

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE *SPOLIGOTYPING*
APLICADA DIRETAMENTE EM AMOSTRAS CLÍNICAS
DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TUBERCULOSE E
CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA**

Patricia Izquierdo Cafrune

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Co-orientação: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Porto Alegre, julho de 2009.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE *SPOLIGOTYPING*
APLICADA DIRETAMENTE EM AMOSTRAS CLÍNICAS
DE PACIENTES COM SUSPEITA DE TUBERCULOSE E
CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA**

Patricia Izquierdo Cafrune

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Co-orientação: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Porto Alegre, julho de 2009.

Dedico este trabalho aos meus pais, Gil Cafrune e Jane Mary Izquierdo Cafrune, por nunca terem medido esforços para me apoiar nesta longa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Arnaldo Zaha, pela orientação durante todos estes anos, paciência e compreensão nos momentos mais difíceis. Por sempre inspirar muita admiração e respeito.

À Profa. Maria Lúcia Rossetti, minha co-orientadora, por todas as oportunidades proporcionadas, confiança e incentivo aos projetos. Por todo apoio e carinho.

À Ludi, por todos estes anos de amizade e convivência, pela ajuda na redação e correção da tese, pelo incentivo, motivação e entusiasmo em relação a este trabalho. Também pelo carinho e paciência nos momentos mais difíceis.

À Lia, por toda a parceria e auxílio em todas as etapas do trabalho, companheirismo nas coletas das amostras e exemplo de dedicação e persistência.

À sempre bem disposta Andrezza pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pela grande amizade, palavras de conforto e parceria, dentro e fora do lab. À Fernanda, grande colega de trabalho e amiga de todas as horas. Amigas como vocês valem ouro!

Às queridas Raquel, Mirela, Luciana, Regina e Francielle, obrigada por todo carinho e apoio.

A todos os colegas do CDCT por ajudarem a fazer os trabalhos acontecer.

À Marta, por todos os ensinamentos em bacteriologia, entusiasmo e auxílio na realização dos projetos. Ao pessoal do Laboratório de Micobactérias do IPB-LACEN/RS por ajudar a cuidar das minhas “bichinhas”.

Ao pessoal do Ambulatório de Tisiologia do Hospital Sanatório Partenon, pelo auxílio na coletas das amostras e revisão de prontuários. À Dra. Gisela, Dra. Carla, Dr. Espina e Dr. Pedro oportunidade de participar de discussões e seminários, que foram muito importantes para melhor compreender a doença Tuberculose.

Aos professores e funcionários do PPG Bioquímica, especialmente à Cléia.

À minha família, sempre presente, incentivando e apoiando meus projetos.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho. OBRIGADA!

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS).

Hospital Sanatório Partenon (HSP).

Laboratório de Tuberculose do Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (IPB-LACEN/FEPPS).

FONTES FINANCIADORAS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).

PARTE I

RESUMO

A tuberculose (TB) permanece como uma doença importante do ponto de vista da saúde pública. Devido ao aumento do número de casos, surgimento de cepas resistentes aos fármacos e a co-infecção pelo HIV, novas estratégias para combater a doença são urgentemente necessárias. Por isso a Organização Mundial da Saúde recomenda investimentos em novas tecnologias e estratégias que possam contribuir para o diagnóstico mais rápido, assim como a aplicação de ferramentas que permitam um melhor entendimento da epidemiologia da TB em diferentes populações. O *spoligotyping* é uma técnica desenvolvida para detecção e diferenciação simultânea de cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A oportunidade de combinar informações diagnósticas rápidas e dados de epidemiologia molecular representa um avanço importante no controle da TB. Dados epidemiológicos, caracterização molecular a partir de amostras clínicas e geolocalização dos casos de TB, podem contribuir para o entendimento da distribuição da doença e auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais específicas para conter sua disseminação. Para isso foi realizado um estudo prospectivo incluindo pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Sanatório Partenon, de agosto de 2005 a abril de 2007. Foram incluídos 202 pacientes, 142 com TB e 60 sem a doença. Entre os pacientes com TB a média de idade foi mais baixa ($36,96 \pm 12,17$ vs $44,54 \pm 6,05$), com maior frequência eram não-brancos, desempregados, sem renda, utilizavam drogas, tinham histórico de encarceramento, eram desnutridos e tinham tido contato com paciente com TB, principalmente intradomiciliar e em prisões. Os pacientes não-brancos apresentaram maiores taxas de infecção por HIV e HCV. Alcoolismo estava associado ao abandono do tratamento. A técnica de *spoligotyping* apresentou um bom rendimento quando aplicada diretamente em amostras clínicas, uma vez que 89% das amostras apresentaram resultados concordantes. Entre os 135 isolados de pacientes genotipados, foram identificados 44 spoligotipos diferentes, sendo 112 isolados (83%) com padrões compartilhados e 23 (17%) com padrões únicos. A família LAM foi a mais frequente englobando 37% dos isolados. Através da geolocalização foi possível observar que há uma grande diversidade genética das cepas circulantes na região estudada, mas também alguns agrupamentos que devem ser melhor caracterizados. A estratégia proposta neste estudo, utilizar o *spoligotyping* diretamente em amostras clínicas, mostrou-se útil para encurtar o tempo de obtenção de informações sobre as identidades das cepas de *M. tuberculosis*. Pode ser utilizada em combinação com dados clínicos dos pacientes para gerar informações epidemiológicas muito mais rapidamente e auxiliar no combate à TB.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains as an important public health issue. Because of the increase in the number of cases, emergence of drug resistant strains and HIV co-infection, new strategies to fight the disease are urgently needed. Thus, the World Health Organization recommends investments on new approaches and technologies that can be used to fasten the diagnosis of TB, as well as the application of tools that allow a better understanding of the epidemiology of the disease in different populations. *Spoligotyping* is a technique which was developed for simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. The opportunity to combine rapid diagnostic information and molecular epidemiology represents an important advance in the epidemiologic control of TB. Epidemiologic data, molecular characterization from clinical samples and spatial localization of TB cases may be used for the understanding of disease distribution and can be useful for the development of more specific strategies to arrest its dissemination. Aiming at this, a prospective study was designed including patients assisted at the outpatient section of Hospital Sanatório Partenon from August 2005 to April 2007. It was included 202 patients from which 142 had a positive diagnosis for TB and 60 had a negative diagnosis for the disease. Mean age was lower among patients diagnosed with TB (36.96 ± 12.17 vs 44.54 ± 6.05), they were more likely to be non-white, to be unemployed and not to have any income, to use drugs, to have incarceration history, to have malnutrition and have had contact with a patient with TB, mainly in the household and in prisons. Non-white patients had higher rates of HIV and HCV co-infection. Alcohol abuse was associated to treatment nonadherence. *Spoligotyping* technique presented good results when applied directly to clinical samples, once 89% of samples presented agreeing results. Among 135 patients isolates genotyped, it was found 44 different spoligotypes, 112 (83%) were shared types and 23 (17%) were unique. LAM family was the most frequent comprising 37% of all isolates. Spatial localization of cases demonstrated a high genetic diversity of strains circulating in the study area, but also pointed some clusters that should be better characterized. The strategy proposed in this study, applying spoligotyping directly to clinical samples, showed to be useful to shorten time in obtaining information on *M. tuberculosis* strains identities. It can be used in combination with clinical data of patients to yield epidemiologic information more rapidly and help to fight TB.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAN	Amplificação de Ácidos Nucléicos
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMTD	<i>Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BK	Bacilo de Koch
CAGE	<i>Cut down, Annoyed by criticism, Guilty, Eye-opener</i>
CAS	<i>Central Asian</i>
CEVS	Coordenação Estadual de Vigilância Sanitária
DR	Repetição Direta
EAI	<i>East African-Indian</i>
EMB	Etambutol
EMTD	<i>Enhanced Mycobacterium tuberculosis Direct</i>
ETH	Etionamida
ETR	Repetição Exata em Tandem
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
GD	Gerência Distrital
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HSP	Hospital Sanatório Partenon
INH	Isoniazida
IPB-LACEN	Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central
IS	Seqüência de Inserção
LAM	<i>Latin American Mediterranean</i>
MDR	Multi-Droga Resistente
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i>
MPTR	<i>Major Polymorphic Tandem Repeat</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OADC	Ácido Oléico, Albumina, Dextrose, Catalase
OMS	Organização Mundial da Saúde

