

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

“ESTUDO DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM
PACIENTES DE ARARAQUARA-SP, NO PERÍODO DE
2002 À 2006”

Adolfo Carlos Barreto Santos

ARARAQUARA - SP
Fevereiro/2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

“ESTUDO DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM
PACIENTES DE ARARAQUARA-SP , NO PERÍODO DE
2002 À 2006”

Adolfo Carlos Barreto Santos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite

Co-orientador: Prof. Dr. José Rodrigo Cláudio Pandolfi

Dissertação de mestrado
apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas – UNESP
– Araraquara-SP, para obtenção
do título de Mestre em Biociências
e Biotecnologia aplicada à
Farmácia.

ARARAQUARA - SP

Fevereiro/2009

DEDICO

À minha mãe, Maria Adir,
Por todo o apoio e dedicação por todos esses anos,
Pela confiança em mim depositada,
Pelo incentivo ao conhecimento,
Por comemorar as vitórias e entender as derrotas junto comigo,
Por agüentar minha ausência,
Pelo seu amor de MÃE.

Ao meu pai, Roque,
Pelo apoio e incentivo ao meu desenvolvimento,
Pela atenção e compreensão,
Pelo seu jeito particular de amar.

A minha orientadora Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite,
Pela sua orientação em todo este trabalho,
Por sua amizade e paciência,
Por sua preocupação comigo e todos os seus orientados,
Pelo ombro amigo sempre disposto a ajudar e
Pelo seu jeito de ser e sua maneira única de formar PESSOAS.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente...

Ao Prof. Dr. José Rodrigo Cláudio Pandolfi, meu co-orientador e principalmente meu amigo que confiando no meu potencial me trouxe para a pesquisa principalmente para o Lab. de Micobactérias;

Ao amigo Fernando Rogério Pavan, pelo companheirismo e amizade bastante sinceros que construímos nesse período;

À amiga Karina Andrade de Prince, que tive a alegria de conviver desde a minha chegada à Araraquara sendo sempre companheira, amiga e fiel;

À amiga Ana Carolina Malaspina, pela amizade, pelas tardes animadas no SESA e por todos os momentos agradáveis que passamos juntos;

À Dra. Daisy Nakamura Sato pela sua amizade e apoio científico durante todo esse tempo;

À minha prima Ana Carolina Correa Refinetti, por sempre estar ao meu lado, pelas longas conversas diárias ao telefone sempre me apoiando, me entendendo e sempre presente mesmo distante;

Aos amigos Gustavo Monanzi e Carlos Eduardo Brantis pelas conversas rápidas no corredor e grande amizade conquistada;

Ao amigo Marcelo Miyata por suas perguntas que me fizeram pensar e por sua amizade;

À amiga Natália Mendes que se fez presente no fim deste trabalho me ajudando muito para este fechamento e pela amizade incondicional;

Aos amigos do laboratório, Paulinho, Cleso, Walclécio, Soraya, Faber, Livia, Carol Paçoca, André e Márcio, pela ajuda e apoio técnico;

Às amigas Sílvia, Marisa, Ednéia e Bernadete, pela amizade e apoio laboratorial e administrativo;

Ao Prof. Dr. Sandro Valentini, e demais alunos do Laboratório de Biomol pelo uso de seus equipamentos no início deste trabalho;

À Profa. Dra. Eliana Varanda por todos esses anos de convívio e principalmente pela sua participação na minha banca de qualificação com suas idéias que foram bem recebidas e devidamente acatadas.

À Profa. Dra. Maria Helena Saad, por ter me recebido em seu laboratório no início da minha carreira de pesquisador, ajudando e incentivando sempre. Obrigado pela sua presença em minha banca de qualificação com suas ótimas idéias para o crescimento deste trabalho.

Aos meus professores que com seu conhecimento foram fundamentais para meu crescimento intelectual;

À amiga Profa. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso, sempre disposta a dividir seu conhecimento comigo e com todos, muito obrigado pela amizade e confiança;

Às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação, Cláudia, Sônia e Laura pela amizade e profissionalismo;

Às amigas do SESA, Brunilde, Rosângela, Leo, Elô e demais funcionárias que ajudaram na realização deste trabalho;

Aos amigos Ronaldo, Marcela, Márcio, Juliana, Norton, Jonathas, Felipe Leiria, Felipe Padilha, Tunico, Fabiana Mattos, Letícia, Mônica, André e Carlos Eduardo que mesmo distante estiveram sempre presente me incentivando e apoiando;

Aos meus padrinhos e demais tios e primos pelo orgulho e incentivo aos meus estudos;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro dado a este projeto (PROCESSO N.: 2005/59459-6);

Ao CNPq pela bolsa de Mestrado concedida.

*“A vida não é um corredor reto e tranqüilo que
nós percorremos livres e sem empecílhos,
mas um labirinto de passagens,
pelas quais nós devemos procurar nosso
caminho, perdidos e confusos, de vez em quando
presos em um beco sem saída.*

*Porém, se tivermos fé,
uma porta sempre será aberta para nós,
não talvez aquela sobre a qual
nós mesmos nunca pensamos,
mas aquela que definitivamente
se revelará boa para nós.”*

A.J. Cronín

Quem mexeu no meu queijo? (1998)

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Resultado do perfil genético obtido através da técnica do PRA dos isolados que não foram positivos através da identificação molecular.....	43
Tabela 02	Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles que não apresentaram IS6110.....	45
Tabela 03	Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2002.....	46
Tabela 04	Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2003.....	47
Tabela 05	Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2004.....	48
Tabela 06	Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2005.....	49
Tabela 07	Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2006.....	50
Tabela 08	Relação entre Número de pacientes com tuberculose pulmonar, cultura positiva e Genotipagem	51
Tabela 09	Distribuição dos 115 pacientes portadores de tuberculose, segundo características demográficas.....	55
Tabela 10	Distribuição dos 115 pacientes portadores de tuberculose, segundo características clínicas e laboratoriais.....	56
Tabela 11	Distribuição dos 115 pacientes portadores de tuberculose, segundo características epidemiológicas adicionais.....	57
Tabela 12	Correlação entre os isolados de <i>M. tuberculosis</i> pertencentes a grupos genéticos definidos pelo MIRU com os dados epidemiológicas identificadas entre os 29 pacientes infectados por estas cepas.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Esquemas de tratamento para pacientes portadores de Tuberculose contendo tempo de tratamento, posologia e indicação para cada estágio da doença.....	18
Quadro 02	Número total de pacientes atendidos no SESA separados por ano, tipo de tuberculose apresentada, cultura e baciloscopia positivas.....	28
Quadro 03	Número da amostra bacteriana segundo o ano de isolamento.....	29
Quadro 04	Condição de amplificação dos isolados submetidos a PCR de identificação para <i>M. tuberculosis</i>	31
Quadro 05	Condição de amplificação dos isolados submetidos a PCR de identificação para micobactérias.....	33
Quadro 06	Desenho das seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores dos 12 loci de MIRU estudados.....	35
Quadro 07	Condição de amplificação dos isolados submetidos a PCR para realização da técnica de MIRU.....	36
Quadro 08	Correlação entre os tamanhos em pb dos amplificados e os alelos de MIRU.....	38
Quadro 09	Distribuição de isolados dentro dos grupos clonais com similaridade igual ou superior a 94%, incluindo os isolados agrupados com 100% de similaridade.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Fotografia do gel de agarose a 1% na confirmação molecular das cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores INS1 e INS2 a apresentando um fragmento de 245pb, dois marcadores de peso molecular (50pb e 100pb) e controle negativo (C-).....	40
Figura 02	Foto do gel de agarose a 1% com o produto da amplificação do gene hsp65 apresentando um fragmento de 439 pares de base(pb) acompanhado do marcador molecular de 100pb.....	42
Figura 03	Fotografia do gel de agarose a 4% da digestão com as enzimas de restrição <i>BstEII</i> e <i>HaeIII</i> do produto amplificado obtendo perfis eletroforéticos das micobactérias empregando a técnica do PRA. Para os isolados 1251, 1370, 6530 e 3884 foi obtido o seguinte perfil eletroforético na enzima de restrição <i>BstEII</i> – (235-120-85) e na <i>HaeIII</i> – (150-130-70), no isolado 7496 foi obtido na digestão com a enzima <i>BstEII</i> – (235-120-100) e <i>HaeIII</i> – (125-105-0), no isolado 6495 foi obtido o perfil na enzima de restrição <i>BstEII</i> – (235-120-100) e <i>HaeIII</i> – (160-105-60) e no isolado 2923 foi obtido o perfil na enzima de restrição <i>BstEII</i> – (440-0-0) e <i>HaeIII</i> – (160-145-60).....	44
Figura 04	Dendrograma produzido com os resultados obtidos pela técnica de MIRU onde se observa a formação de 12 grupos genéticos.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

®.....	MARCA REGISTRADA
µL.....	MICROLITO
µm.....	MICROMETROS
BAAR.....	BACILO ÁLCOOL ÁCIDO RESISTENTE
BK.....	BACILOSCOPIA (BACILO DE KOCH)
Cont.....	CONTATO
Cult.....	CULTURA
DNA.....	DEOXYRIBONUCLEIC ACID
EMB.....	ETAMBUTOL
F.....	FOWARD
HIV.....	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
Hsp.....	HEAT SHOCK PROTEIN
INH.....	ISONIAZIDA
IR.....	ESQUEMA I RETRATAMENTO
/S.....	SEQÜÊNCIA DE INSERÇÃO
kDa.....	QUILODALTONS
LJ.....	LÖWESTEIN JENSEN
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR-TB.....	TUBERCULOSE MULTI-DROGA RESISTENTE
MIRU.....	MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITIS
mL.....	MILILITROS
N/A.....	NÃO HOUE AMPLIFICAÇÃO
Nº.....	NÚMERO
°C.....	GRAUS CELSIUS
OMS.....	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
PAST.....	PALEONTOLOGICAL STATISTICS
Pb.....	PARES DE BASE
PCR.....	POLYMERASE CHAIN REACTION
PPD.....	DERIVADO DE PROTEÍNA PURIFICADA (TESTE INTRADÉRMICO)
PRA.....	RESTRICTION ENZYME PATTERN ANALYSES
PZA.....	PIRAZINAMIDA
R.....	REVERSE
RFLP.....	RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM
RIF.....	RIFAMPICINA
SESA.....	SERVIÇO ESPECIAL DE SAÚDE DE ARARAQUARA
SINAN	SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO
SM.....	ESTREPTOMICINA
TE.....	TAMPÃO TRIS + EDTA
UNESP.....	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
VNTR.....	VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS.....	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Tipo de Estudo.....	27
3.2	Isolados de <i>M. tuberculosis</i>	27
3.3	Técnicas Moleculares.....	30
3.3.1	Reativação e confirmação de pureza da suspensão bacteriana.....	30
3.3.2	Confirmação da espécie <i>M. tuberculosis</i> através da técnica de PCR.....	30
3.3.3	Técnica do PRA.....	32
3.3.4	Técnica de MIRU.....	34
3.3.4.1	Análise dos resultados de MIRU.....	37
3.4	Correlação epidemiológica.....	39
4.	RESULTADOS.....	40
4.1	Identificação Molecular.....	40
4.2	Genotipagem pela técnica de MIRU.....	44
4.3	Avaliação epidemiológica clássica.....	54
4.4	Correlação entre os grupos genéticos de MRU e os dados de epidemiologia clássica.....	58
5.	DISCUSSÃO.....	61
6.	CONCLUSÕES.....	70
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
8.	ANEXOS.....	80
9.	ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS.....	88

RESUMO

O estudo da epidemiologia molecular através de diferentes técnicas vigentes revolucionou a compreensão da epidemiologia da tuberculose permitindo comparação entre linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* e rastreamento da movimentação de linhagens individuais. O presente projeto teve como objetivo utilizar as técnicas de epidemiologia molecular (MIRU) para tentar compreender um pouco mais sobre o fenômeno da transmissão da tuberculose entre os pacientes portadores de tuberculose pulmonar numa pequena cidade de interior paulista, atendidos no Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA - ambulatório de referência no diagnóstico e tratamento de tuberculose) na cidade de Araraquara. Do total de 163 culturas positivas recebidas, a técnica de MIRU foi realizada em 74, 2% (121/163) dos isolados provenientes de pacientes atendidos pelo SESA no período de 2002 à 2006. Foram ainda identificados 5 isolados de micobactérias ambientais (*M. avium*, *M. gordonae*, *M. genevensense*, *M. abscessus* e *M. xenopi*) e 4 micobactérias não identificadas. Dos 121 isolados submetidos a genotipagem, seis não apresentaram todos os alelos dentre os 12 loci de MIRU. Dos 115 isolados submetidos ao dendrograma, 29 (25,2%) agruparam-se em 13 grupos clonais com similaridade de 100%, sendo 10 grupos de dois isolados cada (125 e 168; 153 e 253; 95 e 97; 91 e 99; 92 e 266; 217 e 228; 27 e 117; 260 e 257; 105 e 107; 106 e 220) e 3 contendo 3 isolados cada (150, 157 e 283; 137, 147 e 155; 224, 271 e 286). Os demais 86 isolados (74,8%) apresentaram perfil genético único. Dos 29 pacientes agrupados, apenas 10 (34,4%) eram do sexo feminino e 19 (65,6%) do sexo masculino. Com exceção de um paciente, os demais 28 (96,5%) foram tratados com o esquema I obtendo-se alta por cura em 82,8% dos casos. Apenas um caso de co-infecção HIV/TB foi verificado entre os pacientes em grupos genéticos formados, ao passo que 31% (9/29) eram etilistas, excetuando os pacientes com os dados ignorados. Em relação às profissões, dos 19 pacientes masculinos agrupados geneticamente, destacou-se a função de pedreiro com 21% (4/19), seguido do trabalhador rural com 15,7% (3/19) e entre os pacientes do sexo feminino, 70% (7/10) eram domésticas ou exerciam atividades em casa (passadeira e acompanhante). Considerando uma similaridade igual ou superior a 83%, foi possível destacar 3 grandes grupos clonais A, B e C, envolvendo 86 (74,8%) de todos os isolados analisados. Nestes grandes grupos estavam inseridos todos os 13 grupos clonais com 100% de similaridade. Estes dados sugerem a possibilidade de que a tuberculose em Araraquara se deve a presença de cepas endêmicas persistentes, responsáveis por 74,8% dos casos, além da existência de transmissão recente que neste trabalho foi de 25,2%.

Palavras chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Epidemiologia molecular; Tuberculose

ABSTRACT

The molecular epidemiology study using different techniques revolutionized the understanding of the epidemiology of tuberculosis allowing comparison between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and tracking the movements of individual lines. This project aimed to use the techniques of molecular epidemiology (MIRU) trying to understand more about the phenomenon of transmission of tuberculosis among patients with pulmonary tuberculosis in a small city of São Paulo, attended the Special Health Service of Araraquara (SESA - clinic of reference in the diagnosis and treatment of tuberculosis) in the city of Araraquara. From total 163 positive cultures received, the MIRU technique was performed in 74,2% (121/163) of the isolates from patients attended by SESA in the period from 2002 to 2006. 5 isolates were also identified as environmental mycobacteria (*M. avium*, *M. gordonae*, *M. genevensense*, *M. abscessus* and *M. xenopi*) and 4 unidentified mycobacteria. From the 121 isolates submitted to genotyping, six did not present all alleles among the 12 loci of MIRU. From the 115 isolates submitted to the dendrogram, 29 (25,2%) are grouped into 13 clonal groups with similarity of 100%. 10 groups with two isolates each (125 and 168, 153 and 253, 95 and 97, 91 and 99 ; 92 and 266, 217 and 228, 27 and 117, 260 and 257, 105 and 107, 106 and 220) and 3 groups containing 3 isolates each (150, 157 and 283, 137, 147 and 155, 224, 271 and 286) . The others 86 isolates (74,8%) had a single genetic profile. About the group of 29 patients, only 10 (34,4%) were female and 19 (65,6%) males. Except for one patient, the other 28 (96,5%) were treated with the schedule I having cure in 82,8% of the cases. Only one case of co-infected HIV / TB was found among patients in genetic groups formed, while 31% (9 / 29) were drinkers, except the patients with this data ignored. The 19 male patients grouped genetically, 21% (4 / 19) were bricklayers, followed by the rural worker with 15,7% (3 / 19) and among female patients, 70% (7 / 10) were domestic or they used to make activities at home. Whereas the similarity of 83% or greater, highlighted 3 major clonal groups called A, B and C, involving 86 (74,8%) of all isolates analyzed. In these large groups were included all 13 clonal groups with 100% similarity. These data suggest the possibility the tuberculosis in Araraquara is because of the presence of persistent endemic strains responsible for 74,8% of cases, besides the existence of recent transmission in this work was 25,2%.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Molecular epidemiology; Tuberculosis

I. INTRODUÇÃO

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único representante da família Mycobacteriaceae. Apresentam-se como bacilos curvos ou retos, com 0,2µm a 0,7µm de diâmetro e 1µm a 7µm de comprimento. Possuem propriedade de álcool-ácido resistência devido à grande quantidade de lipídeos presentes em sua parede celular, caracterizados pelos ácidos graxos de cadeia longa constituídos pelos ácidos micólicos. As micobactérias não se coram pelo método de Gram, mesmo sendo consideradas Gram positivas. São aeróbias, não esporuladas e classificadas de acordo com seu tempo de crescimento em micobactérias de crescimento rápido quando requerem menos de 7 dias, e de crescimento lento mais de 7 dias para produzir colônias visíveis em meios de cultura sólidos (PANDOLFI *et al.*, 2007; LEITE & SATO, 2006).

Compreendendo o gênero *Mycobacterium*, existem cerca de 100 espécies conhecidas, em sua grande maioria composta por bactérias saprófitas no meio ambiente e apenas algumas espécies patogênicas ao homem. Dentre as que merecem destaque, encontram-se as que são agentes etiológicos da tuberculose, como os membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*) e o causador da hanseníase, o *Mycobacterium leprae*. Dentre algumas características em comum, as micobactérias compartilham uma característica que as distingue das demais bactérias: a retenção de fucsina básica pela parede celular, mesmo quando tratadas com álcool e ácido,

conferindo-lhes a designação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) quando da utilização do método de coloração Ziehl-Neelsen (DUCATI *et al.*, 2005)

No final do século XIX e início do século XX, foi tamanha a incidência da tuberculose entre membros da mesma família que se chegou a pensar na tuberculose como uma doença inata, transferida de pais para filhos. Posteriormente, descobriu-se que a simples exposição do indivíduo sadio ao bacilo não constituía por si só condição suficiente para produzir a doença. Para se desenvolver no organismo, o bacilo precisa de fatores intrínsecos e extrínsecos como a imunodebilidade e a desnutrição, cujo conjunto possibilita a sua suscetibilidade (LOPES *et al.*, 2008).

