**, São Paulo v. 40, n. 2, p. 265-270, 2006.

ROSSETTI, M. L. Avanços no diagnóstico da tuberculose. In: WORKSHOP DA REDE TB, 2., 2011, Rio de Janeiro. **Trabalhos apresentados...** Rio de Janeiro: Universidade Gama Filho, 2011. Disponível em:

<http://www.redetb.org/attachments/1537_diagn%C3%B3stico-Maria-Lucia_Rossetti.pdf>. Acesso em: 10 out. 2014.

ROZMAN, L. M.; SANTO, A. H.; ROZMAN, M. A. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas em pacientes HIV+ em cinco municípios da Baixada Santista, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, p. 1051-1059, 2007.

RUFINNO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 51-58, 2002.

RUSCH-GERDS, S. et al. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobial. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 688-692, 2006.

SAID, H. M. et al. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 12, p. 369, 2012.

SALFINGER, M. MORRIS, A. J. The role of the microbiology laboratory in diagnosing mycobacterial diseases. **American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, v. 101, n. 4 Suppl 1, p. S6-13, 1994.

SÁNCHEZ, M. et al. Trabajadores de la salud y sus significados en torno a la adherencia al tratamiento de la tuberculosis. **Enfermería Global**, Murcia, v. 12, n. 31, p. 86-108, 2013.

SANTOS, F. L. A. et al. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 33, n. 1, p. 37-47, 2012.

SANTOS, A. C. B. et al. *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**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 156-165, 2013.

SANTOS, L. C.; KIPNIS, A. P. J.; KIPINIS, A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 1-15, jan./abr. 2007.

SANTOS, M. L. S. G. et al. A dimensão epidemiológica da coinfeção TB/HIV. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 5, p. 683-688, 2009.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO. Secretaria Municipal de Planejamento e Gestão Estratégica Ciência, Tecnologia e Inovação. **Conjuntura Econômica de São José do Rio Preto 2013**. 28. ed. São José do Rio Preto: Secretaria Municipal de Planejamento e Gestão Estratégica, 2013.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO. Secretaria Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto 2009. **Controle de tuberculose ARE/VE. Situação da tuberculose em São José do Rio Preto**. São José do Rio Preto: Secretaria Municipal de Saúde e Higiene de São José do Rio Preto, 2009.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. TB Divisão de Controle da Tuberculose 2013. **Relatório de oficina realizada nos dias 17 e 18 de junho/2013 com os GVEs e municípios para discussão dos casos de tuberculose ocorridos em profissionais de saúde e da educação**. Disponível em:

<file:///C:/Users/30062/Downloads/relatorio_ofic_casos_1718junho%20(1).%20TB,%202013.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2014.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saude. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Divisão de controle da Tuberculose. CVE-SES/SP. **TB em**

números. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2012. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_tb.html>. Acesso em: 15 abr. 2014.

SÃO PAULO. Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, CVE/Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Divisão de Tuberculose 2002. **Manual de orientação para coleta de amostras de escarro e outros materiais para baciloscopia e cultura para diagnóstico e controle da tuberculose**. São Paulo: Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, 2002. 26 p.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica, “Prof. Alexandre Vranjac”. Divisão de Tuberculose. **TBWEB versão 1.6**. São Paulo: CVE, 2008. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/DvTBC_TBWEB_2008.pdf>. Acesso em: 15 out. 2014.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica, “Prof. Alexandre Vranjac”. Divisão de Tuberculose. Sala de Situação de Tuberculose. São Paulo: CVE, 2015. Disponível em: <http://www.tuberculose.saude.sp.gov.br/Carta/carta.php> . Acesso em: 22 abr. 2015.

SÃO PAULO. Divisão de Tuberculose. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil. Mudanças no tratamento da tuberculose. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 197-199, 2010.

SILVA, S. A. Bolivianos em São Paulo: entre o sonho e a realidade. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 20, n. 57, p. 157-170, 2006.

SMALL, P. M. et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 330, n. 24, p. 1703-1709, 1994.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA . II Consenso Brasileiro de tuberculose. Diretrizes brasileiras para tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 30, p. S1-S55, 2004. Suplemento 1.

SOLA, C. et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRU-VNTR's: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p.125-133, 2003.

SOLA, C. et al. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 3, p. 390-396, 2001.

SOUZA, M. B. de.; ANTUNES, C. M. F.; GARCIA, G. F. Perfil de sensibilidade e fatores de risco associados à resistência do *Mycobacterium tuberculosis*, em centro de referência de doenças infecto-contagiosas de Minas Gerais. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 430-437, 2006.

STEIN, C. M. Genetic epidemiology of tuberculosis susceptibility: impact of study design. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e1001189, 2011.