PAS	Ácido paraamino-salicílico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCT	Programa de Controle da Tuberculose
PGG	Grupo Genético Principal
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PZA	Pirazinamida
RFLP	Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição
RMP	Rifampicina
rRNA	RNA ribossomal
SDA	Amplificação por Deslocamento de Fita
SIT	<i>Shared International Type</i>
SM	Streptomomicina
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SpoIDB4	<i>Spoligotyping DataBase 4</i>
ST	<i>Shared Type</i>
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose Multirresistente
TMA	Amplificação Mediada por Transcrição
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
VNTR	Número Variável de Repetições em Tandem
XDR	Extensivamente Droga-Resistente
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

PARTE I.....	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. <i>Tuberculose e Epidemiologia</i>	8
1.2. <i>Agente etiológico</i>	10
1.3. <i>Transmissão</i>	11
1.4. <i>Tuberculose e HIV</i>	12
1.5. <i>Tratamento</i>	13
1.6. <i>Resistência aos Fármacos</i>	14
1.7. <i>Diagnóstico da Tuberculose</i>	15
1.7.1. <i>Baciloscopia</i>	15
1.7.2. <i>Cultura</i>	16
1.7.3. <i>Métodos Automatizados de Cultura</i>	17
1.7.4. <i>Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos</i>	18
1.8. <i>Epidemiologia Molecular</i>	22
1.8.1. <i>A técnica de RFLP do IS6110</i>	22
1.8.2. <i>A técnica de MIRU-VNTR</i>	23
1.8.3. <i>A técnica de Spoligotyping</i>	25
1.9. <i>Geolocalização</i>	28
1.9. <i>Justificativa</i>	30
2. OBJETIVOS	32
2.1. <i>Geral</i>	32
2.2. <i>Específicos</i>	32
PARTE II.....	33
CAPÍTULO I.....	34
3. MATERIAS E MÉTODOS	34
3.1. <i>Tipo e Local de Estudo</i>	34
3.2. <i>Pacientes</i>	34
3.3. <i>Critérios de Seleção de pacientes</i>	34

3.4. Critérios de Seleção das Amostras.....	35
3.5. Critérios de Exclusão	35
3.6. Padrão-Ouro	35
3.7. Amostras Clínicas.....	36
3.8. Análise Bacteriológica	36
3.9. Preparação da Amostra Clínica	36
3.10. Extração de DNA de Cultura de <i>M. tuberculosis</i>	37
3.11. Técnica de spoligotyping	38
3.12. Precauções.....	39
3.13. Análise Estatística	39
3.14. Geolocalização dos pacientes	40
3.15. Considerações Éticas	40
CAPÍTULO II.....	41
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Descrição da População Estudada	41
4.2. Artigo Científico.....	48
4.2.1. Análise dos perfis de spoligotyping e geolocalização	55
PARTE III	60
5. DISCUSSÃO	61
5.1. Características dos pacientes	61
5.2. Aplicação de spoligotyping em amostras clínicas	67
5.3. Análise dos SITs e geolocalização	70
6. CONCLUSÕES	74
7. PERSPECTIVAS	75
8. REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS.....	92
ANEXO 1 – LISTA DE TABELAS	93
ANEXO 2 – LISTA DE FIGURAS	94
ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO.....	95
ANEXO 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	98
ANEXO 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose e Epidemiologia

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa de distribuição universal que, até meados do século XX, constituía em uma das principais causas de morte no mundo (Raviglione *et al*, 1995; Dye, 2006). Com a melhoria das condições de vida nos países desenvolvidos e a instituição do tratamento quimioterápico, houve uma redução de sua morbidade e, principalmente, da mortalidade. Até a década de 1980, tinha-se a expectativa da eliminação dessa enfermidade, já considerada sob controle relativo nos países desenvolvidos. Contudo, o crescimento mundial da sua incidência levou, em 1993, a OMS declarar essa doença em estado de emergência, alertando para a necessidade de maiores esforços no seu combate (WHO, 1994; Raviglione, 2003).

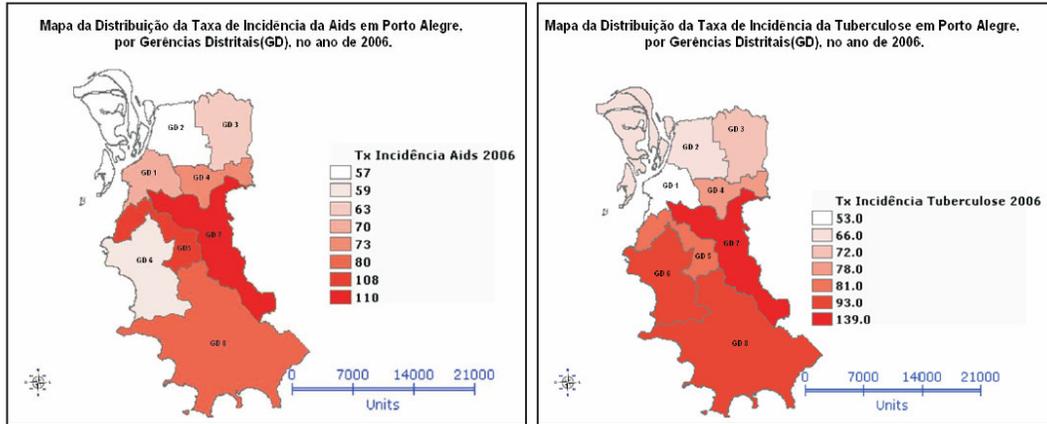
Apesar dos esforços para seu controle, dos Programas de Controle da Tuberculose (PCT) e dos regimes terapêuticos usados, a alta correlação da incidência da doença em populações pobres, a co-infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e o surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados no tratamento criaram condições para que a TB seja uma doença oportunista (Sepkowitz *et al.*, 1995; Brasil, 2004).

De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2006 havia uma prevalência de 14,4 milhões de casos de TB globalmente, com 9,2 milhões de casos novos e 1,7 milhões de mortes pela doença. A região da África tem a mais alta taxa de incidência, 363/100.000 habitantes e a Índia tem o maior número total de casos, estimados em dois milhões (WHO 2008, WHO, 2009).

O Brasil, em 2006 era o 16º entre os 22 países que são responsáveis por 80% de todos os casos de TB no mundo e em 2007 passou a ser o 18º (WHO, 2009). Juntamente com o Peru, contabiliza em torno de 50% dos casos da doença nas Américas. Em 2006, foram notificados 83.293 casos no Brasil, correspondendo a uma incidência de 44/100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade estimada de 4/100.000 (WHO, 2008).

No Rio Grande do Sul (RS), foram notificados 5.176 casos de TB em 2006, com incidência de 47/100.000 habitantes (CEVS/RS, 2007). A incidência em Porto Alegre é a mais alta do RS, 93/100.000 e em 2006 foram notificados 1.320 casos novos da doença (SMS/POA, 2007).