Por ocasião da Reunião da Sociedade de Fisiologia em Berlim no ano de 1882, o alemão Robert Koch apresentou um relato importante sobre a tuberculose. Descreveu o isolamento e forma de cultivo do *M. tuberculosis* a partir de tubérculos macerados, identificando-o como agente etiológico da tuberculose e que passou, então, a ser conhecido como bacilo de Koch (DUCATI *et al.*, 2005).

A principal via de transmissão da tuberculose se dá de pessoa a pessoa através de partículas infectantes presente nas gotículas de 1,0 a 5,0 µm de diâmetro produzidas pelos portadores de tuberculose pulmonar ou laríngea ao tossir, espirrar ou falar (PANDOLFI *et al.*, 2007).

Na maioria das pessoas infectadas, os bacilos inalados são fagocitados por macrófagos alveolares, e podem seguir dois caminhos: são eliminados ou multiplicam no interior das células originando lesões localizadas chamadas

tubérculos. Normalmente, duas a seis semanas após a infecção, ocorre o estabelecimento de imunidade mediada por células, seguida de infiltração de linfócitos e macrófagos ativados na lesão, resultando na eliminação da maior parte da carga bacilar e no término da infecção primária. Nestes casos, a única evidência de infecção prévia é dada pelo teste da tuberculina ou diagnosticada através de raio-X do tórax, uma vez que a infecção ocorre sem a apresentação de sintomas. O foco inicial da infecção pode ocorrer em qualquer lugar nos pulmões, porém, estão geralmente localizados na porção basal e mediana dos pulmões. (LOCHT *et al.*, 2007).

A tuberculose infecção (aquela onde o bacilo da tuberculose se mantém dormente, não causando dano algum ao seu hospedeiro) pode se evoluir para tuberculose doença depois de muitas décadas, após a infecção inicial. Neste caso ocorre expansão da reação de necrose e formação de cavidade no pulmão possibilitando que grande quantidade de bacilos seja eliminada para o meio ambiente através da tosse. Cerca de 15% dos pacientes com a doença ativa podem apresentar tuberculose extra-pulmonar, acometendo principalmente a pleura, os linfonodos, o fígado, o baço, os ossos e as articulações, o coração, o cérebro, o sistema genito-urinário, as meninges, o peritônio ou a pele (DUCATI *et al.*, 2005).

Devido a fatores relacionados à imunidade do hospedeiro, sintomas clínicos característicos da tuberculose, como enfraquecimento, sudorese noturna, febre, perda de peso, dor no peito, insuficiência respiratória, tosse (com produção de escarro, ou não) podem ser produzidos. Nos casos mais graves da

doença, quando há rompimento de algum vaso sangüíneo a tuberculose pulmonar pode causar hemoptise (DUCATI, 2005; LOCHT *et.al*, 2007).

O tratamento quimioterápico padrão proposto pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para o controle da tuberculose no mundo, consiste na administração combinada de drogas; esta associação se dá com o uso das drogas: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), estreptomicina (SM) e etambutol (EMB). Utilizando este elenco, o tratamento quimioterápico tem como objetivos: curar o paciente com tuberculose; prevenir o óbito associado à tuberculose ou suas complicações tardias; prevenir a recidiva da doença; diminuir a transmissão da tuberculose para outros indivíduos e prevenir o surgimento de *M. tuberculosis* resistente às drogas. Para atingir esses objetivos, o tratamento deve seguir esquemas terapêuticos definidos adotados pelo Ministério da Saúde no Brasil como mostrado no quadro 1.

Quadro 1: Esquemas de tratamento para pacientes portadores de Tuberculose contendo tempo de tratamento, posologia e indicação para cada estágio da doença adotado pelo Ministério da Saúde/ Brasil.

ESQUEMA DE TRATAMENTO	Tempo de Tratamento	Posologia	Indicação
Esquema I	6 meses	INH + RIF + PZA (2 meses) INH + RIF (4 meses)	pacientes que estão sendo tratados pela primeira vez
Esquema IR	6 meses	INH + RIF + EMB + PZA (2 meses) INH + RIF + EMB (4 meses)	pacientes que interromperam o tratamento e tem a duração de 6 meses
Esquema II	9 meses	INH + RIF + PZA (2 meses) INH + RIF (7 meses)	pacientes com tuberculose meningo-encefálica
Esquema III	12 meses	SM + PZA + ETH + EMB (3 meses) ETH + EMB (9 meses)	casos de falência em algum dos tratamentos anteriores

Entre os esquemas terapêuticos definidos pela OMS, o Ministério da Saúde, optou por quatro tipos de esquemas. O Esquema I é recomendado para pacientes que estão sendo tratados pela primeira vez e tem a duração de 6 meses. O esquema IR é recomendado para os que interromperam o tratamento e tem a mesma duração de 6 meses. O esquema II é recomendado para os pacientes com tuberculose meningo-encefálica com duração de 9 meses. A posologia varia com o peso e a idade. O esquema III é recomendado para casos de falência e tem a duração de 12 meses e sua posologia é recomendada para a população maior que 15 anos (Programação de Medicamentos Tuberculostáticos do II Consenso Brasileiro – OPAS, 2001).

Algumas vezes durante o tratamento, pode-se observar uma resistência inicial do bacilo à isoniazida, tornando-se necessária a adição de outras drogas de primeira linha, como o EMB e a SM. No caso de resistência simultânea a RIF e INH, caracteriza-se uma bactéria resistente e é denominada na literatura internacional de MDR-TB, tornando necessária uma extensão no período de tratamento ou na maioria das vezes uma nova associação medicamentosa utilizando drogas com maior toxicidade ao paciente (DUCATI, 2005).

A pandemia do HIV vem produzindo um grande reservatório de indivíduos altamente susceptíveis, associado ao controle ineficiente da tuberculose e o aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* multi-droga resistente (MDR-TB), aumentando os problemas já existentes, exacerbando as dificuldades de tratamento e controle da tuberculose (CORBETT *et al.*, 2003).

Dados publicados pela OMS (WHO, 2008) estimam que ocorreram no ano de 2006, 9,2 milhões de novos casos de tuberculose no mundo, já inclusos números referentes a co-infecção TBxHIV, o que resulta em uma razão de incidência de 139/100.000 habitantes. O boletim informa ainda que a Índia, a China, a Indonésia, a África do Sul e a Nigéria estão classificados entre os 5 países com maior incidência de tuberculose no mundo. A Ásia representa 55% dos casos, seguido da África com 31% dos casos, e os demais 3 continentes representam uma pequena parte dos casos de tuberculose. A OMS (WHO, 2008) estima que destes 9,2 milhões de novos casos no ano de 2006, estima-se que 709.000 pacientes (7,7%) sejam portadores do HIV. No Brasil, no ano de 2006, foi estimada uma incidência de 104.000 casos de tuberculose (55/100.000

habitantes), o que deixa nosso país no 16º lugar no *ranking* dos 22 países responsáveis pela maioria dos casos de tuberculose no mundo (WHO, 2008).

Localizada a 775km da capital federal do país e a 269km da cidade de São Paulo, com altitude de 646m em relação ao nível do mar, Araraquara ocupa a região centro-leste do estado de São Paulo. (PORTAL ARARAQUARA, 2008). Segundo dados do CENSO publicados em maio de 2007, a cidade de Araraquara possui a população estimada de 195.815 habitantes com a incidência de tuberculose de 26 casos/100.000 habitantes. Esta taxa é relativamente baixa quando comparada com a cidade de São Paulo que no ano de 2006 encaminhou ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) 3484 notificações (32 casos/100.000 hab).

Para isso, o Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) filiado à Universidade de São Paulo, faz um ótimo trabalho em relação ao atendimento da tuberculose, mas também da maioria das doenças que necessitam de notificação compulsória. Além do excelente trabalho de diagnóstico e tratamento, o SESA possui dados de epidemiologia clássica bastante seguros e confiáveis.

Levantamentos epidemiológicos realizados em diversos países, demonstraram que a tuberculose tem maior prevalência nas camadas populacionais mais pobres. A prevalência da doença está relacionada ao desemprego, baixo grau de escolaridade, alimentação deficiente e insuficiente, habitação insalubre e outros fatores associados à pobreza (LOPES *et al.*, 2008).

Metodologias relacionadas à epidemiologia molecular revolucionaram os campos da pesquisa, prevenção e controle da tuberculose, permitindo a diferenciação e a avaliação de diversidades entre as cepas do complexo *M. tuberculosis*, incluindo as diferenças por região e por população, assim como a medida de prevalência de cepas endêmicas (NIOBE-EYANGO *et al.*, 2004).

Desde o início dos anos 90, para se definir os fatores de risco para a transmissão de tuberculose em áreas com alta incidência da doença, vem sendo utilizada a genotipagem do *M. tuberculosis* que se baseia no reconhecimento genético através de *fingerprints*, onde a formação de grupos genéticos nos indica a possibilidade de uma transmissão recente. (OELLEMANN *et al.*, 2007).

Segundo Eisenach *et al.* (1988), a existência de seqüências de DNA que se repetem no genoma do *M. tuberculosis* apresentam um grande potencial no uso da genotipagem através de *fingerprinting*. Uma dessas seqüências é denominada de IS6110 e apresenta uma relação com a seqüência de inserção da família IS3 encontrada na família *Enterobactériaceae*. Outras seqüências como IS986 e IS987 foram descobertas em seguida sendo que esses novos elementos se diferenciavam entre si em somente alguns pares de base. Por esta razão, posteriormente foram classificados como um mesmo elemento e para evitar confusões, foi recomendado o uso da inserção IS6110 no estudo genético do *M. tuberculosis*.

FROTHINGHAM *et al.*, (1994) relataram que as espécies do complexo *M. tuberculosis* são geneticamente muito parecidas, com 85 a 100% de relação DNA-DNA diferindo entre si quanto à sua epidemiologia.

Dentre as técnicas moleculares, o RFLP-IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é considerado a técnica padrão ouro para a genotipagem do *M. tuberculosis*, sendo comprovada sua eficiência no estudo da transmissão da tuberculose (ALLIX-BÉGUEC *et al.*, 2008).

A técnica de RFLP-IS6110 consegue discriminar as cepas de *M. tuberculosis* através da inserção irregular do IS6110 no genoma das micobactérias. Com isso, os resultados obtidos por esta técnica mostram-se bastante estáveis na observação epidemiológica em casos de tuberculose (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1993).

A metodologia utilizada na técnica de RFLP-IS6110 consiste na genotipagem das cepas de *M. tuberculosis* baseada no polimorfismo gerado pela variação do número de cópias e da posição do IS6110. A técnica do *fingerprinting* se inicia com o cultivo do *M. tuberculosis*, extração do seu DNA, digestão com enzimas de restrição, *Southern blotting* e é finalizada com a identificação da diversidade genética de cada isolado (VAN EMBDEN *et.al.* , 1993).

Entretanto, apesar dos resultados promissores, a técnica de RFLP é trabalhosa, necessitando de pessoal altamente qualificado para a realização do ensaio, sendo tendência mundial a substituição desta técnica por outras de execução mais rápida e facilitada. Dentre elas, vem sendo sugerida uma outra técnica de epidemiologia molecular denominada de MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) que é uma técnica baseada em PCR. Esta técnica foi desenvolvida por SUPPLY *et al.* (2000, 2001) e se baseia no estudo de

VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), que são seqüências que se repetem (*Tandem Repeats*) até centenas de vezes (PANDOLFI *et al*, 2007).

A técnica de MIRU consiste em um sistema altamente reprodutível e rápido, e nesta técnica, há geração de genótipos confiáveis baseado no estudo detalhado de 12 *loci* semelhantes à mini-satélites, contendo VNTRs do genoma do complexo *M. tuberculosis*. Para tal, utilizam-se 12 pares de oligonucleotídeos iniciadores, sendo necessário para cada isolado de *M. tuberculosis* 12 reações de PCR específicas para sua genotipagem (SUPPLY *et al.*, 2001).

Esta técnica possibilita uma comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas e permite o rastreamento da movimentação de linhagens individuais (SUPPLY *et al.* 2000; MAZARS *et al.* 2001), de forma semelhante à técnica de RFLP, porém de execução muito mais fácil. Este tipo de abordagem torna possível maior número de análises e a identificação de mais focos de contágio na população, podendo-se assim estudar métodos mais adequados para interromper a transmissão da doença (SUPPLY *et al.* 2001).

A técnica de Spoligotyping descrita por Kamerbeek *et al.* (1997) é baseada na amplificação *in vitro* de um único *locus* altamente polimórfico no genoma da bactéria contendo múltiplas *direct repeats* – DRs, método que pode ser realizado em laboratórios sem equipamentos sofisticados.

KWARA *et al.* (2003) avaliaram a utilidade epidemiológica dos métodos MIRU e *Spoligotyping*, concluindo que a primeira técnica produz resultados melhores do que a segunda. COWAN *et al.* (2002) compararam as técnicas de MIRU, RFLP e *Spoligotyping* em um grupo de 180 amostras de *M. tuberculosis* e

M. bovis, com baixo número de cópias de IS6110, observando que a técnica de MIRU possibilitou a distinção de 80 padrões, contra 58 de RFLP e 59 de *Spoligotyping*. Quando estes resultados foram cruzados, 122 padrões foram obtidos, indicando que o emprego de vários métodos é necessário para se atingir maior especificidade.

Baseado na estabilidade dos 12 loci de MIRU, a descoberta de variações no genótipo de MIRU-VNTR pode auxiliar na definição de re-infecção (exógena), que é normalmente baseada na observação da variação de no mínimo 3 a 4 bandas de RFLP IS6110. Esse recurso é particularmente importante para estimar os níveis de sucesso dos programas de controle de tuberculose e avaliação de novos métodos clínicos e novas terapias (SAVINE *et al.*, 2002).

Com isso, a técnica de MIRU aplicada como primeira linha na tipagem molecular junto a técnica de *Spoligotyping*, tem provado uma boa discriminação na maioria dos casos, incluindo estudos em larga escala (ALLIX-BÉGUEC *et al.*, 2008).

Por outro lado, para a aplicação da epidemiologia molecular, é preciso ter a identificação correta da espécie de *M. tuberculosis*. Para tal, previamente a aplicação do MIRU, são bem vindos os métodos moleculares de identificação das espécies micobacterianas. A amplificação de um fragmento de DNA contido na seqüência de inserção IS6110 tem sido o método de escolha na identificação molecular pela PCR do complexo *M.tuberculosis* (VAN EMBDEN *et al.*, 1993). Outro método mais abrangente para identificação molecular de diferentes espécies de micobactérias foi desenvolvida por Telenti *et al.* (1993) denominada

PRA (*PCR-restriction enzyme pattern analyses*). Nesta técnica, é feita a PCR da sequência do gene *hsp65*, que codifica a proteína de choque térmico (*heat shock protein*) de 65-kDa. Esse gene é altamente conservado entre as espécies de micobactérias, mas também apresenta regiões hipervariáveis usadas para a identificação das diferentes espécies (TORTOLI *et al.*, 2003). O fragmento de 439 pares de base é submetido à digestão com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* (TELENTI *et al.*, 1993). Os produtos da digestão quando separados por eletroforese em gel de agarose à 4% apresentam perfis específicos de cada espécie de micobactéria. (TORTOLI *et al.*, 2003).

Há cerca de 10 anos o Laboratório de Micobactérias “Dr. Hugo David” vem trabalhando em colaboração com o SESA no quesito ao diagnóstico molecular da tuberculose. E para tal, a técnica da PCR e do PRA foi implantada. Por outro lado, recentemente, a técnica de MIRU foi introduzida por Pandolfi (2006) para o estudo da epidemiologia molecular da tuberculose. Para confrontar dados de epidemiologia clássica com os dados de epidemiologia molecular, este trabalho foi realizado em parceria com o SESA. A pesquisa em colaboração permitiu validar a técnica de MIRU na cidade de Araraquara, uma vez que foi possível dispor de dados de todos os pacientes atendidos na cidade, no intervalo dos anos em que se realizou a pesquisa. O fato de se conseguir esta relação direta entre os dados de epidemiologia molecular e os de epidemiologia clássica coloca o município de Araraquara em uma posição bastante confortável em relação às grandes cidades que tem dificuldades em obter informações fidedignas dos dados clássicos .

II. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo da diversidade genética de isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes do município de Araraquara – SP atendidos pelo SESA no período de 2002 à 2006.

Para tal, os seguintes objetivos específicos formam propostos:

- Confirmar a identificação bioquímica dos isolados de *M. tuberculosis* provenientes do SESA (2002 a 2006) através das técnicas de PCR e PRA;
- Realizar a genotipagem dos isolados de *M. tuberculosis* pela técnica de MIRU;
- Agrupar por similaridade genética os isolados de *M. tuberculosis* estudados;
- Avaliar a presença efetiva de grupos genéticos de *M. tuberculosis* predominantes em Araraquara;
- Correlacionar os agrupamentos genéticos obtidos com a epidemiologia clássica;
- Identificar os índices de tuberculose provenientes de reativação e infecção recente;
- Organizar um banco de dados dos pacientes de tuberculose pulmonar de Araraquara cujas cepas foram submetidas à técnica de MIRU;

III. MATERIAL E MÉTODOS

Quanto ao aspecto ético, o presente estudo possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara, parecer número 01/2003.

1- Tipo de estudo: Retrospectivo de identificação e tipagem molecular de isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

2- Isolados de *M. tuberculosis*

Local do estudo: foram analisados isolados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar residentes na cidade de Araraquara – SP, atendidos no período de 2002 à 2006.

Nestes, o diagnóstico de tuberculose pulmonar foi suspeitado pelo histórico clínico do paciente e confirmado pelo médico e pelo diagnóstico laboratorial através da baciloscopia, do isolamento em cultura e da identificação do *M. tuberculosis* pela metodologia clássica. As cepas foram congeladas em água e estocadas em freezer à -20°C. Esta primeira parte do trabalho foi realizada no SESA da Faculdade de Saúde Pública da USP onde o número total de pacientes atendidos, forma clínica da tuberculose e cultura se encontram no quadro 2.

Quadro 2. Número total de pacientes atendidos no SESA separados por ano, tipo de tuberculose apresentada, cultura e baciloscopia positivas.

Ano	Total de pacientes suspeita TB	Nº pac. TB pulmonar	Outras TB	Cult (+)	BK +
2002	56	41	15	36	31
2003	54	41	13	33	24
2004	55	43	15	25	22
2005	40	32	8	31	23
2006	52	40	12	38	25
TOTAL	257	197	63	163	125

As amostras bacterianas foram então encaminhadas para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara onde foram descongeladas, reativadas e posteriormente analisadas pelas técnicas moleculares. Em um total de 182 isolados congelados enviados ao nosso laboratório pelo SESA, dentre eles alguns em duplicata. Utilizando a técnica de MIRU, foram analisados 121 isolados dos anos de 2002 à 2006.