STEINGART, K. R. et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 6, n. 9, p. 570-581, 2006.

SUCHINDRAN, S.; BROUWER, E. S.; VAN RIE, A. Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 5, p. e5561, 2009.

SUN, J. R. et al. Using a multiplex polymerase chain reaction for the identification of Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 28, n. 1, p. 105-107, 2008.

SUPPLY, P. et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 12, p. 4498-4510, 2006.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 3, p.762-771, 2000.

SUPPLY, P. et al. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 991-1003, 1997.

[TALIP, B. A.](#) et al. An Update on Global Tuberculosis (TB). **Infectious Diseases (Auckl)**, Auckland, v. 6, p. 39-50, 2013.

[TEIXEIRA, L.](#) et al. Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 5, n. 4, p. 321-328, 2001.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose:problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 323-324, 2007.

THIERRY, D. et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 12, p. 2668-2673, 1990.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VALCHEVA, V. et al. Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3005-3011, 2008.

VALENÇA, M. S. et al. Improving tuberculosis control through the partnership between university and the health system. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n. 4, p. 491-495, 2012.

VAN EMBDEN, J. D. A. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.

VAN INGEN, J. et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 18, n. 4, p. 653-655, 2012.

VENDRAMINI, S. H. F. et al. Análise espacial da co-infecção tuberculose/HIV: relação com níveis socioeconômicos em município do sudeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, n. 5, p. 536-541, 2010.

VIEIRA, R. C. A. et al. Perfil epidemiológico dos casos de tuberculose multirresistente do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 56-65, 2007.

VIEIRA, D. E. O.; GOMES, M. Efeitos adversos no tratamento da tuberculose: experiência em serviço ambulatorial de um hospital-escola na cidade de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 34, n. 12, p. 1049-1055, 2008.

VILLA, T. S. et al. Satisfação do usuário com os serviços de atenção à tuberculose em Ribeirão Preto, 2008. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 234-243, 2012.

VON GROLL, A. et al. Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 4, p. e10191, 2010.

WAINE, L. G.; KUBICA, G. P. The mycobacteria. In: SNEATH, P. H. A.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 8. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986. p.1435-1437.

WANG, X. et al. Drug-resistant tuberculosis in Zhejiang Province, China, 1999–2008. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 18, n. 3, p. 496-498, mar. 2012. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/3/11-0760_article. Acesso em: 15 out 2014.

WARREN, R. M., et al. Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin Microbiol.**, v. 40, n.4, p. 1277-1282, 2002.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Tuberculosis – Epidemiology, Population Surveillance. Data Interpretation, Statistical. **WHO**. Geneva: WHO, 2014.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Global Tuberculosis Report 2014. **WHO**. Geneva: WHO, 2014. 171 p.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Library Cataloguing-in-Publication Data**. Global tuberculosis report 2013. Genova: WHO, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global tuberculosis control**. Geneva: WHO, 2012. 89 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Tuberculosis Control**. Geneva: WHO, 2010. 218 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global tuberculosis control**. WHO Report on the tuberculosis epidemic. Tuberculosis (TB) annual report-dots (directly observed treatment, short-course) – a breakthrough in tb control. Geneva: WHO, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global tuberculosis control**. WHO Report. Geneva: WHO, 2011. 258p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement. Geneva: WHO, 2011. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501613_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 14 abr. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global Tuberculosis Control: epidemiology, strategy, financing**: WHO Report. Geneva: WHO, 2009. 314 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning Financing**, Geneva: WHO, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for implementing collaborative TB and HIV programme activities**. World Health Organization Stop TB. Department and Department of HIV/AIDS, 2003. Geneva: WHO, 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO expert special programme on AIDS**. Geneva: WHO, 1987.

[ZAMAN, K.](#) et al. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in selected urban and rural areas in Bangladesh. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v. 37, n. 1, p. 21-26, 2005.

ZUMLA, A. et al. Tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 368, n. 8, p. 745-755, 2013.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
 Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
 Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
 Fone: 3068-2859 e-mail: cepial@ial.sp.gov.br



São Paulo, 25 de novembro de 2011.

Protocolo: **079/2011**
 Registro CEPIAL nº 023/2011 de 24/08/11
 1º Parecer – Protocolo 053/2011 de 21/09/11
 2º Parecer - 0Protocolo 059/2011 de 25/10/11

Projeto de Pesquisa: “Diversidade genética do *Mycobacterium tuberculosis* na região noroeste paulista”.

Pesquisador Responsável: Heloisa da Silveira Paro Pedro

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião de novembro de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX, 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador
 2ª via - CEPIAL
 LMT/dvmp