O Hospital Sanatório Partenon (HSP) é um hospital de referência para tratamento da TB no RS, situado em Porto Alegre, cuja população é de aproximadamente 1.451.131 habitantes. Este ambulatório atende pacientes da área leste de Porto Alegre, provenientes dos bairros Agronomia, Lomba do Pinheiro, Partenon e bairros adjuntos, que conforme a Secretaria Municipal de Saúde estão localizados na Gerência Distrital Partenon - Lomba do Pinheiro (GD 7), abrangendo uma população de aproximadamente 180.000 habitantes. A GD 7 apresentou um coeficiente de incidência de 138,5 casos por 100.000 habitantes, maior que o coeficiente da cidade para o ano de 2006 (93/100.00). Esta região também apresenta a taxa mais alta de infecção por HIV em Porto Alegre, 110,2 casos por 100.000 habitantes, enquanto a média para a capital é de 78,5 casos por 100.000 (Figura 1) (SMS/POA, 2008).



Fonte: EVDI/CGVS/SMS

Figura 1: Mapas da distribuição de TB e AIDS nas Gerências Distritais de Porto Alegre. GD1: Centro; GD2: Noroeste/Humaitá-Navegantes-Ilhas; GD3: Norte/Eixo Baltazar; GD4: Leste-Nordeste; GD5: Glória-Cruzeiro-Cristal; GD6: Sul-Centro Sul; GD7: Partenon-Lomba do Pinheiro; GD8: Restinga-Extremo Sul.

1.2. Agente etiológico

Mycobacterium tuberculosis é o principal agente causador da TB em humanos. É um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, juntamente com outros membros: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii* que são identificados com base em características fisiológicas, bioquímicas e de crescimento (Aranaz *et al.*, 1999; Cataldi & Romano, 2007). Este grupo de bactérias é geneticamente muito relacionado, o que dificulta a sua diferenciação por métodos de identificação convencionais. Esta relação taxonômica muito próxima também é refletida no seu alto grau de conservação evolutiva, sendo que a homologia em suas sequências de DNA é de quase 100% (van Embden *et al.*, 1992).

A parede celular bem desenvolvida contém peptídeoglicano covalentemente ligado a um polissacarídeo ramificado, o arabinogalactano, cujas extremidades são esterificadas com ácidos graxos de alto peso molecular, os ácidos micólicos, conferindo uma importante barreira lipídica. Esta barreira é responsável por muitas das

características fisiológicas da TB, incluindo resistência aos antibióticos e mecanismos de defesa do hospedeiro. A composição e quantidade dos componentes da parede celular afeta as taxas de crescimento e virulência da bactéria (Barrera, 2007). Sob condições laboratoriais favoráveis, *M. tuberculosis* se divide a cada 12 a 24 horas. Este tempo é extremamente lento quando comparado à maioria das bactérias, que se duplica em intervalos regulares que vão de 15 minutos à uma hora (Barrera, 2007). O crescimento lento do bacilo tem um importante significado clínico, pois é um dos fatores que condiciona a evolução crônica da doença (Kritski *et al.*, 2005).

O genoma completo da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* foi sequenciado em 1998. Ele é composto por 4.411.529 pares de bases (pb), contém aproximadamente 4.000 genes, e um conteúdo de G (guanina) + C (citosina) de 65,5% uniformemente distribuído ao longo do genoma (Cole *et al.*, 1998). Aparentemente, a maior parte da recombinação gênica ocorre através de transposons, que são elementos inerentemente instáveis e têm o potencial de causar muitos tipos de rearranjos tais como transposição, deleção, inversão e duplicação (Moström *et al.*, 2002). Os transposons mais simples são as sequências de inserção (ISs) e mais de 14 tipos diferentes destas sequências já foram identificadas no genoma de *M. tuberculosis*. Estas sequências de inserção são geradoras de polimorfismo genético e, portanto, são frequentemente utilizadas para discriminar cepas (Cole *et al.*, 1998; Moström *et al.*, 2002).

1.3. Transmissão

M. tuberculosis é transmitido de pessoa a pessoa, principalmente pela via respiratória, através da fala, do espirro e principalmente da tosse de doentes com TB pulmonar ativa. Neste processo ocorre a eliminação de pequenas gotículas que podem

permanecer em suspensão por minutos ou até mesmo horas depois da expectoração. Somente os núcleos secos (núcleos de Wells) contendo de 1 a 2 bacilos em suspensão podem atingir os bronquíolos e alvéolos, onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares, podendo dar início a sua multiplicação. O número de bacilos nas gotículas, a virulência dos bacilos, exposição destes à luz ultravioleta (UV), grau de ventilação, e a formação de aerossóis, influenciam na transmissão. A introdução de *M. tuberculosis* nos pulmões leva a infecção do sistema respiratório, entretanto o bacilo pode se disseminar para outros órgãos, tais como gânglios, pleura, ossos, ou meninges, e causar TB extrapulmonar.

O risco de infecção pelo bacilo é elevado e estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da tuberculose, mas apenas 2 a 5% destas pessoas desenvolvem a doença dentro de um período de 2 anos. Nos demais casos o bacilo fica em estado de dormência e pode ser reativado muitos anos após a infecção (Smith & Moss, 1994). Estima-se que um paciente pulmonar bacilífero, se não tratado, pode infectar de 10 a 15 pessoas por ano (Bates, 1980; ATS, 2000; Kritski *et al.*, 2005).

1.4. Tuberculose e HIV

A infecção por HIV exerce uma grande influência no curso natural da TB. Indivíduos com infecção latente por *M. tuberculosis* que contraem HIV têm um risco de desenvolver TB a uma taxa de 7 a 10% por ano, comparado a aproximadamente 8% ao longo da vida em indivíduos não infectados pelo vírus. Pacientes com HIV recentemente infectados com *M. tuberculosis* podem progredir para doença ativa a uma taxa superior a 35% nos primeiros 6 meses, comparado a 2 a 5% nos primeiros 2 anos entre os indivíduos HIV negativos (Daley *et al.*, 1992; Sepkowitz *et al.*, 1995). Com a

introdução da terapia antiretroviral para o HIV, o risco de progressão para TB ativa entre aqueles co-infectados por *M. tuberculosis*, mesmo sendo mais alto do que entre indivíduos HIV negativos, é consideravelmente menor. O papel das células T CD4+ na proteção contra a progressão da doença é ressaltada pela alta susceptibilidade a TB em pacientes com depleção avançada das células T CD4+ induzida pelo HIV (Girardi *et al.*, 2005). Além disso, entre pacientes HIV positivos em fase avançada de comprometimento imunológico há uma maior ocorrência de TB extrapulmonar e disseminada, apresentação radiológica atípica e maior ocorrência de micobactérias não tuberculosas, fatores que dificultam o diagnóstico (Kritski *et al.*, 2005; Picon *et al.*, 2007a; de Carvalho *et al.*, 2008).

1.5. Tratamento

No Brasil, o tratamento para TB é feito, obrigatoriamente, na rede pública de saúde e os fármacos são fornecidos gratuitamente pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2002). A partir da década de 1940, houve uma tendência de diminuição da mortalidade por TB em decorrência da utilização dos tuberculostáticos: estreptomicina (SM) a partir de 1948; ácido para-aminosalicílico (PAS) a partir de 1949; isoniazida (INH) a partir de 1952. A partir da década de 1960, começou efetivamente a utilização de esquemas terapêuticos mundialmente padronizados. Em 1964, utilizava-se o esquema padrão de 18 meses de duração (SM+INH+PAS), que no ano seguinte foi reduzido para 12 meses (Ruffino-Netto, 2002). Nos anos seguintes foram introduzidos a rifampicina (RMP), a pirazinamida (PZA), a etionamida (ETH) e o etambutol (EMB).