Quadro 3. Número de identificação, total dos isolados de *M. tuberculosis* analisados, por ano de isolamento

2002	2003	2004	2005	2006
25	119	170	211	256
27	123	173	212	257
79	124	175	213	258
86	125	176	214	259
89	129	179	215	260
90	130	181	217	261
91	133	184	218	265
92	134	186	219	266
93	135	189	220	268
95	136	193	222	269
97	137	199	224	271
98	146	203	226	272
99	147	206	228	273
100	148	207	233	274
101	149	208	234	275
103	150	209	236	276
102	151	289	238	277
104	152	290	241	278
105	153	291	244	279
106	155		246	282
107	157		250	283
108	159		253	284
112	160			285
114	161			286
117	162			287
293	164			
	166			
	167			
	168			

3- Técnicas Moleculares

Todo o procedimento de manipulação de células de *M. tuberculosis* viáveis foi realizado no Laboratório de Segurança Nível 3 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP.

3.1- A reativação e verificação da pureza da suspensão bacteriana foram feitas segundo Malaspina, (2004). Após o descongelamento à temperatura ambiente, 200µL de cada amostra bacteriana foi colocado em 2,0 mL do meio 7H9 enriquecido com OADC (BD BBL®) e acrescido de 20µL do antifúngico Ciclohexemida a 5% e incubado a 37°C por 7 dias, com agitação manual uma vez ao dia. Em presença de turvação, o material foi submetido à confecção de um esfregaço utilizando uma alíquota de 100µL que foi depositada em uma lâmina e após o espalhamento, fixada pelo calor e corado pela técnica de Ziehl-Neelsen para verificação de cultura pura de Bacilos Álcool-Ácido-Resistentes (BAAR). Em caso positivo, o conteúdo de 200µL de cada tubo, com cultura supostamente reativada, foi transferida para dois tubos contendo meio de Löwestein-Jensen (LJ) inclinado, sendo incubado por no mínimo 21 dias a 37°C podendo chegar a 60 dias.

3.2- Confirmação da espécie *M. tuberculosis* através da PCR foi feita segundo van Embden (1993) com pequenas modificações. Após a multiplicação bacteriana no meio de Löwestein-Jensen (LJ), as culturas positivas foram confirmadas como sendo de *M. tuberculosis* pela técnica de PCR, empregando o par de oligonucleotídeos iniciadores *INS1* (CgTgAgggCATCgAggTggC) e *INS2*

(gCgTAggCggTgACAAA) que amplificou especificamente um fragmento de 245pb contidos na seqüência de inserção IS6110.

Inicialmente, realizou-se a extração de DNA através da termólise segundo Mazars *et al.*, 2001, com pequenas modificações. O procedimento consistiu em submeter, uma alçada da colônia crescida em meio sólido acrescido em 300µL de tampão TE pH 8,0 (Tris-Hcl + EDTA) em um microtubo com tampa de trava, a três ciclos de fervura por 10 minutos seguido de congelamento a -20°C.

Para a amplificação (VAN EMBDEN *et al.*, 1993), em linhas gerais, no volume final da reação de 25µL, foram adicionados 21,5µL de “Master Mix” (PROMEGA na diluição de 2 partes de PCR Master Mix 2x para 1 parte de água ultrapurificada) 0,5µL dos oligonucleotídeos iniciadores na concentração de [25pmol] *INS1* e *INS2* e 2,5µL do DNA de cada amostra, extraído por termólise, e a mistura da reação foi amplificada em Termociclador (PTC-100, MJ Research), empregando o seguinte protocolo de ciclagem:

Quadro 4. Condição de amplificação dos isolados submetidos a PCR de identificação para *M. tuberculosis*

PASSO	TEMPO	TEMPERATURA	QUANTIDADE DE CICLOS
1º	10 minutos	95°C	1
2º	1 minuto	94°C	30
	2 minutos	56°C	
	1 minuto	72°C	
3º	7 minutos	72°C	1
4º	∞	4°C	1

Na sequência, 15µL do produto amplificado foi aplicado em gel de agarose a 1% contendo Brometo de etídio na concentração de 10µg/mL e o produto da amplificação foi resolvido por eletroforese a 90 volts e padrão de peso molecular de 50pb aí adicionado. A eletroforese foi fotodocumentada empregando Alpha Imager – Alpha Innotech®.

3.3- Técnica do PRA

Os isolados que não apresentaram amplificação do fragmento de 245 pb dentro do *IS6110*, foram submetidos a técnica do PRA para a identificação de outras espécies de micobactérias segundo Plikaytis *et al.* (1992) e Telenti *et al.* (1993).

Utilizando o DNA extraído por termólise descrito anteriormente, os isolados foram submetidos à PCR para amplificação do gene *hsp65* produzida com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores Tb11 (ACCAACgATggTgTgTCCAT) e Tb12 (CTTgTCgAACCgCATACCCT). Empregando volume final de 30µL em cada reação, foram utilizados 27µL de Master Mix (PROMEGA®) na diluição recomendada pelo fabricante de 1 parte de Master Mix 2x para 1 parte de água ultra-pura e 0,25µL (25pmoles) de cada oligonucleotídeo iniciador (Tb11 e Tb12) e 2,5µL do DNA extraído por termólise. Para a amplificação foram utilizados os ciclos descritos no quadro 5.

Quadro 5: Condição de amplificação dos isolados submetidos a PCR de identificação para micobactérias

PASSO	TEMPO	TEMPERATURA	QUANTIDADE DE CICLOS
1º	10 minutos	94°C	1
2º	1 minuto	94°C	45
	1 minuto	60°C	
	2 minutos	72°C	
3º	10 minutos	72°C	1
4º	∞	4°C	-

Dez microlitros dos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 6,0µL brometo de etídio (10µg/mL) e em seguida fotodocumentado. O amplificado de 439 pares de base (figura2) foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*.

Para cada enzima de restrição foi feita uma reação com volume final de 20µL. Acrescidos em 7,5µL de água ultrapurificada (MiliQ), 2,0µL do tampão da enzima, 0,5µL de cada enzima (*BstEII* e *HaeIII*) e 10µL do produto amplificado. Para a digestão, as enzimas possuem temperaturas específicas para tal. Para a *BstEII* foi incubada a 60°C por 1 hora e para a *HaeIII* foi incubada 37°C também por 1 hora. Após a incubação os produtos digeridos foram submetidos a nova eletroforese em gel de agarose a 4% e corados com o brometo de etídio se deu após a eletroforese. Junto com o produto da digestão foi aplicado no gel padrões de peso molecular de 25 e 50 pares de base. Após a eletroforese o gel foi fotodocumentado.

A interpretação dos resultados foi feita através de um site desenvolvido por alguns Institutos de pesquisa internacionais em parceria com o Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP) que foi denominado PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

O PRASITE consiste em uma página de internet onde é possível inserir os perfis encontrados após a digestão do produto amplificado pelas enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*. A página informa a identificação da micobactéria com o perfil eletroforético informado.

3.4- Técnica de MIRU

Confirmada a identificação de *M. tuberculosis*, os isolados clínicos foram então submetidos à técnica de MIRU.

Para a técnica de MIRU foi utilizado o mesmo DNA extraído por termólise. A amplificação dos alelos foi feita segundo SUPPLY *et al.* (2000) modificado por Pandolfi, (2006) onde são utilizados 12 pares de oligonucleotídeos iniciadores, para amplificar regiões repetitivas não codificadoras, realizando para cada cepa um total de 12 reações com temperaturas de hibridização diferentes em 3 delas como está descrito no quadro 6.

Quadro 6. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores dos 12 loci de MIRU estudados.

Locus de MIRU	Identificação	Seqüência do oligonucleotídeo	Temperatura de hibridização
02	2F	TggACTTgCagCAATggACCAACT	60°C
	2R	TACTCggACgCCggCTCAAAAT	
04	4F	gCgCgAgAgCCCgAACTgC	55°C
	4R	gCgCagCagAAACgTCagC	
10	10F	gTTCTTgACCAACTgCagTCgTCC	55°C
	10R	gCCACCTTggTgATCagCTACCT	
16	16F	TCggTgATCgggTCCAgtCCAgtTA	55°C
	16R	CCCgTCgTgCagCCCTggTAC	
20	20F	TCggAgAgATgCCCTTCgAgTTAg	55°C
	20R	ggAgACCgCgACCaggTACTTgTA	
23	23F	CTgTCgATggCCgCAACAAAACg	55°C
	23R	AgCTCAACgggTTCgCCCTTTTgTC	
24	24F	CgACCAAgATgTgCaggAATACAT	50°C
	24R	gggCgAgTTgAgCTCACAgAA	
26	26R	TAggTCTACCgTCgAAATCTgTgAC	50°C
	26F	CATAggCgACCaggCgAATAg	
27	27F	TCgAAAgtCCTCTgCgTgCCAgTAA	55°C
	27R	gCgATgTgAgCgTgCCACTCAA	
31	31F	ACTgATTggCTTCATACggCTTTA	55°C
	31R	gTgCCgACgTggTCTTgAT	
39	39F	CgCATCgACAAACTggAgCCAAAC	55°C
	39R	CggAAACgTCTACgCCCCACACAT	
40	40F	gggTTgCTggATgACAACgTgT	55°C
	40R	gggTgATCTCggCgAAATCagATA	

Empregando volume final de 25µL em cada reação, foram utilizados 21µL de Master Mix (PROMEGA®) na diluição de 1 parte de Master Mix para 2 partes de água ultra-pura acrescido de 1µL dos oligonucleotídeos iniciadores R e F correspondentes aos *loci* estudado e 2µL do DNA extraído por termólise. Para a amplificação foram utilizados os ciclos descritos no quadro 7.

Quadro 7. Condição de amplificação dos isolados submetidos a PCR para realização da técnica de MIRU

PASSO	TEMPO	TEMPERATURA	QUANTIDADE DE CICLOS
1º	15 minutos	95°C	1
2º	1 minuto	94°C	40
	1 minuto	60°C, 55°C, 50°C	
	2 minutos	72°C	
3º	10 minutos	72°C	1
4º	∞	4°C	-

Os produtos de amplificação, de tamanho variável, foram resolvidos junto com os padrões de peso molecular (50 e 100 pares de bases) por eletroforese em gel de agarose a 2% contendo Brometo de Etídio (10µg/mL). A eletroforese foi fotodocumentada e as imagens dos géis foram digitalizadas para análise e confecção de dendrograma.

3.4.1- Análise dos Resultados de MIRU:

Os amplificadores de MIRU foram classificados em alelos para cada um dos 12 *loci* estudados. Após obtenção dos amplificadores de todas as amostras para um dado *locus*, foram determinados os tamanhos dos fragmentos em pares de base. O seu tamanho foi determinado com o auxílio dos padrões moleculares de 50pb e 100pb e comparado com a tabela de alelos descrito no quadro 8 (MAZARS *et al.*, 2001), que mostra o valor do alelo correspondente ao tamanho da banda observada no gel. Determinado o perfil de alelos para cada cepa, os MIRUs foram analisados comparativamente empregando o programa Bionumerics (Applied Maths®) para construção do dendrograma.

Quadro 8: Correlação entre os tamanhos em pb dos amplificados e os alelos de MIRU

Alelo	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164

OBS. Tabela construída para permitir a correlação com amplificados obtidos com “primers” desenhados segundo Supply *et al.* 2001.

4- Correlação epidemiológica

Para confrontar os resultados obtidos através da epidemiologia molecular realizada com o auxílio da técnica de MIRU, foram utilizadas informações clínico-epidemiológicas dos pacientes atendidos pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), que é a instituição responsável pelo atendimento, tratamento e acompanhamento dos doentes na cidade de Araraquara. Foi aplicado a todos os pacientes atendidos, um questionário elaborado principalmente para o estudo epidemiológico (em anexo), com dados necessários para tal correlação. As informações obtidas através dos questionários alimentaram o programa de bioinformática EPI-INFO versão 3.5.1 para analisar e correlacionar os dados epidemiológicos com os resultados de genotipagem.

IV. RESULTADOS

De um total de 182 isolados congelados recebidos, foi possível a reativação de 158 isolados.

1- Identificação Molecular:

A técnica da PCR confirmou a identificação do *M. tuberculosis* em 140 isolados que apresentaram um produto de amplificação de 245pb (Figura 1).

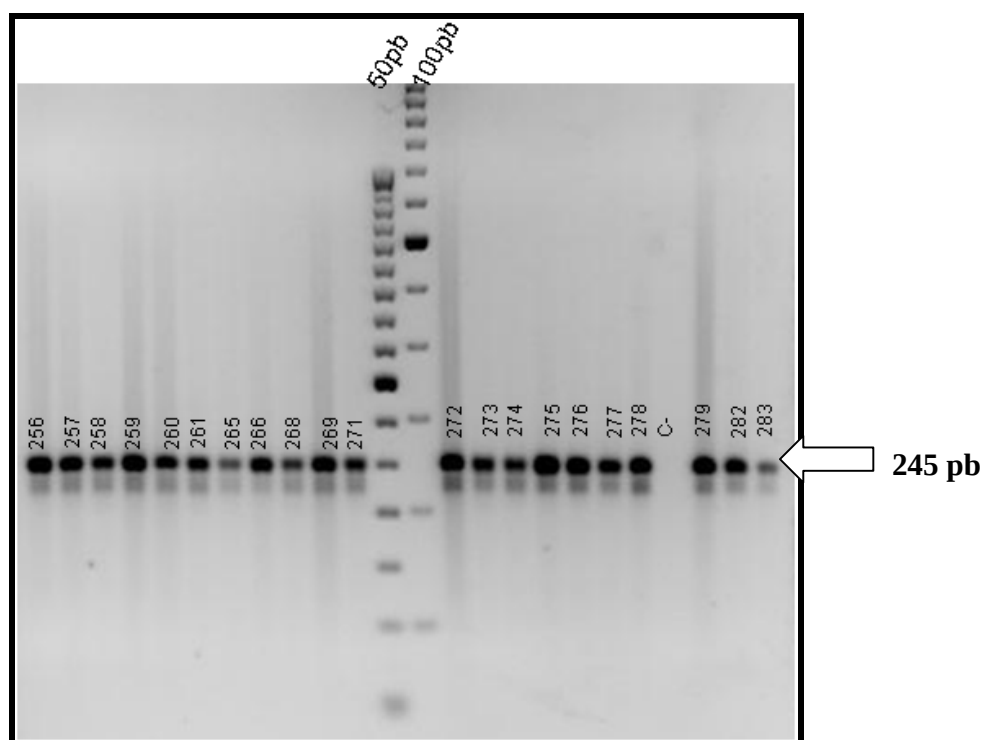


Figura 1: Fotografia do gel de agarose a 1% na confirmação molecular dos isolados de *M. tuberculosis*, utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores INS1 e INS2 a apresentando um fragmento de 245pb, dois marcadores de peso molecular (50pb e 100pb) e controle negativo (C-).

Nestes isolados, a pureza da cultura ainda foi verificada pela confecção do esfregaço em lâmina, coloração pela técnica de Ziehl N elsen e observação de BAAR. Posteriormente, foi verificado que dos 140 isolados, 28 eram amostras em duplicata. Dos 18 isolados que não apresentaram amplificação de 245 pb, a técnica do PRA (Figura 2 e 3 e Tabela 1) confirmou a identificação de mais 9 isolados de *M.tuberculosis*, 4 isolados tiveram resultado inconclusivo e 5 foram identificadas como: *M. xenopii*, *M. gordonae*, *M. abscesus*, *M. genevalensis*, e *M. avium*. Os resultados indicaram que 9 isolados clínicos de *M. tuberculosis* não tinham a seqüência de inserção *IS6110* específica de *M. tuberculosis*. Outros 5 isolados identificados no SESA como *M. tuberculosis* pelos método clássico, foram identificadas molecularmente como micobactérias não tuberculosas. Os demais 4 isolados não puderam ser identificados tanto por PCR como pelo PRA. Futuramente estes 4 isolados poderão ser submetidos ao seqüenciamento para identificação final e quem sabe propor uma nova espécie ou variante de alguma espécie micobacteriana.

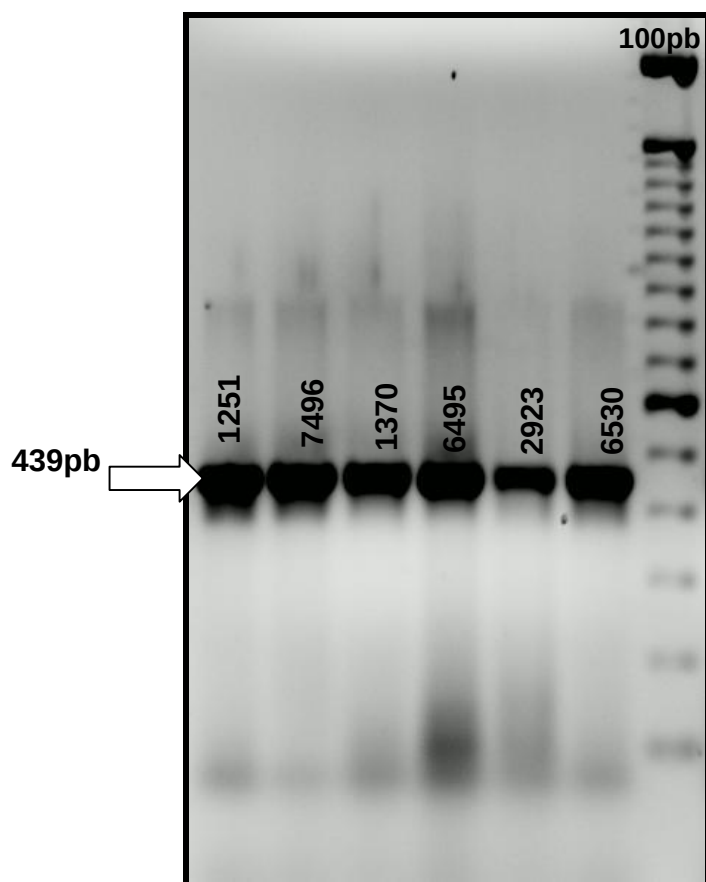


Figura 2: Foto do gel de agarose a 1% com o produto da amplificação do gene hsp65 apresentando um fragmento de 439 pares de base(PB) acompanhado do marcador molecular de 100pb.

Os isolados que foram submetidos à técnica do PRA foram identificados conforme a tabela 1.

Tabela 1: Resultado do perfil genético dos isolados de micobactérias utilizando a técnica do PRA.