Em 1979 a Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária/Ministério da Saúde normatizou para todo o país um PCT tendo como base fundamental o tratamento

quimioterápico, com um esquema de primeira linha, chamado Esquema 1 (E-1) ou RHZ de curta duração: RMP, INH e PZA por 2 meses, seguidos de RMP e INH por 4 meses. O E-1 é indicado para todas as formas de TB sem uso prévio de medicação e, para o retratamento, nos casos de recidiva depois de curados, desde que estes pacientes tenham tido alta por cura há mais de cinco anos (Brasil, 2002).

1.6. Resistência aos Fármacos

O surgimento de resistência em *M. tuberculosis* foi observado pouco depois da introdução dos primeiros fármacos anti-TB (Leão & Portaels, 2007). Mundialmente é aceito o conceito de TB Multidroga-resistente (MDR) quando uma cepa é resistente a INH e RMP (Martin & Portaels, 2007). No Brasil, TB Multi-resistente (TBMR) é considerada a cepa é resistente a INH, RMP e ao menos mais um fármaco (PZA, EMB e/ou SM) (Brasil, 2002). A TBMR é uma grande preocupação, pois as taxas de cura são menores e os fármacos de segunda linha são menos efetivos, mais tóxicos, além de terem um custo elevado (Martin & Portaels, 2007; Dye, 2009). Mais recentemente foram caracterizadas cepas de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes (*Extensive Drug Resistant* - XDR), definidas como cepas que além de serem MDR também são resistentes a qualquer fluoroquinolona e ainda a mais um dos três fármacos injetáveis utilizados no tratamento da TB (Canamicina, Capreomicina ou Amicacina). Cepas de *M. tuberculosis* XDR já foram encontradas em mais de 50 países (inclusive Brasil) e são especialmente preocupantes, pois podem representar uma doença incurável e altamente letal (Chan & Iseman, 2008; Dye, 2009). Este cenário reforça a necessidade de medidas para o controle da disseminação das cepas MDR e XDR, incluindo o desenvolvimento de testes rápidos para detecção destas cepas, evitando atrasos no início de um tratamento adequado (Chan & Iseman, 2008; Dye, 2009).

1.7. Diagnóstico da Tuberculose

Denomina-se “caso de tuberculose” todo o indivíduo com diagnóstico confirmado por baciloscopia e/ou cultura e aquele em que o médico, com base nos dados clínicos e epidemiológicos e no resultado de exames complementares, firma o diagnóstico de TB (Brasil, 2002).

1.7.1. Baciloscopia

A baciloscopia, também chamada de pesquisa de BK (Bacilo de Koch) é a pesquisa microscópica do Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR) em um esfregaço de amostra clínica. Apesar dos avanços tecnológicos na micobacteriologia, a baciloscopia, corada pelo método de Ziehl Neelsen (ZN) e seguindo técnica padronizada de observação ao microscópio de campo claro, continua sendo particularmente importante na vigilância da TB. Isto se deve ao fato de apresentar baixo custo e por detectar os casos bacilíferos, ou seja, os principais casos infecciosos de TB pulmonar, responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão. Disponibiliza ampla cobertura diagnóstica, e frequentemente é o único método diagnóstico em países em desenvolvimento. Porém, sua sensibilidade é baixa, variando de 25% a 65% em relação à cultura, sendo necessários de 5.000 a 10.000 bacilos/mL de escarro para um resultado positivo. Resultados de baciloscopia negativa não excluem um caso de TB (de Waard & Robledo, 2007; Brasil, 2008). A tabela 1 apresenta os critérios para leitura e interpretação da baciloscopia (Brasil, 2008).

Tabela 1: Critérios para leitura e interpretação da baciloscopia de escarro corada pelo método de Ziehl-Neelsen.

Leitura	Resultado
0 bacilos/100 campos	Negativo
1-9 bacilos/100 campos	Positivo - Número exato de bacilos
10-99 bacilos/100 campos	Positivo +
1-10 bacilos/campo	Positivo ++
> 10 bacilos/campo	Positivo +++

Fonte: Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (Brasil, 2008).

1.7.2. Cultura

A cultura permite a multiplicação e o isolamento dos bacilos a partir da semeadura da amostra clínica, em meios de cultura específicos para micobactérias. Os meios sólidos mais comumente utilizados são aqueles a base de ovos, o Löwenstein-Jensen (LJ) e Ogawa (Brasil, 2008). É um método sensível e específico para o diagnóstico das doenças causadas por micobactérias, principalmente para TB pulmonar e extrapulmonar. O limite de detecção de bacilos da cultura é de 100 bacilos por mL de escarro, mas quando realizada com alta qualidade técnica é capaz de detectar de 10 a 100 bacilos cultiváveis por mL de escarro. É o método de referência (padrão-ouro) para o diagnóstico de TB, podendo, portanto servir para avaliar um novo método diagnóstico. Permite também a posterior identificação da espécie de micobactéria isolada e o teste de sensibilidade aos fármacos anti-TB, assim como a realização de várias técnicas moleculares. Em geral a sensibilidade da cultura é de 80-85% e a especificidade é de aproximadamente 98%. Entretanto, o crescimento do bacilo só é detectável de 30 a 60 dias após a inoculação (ATS, 2000; de Waard & Robledo, 2007; Brasil, 2008). No Brasil, a cultura não é realizada par todos os casos e segue critérios como: a) sintomas e dados clínicos compatíveis, com baciloscopia persistentemente

negativa, b) suspeita de TB extrapulmonar, c) contatos de pacientes com TB resistente, d) tratamento prévio, e) HIV positivo, f) suspeita de infecção por micobactéria não tuberculosa, g) falência ao tratamento e h) vigilância de resistência aos fármacos (Brasil, 2008). A tabela 2 apresenta os critérios para leitura e interpretação dos resultados da cultura.

Tabela 2: Critérios para leitura e interpretação da cultura em meio sólido.

Leitura	Resultado
Sem crescimento	Negativo
Menos de 20 colônias	Positivo – número exato de colônias
20 a 100 colônias	Positivo +
Mais de 100 colônias separadas	Positivo ++
Colônias confluentes (incontáveis)	Positivo +++

Fonte: Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (Brasil, 2008).

1.7.3. Métodos Automatizados de Cultura

O BACTEC TB-460 foi o primeiro sistema semi-automatizado disponível no mercado para cultura de micobactérias. O tempo de crescimento de *M. tuberculosis* nos meios de cultura convencionais (30 a 60 dias) foi sensivelmente reduzido para 14 dias. Entretanto, como utiliza um sistema radioativo para detecção (dificuldade no descarte e altos custos) sistemas alternativos foram desenvolvidos para substituí-lo (Kritski *et al.*, 2005; Tortoli & Palomino, 2007). O MGIT960 (Becton Dickinson Diagnostic Inst Systems, Sparks, MD), VersaTREK (Trek Diagnostic Systems) e BacT/Alert 3D (bioMérieux) utilizam meio líquido 7H9 enriquecido com OADC (*Oleic acid, Albumin, Dextrose, Catalase*). É necessário realizar descontaminação antes da inoculação das amostras nos tubos e posterior cultivo em meio sólido para a identificação morfológica da colônia de *M. tuberculosis*. Estes sistemas se mostraram mais rápidos e sensíveis que

os meios sólidos (detecção de uma a três semanas), mas não foi observada diferença significativa entre eles. Uma grande limitação de sistemas automatizados é o custo elevado, um fator limitante para sua implantação como teste diagnóstico de rotina, principalmente em países em desenvolvimento, onde os recursos são escassos e há um grande número de casos da doença (Kristiski *et al.*, 2005; de Waard & Robledo, 2007; Tortoli & Palomino, 2007; Nyendak *et al.*, 2009).

1.7.4. Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos

Para diagnosticar a TB mais rapidamente, foram desenvolvidos testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos (AAN) específicos para o complexo *M. tuberculosis* para a detecção do organismo diretamente de amostras clínicas. Os testes de AAN podem ser categorizados em *in house* ou kits comerciais. Os testes *in house* são aqueles desenvolvidos e padronizados nos diferentes laboratórios de pesquisa e diferem na preparação das amostras, o alvo a ser amplificado e no método de detecção. Os kits comerciais são produzidos em larga escala e geralmente se caracterizam por uma maior reprodutibilidade de resultados (Piersimoni & Scaparo, 2003; Flores *et al.*, 2005).

A maioria dos testes de AAN *in house* utiliza a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação e há uma grande diversidade de sequências utilizadas como alvo. Entre estas estão o gene que codifica a proteína MPB 64 (Manjunath *et al.*, 1991), a proteína de choque térmico de 65 kDa (Brisson-Noel *et al.*, 1989), a proteína antigênica de 38 kDa (Andersen & Hansen, 1989), que estão presentes em uma única cópia no genoma de *M. tuberculosis*. A sequência de inserção IS6110 (Eisenach *et al.*, 1990) geralmente está presente de 1 a 20 cópias no genoma de *M. tuberculosis* e sua utilização foi associada com uma maior sensibilidade em testes *in house* para o diagnóstico de *M. tuberculosis* (Flores *et al.*, 2005).

A preparação da amostra clínica é um fator que influencia a acurácia dos testes de AAN, principalmente a sensibilidade. Para extração do DNA, a lise celular pode ser realizada com elevadas temperaturas apenas (Victor *et al.*, 1992), ou com tampões de lise contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Thierry *et al.*, 1990), Tween 20 (Brisson-Noel *et al.*, 1991), Triton X-100 (Shawar *et al.*, 1993), Nonidet P40 (Zambardi *et al.*, 1993), Tiocianato de Guanidina (Boom *et al.*, 1990), por exemplo. Outra alternativa é a utilização de processos mecânicos com partículas de vidro (Santos *et al.*, 1992) ou zircônio (Kox *et al.*, 1994), além de ultra som para o rompimento da parede celular (Nolte *et al.*, 1993). A purificação do DNA tem como objetivo a remoção de substâncias presentes nas amostras clínicas que podem atuar como inibidores da DNA polimerase. Entre os métodos já descritos, existem aqueles que utilizam as amostras sem purificação (Shawar *et al.*, 1993), a utilização de fenol/clorofórmio ou clorofórmio/álcool isoamílico (Brisson-Noel *et al.*, 1989; Hermans *et al.*, 1990; Manjunath *et al.*, 1991; Nolte *et al.*, 1993) e a utilização de partículas de sílica (Andersen *et al.*, 1993; Rossetti *et al.*, 1997) ou sacarose (Victor *et al.*, 1992).

A detecção do produto amplificado pode ser realizada através de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (Kox *et al.*, 1994; Rossetti *et al.*, 1997), gel de poliacrilamida (Victor *et al.*, 1992), ou hibridização dos fragmentos amplificados com sondas específicas. A detecção por hibridização pode ser realizada pelo uso de biotina (Andersen *et al.*, 1993; Sperhake *et al.*, 2004; Scherer *et al.*, 2007) ou digoxigenina (Wilson *et al.*, 1993; Kox *et al.*, 1996) incorporadas às moléculas de DNA.

Os testes de AAN *in house* apresentam custos mais baixos que os testes comerciais e rendimentos promissores, mas as estimativas de acurácia são muito heterogêneas (Flores *et al.*, 2005; Greco *et al.*, 2009). Para que possam ser utilizados na

rotina de diagnóstico de TB, devem ser padronizados e validados em cada laboratório e ensaios clínicos devem ser realizados (Sperhackle *et al.*, 2004; Kritski *et al.*, 2005; Greco *et al.*, 2009).

Entre os kits comerciais disponíveis, apenas três foram amplamente difundidos e avaliados. O Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTD test; Gen-Probe, San Diego, CA, USA), o Amplicor MTB (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA), e o BD ProbeTec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD) (Kritski *et al.*, 2005; Tortoli & Palomino, 2007). Inicialmente os dois primeiros foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização em amostras clínicas pulmonares com baciloscopia positiva, mas uma nova versão do teste AMTD (EMTD – Enhanced *M. tuberculosis* Direct Test) foi aprovada para a utilização em amostras de pacientes suspeitos de TB pulmonar com baciloscopia positiva e negativa (Drobniewski *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2005). O BD ProbeTec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD) ainda não foi aprovado pelo FDA e apenas o Amplicor MTB (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA) possui registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008).

Os testes AMTD e EMTD são baseados na amplificação mediada por transcrição reversa e têm como alvo o RNA ribossômico (rRNA) 16S de uma região específica do complexo *M. tuberculosis*. O processo é realizado em um único tubo, o que minimiza o risco de contaminação e pode ser completado em 2 horas e 30 min. Não possui controle interno para avaliação de inibição (Tiwari *et al.*, 2007; Tortoli & Palomino, 2007).

O Amplicor MTB test é baseado na PCR do gene do rRNA 16S do gênero *Mycobacterium*. Para reduzir a contaminação é utilizado dUTP e N-uracil-glicosilase. O teste pode ser realizado em 6 a 7h e possui controle interno para detectar possível inibição da reação (Cheng *et al.*, 2005; Tortoli & Palomino, 2007).

O BD ProbeTec ET é baseado na amplificação isotérmica por deslocamento de fita utilizando a DNA polimerase e tem como alvo a sequência de inserção IS6110. Através de um controle interno a amplificação pode ser monitorada em tempo real. O tempo de realização do teste é de em torno de 4h (Tortoli & Palomino, 2007). A performance dos testes em um estudo de meta-análise é mostrada na tabela 3 (Greco *et al.*, 2006).

Tabela 3: Performance dos testes comerciais de AAN.

Teste (método)	BK +		BK -	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
EMTD (TMA)	95 - 98%	93 - 97%	70 - 80%	98 - 98,5%
Amplicor MTB (PCR)	94 - 97%	80 - 86%	57 - 65%	96 - 97%
BD ProbeTec ET (SDA)	96 - 99%	84 - 93%	66 - 76%	96 - 97%

BK: Bacilo de Koch; TMA: *Transcription Mediated Amplification*; PCR: *Polymerase Chain Reaction*; SDA: *Strand Displacement Amplification*. Modificado de Greco *et al.*, 2006.

Os testes de AAN, tanto comerciais como *in house*, apresentam como maior vantagem a rapidez em sua realização, mas não devem substituir os métodos convencionais no diagnóstico da TB. Somente a detecção de DNA de *M. tuberculosis* não significa necessariamente doença ativa, portanto, os dados moleculares precisam ser interpretados juntamente com os dados clínicos (Ling *et al.*, 2008). A maior desvantagem são os altos custos dos kits comerciais, dificultando sua utilização em países com menos recursos e uma grande carga da doença (Kritski *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2008; Greco *et al.*, 2009; Nyendak *et al.*, 2009).