Número da cepa	Identificação pela técnica do PRA
293	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
103	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
120	Inconclusivo
124	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
135	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
151	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
169	Inconclusivo
171	Inconclusivo
180	<i>Mycobacterium xenopi</i>
181	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
189	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
292	<i>Mycobacterium gordonae</i>
191	Inconclusivo
200	<i>Mycobacterium abscessus</i>
204	<i>Mycobacterium genevense</i>
207	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
209	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
255	<i>Mycobacterium avium</i>

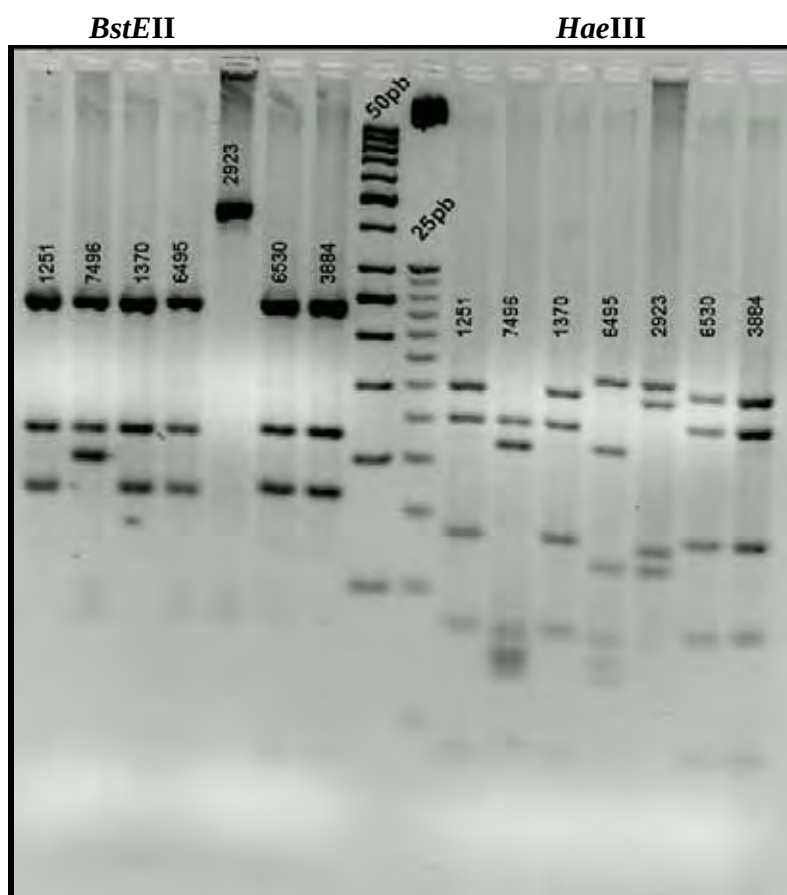


Figura 3: Fotografia do gel de agarose a 4% da digestão com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* do produto amplificado obtendo perfis eletroforéticos das micobactérias empregando a técnica do PRA. Para os isolados 1251, 1370, 6530 e 3884 foi obtido o seguinte perfil eletroforético na enzima de restrição *BstEII* – (235-120-85) e na *HaeIII* – (150-130-70), no isolado 7496 foi obtido na digestão com a enzima *BstEII* – (235-120-100) e *HaeIII* – (125-105-0), no isolado 6495 foi obtido o perfil na enzima de restrição *BstEII* – (235-120-100) e *HaeIII* – (160-105-60) e no isolado 2923 foi obtido o perfil na enzima de restrição *BstEII* – (440-0-0) e *HaeIII* – (160-145-60).

2- Genotipagem pela técnica do MIRU:

Após a confirmação da pureza e da identificação do *M. tuberculosis*, a genotipagem foi realizada em 121 isolados (112 + 9 isolados identificados pela técnica do PRA como pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*), onde foi

estudada a amplificação dos 12 *loci* de MIRU, para cada uma das cepas isoladas pela equipe do SESA.

Foi verificado que entre os 9 isolados de *M. tuberculosis*, que não apresentaram amplificação do fragmento de 245 pb (do *IS6110*), apenas 3 apresentaram amplificação em todos alelos e 6 falharam em amplificar certos alelos de MIRU (tabela 2). Resultados de MIRU dos demais isolados de *M. tuberculosis* que amplificaram fragmento de 245pb encontram-se divididos pelo ano de isolamento onde as tabelas (3, 4, 5, 6 e 7) possuem o número de cada cepa estudada e seu alelo para cada oligonucleotídeo iniciador de MIRU analisado.

Tabela 2: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles que não apresentaram *IS6110*.

Nºamostra	ALELOS											
	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
293	2	2	5	3	1	3	1	5	N/A	3	2	3
103	2	2	3	2	2	6	1	4	3	3	2	1
124	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
135	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
151	N/A	N/A	N/A	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
181	2	2	3	1	N/A	N/A	1	5	N/A	3	2	4
189	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
207	2	2	4	3	1	6	1	4	3	2	2	8
209	2	2	4	2	1	6	1	4	2	3	2	1

N/A – Não houve amplificação

Tabela 3: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2002.

Nº amostra	ALELOS											
	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
25	2	2	4	2	2	6	1	4	3	3	2	1
27	1	2	4	3	2	6	1	4	3	2	2	3
79	2	2	5	3	2	6	1	5	3	1	2	3
86	2	2	5	3	1	6	1	4	3	2	2	1
89	1	2	5	3	2	6	1	5	3	2	2	2
90	2	2	5	2	2	6	1	5	2	3	2	1
91	1	2	4	4	2	6	1	5	3	2	2	2
92	1	2	5	3	2	6	1	4	3	2	2	2
93	2	2	4	4	2	6	1	3	2	2	2	1
95	2	2	4	2	2	6	1	3	2	3	2	1
97	2	2	4	2	2	6	1	3	2	3	2	1
98	2	2	4	3	2	5	1	6	3	3	2	1
99	1	2	4	4	2	6	1	5	3	2	2	2
100	1	2	4	4	2	6	1	5	3	2	2	5
101	2	2	6	4	2	3	1	5	3	3	2	2
102	1	2	4	4	2	6	1	5	3	2	2	6
104	2	2	6	4	2	3	1	5	3	3	2	3
105	2	2	6	3	2	3	1	5	3	3	2	3
106	2	2	6	3	2	3	1	5	3	3	2	1
107	2	2	6	3	2	3	1	5	3	3	2	3
108	2	2	4	3	1	6	1	4	3	2	2	1
112	2	2	5	2	1	6	1	4	3	2	2	1
114	2	2	3	2	2	5	1	6	4	3	2	1
117	1	2	4	3	2	6	1	4	3	2	2	3

Tabela 4: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2003.

Nº amostra	ALELOS											
	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
119	1	2	4	2	2	7	1	4	1	2	2	4
123	2	2	5	2	1	3	1	5	1	3	2	3
125	2	2	3	2	2	5	1	6	3	3	2	1
129	1	2	4	2	2	8	1	5	1	2	2	4
130	2	2	3	0	2	5	1	5	1	3	2	4
133	2	2	5	2	2	3	1	5	3	3	2	3
134	1	2	2	3	2	6	1	5	2	2	2	1
136	2	2	2	3	2	5	1	2	3	3	2	3
137	1	2	3	3	2	6	1	5	3	2	2	2
146	2	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	4
147	1	2	3	3	2	6	1	5	3	2	2	2
148	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2	4
149	2	2	4	3	2	3	1	5	3	3	2	3
150	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	2	1
152	2	2	1	2	2	6	1	6	3	3	2	1
153	2	2	3	2	2	6	1	6	3	3	2	1
155	1	2	3	3	2	6	1	5	3	2	2	2
157	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	2	1
159	2	2	3	1	2	5	1	6	2	3	2	1
160	2	2	4	0	2	7	1	6	2	3	2	1
161	1	2	4	2	2	6	1	5	3	2	2	4
162	1	2	4	2	2	6	1	6	3	2	2	5
164	2	2	5	2	2	5	1	6	3	3	2	3
166	2	2	5	2	1	3	1	5	3	3	2	3
167	2	2	3	2	1	6	1	4	3	2	2	1
168	2	2	3	2	2	5	1	6	3	3	2	1

Tabela 5: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2004.

Nº amostra	ALELOS											
	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
170	1	2	2	2	1	6	1	5	3	2	3	4
173	1	2	3	3	2	2	1	5	3	2	3	2
175	2	2	4	1	2	6	1	4	1	3	3	1
176	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	3	3
179	1	2	4	2	1	6	1	7	3	2	3	4
184	2	2	3	3	2	6	1	5	3	3	3	1
186	2	2	2	1	2	6	1	4	3	3	3	1
193	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	3	1
199	1	2	3	2	2	6	1	5	3	3	3	1
203	2	2	4	3	2	7	1	5	3	3	3	5
206	2	2	4	3	2	4	1	3	3	2	3	1
208	2	2	2	2	2	6	1	4	3	3	3	1
289	1	2	3	4	1	6	1	5	3	2	3	1
290	2	2	4	2	1	3	1	5	3	3	3	3
291	2	2	3	0	2	3	1	5	2	3	3	1

Tabela 6: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2005.

Nº amostra	ALELOS											
	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
211	2	2	5	3	2	3	1	6	3	3	2	3
212	2	2	4	3	2	6	1	3	3	3	2	3
213	2	2	4	1	2	6	1	3	2	3	2	1
214	2	2	4	3	2	5	1	7	3	2	2	1
215	2	1	3	2	2	6	1	4	3	2	2	1
217	1	2	4	3	2	6	1	4	3	2	2	2
218	2	2	3	2	2	6	1	4	3	3	2	1
219	1	2	4	3	1	3	1	4	3	2	2	2
220	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	1
222	2	2	3	3	2	6	1	4	3	3	2	1
224	2	3	4	3	2	5	1	5	3	3	2	3
226	1	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	5
228	1	2	4	3	2	6	1	4	3	2	2	2
233	3	3	2	3	2	6	1	5	3	3	2	4
234	1	2	4	3	2	5	1	4	3	2	2	2
238	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
241	1	2	4	2	2	6	1	4	3	2	2	4
244	1	2	4	3	2	6	1	3	3	2	2	4
246	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2	2
250	2	2	4	1	2	5	1	6	3	3	2	1
253	2	2	3	2	2	6	1	6	3	3	2	1
236	2	2	3	3	2	6	1	3	3	3	2	1

Tabela 7: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados submetidos a técnica de MIRU mostrando o perfil genético de cada um deles no ano de 2006.

Nº amostra	ALELOS											
	02	04	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
256	2	2	4	0	1	5	1	6	3	3	2	1
257	2	2	5	3	1	4	1	5	3	3	2	3
258	2	2	2	2	2	6	1	4	3	3	2	1
259	1	2	3	3	1	6	1	5	3	2	2	9
260	2	2	5	3	1	4	1	5	3	3	2	3
261	2	2	4	2	2	6	1	6	3	3	2	1
265	2	2	3	3	2	2	1	4	3	3	2	3
266	1	2	5	3	2	6	1	4	3	2	2	2
268	2	2	4	3	2	6	1	3	3	3	2	4
269	1	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	4
271	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	3
272	2	2	4	2	2	6	1	4	2	3	2	1
273	1	2	3	3	1	6	1	5	3	2	2	8
274	1	2	4	2	2	6	1	4	3	2	2	3
275	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1
276	2	2	3	3	2	6	1	4	3	3	2	3
277	1	2	4	3	2	6	1	3	3	1	2	5
278	1	2	2	3	2	6	1	4	3	2	2	2
279	2	2	4	1	2	8	1	4	3	3	2	1
282	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	2
283	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	2	1
284	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
285	2	2	4	2	2	6	1	2	3	3	2	1
286	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	3
287	2	2	4	1	2	6	1	5	2	3	2	1

Na tabela 8 são apresentados os resultados da representatividade dos isolados clínicos analisados pela técnica de MIRU a partir das cepas de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar atendidos pelo SESA no período de 2002 a 2006.

Tabela 8: Relação entre Número de pacientes com tuberculose pulmonar, cultura positiva e Genotipagem

Ano	Nº pacientes atendidos com TB pulmonar	Nº de Cult. + recebidas	Isolados submetidos a téc de MIRU N / %
2002	41	36	26 / 72,2%
2003	41	33	29 / 87,9%
2004	43	25	19 / 76%
2005	32	31	22 / 71%
2006	40	38	25 / 65,8%
TOTAL	197	163	121 / 74,2%

Do total de culturas positivas recebidas, a técnica de MIRU foi realizada em 74, 2% (121/163) dos isolados. Empregando os valores de alelos gerados pelos 12 *loci* de cada isolado clínico do *M. tuberculosis* apresentados nas Tabelas de 2 a 7, tendo excluído os seis que não apresentaram todos os alelos e utilizando o programa BIONUMERICS®, foi gerado um dendrograma para avaliar o nível de similaridade existente entre os 115 isolados estudados (figura 4).



Figura 4: Dendrograma produzido com os resultados obtidos pela técnica de MIRU onde se observa a formação de 13 grupos genéticos.

Dos 115 isolados estudados por MIRU, 29 (25,2%) agruparam-se em 13 grupos clonais com similaridade de 100%, sendo 10 grupos de dois isolados cada (125 e 168; 153 e 253; 95 e 97; 91 e 99; 92 e 266; 217 e 228; 27 e 117; 260 e 257; 105 e 107; 106 e 220) e 3 contendo 3 isolados cada (150, 157 e 283; 137, 147 e 155; 224, 271 e 286). Os demais 86 isolados (74,8%) apresentaram perfil genético único. Entretanto, ao considerar uma similaridade igual ou superior a 83%, foi possível destacar 3 grandes grupos clonais A, B e C, envolvendo 86 (74,8%) de todos os isolados analisados. Nestes grandes grupos A, B e C estavam inseridos todos os 13 grupos clonais com 100% de similaridade. A distribuição dos isolados dentro dos referidos grupos são apresentados na quadro 9.

Quadro 9: Distribuição de isolados dentro dos grupos clonais com similaridade igual ou superior a 83%, incluindo os isolados agrupados com 100% de similaridade

	Similaridade de 83 ou mais	Total de isolados
A	(27 e 117), 274, (217 e 228), 282, 89, 234, (92 e 266), (137, 147 e 155), (91 e 99), 79, 246, 276, (224, 271, 286), 164, 134, 278, 289	25
B	209, 272, 90, (95 e 97), 213, 175, 86, 108, 112, 25, 218, 279, 103, 167, 215, 222, 236, 186, 208, 258, 285, 250, 256, 159, 160, 287, (153 e 253), (150, 157 e 283), 261, 275, (125 e 168), 114, 193, 199, 184, 98, 214, 152	43
C	133, 166, 149, 211, 238, 284, (257 e 260), 176, 101, 104, (105 e 107), 219, 290, (106 e 220), 123	18

3- Avaliação epidemiológica clássica:

Foram analisados apenas os dados epidemiológicos dos 115 pacientes dos quais foram obtidos isolados clínicos de *M. tuberculosis* com perfis genotípicos de MIRU. A análise foi baseada nos questionários (modelo em anexo), empregando o programa EPI-INFO versão 3.5.1, e os resultados estão apresentados nas tabelas 9, 10 e 11.

Os pacientes do sexo masculino representaram 73% (84/115) e do sexo feminino 27% (31/115) dos pacientes acometidos por tuberculose na cidade de Araraquara. A faixa etária variou de 15 a 87 anos de idade com predominância de 58,2% dos pacientes com idade entre 21 e 49 anos (média de 43,7 anos). Em relação a escolaridade, 67,9% deles apresentaram no máximo o primeiro grau completo. Quanto à procedência 45,2% dos pacientes, eram naturais da cidade de Araraquara e 43,5% do total ganhavam alguma renda. Nesta população avaliada, 23 (20%) pacientes foram à óbito e dentre estes, 8 (34,8%) pacientes tiveram a causa da morte devido a tuberculose pulmonar. O tempo médio de duração dos sintomas, desde o seu aparecimento até a procura de um atendimento médico, foi bastante alto, com média de 63,9 dias. No diagnóstico, 81,8% (94) dos pacientes apresentaram baciloscopia positiva. Em relação ao tratamento, na sua grande maioria, 106 (92,2%) pacientes foram tratados com o esquema I, dos quais 97 (84,3%) obtiveram alta por cura. Em relação a fatores predisponentes, pacientes portadores de HIV foram representados por apenas 8,7% da população ao passo que etilismo foi de 32,1%, tabagismo de 45,2% e contatos prévios com outros pacientes com tuberculose foi de 29,6%.

Tabela 9: Distribuição dos 115 pacientes portadores de tuberculose, segundo características demográficas.

CARACTERÍSTICAS	Nº (%) DE PACIENTES (n=115) ^a
Idade (anos)	
Média	43,7 ± 15,4
Médiana	43 (15 - 87)
Faixa etária	
15 a 20	6 (5,3%)
21 a 49	67 (58,2%)
50 a 87	42 (36,5%)
Sexo	
Feminino	31 (27%)
Masculino	84 (73%)
Natural de Araraquara	
Sim	52 (45,2%)
Não	63 (54,8%)
Escolaridade	
Analfabeto e 1º grau completo	78 (67,9%)
2º grau incompleto ou mais	33 (28,6%)
Ignorado	4 (3,5%)
Número de pessoas em casa	
1 a 2	14 (12,2%)
3 a 5	67 (58,3%)
Ignorado	34 (29,5%)
Renda	
Com renda	50 (43,5%)
Sem renda	27 (23,4%)
Ignorado	38 (33,1%)
Valor da Renda	
Média (reais)	592,47 ± 446,26 (140,00 – 2.000,00)
Óbito	
Sim	23 (20%)
Não	92 (80%)
Óbito por TB (n=23)	
Sim	8 (34,8%)
Não	15 (65,2%)

^a - valores diferentes são descritos acompanhando a análise correspondente

Tabela 10: Distribuição dos 115 pacientes portadores de tuberculose, segundo características clínicas e laboratoriais.

CARACTERÍSTICAS	Nº (%) DE PACIENTES (n=115) ^a
Tempo de sintomas (dias) (n=68)	
Média	63,9 ± 60,55 (3-365)
Tuberculose anterior	
Sim	10 (8,7%)
Não	84 (73%)
Ignorado	21 (18,3%)
Esquema de tratamento	
Esquema I (INH, RIF, PZA)	106 (92,2%)
Esquema IR (INH, RIF, PZA, EMB)	8 (6,9%)
Ignorado*	1 (0,9%)
Tipo de alta	
Cura	97 (84,3%)
Abandono	6 (5,2%)
Óbito	8 (7%)
Outro	4 (3,5%)
BCG	
Sim	32 (27,8%)
Não	21 (18,3%)
Ignorado	62 (53,9%)
Baciloscopia	
Positiva	94 (81,8%)
Negativa	20 (17,4%)
Não realizada	1 (0,8%)
Positiva +	56 (58,7%)
Positiva ++ e +++	38 (41,3%)
HIV	
Positivo	10 (8,7%)
Negativo	83 (72,2%)
Não Raelizado	16 (13,9%)
Ignorado	6 (5,2%)

^a - valores diferentes são descritos acompanhando a análise correspondente

* - paciente faleceu no dia do diagnóstico

RFP - Rifampicina

INH - Isoniazida

PZA - Pirazinamida

SM - Estreptomicina

EMB - Etambutol

ETH - Etionamida

CS - Cicloserina

PAS - Paranitrobenzoico

Tabela 11: Distribuição dos 115 pacientes portadores de tuberculose, segundo características epidemiológicas adicionais.

CARACTERÍSTICAS	Nº (%) DE PACIENTES (n=115)
Contato prévio com tuberculose	
Sim	34 (29,6%)
Não	55 (47,8%)
Ignorado	26 (22,6%)
Local de procedência	
São Paulo	92 (80%)
Outros Estados	15 (13%)
Ignorado	8 (7%)
Etilismo	
Sim	37 (32,2%)
Não	58 (50%)
Ignorado	20 (17,8%)
Tabagismo	
Sim	52 (45,2%)
Não	45 (39,1%)
Ignorado	18 (15,7%)

4- Correlação entre clusters de MIRU e dados de epidemiologia clássica :

O dendrograma gerou formação de 13 grupos genéticos sendo 3 grupos com três indivíduos cada e 10 com dois indivíduos cada. Tentativa de correlação entre os isolados em cluster e dados epidemiológicos dos pacientes que geraram estes isolados são apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Correlação entre os isolados de *M. tuberculosis* pertencentes a grupos genéticos definidos pelo MIRU com os dados epidemiológicas identificadas entre os 28 pacientes infectados por estas cepas

Grupo Genético	Nº da amostra	Data da Baciloscopia	Fatores de Risco: HIV/Etilismo/ Cont. Anterior	Tratamento/ Tipo de alta	Idade/ Profissão	Outras relações Epidemiológicas
I	91	21/03/2002	Neg/Não /Sim	Esquema I/ Cura	23 anos Trab. Rural	
	99	06/06/2002	Neg/Não/Não	Esquema I/ Cura	20 anos Balconista	
II	92	14/02/2002	Neg/ Não/Sim	Esquema I/ Cura	64 anos Jardineiro	
	266	21/02/2006	Neg/Sim/Não	Esquema I/Cura	37 anos Serv. Gerais	
III	217	17/02/2005	Ig/ Sim/ Ig	Esquema I /Cura	45 anos Serv Gerais	Moradores do mesmo bairro
	228	10/02/2005	Ig./Ig./Não	Esquema I/ Cura	65 anos Garçom	
IV	27	29/08/2002	Neg/Não/Sim	Esquema I/Cura	43 anos Pedreiro	Marido e esposa
	117	24/05/2002	Neg/Não/Sim	Esquema I/Cura	42 anos Do lar	
V	137	13/05/2003	Neg/Sim/Não	Esquema I/ Cura	61 anos Caseiro	Moradores de bairros próximos
	147	12/08/2003	Neg/Ig./Sim	Esquema I/ Cura	50 anos Pedreiro	
	155	06/10/2003	Ig./Ig./Não	Esquema I/ Óbito	38 anos Aposentado	

VI	224	24/04/2005	Neg/Ig./Não	Esquema I/ Cura	57 anos Pedreiro	
	271	06/11/2006	Ig./Ig./Ig.	Esquema IR/ Transferido	87 anos Do lar	
	286	29/07/2003	Ig./ Não/ Não	Esquema I/ Cura	81 anos Do lar	
VII	95	11/04/2002	Neg/Não/Não	Esquema I/ Cura	65 anos Caminho- neiro	
	97	03/05/2002	Neg/Sim/Não	Esquema I/ Cura	58 anos Vendedor	
VIII	125	04/02/2003	Neg/ Ig./Sim	Esquema I/ Cura	31 anos Do lar	
	168	11/12/2003	Neg/Não/Não	Esquema I/ Abandono	44 anos Téc. terapêutico	
IX	153	20/10/2003	Pos/Sim/Sim	Esquema IR/ Cura	48 anos Do lar	Moradores de bairros próximos
	253	14/12/2005	Neg/Não/Sim	Esquema I/ Cura	39 anos Cobrador de ônibus	
X	150	23/07/2003	Neg/Não/Sim	Esquema I/ Cura	39 anos Caminho- neiro	
	157	10/10/2003	Neg/Não/Não	Esquema I Abandono	26 anos Acompa- nhante	
	283	27/04/2006	Neg/Sim/ Não	Esquema I/Cura	58 anos Trab. Rural	
XI	105	30/08/2002	Neg/Ig./Ig.	Esquema I/ Cura	51 anos Jardineiro	
	107	29/08/2002	Neg/Não/Não	Esquema I/ Cura	38 anos Do lar	
XII	257	15/09/2006	Neg/Sim/Sim.	Esquema I/ Cura	43 anos Trab. Rural	
	260	05/07/2006	Neg/ Ig./Ig.	Esquema I/ Óbito	48 anos Passadeira	
XIII	106	05/03/2004	Neg/Sim/Sim	Esquema I/ Cura	37 anos Vendedor	Moradores próximos
	220	04/03/2005	Neg/Sim/Sim	Esquema I/ Cura	50 anos Pedreiro	

Dos 29 pacientes agrupados, apenas 10 (34,4%) eram do sexo feminino e 19 (65,6%) do sexo masculino. Com exceção de um paciente, os demais 28 (96,5%) foram tratados com o esquema I obtendo-se alta por cura em 82,8% dos casos. Apenas um caso de co-infecção HIV/TB foi verificado entre os pacientes em grupos genéticos formados, ao passo que 31% (9/29) eram etilistas, excetuando os pacientes com os dados ignorados. Em relação às profissões dos 19 pacientes masculinos agrupados por similaridade genética dos isolados de *M. tuberculosis* geneticamente, destacou-se a função de pedreiro com 21% (4/19), seguido do trabalhador rural com 15,7% (3/19) e entre os pacientes do sexo feminino, 70% (7/10) eram domésticas ou exerciam atividades em casa (passadeira e acompanhante).

V. DISCUSSÃO

O agente da tuberculose, o *M. tuberculosis* é transmitido principalmente através do ar sendo responsável por aproximadamente 10 milhões de novos casos da doença no mundo e mortalidade de cerca de 3 milhões de pessoas anualmente. Por outro lado, é estimado que 1/3 da população apresente a infecção latente, representando um grande reservatório da doença (SUPPLY *et. al.*, 2001).

Nas grandes cidades e capitais como São Paulo e Rio de Janeiro, os problemas da tuberculose são amplamente estudados (OELEMANN *et. al.*, 2007). Entretanto nas pequenas cidades do interior, poucas são as literaturas pertinentes (SEVERO&LEITE, 2005, MALASPINA *et.al*, 2008). Neste sentido, este trabalho objetivou estudar os fatores relacionados com a transmissão e mobilidade das cepas de *M. tuberculosis* numa cidade do interior de São Paulo. Foi empregada a técnica de MIRU para diferenciar e/ou agrupar isolados clínicos de *M. tuberculosis* através de suas características genotípicas. Foi avaliado, e também evidenciado quando a tuberculose era devido à infecção recente ou a reativação, bem como estabelecida as possíveis ligações epidemiológicas cruzando os resultados de genotipagem com os dados da epidemiologia clássica, contribuindo assim para o controle da tuberculose, em uma cidade do interior do Estado de São Paulo.

Em relação à identificação do *M. tuberculosis*, foi verificada a importância de se utilizar além da metodologia clássica, os métodos moleculares como PCR que amplificaram alelos específicos e a técnica do PRA. Em nosso trabalho, dos

158 isolados identificados como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* pelo método clássico, 9 (5,7%) foram identificadas como outras espécies de micobactérias (tabela 1), sendo identificado um isolado de cada uma das seguintes espécies: *M. xenopii*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. genevensis*, *M. gordonae*. Em quatro isolados a identificação foi inconclusiva. Excetuando *M. gordonae* e as 4 não identificadas, as demais são consideradas micobactérias potencialmente patogênicas para humanos, causando diferentes tipos de infecção como lesões cutâneas, e doenças pulmonares (DUCATI, 2005). A co-infecção *M. tuberculosis* e outras micobactérias potencialmente patogênicas têm sido descritas por diferentes autores (TANAKA *et. al*, 2003, LEITE *et al.*, 2005). Neste sentido, estes isolados poderiam estar contaminando o mesmo paciente, juntamente com o *M. tuberculosis*. Entretanto após o procedimento de congelamento, descongelamento e cultivo, devido à sua maior velocidade de crescimento em relação ao *M. tuberculosis*, estas micobactérias podem ter prevalecido nos subcultivos (STREIT *et. al*, 2008).

Por outro lado, apesar da técnica da PCR, empregando os *primers* que amplificam fragmento contido na sequência de inserção *IS6110*, ser de grande facilidade e ser um método altamente sensível (VAN EMBDEN *et.al*, 1993) em nosso trabalho esta técnica deixou de identificar 5,7% (9/158) dos isolados. A *IS6110* são transposons que aparecem na frequência de 0 a 20 vezes nas cepas de *M. tuberculosis* (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1993). Entretanto certas cepas de *M. tuberculosis* podem ou não apresentar o *IS6110* como foi encontrado em isolados no Sul da África e em um isolado em Minas Gerais onde haviam

deleções totais ou parciais do *IS6110* (GIBSON *et al.*, 2008). Nos isolados estudados provenientes da cidade de Araraquara, foi verificado que dentre as 149 cepas identificadas como *M. tuberculosis*, 9 não apresentavam *IS6110*. Com isso, a utilização da técnica do PRA nestes isolados cujo transposon está ausente, aumentou o acerto na identificação desses isolados.

Em relação aos dados epidemiológicos obtidos com a aplicação do questionário (tabelas 9, 10 e 11) entre os 115 pacientes com tuberculose pulmonar, a faixa etária predominante era de 21 e 49 anos. Nesta faixa etária estão os indivíduos economicamente ativos que estão no mercado de trabalho. Fato demonstrado no questionário de que 43,5% tinham algum tipo de renda. Isso traz problema social e pobreza concordando com Santos *et. al* (2007) e Severo&Leite (2005). Por outro lado, observa-se ausência de casos de tuberculose em menores de 15 anos justificado pelo fato de que 100% dos recém nascidos em Araraquara foram vacinados com a Vacina BCG (SINAN, 2006).

Destaca-se também que na população estudada, 73% dos pacientes eram do sexo masculino. A predominância do sexo masculino entre os pacientes com tuberculose pulmonar na cidade de Araraquara já havia sido observado por Malaspina (2004) que verificou frequência de 76,1% para este sexo. Em Américo Brasiliense, cidade que dista 21km de Araraquara, Severo&Leite (2005) verificaram também a frequência aumentada de 73,9% para o sexo masculino. Entretanto, na cidade de São Paulo, os dados encontrados no ambulatório Clemente Ferreira, a frequência de tuberculose entre os indivíduos do sexo

masculino foi apenas de 1,5 vezes superior ao do sexo feminino nos anos de 2005 a 2007 (dados não publicados). Estes dados talvez possam ser explicados pela diferença social ainda enraizada nas cidades do interior onde a grande maioria das mulheres são do lar (maior permanência nas casas), enquanto que os homens exercem atividades externas. Neste raciocínio, quanto a fatores de risco, apesar da infecção pelo HIV ser verificada em apenas 8,7% dos pacientes, o etilismo, que é também considerado fator imunodebilitante foi verificado em 32,1% dos pacientes, sendo marcante para o sexo masculino onde 41% destes eram etilistas.

Em relação aos grupos genéticos gerados pela técnica de MIRU (figura 4 e tabela 12), 29 isolados dos 115 analisados formaram 13 agrupamentos com 100% de similaridade. Segundo Small *et. al.* (1994), esses grupos significam a existência de transmissão recente. Neste sentido pode se inferir que nesta população estudada, cerca de 25,2% dos casos de tuberculose eram decorrentes de transmissão recente. Sendo a tuberculose uma doença oportunista, é possível observar que alguns pacientes, cujos isolados formaram grupos genéticos idênticos, só manifestaram a doença alguns anos depois do contato com o paciente infectado (tabela 12). Esta afirmativa é exemplificada pelo paciente número 92 onde o diagnóstico de tuberculose é datado de 14/02/2002 e do outro paciente de número 266 que gerou cepa em agrupamento é de 21/02/2006, assim como os pacientes 224, 271 e 286; 153 e 253; 150, 157 e 283, 106 e 220 que apresentaram a manifestação da doença em anos diferentes.

Por outro lado, 74,8% dos pacientes apresentaram isolados clínicos de *M. tuberculosis* com perfil genético único o que pode inferir que na população estudada de Araraquara, a tuberculose é decorrente de reativação em 74,8% dos casos. Malaspina (2004) trabalhando com a técnica de RFLP verificou para a mesma comunidade de Araraquara que 71,7% casos de tuberculose eram devido a reativação e 28,3% em decorrência da transmissão, dados confirmados por Pandolfi, (2006) utilizando a técnica de MIRU, para o mesmo período.

Para Sharma *et.al.* (2008), um estudo realizado em Kanpur, zona rural no sul da Ásia, a aplicação da técnica de MIRU não apresentou a formação de nenhum grupo genético afirmando que mesmo em pequenas populações há uma grande diversidade desses isolados. No estudo realizado com os isolados clínicos do maior ambulatório da cidade de São Paulo, o Instituto Clemente Ferreira, pela técnica de MIRU, também não foi verificado grupos com 100% de similaridade. Entretanto, das 86 cepas analisadas, 28 foram agrupadas em 14 grupos clonais com similaridade igual ou superior a 95%, e pertenciam às mesmas famílias de *Spoligotyping*. A vantagem de se estudar a epidemiologia molecular da tuberculose numa cidade menor é a possibilidade de se analisar quase que a totalidade dos isolados clínicos, como verificado neste trabalho, que no decorrer dos 5 anos, foi possível analisar pela técnica do MIRU 74,2% dos isolados de tuberculose pulmonar com cultura positiva. Este fato propicia dados mais fidedignos que possibilita analisar casos de infecção recente/reactivação. Foi verificado neste trabalho também a vantagem do MIRU em relação ao RFLP. A técnica do MIRU é baseada na PCR sendo de execução fácil quando

comparado a técnica do RFLP (SUPPLY *et al.*, 2000). E dentre os isolados clínicos de *M. tuberculosis*, obtidos na cidade de Araraquara, 7,8% (9/115) não apresentavam o IS6110. A técnica do MIRU independe da presença do IS6110, ao passo que a tipagem por RFLP é baseada exclusivamente na quantidade e locais de inserção do IS6110 (RITACCO *et.al.*, 2008). Entretanto, dos 9 isolados sem IS6110 detectados neste trabalho apenas em 3 foi possível caracterizar todos os 12 loci do MIRU, fato que deverá ser estudado posteriormente.

Em relação a resistência a quimioterápicos vigentes dos isolados clínicos pertencentes a grupos clonais, no Ambulatório do Instituto Clemente Ferreira, 62,9% eram constituídos por isolados com sensibilidade a todas as 3 drogas testadas e 37,1% com resistência a uma ou mais drogas (dados não publicados).

Analisando os grupos genéticos encontrados neste trabalho, pode-se verificar que todos eram constituídos de isolados sensíveis uma vez que em 82,7% dos casos houve alta por cura empregando o Esquema I (tabela 12). Houve ainda 1 caso de transferência, 2 casos de abandono, 2 casos óbito, entretanto nenhum destes devido à Tuberculose. Os dados deste trabalho associados aos obtidos pelo Ambulatório do Instituto Clemente Ferreira-SP (especializados em atendimentos a pacientes MDR-TB) reforçam o entendimento de que as cepas sensíveis às drogas é que estão predominantemente formando grupos genéticos, isto é, são mais infectantes.

Ainda, entre os grupos formados, analisando os fatores de risco para aquisição da Tuberculose, nossos resultados indicam que o etilismo é um dos

principais fatores predisponentes. Este dado difere dos encontrados nas cidades densamente habitadas como São Paulo e Rio de Janeiro (GIBSON *et. al*, 2008), bem como os descritos na literatura internacional como citado por Lannoy *et. al.*, (2008) onde o HIV figura como um dos principais fatores predisponentes à tuberculose. Em relação a profissão, no sexo masculino, os trabalhadores da área da construção civil, como os pedreiros, seguido de trabalhadores rurais, predominaram entre os pacientes com tuberculose.

Segundo as fontes do IBGE (Pesquisa Anual de Serviços - IBGE, 2006), a cidade de Araraquara é uma cidade agro-industrial onde predomina a indústria sucroalcooleira. Neste sentido, para os cortadores de cana, as condições desgastantes e a situação de stress em decorrência de um regime de trabalho intenso, provavelmente tenha favorecido o desenvolvimento da doença. Fato semelhante foi verificado por Severo&Leite (2005), analisando a incidência de Tuberculose na população de Américo Brasiliense, onde a cultura canavieira é uma das principais fontes de renda da cidade.

Analisando os grupos genéticos encontrados neste trabalho, com similaridade de 83% ou mais, pode se dizer que 74,8% dos isolados da cidade de Araraquara pertenciam a um dos 3 grandes grupos A1, B1 ou C1 (quadro 9). Malaspina (2004) também verificou algo semelhante empregando a técnica do RFLP, onde 52% dos isolados pertenciam às famílias A e P. Esta diferença de cerca de 20% na mesma população, provavelmente é devido à utilização de ferramenta diferenciada para análise epidemiológica, mas, sobretudo devido ao menor tempo de análise por Malaspina (2004).

Segundo Bradem *et al.*, (1997), agrupamentos de isolados de *M. tuberculosis*, nem sempre representam transmissão recente, mas pode refletir persistência de cepas endêmicas bem conservadas. Neste sentido o que podemos sugerir é de que a tuberculose em Araraquara se deve a presença de cepas endêmicas persistentes, responsáveis por cerca de 74,8% dos casos, além da existência de transmissão recente que neste trabalho foi de 25,2%. Outro fato que pode justificar a transmissão da Tuberculose é a baciloscopia, que em 81,8% dos casos, o paciente era bacilífero, aliado ao retardo de diagnóstico uma vez que os pacientes na sua maioria procuraram os médicos após 2 meses do início dos sintomas (tabela 10).

Segundo Supply *et. al.* (2006), os *loci* de MIRU são bastante estáveis e possuem um poder discriminatório bastante confiável, porém, observando a discriminação do *locus* 4, *locus* 24 e *locus* 39 nos isolados da cidade de Araraquara – SP, percebeu-se que o poder discriminatório desses *loci* não foi tão eficaz quanto os demais *loci* estudados.

A utilização da técnica de MIRU na genotipagem dos isolados de *M. tuberculosis* se mostrou bastante eficaz durante a realização deste trabalho, informando pacientes portadores de reativação assim como os de infecção recente. Mostrou ainda que os isolados que não foram confirmados pela amplificação do IS6110, e submetidos à técnica de MIRU, não foi obtido sucesso na maioria dos isolados pois não houve amplificação na maioria dos 12 *loci* estudados.