1.8. Epidemiologia Molecular

Epidemiologia molecular é a integração de técnicas baseadas na caracterização de sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos de um patógeno, com abordagens epidemiológicas convencionais, para identificar os determinantes da distribuição, transmissão e manifestação da doença na população, visando a possibilidade de intervenção e prevenção (Small & van Embden, 1994; Foxman & Riley, 2001).

O desenvolvimento das ferramentas de epidemiologia molecular desde o início da década de 1990 contribuiu muito para o conhecimento da genética populacional da TB através de métodos confiáveis para identificar cepas diferentes de *M. tuberculosis* (Mathema *et al.*, 2006; Gillespie, 2007). Diversas metodologias podem ser utilizadas para verificar polimorfismos no DNA de *M. tuberculosis*. Estes métodos incluem o polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), hibridização de DNA, a PCR e diferentes combinações deles (Kremer *et al.*, 1999).

As três técnicas mais utilizadas para este propósito incluem a genotipagem utilizando o RFLP da sequência de inserção IS6110, *mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRUs) e *spoligotyping* (Mathema *et al.*, 2006; Gillespie, 2007; van der Spuy *et al.*, 2009).

1.8.1. A técnica de RFLP do IS6110

O RFLP do IS6110 é considerado o padrão-ouro entre as técnicas de genotipagem de *M. tuberculosis* (Kremer *et al.*, 2005; van Soolingen *et al.*, 2007). Tem alto poder discriminatório e sua utilidade foi comprovada em estudos de transmissão da TB (Small *et al.*, 1994; Diel *et al.*, 2002; Glynn *et al.*, 2008), de verificação da disseminação clonal de linhagens MDR (Bifani *et al.*, 1996; Dahle *et al.*, 2003; Samper

et al., 2005), de identificação de fatores de risco para transmissão da doença (Fandinho *et al.*, 2000; Haase *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2008), detecção de contaminação cruzada em laboratórios (Gutiérrez *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 2006) e estudos que diferenciam TB causada por transmissão recente ou reativação endógena (Diel *et al.*, 2002; Lillebaek *et al.*, 2002). Entretanto, esta técnica é demorada e trabalhosa, requer semanas de incubação para cultivar um número de organismos que possam fornecer quantidades de DNA suficientes para sua realização (Mathema *et al.*, 2006; van Soolingen *et al.*, 2007). Além disso, os padrões obtidos são difíceis de comparar entre laboratórios distintos, pois requerem programas especializados para análise dos complexos padrões de bandas gerados (Cowan & Crawford, 2002; Mathema *et al.*, 2006; van Soolingen *et al.*, 2007). As cepas que possuem um número pequeno de cópias de IS6110, geralmente inferior a 6, podem apresentar padrões idênticos, mesmo não sendo epidemiologicamente relacionadas (van Soolingen *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1996; Goulding *et al.*, 2000). Isto ocorre devido à existência de pontos preferenciais de integração do IS6110 no genoma de *M. tuberculosis*, sendo um destes pontos na região DR (Direct Repeat), na posição da DR 30 (Fomukong *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998; Filliol *et al.*, 2000), necessitando de um segundo marcador para sua diferenciação.

1.8.2. A técnica de MIRU-VNTR

Frothingham e Meeker-O'Connell realizaram uma análise sistemática dos lócus *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) em cepas do complexo *M. tuberculosis* e encontraram 11 lócus incluindo cinco *Major Polymorphic Tandem Repeats* (MPTR) (A a E) e seis *Exact Tandem Repeats* (ETR) (A a F), variando de tamanho de 53 a 79 pares de base (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998). Desde então, lócus adicionais VNTR foram relatados. Supply e colaboradores identificaram 41 VNTRs de MIRU

(repetições em tandem de 40 a 100 pb) localizados em regiões de minissatélite do cromossomo de H37Rv, CDC1551, e AF2122/97 (Supply *et al.*, 2000; Mazars *et al.*, 2001). Doze dos 41 loci MIRU foram selecionados para genotipagem de isolados clínicos de *M. tuberculosis* e foram reportados em um formato de 12 dígitos (Supply *et al.*, 2000). O método baseia-se na amplificação por PCR de múltiplos loci utilizando *primers* específicos para as regiões flanqueadoras de cada locus e na determinação dos tamanhos dos amplicons, que refletem o número de cópias dos MIRU-VNTR alvo. A análise dos tamanhos pode ser realizada utilizando um sistema de capilaridade (Allix *et al.*, 2004), eletroforese em gel (Mazars *et al.*, 2001) ou HPLC (Evans *et al.*, 2004). Os dados digitalizados permitem comparação inter e intralaboratorial. O poder discriminatório da análise por MIRU-VNTR é proporcional ao número de loci avaliados; em geral, quando somente os 12 loci são utilizados, é menos discriminatório que o RFLP do IS6110. Quando mais de 12 loci são utilizados, ou a análise é combinada com *spoligotyping*, o poder discriminatório é semelhante ao do RFLP do IS6110 (Mathema *et al.*, 2006).

Um estudo comparativo relatou que a análise por VNTR tem o melhor poder discriminatório e reprodutibilidade entre as técnicas baseadas na PCR (Kremer *et al.*, 2005). O método tem sido utilizado em alguns estudos de epidemiologia molecular e também em estudos filogenéticos (Sun *et al.*, 2004; Warren *et al.*, 2004; Stravum *et al.*, 2009), assim como para avaliar a transmissão de *M. bovis* (Roring *et al.*, 2004). Em uma colaboração internacional, a resolução, estabilidade e aplicabilidade de 29 loci MIRU-VNTR foram comparadas através da tipagem de 824 isolados de *M. tuberculosis*, representativos dos principais grupos genéticos, revelando os 24 loci MIRU-VNTR mais úteis. Um subconjunto de 15 loci com as maiores taxas evolutivas foi definido e concentrou 96% da resolução obtida com o conjunto de 24 loci com poder

discriminatório comparável ao do RFLP do IS6110. Assim, foi proposto que o conjunto de 15 lócus seja utilizado como o novo padrão para diferenciação epidemiológica de *M. tuberculosis* e o sistema de 24 lócus seja utilizado como uma ferramenta de alta resolução para estudos filogenéticos (Supply *et al.*, 2006).

O uso de diferentes conjuntos de VNTR de uma coleção para outra dificultaria a comparação dos perfis de um laboratório para outro, uma das vantagens da técnica. Apesar de promissora, esta nova seleção de lócus MIRU-VNTR ainda necessita ser avaliada em diferentes ambientes e populações, pois a variabilidade de lócus específicos de MIRU depende dos isolados analisados, sua origem geográfica e diversidade genética inerente das cepas (Mathema *et al.*, 2006).

1.8.3. A técnica de Spoligotyping

O *spoligotyping* é uma técnica baseada no polimorfismo existente na região DR (*Direct Repeat*) de *M. tuberculosis*, que consiste de um número variável de cópias de uma repetição direta de 36 pb, intercaladas com sequências específicas de espaçadores de 34 a 41 pb. As cepas de *M. tuberculosis* variam no número de DRs e na presença ou ausência de espaçadores específicos e os spoligotipos evoluem através da perda sucessiva de espaçadores na região DR de *M. tuberculosis*, sem a habilidade de readquirir os espaçadores perdidos. Alguns destes eventos de deleção são mediados pela transposição de sequências de inserção na região DR ou recombinação homóloga entre DRs (Arnold, 2006). O *spoligotyping* apresenta um poder discriminatório menor do que o RFLP do IS6110 e outros sistemas de genotipagem (Kremer *et al.*, 1999; Kremer *et al.*, 2005). As deleções de sequências espaçadoras específicas não são eventos evolutivos independentes, e padrões idênticos podem surgir em cepas não relacionadas (homoplasia) como um resultado de evolução convergente (Warren *et al.*, 2002a).