Percebemos que as técnicas moleculares não substituem os métodos epidemiológicos convencionais, mas ajudam a esclarecer problemas que não poderiam ser estudados.

Outras correlações epidemiológicas como relação familiar e proximidades de habitação foram verificados entre os grupos genéticos formados indicando a importância do trabalho integrado entre a epidemiologia clássica e a molecular.

VI. CONCLUSÕES

Em vista do trabalho apresentado, foi possível chegar a algumas conclusões bastante interessantes sobre a transmissibilidade da Tuberculose na Cidade de Araraquara- SP.

- A genotipagem pela técnica de MIRU é eficaz, reprodutível e de execução prática e facilitada;
- Nas pequenas cidades a genotipagem dos isolados de *M. tuberculosis* pela técnica de MIRU pode ser aplicada em porcentagem expressiva de casos de tuberculose, havendo possibilidade de encontrar grupos genéticos em frequências mais próximas da realidade do que nas grandes cidades;
- A genotipagem pela técnica de MIRU aliada a epidemiologia clássica, é um instrumento eficaz na avaliação da transmissão e fatores de riscos relacionados com a aquisição da tuberculose;
- Na cidade de Araraquara foi verificado presença de *M. tuberculosis* com ausência de *IS6110* indicando a necessidade de se complementar a identificação do *M. tuberculosis* pela técnica do PRA além da PCR;
- A técnica do MIRU é possível ser aplicada em isolados de *M. tuberculosis* sem *IS 6110*;

- Entre os 13 grupos genéticos formados, em alguns casos foi possível confirmar a transmissão recente, justificada pela correlação com a Epidemiologia Clássica, como pacientes que eram casados, habitavam no mesmo bairro ou bairros próximos e até sob o mesmo endereço;
- Em Araraquara, o etilismo é um dos fatores imunodebilitante mais importante;
- Trabalhadores da construção civil e trabalhadores rurais foram as profissões mais representativas na formação dos grupos genéticos;
- Em 25,2% dos casos, a Tuberculose na cidade de Araraquara é em decorrência da transmissão recente;
- Em aproximadamente 74,8% dos casos estudados de tuberculose pulmonar na cidade a tuberculose é devido à reativação;
- Em aproximadamente 74,8% dos casos, a tuberculose em Araraquara é devido a representantes de um dos 3 grandes grupos (A, B ou C).

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 *M. tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** v.46, n.4, p.1398-1406, 2008.

BRADEN C.R.; TEMPLETON G.L. ; CAVE M.D. ; VALWAY S.; ONORATO I.M.; CASTRO K.G. ; MOERS D. ; YANG Z. ; STEAD W.W.; BATES J.H. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. **J. Infect. Dis.** v.75, n.6, p.1446-1452, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programação de Medicamentos** – Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS-OMS. Disponível em : <http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArg/manual-tuberculostatico.pdf> . Acesso em 21 de junho de 2008.

CENSO 2007, Contagem da população (arquivo em pdf.) Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/contagem.pdf>. Acesso em 1 de julho de 2008.

CORBETT, E. L.; WATT, C. J.; WALKER, N.; MAHER, D.; WILLIAMS, B. G.; RAVIGLIONE, M. C.; DYE, C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Arch. of Internal Med.**, v. 163, p. 1009-1021, 2003.

COWAN, L.A.; MOSHER, L.; DIEM, L.; MASSEY, J.P.; CRAWFORD, J.T. Variable-Number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. **J. Clin. Microbiol.** v.40, n.5, p. 1592-1602, 2002.

DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. Micobactérias In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 409-421.

EISENACH, K.D.; CRAWFORD J. T.; BATES J.H. Repetitive DNA sequences as probes for *M. tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol**, v.26, n.11, p.2240-2245, 1988.

FROTHINGHAM, R.; HILLS, H. G.; WILSON, K. H. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J. Clin. Microbiol**, v. 32, p. 1639-1643, 1994.

GIBSON A.L.; HUARD R.C.; GEY VAN PITTIUS N.C.; LAZZARINI L.C.; DRISCOLL J.; KUREPINA N.; ZOZIO T.; SOLA C.; SPINDOLA S.M.; KRITSKI A.L.; FITZGERALD D.; KREMER K.; MARDASSI H.; CHITALE P.; BRINKWORTH J; GARCIA DE VIEDMA D; GICQUEL B; PAPE JW; VAN SOOLINGEN D.; KREISWIRTH B.N.; WARREN R.M.; VAN HELDEN P.D.; RASTOGI N.; SUFFYS P.N.; LAPA E SILVA J.; HO J.L. 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.**, v.46, n. 4, p. 1259-1267, 2008

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Pesquisa Anual de Serviços: relatório de comércio e serviços. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/comercioeservico/pas/pas2006/notastecnica2006.pdf> Acesso em 06 de janeiro 2009.

KAMERBEEK J.; SCHOULS L.; KOLK A.; VAN AGTERVELD M.; VAN SOOLINGEN D.; KUIJPER S.; BUNSCHOTEN A.; MOLHUIZEN H; SHAW R.; GOYAL M.; VAN EMBDEN J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* v.35, n.4 p.907-914, 1997

KWARA, A.; SCHIRO, R.; COWAN, L.S.; HYSLOP, N.E.; WISER, M.F.; HARRISON, S.R.; KISSINGER, P.; DIEM, L.; CRAWFORD, J.T. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J. Clin. Microbiol.** v.41, n.06, p. 2683-2685, 2003.

LANNOY L.H.; CORTEZ-ESCALANTE J.J.;, EVANGELISTA MDO S.;, ROMERO G.A. Tuberculosis incidence and risk factors among patients living with HIV/AIDS in public health service institutions in Brasilia, Federal District. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.41, n.6, p.549-555, 2008

LEITE, C. Q. F. ; ROCHA, A.S. ; LEITE, S.R.A; FERREIRA, R.M.C. ; SUFFYS, P.N ; FONSECA, L.S.; SAAD, M.H.F. A comparison of mycolic acids analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin layer chromatography and Molecular Methods. **Microbiol. And Immunol**, v.49, n.7, p.571-578, 2005.

LEITE, C.Q.F. e SATO, D.N. *Mycobacterium* In: SILVA, C.H.P.M. & NEUFELD, P.M. (Ed.) **Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2006, p.317-333.

LOCHT, C.; ROUANET, J.M.H.; MASCART, F. How a different look at latency can help to develop novel diagnostics and vaccines against tuberculosis - a review. **Expert. Opin. Biol.Ther.**, v.7, n.11, p.1665-1677, 2007.

LOPES, L.K.O.; TELES, S.A.; SOUZA, A.C.S.; RABAHI, M.F.; TIPPLE, A.F.V. Tuberculosis risk among nursing professionals from Central Brazil. **Am. J. Infect. Control.** ,v.36, p.148-151, 2008.

MALASPINA, A. C. **Estudo da epidemiologia molecular da tuberculose em pacientes de Araraquara-SP no período de 2000 a 2002.** 2004 69 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

MALASPINA A.C.; CAVALCANTI H.R.; LEITE C.Q.F.; MACHADO S.M.; VIANA B.H.; SILVA R.M.; HAGE E.F.; FIGUEIREDO W.M.; MARQUES E.; FERRAZOLI L.; ARBEX M.; LESSI M.; FONSECA L.S.; RIGOUTS L.; SAAD M.H.; Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* molecular typing in a tuberculosis low-endemic agro-industrial setting of Brazil. **J Infect Dis.** ,v.61 n.3 p231-233, 2008.

MAZARS, E.; LESJEAN; BANULS, A.L.; GILBERT, M.; VINCENT. V.; GICQUEL, B.; TIBAYRENC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **PNAS.** ,v. 98, n. 04, p. 1901-1906, 2001.

NIOBE-EYANGO, S.N.; KUABAN, C.; SORLIN, P.; THONNON, J.; VICENT, V.; GUTIERREZ, M.C. Molecular characteristics of strain of the Cameroon family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** ,42, n.11, p. 5029-5035, 2004.

OELEMANN, M.C.; FONTES, A.N.B.; PEREIRA, M.A.S.; BRAVIN, Y.; SILVA, G.; DEGRAVE, W.; CARVALHO, A.C.C.; BRITO, R.C.; KRITSKI, A.L.; SUFFYS, P.N. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in community health centers of Rio de Janeiro city, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, n.4, p. 455-462, 2007.

PANDOLFI, J.R. **Otimização da técnica de MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) para o estudo epidemiológico de pacientes com tuberculose**. 2006 84f. – (Doutorado) – Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista.

PANDOLFI, J.R.; MALASPINA, A.C.; SANTOS, A.C.B.; SUFFYS, P.N.; OELLEMANN, M.A.C.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C.Q.F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v.28, n.3, p.251-257, 2007.

PLIKAYTIS, B.B; PLIKAYTIS, B.D; YAKRUS, M.A; BUTLER, W.R; WOODLEY, C.L; SILCOX, V.A; SHINNICK, T.M. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. **J. Clin. Microbiol.** v.30, n7, p.1815-1822, 1992.

PREFEITURA de Araraquara. Portal Araraquara – Prefeitura de Araraquara – **História da Cidade**. Disponível em: <http://www.araraquara.sp.gov.br/> . Acesso em 26 de junho de 2008.

RITACCO V; LÓPEZ B; CAFRUNE PI; FERRAZOLI L; SUFFYS PN; CANDIA N; VÁSQUEZ L; REALPE T; FERNÁNDEZ J; LIMA KV; ZURITA J; ROBLEDO J; ROSSETTI ML, KRITSKI AL, TELLES MA, PALOMINO JC, HEERSMA H, VAN SOOLINGEN D; KREMER K; BARRERA L. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.103, n.5 p.489-492, 2008.

SANTOS, M.L.S.G.; VENDRAMINI, S.H.F.; GAZETTA, C.E.; OLIVEIRA, S.A.C.; VILLA, T.C.S. Poverty: Socioeconomic characterization at Tuberculosis. **Rev. Latinoam. Enferm.** n.15 p.762-767, 2007

SAVINE, E.; WARREN, R.N.; VAN DER SPUIJ, G.D.; BEYERS, N.; VAN HELDEN, P.D.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. Stability of variable-number tandem repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units from 12 loci in several Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n.12, p. 4561-4566, 2002.

SEVERO, N.P.F. e LEITE, C.Q.F. Caracterização da população portadora de tuberculose no município de Américo Brasiliense no período de 1992 a 2002. **Rev Cienc Farm. Araraquara**, v.26, n.1, p. 83-86, 2005.

SHARMA P.; CHAUHAN D.S.; UPADHYAY P.; FAUJDAR J.; LAVANIA M.; SACHAN S.; KATOCH K.; KATOCH V.M. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a rural area of Kanpur by spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) typing. **Infect Genet Evol.** v.8, n.5, p.621-626, 2008.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN – **Distribuição de casos segundo forma clínica e grupo etário**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>>. Acesso em 20 de julho de 2008.

SMALL, P. M.; HOPEWELL, P. C.; SINGH, S. P.; PAZ, A.; PARSONNET, J.; RUSTON, D. C.; SCHECTER, G. F.; DALEY, C. L.; SCHOOLNIK, G. K. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 1703-1709, 1994.

SOUZA F.B.; VILLA T.C. ; CAVALCANTE S.C.; RUFFINO NETTO A.; LOPES L.B.; CONDE M.B. Peculiarities of tuberculosis control in a scenario of urban violence in a disadvantaged community in Rio de Janeiro, Brazil. **J Bras Pneumol.**, v. 33, n.3, p.318-322, 2007

STREIT M.; BREGENZER T.; HEINZER I. Cutaneous infections due to atypical mycobacteria. **Hautarzt.**, v.59, n1, p.59-70, 2008

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Mol. Microbiol.**, v.36, n.3, p.762-771, 2000.

SUPPLY, P.; LESJEAN S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; LOCHT C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.10, p.3563-3571, 2001.

SUPPLY P.; ALLIX C.; LESJEAN S.; CARDOSO-OELEMANN M.; RÜSCHGERDES S.; WILLERY E.; SAVINE E.; DE HAAS P.; VAN DEUTEKOM H.; RORING S.; BIFANI P.; KUREPINA N.; KREISWIRTH B.; SOLA C.; RASTOGI N.; VATIN V.; GUTIERREZ M.C.; FAUVILLE M.; NIEMANN S.; SKUCE R.; KREMER K.; LOCHT C.; VAN SOOLINGEN D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n.12, p.4498-4510, 2006.

TANAKA I.I.; ANNO I.S.; LEITE S.R.; COOKSEY R.C.; LEITE C.Q.F. Comparison of a multiplex-PCR assay with mycolic acids analysis and conventional methods for the identification of mycobacteria. **Microbiol Immunol.**, v.47, n.5, p.307-312, 2003.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTFGER, E.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.175-178, 1993.

TORTOLI, E. Impacts of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16, p.319-354, 2003.

VAN EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.D.; DALE, J.W.; EISENACH, K.D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; MCADAM, R.; SHINNICK, T.M.; SMALL, P.M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.02, p.406-409, 1993.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; GROENEN, P. M. A.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1987-1995, 1993.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data - Global tuberculosis Control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008. "WHO/HTM/TB/2008.393". Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/> Acesso em 1 de julho de 2008.

VIII- ANEXOS

ANEXO I**SERVIÇO ESPECIAL DE SAÚDE DE ARARAQUARA - SESA
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA – USP*****PROGRAMA DE TUBERCULOSE*****CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA E
MICROBIOLÓGICA DOS PACIENTES****Data da entrevista:** ____ / ____ / ____**1. Identificação:**Nome: _____

Cadastro/Matrícula: _____

Nascimento: ____/____/____ Idade Presumida(em anos): ____ Naturalidade: _____ Estado:
_____Endereço: _____

Bairro: _____

Referência: _____

Município: _____

Endereço trabalho/escola: _____ Bairro:

Cor ou Raça: Branca Preta Parda Amarela Indígena Sem declaração

Procedência: _____

Estado: _____

Zona: Urbana Rural Sem residência fixa Penitenciária Sem dados

Estado civil: Casado Solteiro Viúvo Separado/Divorciado/Desquitado União consensual

2. Caracterização sócio-econômica:

Profissão: _____

Atividade: _____

Situação Profissional atual: Vínculo empregatício Autônomo Aposentado Desempregado

Rendimento mensal atual: R\$ _____ Sem renda há quanto tempo? _____ (meses)

Escolaridade: Analfabeto Até 4ª série do 1º grau 1º grau incompleto 1º grau completo
2º grau incompleto 2º grau completo Universitário incompleto Universitário completo

Moradia: Unifamiliar Multifamiliar Coletiva Rua
Outra: _____

Nº pessoas que vivem na mesma casa: 1 2 3 4 5 ou mais

Nº refeições diárias: 1 2 3 ou mais nenhuma

Onde passa a maior parte do tempo? Domicílio Trabalho Rua Clube/associação
Bar ou similar Outro: _____ Nº horas/dia: _____

3. Situação Epidemiológica:

Notificado em : ____/____/____ Semana epidemiológica: ____/____ Ficha epidemiológica nº: ____

Notificado por:

SESA UBS PS Hospital Laboratório Médico conveniado
Médico particular Controle de comunicante Busca ativa da Vigilância Epidemiológica

Vacina **BCG-ID** ____/____/____ Cicatriz : + -

Tem ou teve contato com paciente de Tuberculose?

Não Sim, há ____ meses/anos Por ____ meses/anos Nome: _____

Teve Tuberculose anteriormente?

Sim Quantas vezes? _____ Não

Tipo de tuberculose: _____ início da doença: ____/____/____

Local do tratamento: _____ tratamento de ____/____/____ a
____/____/____

Alta: cura mudança de diagnóstico abandono transferência

Tipo de tuberculose: _____ início da doença: ____/____/____

Local do tratamento: _____ tratamento de ____/____/____ a
____/____/____

Alta: cura mudança de diagnóstico abandono transferência

Tipo de tuberculose: _____ início da doença: ____/____/____

Local do tratamento: _____ tratamento de ____/____/____ a
____/____/____

Alta: cura mudança de diagnóstico abandono transferência

4. Antecedentes Pessoais:

Tabagismo: Sim, há _____ anos Nº cigarros/dia: _____ Não

Etilismo: Sim, há _____ anos Não

Comportamento de risco para HIV/AIDS? Sim, qual ? _____
Não

Sorologia HIV: Negativa Positiva Indeterminada Não Realizada
Recusa

ELISA1 em: ____/____/____ ELISA2 em: ____/____/____

Diabetes Candidíase oral Blastomicose Outra micose profunda
(_____) Hanseníase Doença mental Anemia Câncer de
pulmão Outra neoplasia (_____) Não

Cirurgia: Sim, de _____ Não

Uso de droga imunossupressora: Sim, qual? _____
Não

5. História da doença atual:

Sintomas: Início em ____/____/____ emagrecimento febre tosse anorexia
dispnéia
escarros hemoptóicos fraqueza sudorese noturna dor torácica outro

Local de diagnóstico: _____ **Data:**
____/____/____

Exames: PPD ____/____/____ Resultado : _____mm **Não realizado**

Baciloscopia nº ____ **Data:** ____/____/____ escarro outro material: _____
 Positivo IB= ____ Negativo **Não realizado**

Cultura : nº ____ escarro outro material: _____
 Positiva Negativa, realizado , ____/____/____ **Não realizada**

Identificação: _____, realizado , ____/____/____ **Não realizada**

Antibiograma Preencher: S (sensível) R (resistente) realizado , ____/____/____ **Não realizado**

Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Streptomicina
 Etambutol Etionamida Cicloserina Paranitrobenzoico Outro

PCR :

Raio-X de tórax: Normal Suspeita Tb Compatível c/ outras afecções Sequela **Não realizado**

Raio-X de outros locais: Sim, qual? _____ Não

Biópsia ganglionar Biópsia pulmonar Biópsia pleural
 Outros: _____

Avaliação antropométrica inicial: Peso: _____Kg Altura: _____ m IMC= _____

Forma clínica: Pulmonar Pleural Ganglionar Meníngea Outra: _____

Início do tratamento: ____/____/____ **Esquema:** ____ **Fim do tratamento:** ____/____/____

Medicamentos utilizados: Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Etambutol Etionamida

Streptomicina Amicacina Clofazimina Norfloxacino Outro

Baciloscopia de Controle : Data: ____/____/____ Negativa Positiva, IB= ____ **Não realizada**

Cultura: Data ____/____/____ Negativa Positiva **Não realizada** **Identificação:**

Data: ____/____/____ Negativa Positiva, IB= _____ **Não realizada**

Cultura: Data ____/____/____ Negativa Positiva **Não realizada**

Identificação: _____

Data: ____/____/____ Negativa Positiva, IB= _____ **Não realizada**

Cultura: Data ____/____/____ Negativa Positiva **Não realizada** **Identificação:**

Tratamento 2: Início ____/____/____ **Motivo:** ____ **Esquema:** ____ **Fim do tratamento 2:**

____/____/____

Na Alta medicamentosa :

Baciloscopia : Data: ____/____/____ Negativa Positiva, IB= _____ **Não realizada**

Cultura: Data ____/____/____ Negativa Positiva **Não realizada**

Identificação _____

Raio-X de tórax: Normal Suspeita Tb Compatível c/ outras afecções Sequela **Não realizado**

Outros Exames :

ALTA : ____/____/____ **TIPO :** _____ **Peso =** _____
Kg

Revisão 1 : ____/____/____ _____ **Revisão 2 :** ____/____/____

Exame físico de alta:

Internação: ____/____/____

Motivo: _____

Local: _____ **Alta hospitalar:** ____/____/____ **Tipo:** _____

Internação: ____/____/____

Motivo: _____

Local: _____ **Alta hospitalar:** ____/____/____ **Tipo:** _____

Retorno ao SESA: ____/____/____

Esquema proposto:

Outras intercorrências: 1) _____ Data: ____/____/____

2) _____ Data: ____/____/____

ÓBITO

Devido à tuberculose : ☐ **sim** ☐ **não**

Data : ____/____/____ **Local :** _____

Causas: _____

ANEXO II

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Seção Técnica Acadêmica

Protocolo nº 17/2002-CEP

Interessado: Profª Drª CLARICE QUEICO FUJIMURA LEITE

Projeto: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM
PACIENTES DA REGIÃO DE ARARAQUARA

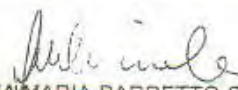
Parecer nº 01/2003 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Epidemiologia molecular da tuberculose em pacientes da Região de Araraquara", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considera o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Lembramos Vossa Senhoria da necessidade de entrega do relatório em setembro de 2004. Neste relatório deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 31 de janeiro de 2003.


Profª. Drª. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI
Coordenadora do CEP

ANEXO III

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Obrigatório para Pesquisa Científica em Seres Humanos-Resolução nº 196 de 10/10/96 - Conselho Nacional de Saúde)

Dados sobre a pesquisa

Título do Projeto: Epidemiologia Molecular da Tuberculose em pacientes da região de Araraquara

Coordenadora do projeto: Clarice Queico Fujimura Leite telefone: (0XX16) 3301 6953

Médicos responsáveis: Dr. Eduardo F. Hage e Dr. Walter Manso Figueiredo telefone: (0XX16) 222 2277

Telefone de contato do Cômite de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP: (0XX16) 3301 6897

Nossa preocupação com o aumento da tuberculose no Brasil é a justificativa deste estudo. Seu objetivo é conhecer melhor a transmissão da doença em pacientes da região de Araraquara. Os resultados desta pesquisa possivelmente oferecerão subsídios ao aprimoramento dos programas de saúde pública. **Sua participação do estudo não é obrigatória e caso não deseje participar, seu atendimento não será prejudicado.** Os dados pedidos no questionário são aqueles necessários ao seu atendimento ambulatorial e outros que farão parte do estudo já explicado. Os dados desta pesquisa serão sigilosos, sendo seu nome mantido sob anonimato. Caso você tenha alguma dúvida converse com um dos responsáveis.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu _____, declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo médico(a) ou agente de saúde, concordei em participar do projeto de pesquisa acima e com os seguintes termos:

1. Eu compreendo que minha participação é inteiramente voluntária e não é, de forma alguma, condição para que receba tratamento médico neste serviço de saúde. Se eu decidir não participar desta pesquisa ou interrompê-la a qualquer momento não serei prejudicado.

2. Eu responderei a um questionário padronizado que investigará aspectos sobre meu perfil sócio-econômico. O questionário identificará fatores de risco que possam estar associados à transmissão da tuberculose, além de analisar o uso de drogas e/ou tóxicos, hábitos sexuais e transmissão sanguínea prévia.

3. Após aconselhamento sobre o significado do teste sorológico para o vírus da Aids, eu permitirei que o resultado seja utilizado nesta pesquisa.

4. Posso me recusar a fazer o teste sorológico para o vírus da Aids, sem que isto implique na minha exclusão desta pesquisa.

Data ____/____/____

Assinatura do paciente

Endereço:

Identidade (Nº do RG):

IX – ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS



Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia

Pandolfi, J.R.^{1,2}; Malaspina, A.C.¹; Santos, A.C.B.¹; Suflys, P.N.³; Oellermann, M.A.C.¹; Valentini, S.R.¹; Leite, C.Q.F.^{3*}

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP Araraquara, SP, Brasil.

²Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Camilo Castelo Branco, UNICASTELO, Descalvado, SP, Brasil.

³Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Tuberculose, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido 27/11/2007 / Aceito 28/02/2008

RESUMO

A existência de sistemas que possam diferenciar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* epidemiologicamente relacionadas daquelas não relacionadas, são ferramentas importantes. A tuberculose é uma doença infecciosa, na qual técnicas de biologia molecular permitem a obtenção de informações muito difíceis ou impossíveis de serem alcançadas pela epidemiologia clássica. Um método de tipagem discriminatório, baseado no DNA genômico bacteriano, denominado RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), é empregado no estudo epidemiológico da tuberculose. Entretanto esta técnica é trabalhosa e sua substituição é uma tendência. Assim, outras sequências têm sido usadas como marcadores epidemiológicos, como na *Spoligotyping*, a qual é baseada na PCR, com hibridização diferencial subsequente dos produtos amplificados. O polimorfismo observado nas diferentes amostras é provavelmente produto de recombinação homóloga. A técnica de MIRU (*mycobacterial interspersed repetitive unit*) é um sistema rápido e reprodutível, onde ocorre a geração de genótipos baseados no estudo de 12 loci contendo VNTRs (número variável de repetições em sequência) do complexo *M. tuberculosis*. Ela compara as cepas de áreas geográficas diferentes e permite o rastreamento do movimento de linhagens individuais, como no RFLP. Este tipo de abordagem permite a análise de maior número de cepas e a identificação de um número maior de focos de contaminação dentro da população, propiciando melhores maneiras de frear a transmissão da doença.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculose; epidemiologia molecular; genotipagem.

INTRODUÇÃO

A tuberculose, doença infecto-contagiosa, acomete o homem há milênios, como demonstram os esqueletos fósseis de seres humanos com lesões ósseas compatíveis com essa enfermidade encontrados em várias regiões e datados até de cinco mil anos a.C. (Marques & Cunha, 2003). Com os movi-

mentos migratórios e com as grandes guerras, a doença espalhou-se pelo mundo.

A tuberculose é uma doença crônica, causada pelo complexo *M. tuberculosis* e sua forma clínica é caracterizada principalmente pelo comprometimento dos pulmões (pulmonar), podendo também atingir outros sítios anatómicos (extrapulmonar) ou ocorrer de maneira disseminada (disseminada ou miliar).

As espécies do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. caprae*) pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único representante da família *Mycobacteriaceae* e os membros deste complexo se apresentam em forma de bacilos curvos ou retos de 0,2 a 0,7 µm de largura e 1,0 a 3,0 µm de comprimento. Possuem a propriedade de álcool-ácido resistência devido ao alto conteúdo lipídico de sua parede celular (cerca de 60% de seu peso seco) que contém ácidos graxos de cadeia longa (75 a 90 carbonos) denominados ácidos micólicos (Sherris, 1984; Sato, 1999; Strohl et al., 2004). São organismos aeróbios, não esporulados e de crescimento lento, ou seja, requerem mais de sete dias para produzir colônias visíveis em meios de cultura sólidos, pois a natureza hidrofóbica de sua superfície celular leva à formação de aglomerados e a alterações na permeabilidade dos nutrientes através da célula (Sherris, 1984; Sato, 1999; Strohl et al., 2004).

A tuberculose é transmitida de pessoa a pessoa por via aérea, através de gotículas de 1,0 a 5,0 µm de diâmetro produzidas pelo indivíduo portador da forma clínica pulmonar ou laringea da doença, ao tossir, espirrar ou falar (Edwards & Kirkpatrick, 1986). Após a inalação, as gotículas, que geralmente contêm de um a dois organismos, são levadas até a árvore brônquica e atingem os alvéolos, local onde os bacilos iniciarão o processo patológico da doença, se conseguirem sobreviver às defesas primárias e se multiplicarem dentro do macrófago alveolar (Edwards & Kirkpatrick, 1986; Horsburgh, 1996).

A patogenicidade do *M. tuberculosis* depende de sua capacidade de sobreviver e crescer dentro das células do hospedeiro. O bacilo não produz toxinas demonstráveis, porém, quando envolvido pelos macrófagos, inibe a fusão das vesículas fagocíticas com os lisossomos através dos

*Autor Correspondente: Clécio Qazian Fajonura Leite - Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacéuticas - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rodovia Araraquara-Juli, km 01 - CEP: 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil - e-mail: leitecqf@cfar.unesp.br

Epidemiologia molecular da tuberculose

sulfolipídeos (Strohl et al., 2004).

O crescimento da bactéria é lento, ocorrendo aproximadamente uma divisão a cada intervalo de 25 a 32 horas dentro do macrófago. Os organismos se multiplicam por um período de duas a doze semanas até atingirem o número de 10^7 a 10^8 células, quantidade suficiente para induzir uma resposta imune celular que poderá ser detectada pela reação do teste tuberculínico (PPD) (Smith & Wiengeshauss, 1989). Muitas vezes um resultado de PPD positivo é a única indicação de que a infecção com o *M. tuberculosis* tenha ocorrido.

O *M. tuberculosis* estimula tanto as respostas imunes humorais como as celulares, embora os anticorpos circulantes não forneçam resistência ao organismo. A imunidade celular e a hipersensibilidade tardia aos antígenos proteicos do bacilo se desenvolvem durante o curso da infecção e contribuem para a patologia e a imunidade da doença (Sherris, 1984; Strohl et al., 2004).

Indivíduos com infecção latente, ou seja, que não apresentam a doença em sua forma ativa, não podem transmitir os bacilos. Estima-se que cerca de 10% das pessoas que adquirem a infecção e não recebem a terapia preventiva não desenvolver a doença; nos 90% restantes, a infecção permanecerá latente ou será eliminada pelas defesas do organismo. O risco é maior nos primeiros dois anos após a infecção, período em que a manifestação da doença é observada em 50% dos casos (Bloom, 1994). Por outro lado, os bacilos podem permanecer vivos no interior dos granulomas durante toda a vida do indivíduo, reativando-se diante de condições favoráveis ao seu desenvolvimento conforme dados de nossos estudos (Leite & Telaro Junior, 1997).

Portanto, a tuberculose pode resultar de uma infecção exógena (infecção recente), causada pelo contágio com um paciente bacilífero, ou de uma infecção endógena (reativação), quando ocorre a recrudescência da infecção primária.

O indivíduo portador pode sofrer uma redução de sua capacidade em responder à infecção sob algumas condições. Entre elas estão o uso de corticóides e outras drogas imunossupressoras e o desenvolvimento de certas doenças como diabetes mellitus e a infecção pelo vírus HIV. Nestas situações, se o indivíduo for infectado pelo *M. tuberculosis*, a probabilidade do desenvolvimento da forma ativa da tuberculose é maior (American Thoracic Society, 2000).

A tuberculose é a principal causa de morte em adultos decorrente de um único agente infeccioso (Mazars et al., 2001). Esta doença continua sendo responsável por altos índices de mortalidade em todo o mundo, apesar de se conhecer seu agente etiológico e suas formas de transmissão, de dispor-se de quimioterápicos eficazes e de se praticar vacinação em larga escala nas populações (Leite & Telaro Junior, 1997). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de dois bilhões de pessoas estão infectadas pelo *M. tuberculosis*, o que corresponde a um terço da população mundial, ocorrendo anualmente oito milhões de novos casos de tuberculose e três milhões de mortes (Raviglione et al., 1995).

Voltou-se hoje, como num passado não muito remoto da história da Medicina, a enfatizar-se a importância de fatores não-biológicos determinantes da morbidade e da mortalidade. Em algumas enfermidades a influência de tais fatores é mais nítida, como no caso da tuberculose (Pereira & Ruffino Netto, 2003). A simples presença do bacilo não basta para causá-la. Frequentemente, os fatores de ordem social, econômica e cultural têm que estar presentes para que a moléstia se desenvolva. Assim sendo, muitas vezes, alterações nas condições de vida das pessoas são fundamentais para explicar modificações em sua incidência e prevalência (Pereira & Ruffino Netto, 2003). Em todo o mundo, o mapa da prevalência da tuberculose se adapta ao mapa da miséria. A desnutrição deprimindo a imunidade celular justifica o maior adoecimento. Por si só, as condições de moradia, promíscuas, em cômodos úmidos, e sem ventilação, propiciam uma maior carga infectante, que também condiciona o maior adoecimento por primo-infecção ou por re-infecção exógena (Marques & Cunha, 2003).

Atualmente, em várias regiões do mundo, considera-se que são responsáveis pela elevação alarmante da incidência da tuberculose, a infecção pelo HIV, o uso de drogas injetáveis, o aumento da pobreza, do número de desabrigados, a migração, a má nutrição, a urbanização e a perda da qualidade dos programas de controle da tuberculose (Antunes & Waldman, 1999; Marques & Cunha, 2003; Sola et al., 2003).

Antes do início da epidemia da Aids, aproximadamente 85% dos casos de tuberculose reportados eram pulmonares; os 15% dos casos restantes envolviam locais extrapulmonares ou ambas as formas (Farer et al., 1979). Esta distribuição é substancialmente diferente entre as pessoas infectadas com o HIV. Small et al. (1991), em um grande estudo retrospectivo de tuberculose em pacientes com Aids em infecção avançada, descreveram que 38% dos doentes apresentavam apenas o envolvimento pulmonar, 30% sítios extrapulmonares e 32% apresentavam envolvimento tanto pulmonar como extrapulmonar.

A epidemiologia busca identificar os fatores determinantes da distribuição da doença no tempo e no espaço, bem como os fatores envolvidos em sua transmissão, manifestação e evolução, sempre motivada pela oportunidade ou possibilidade de intervir e preveni-la (Higginson, 1977; Foxman & Riley, 2001).

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE

A epidemiologia molecular utiliza concomitantemente técnicas de biologia molecular, que caracterizam o conteúdo nucleotídico e a epidemiologia clássica, que estuda a distribuição e os fatores determinantes da doença nas populações humanas (Foxman & Riley, 2001).

Levin et al. (1999) definem que os objetivos práticos da epidemiologia molecular são identificar os microrganismos responsáveis por doenças infecciosas, determinar sua rota de transmissão e identificar os genes

Epidemiologia molecular da tuberculose

responsáveis por sua virulência, resistência a drogas e produção de antígenos relacionados a vacinas. A epidemiologia molecular envolve, além do uso de técnicas moleculares para o estudo da taxonomia, filogenia ou genética de populações, a aplicação destas técnicas em problemas epidemiológicos (Foxman & Riley, 2001).

Marcadores moleculares são empregados, em estudos de epidemiologia molecular de doenças infecciosas, para rastrear a transmissão de linhagens específicas de seus agentes etiológicos. Esses dados são normalmente aplicados para descrever-se a distribuição de cepas em populações humanas e para verificar os fatores de risco de hospedeiros e parasitas, na dispersão da doença (Murray & Alland, 2002).

Assim, sistemas que possam diferenciar cepas de *M. tuberculosis* epidemiologicamente relacionadas, das outras não relacionadas, são ferramentas poderosas numa investigação de surtos de infecção hospitalar, ou comunitária, bem como para diferenciar reativação endógena de uma re-infecção exógena. A tipagem por bacteriófagos tem sido empregada com esta finalidade, mas o número de tipos delineados por esta metodologia é baixo, agrupando cepas não correlacionadas.

A tuberculose é um exemplo de doença infecciosa em que as técnicas de biologia molecular permitiram a obtenção de informações que seriam difíceis ou até mesmo impossíveis de serem conseguidas através de métodos laboratoriais convencionais.

Os métodos de tipagem baseada na sequência de inserção IS6110 são usados para uma variedade de investigações epidemiológicas como a confirmação de surtos em instituições, a identificação de surtos em situações que parecem ser de casos esporádicos de tuberculose, de fatores de risco para infecções recentes ou para doenças em progressão rápida, o rastreamento geográfico da distribuição de clones de *M. tuberculosis* de importância para a saúde pública e a avaliação de contaminação laboratorial cruzada com o *M. tuberculosis* (Foxman & Riley, 2001).

As espécies do complexo *M. tuberculosis* são geneticamente muito similares, com 85 a 100% de relação DNA-DNA diferindo entre si quanto à sua epidemiologia (Frothingham et al., 1994). Estas espécies possuem uma sequência de inserção exclusiva em seu cromossomo identificada como IS6110, de 1.355 pares de base, relacionada à família IS3 das enterobactérias.

Um método de tipagem altamente discriminatório, baseado na variação da sequência de DNA no genoma bacteriano, denominado de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) é amplamente utilizado no estudo epidemiológico da tuberculose. Este método baseia-se na digestão do DNA genômico bacteriano por enzimas de restrição, denominadas de endonucleases, que geram fragmentos de diferentes comprimentos. Os fragmentos são então separados em gel de agarose e hibridizados por sonda de DNA. A sequência mais utilizada para o estudo epidemiológico da tuberculose é a IS6110. Todas as cepas de *M. tuberculosis* contêm de uma a 20 cópias de IS6110, A

localização, assim como a quantidade de cópias dessa inserção presente no cromossomo, variam enormemente de cepa para cepa, mas são relativamente estáveis dentro da mesma cepa (Supply et al., 2001). Estudos epidemiológicos realizados com a utilização de uma metodologia padronizada, como o RFLP, permitem que os resultados obtidos em diferentes laboratórios possam ser analisados, o que possibilita a comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas e que permite que a movimentação de linhagens individuais possa ser rastreada (van Embden et al., 1993).

Dados assim são de grande importância no estudo da transmissão global da tuberculose e na identificação de linhagens com propriedades particulares, como alta infectividade, virulência e resistência a drogas. A análise de grande número de isolados pode gerar respostas para questões de longa data como a eficiência da vacinação com BCG e a frequência de reativação versus re-infecção, questões estas que são de importância crescente com o surgimento da AIDS pandêmica (van Embden et al., 1993).

Em nosso laboratório, foi implantada por Malaspina (2004), a técnica de RFLP para tipagem de *M. tuberculosis*, quando estudou-se 49 amostras de *M. tuberculosis*; verificou-se que 28,9% delas pertenciam a um dos quatro "clusters" que foram denominados de A, A1, A2 e P. Estes resultados foram condizentes com aqueles obtidos no estudo feito através da epidemiologia clássica. Segundo Small et al. (1994), os casos de tuberculose associados às cepas em "cluster" são decorrentes de transmissão recente. Neste sentido, 28,9% dos casos de tuberculose em Araraquara eram provenientes de infecção recente e os demais 71,1% das amostras eram originários de reativação endógena. Estes dados mostraram a importância da continuidade do trabalho e a necessidade de se organizar um banco de dados dos pacientes com tuberculose pulmonar de Araraquara submetendo as cepas isoladas à técnica de RFLP.