Assim, grupos de isolados compartilhando o mesmo padrão podem representar cadeias de transmissão recente, mas também podem representar similaridades genéticas mais amplas (ancestral comum distante), enquanto isolados com padrões diferentes de *spoligotyping* podem seguramente ser considerados genótipos distintos (Hayward & Watson 1998). Por isso a tipagem de cepas por *spoligotyping* tem sido aplicada principalmente para descartar relações epidemiológicas ao invés de confirmá-las. Entretanto, é muito útil para realização de *screening* em um grande número de isolados, e pode ser associado a uma técnica secundária de genotipagem, fornecendo informações epidemiológicas mais rapidamente (Ferdinand *et al.*, 2002; Kremer *et al.*, 2005; Nicol & Wilkinson, 2008), e já foi demonstrada a habilidade desta técnica em determinar o mecanismo patogênico de recidiva da doença (Warren *et al.*, 2002b).

Esta metodologia é rápida, de simples execução e permite detecção e diferenciação de cepas de *M. tuberculosis* simultaneamente, além de diferenciação de membros do complexo *M. tuberculosis* (Kamerbeek *et al.*, 1997). A reprodutibilidade do *spoligotyping* é uma das mais altas entre as técnicas rápidas, baseadas na PCR e produz padrões de fácil análise através de programas de computador, permitindo a realização de estudos com grande número de amostras (Goyal *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 1999; Kremer *et al.*, 2005; Driscoll, 2009). Isto facilitou o desenvolvimento de um banco mundial com uma nomenclatura consistente dos principais grupos genéticos de *M. tuberculosis* (Filliol *et al.*, 2002; Filliol *et al.*, 2003; Brudey *et al.*, 2006). O banco mundial (SpolDB4) de padrões de *spoligotyping* pode ser acessado livremente (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo>). Este banco de dados contém 39.295 isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* obtidos de 122 países, contendo 1.939 spoligotipos diferentes (STs) (Brudey *et al.*, 2006). Muitas famílias de cepas foram identificadas baseadas no padrão de *spoligotyping* e estas famílias foram

agrupadas em três Grupos Genéticos Principais (PGG – *Principal Genetic Group*). O PGG1 inclui as famílias *East African-Indian* (EAI), Beijing e *Central Asian* (CAS) ou Dheli. O PGG2 inclui as famílias Harleem, *Latin American and Mediterranean* (LAM) e X. A família T e outras famílias ainda não muito bem caracterizadas, estão classificadas no PGG3 (Rastogi & Sola, 2007). As três famílias genotípicas principais, LAM, Harleem e T são as mais frequentes na África, América Central, Europa e América do Sul. Estas famílias englobam 80% de todos os isolados brasileiros incluídos no SpolDB4 (Brudey *et al.*, 2006).

Outra característica importante da técnica é que requer pequenas quantidades de DNA para sua realização, podendo ser aplicada diretamente em amostras clínicas (Heyderman *et al.*, 1998; Goyal *et al.*, 1999), em esfregaços de lâminas coradas por ZN, recentes ou armazenadas por vários anos (van der Zanden *et al.*, 2003; Gori *et al.*, 2005; Suresh *et al.*, 2007) e tecidos preservados em parafina (van der Zanden *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1999). A extração de DNA das lâminas coradas por ZN é realizada através de protocolos que utilizam Chelex-100 (Walsh *et al.*, 1991). Em um estudo realizado em Gana, 175 amostras de escarro foram extraídas pelo método de fenol/clorofórmio (Van Soolingen *et al.*, 1991) e analisadas por *spoligotyping*. Padrões completos foram obtidos em 159 (90,9%) amostras (Goyal *et al.*, 1999), porém as amostras foram selecionadas por apresentar alta carga bacilar na análise por ZN. A possibilidade de utilizar esta técnica diretamente em amostras clínicas representa uma vantagem significativa quando resultados rápidos são necessários e também em locais onde a cultura do bacilo não está amplamente disponível (Goguet de la Salmoniere *et al.*, 1997). A obtenção de informações sobre as identidades das cepas precocemente é importante para que tais informações possam ter utilidade clínica e possam ser

utilizadas no manejo da doença durante seu curso (Hayward & Watson, 1998; Gori *et al.*, 2005).

1.9. Geolocalização

O mapeamento em saúde se refere às atividades, técnicas e ferramentas que são utilizadas para estabelecer a geografia ou localização como o fator que integra dados de saúde e da comunidade. Geralmente tem como objetivo criar uma representação cartográfica de um ambiente, adicionando informações para o planejamento e tomada de decisões em saúde pública, através de um melhor entendimento de relações espaciais visualmente. Mostra-se útil na análise de dados demográficos e sua distribuição na geografia; distribuição de doenças, de grupos de alto risco, seleção de locais e localização de serviços de saúde. Identificar estes elementos pode auxiliar as autoridades como parte do sistema de saúde a elaborar um plano para combater a disseminação da doença. A combinação de epidemiologia e mapeamento propicia a habilidade de identificar, localizar e agrupar o estado de saúde com as pessoas, lugares e atividades. Serve para dar apoio às funções centrais de saúde pública de vigilância, determinação de alvos e intervenção, e sua real contribuição emerge quando os mapas são associados aos esforços para controle e prevenção das doenças (Al-Shorbaji, 2009).

A SMS de Porto Alegre e o PCT do RS têm realizado o mapeamento de casos de TB nos municípios prioritários (com maiores incidências) para definir as áreas com maior número de casos, associadas ao alto risco social (SMS/POA, 2008; CEVS/RS, 2007). Assim como em estudos realizados na Índia, Estados Unidos, Canadá e Vitória/ES, foram identificadas incidências diferentes em uma mesma cidade e regiões com alta concentração de casos da doença (Moonan *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2006;

Haase *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2008). A combinação da caracterização molecular de cepas com mapeamento tem auxiliado na identificação de regiões geográficas onde está ocorrendo transmissão da TB (Bishai *et al.*, 1998; Moonan *et al.*, 2004; Haase *et al.*, 2007). Em Montreal, a utilização de dados espaciais e de genotipagem sugeriu a ocorrência de transmissão em uma área específica e dentro de um subgrupo da população. Também foi demonstrada uma concentração de casos além daquela esperada pela distribuição da população de origem estrangeira, em um grupo de indivíduos nascidos no Canadá (Haase *et al.*, 2007).

O investimento em estudos que utilizem a combinação de dados de vigilância epidemiológica, caracterização molecular e distribuição geográfica dos casos de TB, seria de grande utilidade uma vez que melhoram o entendimento da distribuição da doença e podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais específicas para conter sua disseminação (Tiwari *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2007).

1.9. Justificativa

A TB permanece como uma doença importante do ponto de vista da saúde pública. Devido ao aumento do número de casos globalmente, surgimento de cepas resistentes aos fármacos e a co-infecção pelo HIV ameaçando os programas de controle da TB, novas estratégias para combater a doença são urgentemente necessárias (Ruffino-Neto, 2002; Nguyen *et al.*, 2004; Dye, 2006). Para prevenir a transmissão de *M. tuberculosis* é importante que se tenha um diagnóstico rápido e acurado. Uma barreira importante para o controle da TB é que atualmente as taxas de detecção de casos são baixas (Broekmans, 1994; Jassal & Bishai, 2009). A OMS recomenda investimentos em novas tecnologias e estratégias que possam contribuir para o diagnóstico mais rápido, assim como a aplicação de ferramentas que permitam um melhor entendimento da epidemiologia da TB em diferentes populações (WHO, 2008).