Entretanto, apesar dos resultados promissores, a técnica de RFLP é trabalhosa, necessitando de pessoal altamente qualificado para a realização do ensaio, sendo tendência mundial, a substituição desta técnica por outras de execução mais rápida e facilitada. Neste sentido, outras sequências têm sido utilizadas como marcadores epidemiológicos que incluem sequências DR (*Direct Repeat*), espaçadores dentro da região DR (*Spoligotyping*) e sequência polimórfica rica em GC (PGRS).

O cromossomo do *M. tuberculosis* contém múltiplas cópias da sequência DR localizadas em um único locus cromossomal. A técnica de *Spoligotyping* é baseada na amplificação da região DR, pela PCR, e subsequente hibridização diferencial dos produtos amplificados com oligonucleotídeos, complementares às regiões espaçadoras variáveis localizadas entre as DRs, imobilizados em uma membrana de nylon, onde 43 dessas sequências espaçadoras são previamente sensibilizadas. O polimorfismo dessa região, nas diferentes amostras, é provavelmente produto de uma recombinação homóloga do distante ou adjacente DR assim como as mudanças causadas pela localização da re-

Epidemiologia molecular da tuberculose

gião da IS6110 (Rodríguez et al., 2004).

O produto da PCR obtido difere em tamanho por duas razões: primeiro, os amplificadores contêm muitos espaçadores com suas DRs se os oligonucleotídeos iniciadores ligarem em DRs não imediatamente vizinhas; segundo, os amplificadores em cada ciclo funcionam eles mesmos como iniciadores e se tornam alongados com uma ou mais DVRs (*direct variable repeats*), conforme descrito por Rodríguez et al. (2004).

Cepas que são similares, ou diferentes, podem ser identificadas pelos seus padrões analíticos gerados, característicos do número e identidade dos espaçadores contidos nas linhagens analisadas. A presença das seqüências espaçadoras varia em diferentes cepas e é visualizada por uma mancha em um ponto fixo da membrana de hibridização. Assim, segundo Kamerbeek et al., 1997, a técnica de *Spoligotyping* possibilita a detecção e a tipificação simultânea de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, e é indicada como técnica de escolha para a comparação de cepas com poucas cópias de IS6110. Outra vantagem é a distinção que se dá pela presença ou ausência de espaçadores.

O poder de distinção do *Spoligotyping* é menor do que o do RFLP, quando cepas com alto número de cópias de IS6110 são analisadas, entretanto, o poder de distinção do *Spoligotyping* é maior para a avaliação de cepas com baixo número de cópias. O método é simples, rápido e robusto, mas tem baixa discriminação (Kanduma et al., 2003; Rodríguez et al., 2004).

Em trabalho realizado por nosso grupo (Barco et al., 2006), a técnica de *Spoligotyping* foi empregada para discriminar 33 cepas de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes das regiões de São Paulo e Paraná, com marca de resistência à pirazinamida e a outros quimioterápicos. Essa avaliação possibilitou o agrupamento de algumas destas amostras em três "clusters" denominados A, B e C.

Métodos baseados em mini-satélites que contêm número variável de repetições em seqüência (*variable numbers of tandem repeats* - VNTRs) foram demonstrados ser efetivos para a tipagem de *M. tuberculosis* (Kanduma et al., 2003). Dentre elas, destaca-se a técnica de epidemiologia molecular denominada MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*), que é um estudo baseado na reação em cadeia da enzima polimerase (PCR). Esta técnica foi desenvolvida por Supply et al. (2000; 2001) e se baseia no estudo de VNTRs, seqüências que se repetem seqüencialmente (de maneira adjacente) (*tandem repeats*) até centenas de vezes.

A técnica de MIRU consiste em um sistema altamente reprodutível e rápido, havendo geração de genótipos confiáveis baseado no estudo detalhado de 12 loci contendo VNTRs do genoma do complexo *M. tuberculosis* (Supply et al., 2001). Ela possibilita uma comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas e permite o rastreamento da movimentação de linhagens individuais (Supply et al., 2000; Mazars et al., 2001; Supply et al., 2001) de forma semelhante à técnica de RFLP sendo, no

entanto, de execução muito mais fácil. Este tipo de abordagem torna possível maior número de análises e identificação de mais focos de contágio na população, podendo assim estudar-se métodos mais adequados para interromper a transmissão da doença.

Objetivando diminuir o tempo de realização do MIRU, facilitar a manipulação das amostras e diminuir a chance de erros, Supply et al. (2001) demonstraram a aplicação de MIRU de modo automatizado, utilizando para tal, oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluorescência, que pode ser captada pela câmera CCD de um seqüenciador automático de DNA com capacidade para 96 amostras simultâneas. Dessa forma, cada amostra a ser avaliada para os 12 loci passa a ser desenvolvida em apenas quatro PCR-multiplex distintas, diminuindo a manipulação de amostras de DNA e otimizando o trabalho. A determinação do tamanho dos fragmentos amplificados (*amplicons*) é dada pelo seqüenciador e a definição de qual locus ele representa é obtida pela cor detectada pelo aparelho. Assim, em cada corrida de eletroforese um seqüenciador, que utiliza gel de acrilamida, pode dar o resultado final dos 12 loci de MIRU de 24 amostras, previamente amplificadas, em cerca de quatro horas e períodos ainda menores podem ser obtidos com seqüenciadores que utilizam capilares. Outra tentativa, bem sucedida, de automatização de MIRU foi feita por Evans et al. (2004), utilizando cromatografia líquida para a determinação dos tamanhos dos fragmentos amplificados (*amplicons*) pela técnica de PCR convencional, facilitando a determinação dos tamanhos das bandas e a classificação dos alelos, sem necessitar de equipamentos mais sofisticados ou reagentes fluorescentes caros. É importante salientar que os métodos automatizados de MIRU são muito mais caros que a versão manual, sendo justificado seu uso apenas em estudos de grande número de amostras.

Kwara et al. (2003) avaliaram a utilidade epidemiológica dos métodos de MIRU e de *Spoligotyping* e concluíram que o primeiro produz resultados melhores que o segundo. Resultados semelhantes a estes também foram obtidos em nosso laboratório (Pandolfi, 2006). Cowan et al. (2002), compararam as técnicas de MIRU, RFLP e *Spoligotyping* em um grupo de 180 amostras de *M. tuberculosis* e *M. bovis* com baixo número de cópias de IS6110, e verificaram que a técnica de MIRU possibilitou a observação de 80 padrões distintos, contra 58 de RFLP e 59 de *Spoligotyping* e que quando os resultados foram cruzados, 122 padrões foram obtidos, indicando que é necessário o emprego de vários métodos para se atingir maior poder discriminatório.

Niobe-Eyangoh et al. (2004) realizaram, com as técnicas de MIRU, *Spoligotyping* e RFLP, uma investigação preliminar da biodiversidade genética do Complexo *M. tuberculosis*, na República dos Camarões, um país com grande prevalência de tuberculose. Os resultados confirmaram predominância de uma linhagem específica de *M. tuberculosis* que foi denominada de "família de micobactérias Camarões". A demonstração da presença marcante de um genótipo particular na República dos Camarões permitiu um estudo mais refinado da transmissão da tuberculose, dentro de uma área geográfica.

Epidemiologia molecular da tuberculose

Savine et al. (2002) relataram em suas pesquisas que em um grande número de linhagens e de *backgrounds* genéticos os 12 loci de MIRU são estáveis em um período superior a seis anos. Baseado nessa estabilidade de MIRUs, a descoberta de variações em seu genótipo pode auxiliar na definição de re-infecção exógena que é normalmente baseada na observação da variação de no mínimo três a quatro bandas de IS6110 RFLP. Esse recurso é particularmente importante para estimar os níveis de sucesso dos programas de controle de tuberculose e avaliação de novos métodos clínicos e novas terapias.

Para van Embden et al. (1993), a análise de grande número de isolados pode gerar respostas para questões de longa data como a eficiência da vacinação com BCG e a frequência de reativação versus re-infecção, questões estas que são de importância crescente com o surgimento da Aids. Devido à facilidade de execução, a técnica de MIRU torna possível este ansio. Os levantamentos bibliográficos reforçam ainda o emprego da tipagem com MIRU como uma ferramenta de primeira linha para o estudo da diversidade genética de isolados de *M. tuberculosis* em larga escala.

Bull et al. (2003) demonstraram que a técnica de MIRU também pode ser empregada para a diferenciação de *M. avium paratuberculosis* de outras espécies do complexo *M. avium*, acentuando assim ainda mais a importância do desenvolvimento deste ensaio.

A evolução e a intensidade com que a técnica de MIRU é empregada em diferentes problemas da biologia de Micobactérias gerou um avanço considerável nesta área, o que pode demonstrar a importância dos estudos de MIRU para o desenvolvimento mais acelerado da epidemiologia molecular e sugerir a necessidade de novos trabalhos, implementando este método e comparando o emprego de diferentes técnicas moleculares na epidemiologia e filogenia destes microrganismos, bem como a utilização de mais de um método para a obtenção de resultados ainda mais discriminatórios.

Assim, estudo de nosso grupo comparou as técnicas de MIRU com a de RFLP e de MIRU com a de *Spoligotyping*, quando observou-se que a capacidade de discriminação da primeira é comparável à da de RFLP, sendo superior à do *Spoligotyping* (Pandolfi, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A existência de um banco de dados mundial de genótipos de MIRU, a reprodutibilidade e a facilidade de execução da técnica, em vários laboratórios no redor do mundo, permite comparações entre dados obtidos nesses locais, favorecendo a geração de dados epidemiológicos mais consistentes e precisos.

Outros estudos com um maior número de amostras, estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório, empregando os métodos de MIRU e *Spoligotyping* e métodos de epidemiologia clássica, buscando analisar o comportamento das cepas isoladas no município de

Araraquara, SP. Esses estudos poderão indicar as medidas mais adequadas a serem tomadas no controle da tuberculose. Ademais, poderão também apontar tendências nos padrões epidemiológicos de cepas isoladas em uma cidade de cerca de 200 mil habitantes e naqueles obtidas numa grande metrópole.

ABSTRACT

Tuberculosis and the molecular study of its epidemiology

Systems that can distinguish epidemiologically-related *Mycobacterium tuberculosis* strains from unrelated ones are extremely valuable. Molecular biology techniques have allowed a great deal of information to be acquired about the infectious disease tuberculosis (TB) that was very hard or impossible to obtain by conventional epidemiology. A typing method based on bacterial DNA genome differences, known as RFLP (restriction fragment length polymorphism), is widely used to discriminate strains in the epidemiologic study of TB. However, RFLP is laborious and there is a tendency to replace it by other methods. Thus, other DNA sequences have been employed as epidemiological markers, as in *Spoligotyping*, a fast technique based on PCR followed by differential hybridization of amplified products. The polymorphism observed among different isolates is probably the product of strain-dependent recombination. MIRU (mycobacterial interspersed repetitive unit) typing is a reproducible and fast assay, involving the generation of genotypes based on the study of 12 loci containing VNTRs (variable-number tandem repeats) in strains of the *M. tuberculosis* complex. It compares strains from different geographic areas and allows the movement of individual lineages to be tracked, as in RFLP. This approach enables a greater number of isolates to be analyzed, leading to the identification of a larger number of foci of transmission within the population and thus to improved ways of slowing the progress of the disease.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; molecular epidemiology; genotyping

REFERÊNCIAS

- American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376-95.
- Antunes JLF, Waldman EA. Tuberculosis in the twentieth century: time-series mortality in São Paulo, Brazil, 1900-97. *Cad Saúde Publ* 1999; 15(3):463-76.

Epidemiologia molecular da tuberculose

- Barco P, Cardoso RE, Hirata RDC, Leite CQF, Pandolfi JR, Sato DN, Shikama ML, Fráza de Melo F, Mamizuka EM, Campanerut PAZ, Hirata MH. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Southeast region of Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(5):930-5.
- Bloom BR. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington: American society for microbiology; 1994. 637p.
- Bull TJ, Sidi-Boumedine K, McMinn EJ, Pockup R, Hermon-Taylor J. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Cell Probes* 2003; 17:157-64.
- Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy number of IS 6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5):1592-602.
- Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:1062-71.
- Evans JT, Hawkey PM, Smith EG, Boese KA, Warren RE, Hong G. Automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive units typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 2004; 42:175-80.
- Farer LS, Lowell LM, Meador MP. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am J Epidemiol* 1979; 312:205-17.
- Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 2001; 153:1135-41.
- Frøthingham R, Hills HG, Wilson KH. Extensive DNA sequence conservation throughout the *M. tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1639-43.
- Higginson J. The role of the pathologist in environmental medicine and public health. *Am J Pathol* 1977; 86:460-84.
- Horsburgh J. Tuberculosis without tubercles. *Tuberc Lung Dis* 1996; 77:197-8.
- Kamerbeek J, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4):907-14.
- Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. *J Appl Microbiol* 2003; 94:781-91.
- Kwara A, Schiro R, Cowan LS, Hyslop NE, Wiser MF, Harrison SR, Kissinger P, Diem L, Crawford JT. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6):2683-85.
- Leite CQF, Telarolli Junior R. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. *Rev Ciênc Farm* 1997; 18(1):17-28.
- Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer M. Population biology, evolution, and infection disease; convergence and synthesis. *Science* 1999; 283:806-9.
- Malaspina AC. *Estudo da epidemiologia molecular da tuberculose em pacientes de Araraquara-SP no período de 2000 a 2002*. [Dissertação] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 2004.
- Marques AMC, Cunha RV. A medicação assistida e os índices de cura de tuberculose e de abandono de tratamento na população indígena Guarani-Kaiwá no Município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(5):1405-11.
- Mazars E, Lesjeun S, Bonuls A, Gilbert M, Vincent V, Ciequel B, Tibayrenc M, Lochu C, Supply P. 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.
- Murray M, Alland D. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Am J Epidemiol* 2002; 155(6):565-71.
- Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Serlin P, Thomson J, Vincent V, Gutierrez C. Molecular characteristics of strains of the Cameroon Family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5029-35.
- Pandolfi JRC. *Otimização da técnica de MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) para o estudo epidemiológico de paciente com tuberculose*. [Tese] Araraquara: Instituto de Química, UNESP; 2006.
- Pereira JCM, Ruffino-Neto A. Sobre Tuberculose. In: Pereira JCM editor. *Medicina, saúde e sociedade*. Ribeirão Preto: Complexo Gráfico Villimpress; 2003. p.149-171.
- Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 273:220-6.
- Rodriguez CAR, Zumárga MJ, Oliveira EM, Cataldi AA, Romano MI, Otto HH, Bonafé VL, Ferreira Neto JS. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo, utilizando a técnica de Spoligotyping. *Arq Inst Biol (São Paulo)* 2004; 71(3):277-82.

Epidemiologia molecular da tuberculose

- Sato DN. *Mycobacterium Bacteriologia*; um texto ilustrado. Rio de Janeiro: Eventos Editora; 1999. p.285-315.
- Savine E, Warren RM, van Der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Locht C, Supply P. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4561-6.
- Sheris JC. Mycobacteria. In: Sheris JC. *Medical microbiology: an introduction to infectious diseases*. New York: Elsevier Science; 1984. p.291-304.
- Small PM, Schecter GF, Goodman PC, Sande MA, Chaisson RE, Hopewell PC. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991; 324:289-94.
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schecter GF, Daley CL, Schoolnik GK. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330:1703-9.
- Smith D, Wiengeshaus E. What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in humans. *Rev Infect Dis* 1989; 11:S385-93.
- Sola C, Filliol I, Legrand L, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 2003; 3:125-33.
- Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. *Microbiologia ilustrada*. Porto Alegre: Artmed; 2004. p.259-72.
- 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.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10):3563-71.
- van Embden JDA, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31:406-09.

ORIGINAL ARTICLE

Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR

M. A. Cardoso¹, R. F. Cardoso¹, R. D. C. Hirata², M. H. Hirata², C. Q. F. Leite³, A. C. B. Santos³, V. L. D. Siqueira¹, W. Okano⁴, N. S. Rocha⁴ and M. V. C. Lonardoni¹

¹ Department of Clinical Analysis, State University of Maringá, Paraná, Brazil

² Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ School of Pharmaceutical Science, Paulista State University, Araraquara, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Veterinary Clinic, Paulista State University, Botucatu, São Paulo, Brazil

Impacts

- Bovine tuberculosis still remains an important zoonosis in developing countries and spreads to humans through inhalation of droplet nuclei or by ingestion of infected meat or raw dairy products.
- Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis is difficult considering that the isolation of mycobacteria in clinical samples is extremely laborious and time consuming. However, methods for detection of *Mycobacterium bovis* by Polymerase Chain Reaction (PCR) have been developed to improve the diagnosis.
- Frequency of PCR-positive results (54.5%) was similar to that of culture-positive results (51.5%, $P > 0.05$) when a set of three PCR with different volume of DNA sample, 1.0 (diluted 1 : 2 and not diluted) and 2.5 μ l was used in the assay. This indicates direct detection of *M. bovis* in lymph nodes by PCR a fast and useful tool for epidemic manages of the bovine tuberculosis in county where the disease is endemic.

Keywords:

Mycobacterium bovis; lymph nodes; bovine tuberculosis; diagnosis; PCR; culture

Correspondence:

R. F. Cardoso. Department of Clinical Analysis, State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil. Tel.: +55 44 3261 4797; Fax: +55 44 3261 4797; E-mail: rfcardoso@uem.br

Received for publication August 7, 2007

doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01199.x

Summary

Thirty-five lymph node samples were taken from animals with macroscopic lesions consistent with *Mycobacterium bovis* infection. The animals were identified by postmortem examination in an abattoir in the northwestern region of state of Paraná, Brazil. Twenty-two of the animals had previously been found to be tuberculin skin test positive. Tissue samples were decontaminated by Petroff's method and processed for acid-fast bacilli staining, culture in Stonebrink and Lowenstein-Jensen media and DNA extraction. Lymph node DNA samples were amplified by PCR in the absence and presence (inhibitor controls) of DNA extracted from *M. bovis* culture. *Mycobacterium bovis* was identified in 14 (42.4%) lymph node samples by both PCR and by culture. The frequency of PCR-positive results (54.5%) was similar to that of culture-positive results (51.5%, $P > 0.05$). The percentage of PCR-positive lymph nodes increased from 39.4% (13/33) to 54.5% (18/33) when samples that were initially PCR-negative were reanalysed using 2.5 μ l DNA (two samples) and 1 : 2 diluted DNA (three samples). PCR sensitivity was affected by inhibitors and by the amount of DNA in the clinical samples. Our results indicate that direct detection of *M. bovis* in lymph nodes by PCR may be a fast and useful tool for bovine tuberculosis epidemic management in the region.