A população atendida pelo Hospital Sanatório Partenon apresenta os mais altos coeficientes de TB e HIV de Porto Alegre (SMS/POA, 2008). Além da busca de casos de TB através de um diagnóstico precoce, estudos epidemiológicos locais são importantes como ferramentas para conhecer não só a população, mas também as características do agente infeccioso para fornecer informações que possam contribuir para delinear corretamente estratégias de controle, atuando na prevenção de novos casos (van de Spuy *et al.*, 2009). Como mencionado anteriormente, o *spoligotyping* é uma técnica desenvolvida para detecção e diferenciação simultânea de cepas do complexo *M. tuberculosis* (Kamerbeek *et al.*, 1997). A oportunidade de combinar informações diagnósticas rápidas e dados de epidemiologia molecular representa um avanço importante no controle da TB (Gori *et al.*, 2005). Poucos estudos foram realizados utilizando o *spoligotyping* diretamente em DNA extraído de amostras clínicas

(Heyderman *et al.*, 1998, Goyal *et. al*, 1999). Por isso é importante avaliar o desempenho dessa técnica em diferentes ambientes, condições de rotina e desenho de estudo. A combinação de dados epidemiológicos, caracterização molecular a partir de amostras clínicas e geolocalização dos casos de TB, podem contribuir para o entendimento da distribuição da doença e auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais específicas para conter sua disseminação mais rapidamente.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Através da coleta prospectiva de dados e análise de amostras clínicas de pacientes com suspeita de TB, avaliar a contribuição da técnica de *spoligotyping* aplicada diretamente nas amostras clínicas. Analisar o perfil epidemiológico da população de abrangência do ambulatório do Hospital Sanatório Partenon (Porto Alegre, RS) e geolocalizar os casos para identificar a distribuição espacial dos perfis genotípicos presentes naquela população.

2.2. Específicos

- ▶ Coletar amostras de escarro de pacientes com suspeita de TB atendidos no ambulatório do Hospital Sanatório Partenon para identificar os casos da doença através de diagnóstico laboratorial;
- ▶ Realizar entrevistas para coleta de dados clínicos-epidemiológicos dos pacientes para caracterizar a população;
- ▶ Aplicar a técnica de *spoligotyping* diretamente nas amostras clínicas dos pacientes para avaliar a acurácia desta, através da comparação com os padrões de *spoligotyping* da cultura do microrganismo;
- ▶ Comparar os padrões de *spoligotyping* com o banco mundial de spoligotipos e analisar a frequência dos tipos circulantes na população estudada;
- ▶ Geolocalizar os pacientes para ilustrar a distribuição dos spoligotipos na região.

PARTE II

CAPÍTULO I

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Tipo e Local de Estudo

Estudo de coleta prospectiva em pacientes com suspeita de TB atendidos no ambulatório do Hospital Sanatório Partenon (HSP) de Porto Alegre/RS.

As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Micobactérias, Seção de Bacteriologia do Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/RS) - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). O estudo de caracterização molecular foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da FEPPS (CDCT-FEPPS)

3.2. Pacientes

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos atendidos no ambulatório do HSP, com suspeita de TB que aceitaram participar do estudo, de 1º de agosto de 2005 a 30 de abril de 2007. As informações foram obtidas pela aplicação de questionário padronizado (anexo 3) e pela revisão dos prontuários da unidade de saúde.

3.3. Critérios de Seleção de pacientes

- Ter idade acima de 18 anos;

- Ser sintomático respiratório;
- Concordar em participar do estudo mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 4);
- Responder ao questionário epidemiológico (anexo 3).
- Fornecer material clínico em quantidade suficiente para as análises propostas pelo estudo;

3.4. Critérios de Seleção das Amostras

Foram analisadas neste estudo as amostras clínicas fornecidas em quantidade suficiente para a análise molecular e bacteriológica.

3.5. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que não forneceram material suficiente para todas as análises. Também foram excluídas as amostras que devido a problemas técnicos não foi possível obter DNA do isolado bacteriano.

3.6. Definição de caso

Para definição de caso, o critério clínico-bacteriológico foi utilizado como padrão-ouro, que é, neste caso como: cultura positiva para *M. tuberculosis* no material biológico ou cultura para micobactéria negativa com presença de critério clínico radiológico evolutivo de TB, preconizado conforme as normas técnicas da Secretaria Estadual de Saúde /RS e Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT/MS).

3.7. Amostras Clínicas

Uma alíquota de 500 µL de escarro foi separada em um microtubo e congelada para extração de DNA. O volume restante foi utilizado para cultivo e baciloscopia.

3.8. Análise Bacteriológica

As amostras foram descontaminadas com NaOH 4%, semeadas em meio de cultura Ogawa, colocadas em uma estufa a 37° C, por um período de 4 a 8 semanas (Kudoh & Kudoh, 1974). Posteriormente foi realizado um esfregão e coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (Brasil, 2008) para avaliação bacterioscópica. As amostras foram classificadas de acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (Brasil, 2008).

3.9. Preparação da Amostra Clínica

O método de extração de DNA das amostras clínicas foi realizado como descrito por Rossetti *et al.* (1997). Uma alíquota de 500 µL de amostra clínica foi descontaminada e liquefeita adicionando uma mistura de mesmo volume de N-acetil-L-cisteína 0.5% (NALC)/ NaOH 2%. Após foi concentrada por centrifugação (12.000 rpm por 10 min). O material centrifugado sedimentado foi lavado 3 vezes com TE 1X (10 mM Tris–1 mM EDTA, pH 8,0). O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de TE 1X e fervido por 10 min em banho-maria. Após nova centrifugação (12.000 rpm, 20 seg), o sobrenadante foi misturado com 5 µL de resina de sílica (Marligen Biosciences, Inc., Ijamsville, MD, USA) e incubado por 5 min. a temperatura ambiente. A mistura foi

centrifugada (12.000 rpm, 1 min) e o sobrenadante cuidadosamente removido. O centrifugado (DNA/resina de sílica) foi lavado com álcool 70% e novamente centrifugado como na etapa anterior, então foi deixado à temperatura ambiente para secar. Foram adicionados 30 µL de TE 1X e nova centrifugação foi realizada. O sobrenadante (contendo o DNA) foi utilizado para análise. Em cada extração foram incluídos um controle negativo que consiste de um tubo contendo apenas tampão TE e um controle positivo que consiste de uma diluição de *M. tuberculosis* H37Rv contendo 50 unidades formadoras de colônias (UFCs).

3.10. Extração de DNA de Cultura de *M. tuberculosis*

A extração do DNA dos isolados de *M. tuberculosis* foi realizada conforme descrito por van Embden *et al.* (1993). Algumas colônias de *M. tuberculosis* foram suspensas em 400 µL de TE 1X (10 mM Tris–1 mM EDTA, pH 8,0) e inativadas em banho-maria a 80°C. A quebra da parede celular foi realizada com 50µL de lisozima (10 mg/mL). Então foi adicionada uma solução de 70 µL de SDS (10%) e 5 µL de Proteinase K (10 mg/mL), seguido de 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de uma mistura de CTAB/NaCl (4,1% NaCl/ 10% CTAB) para a complexação de proteínas e lipídeos. Um volume de 750 µL de clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1) foi adicionado e após centrifugação ocorreu a separação de fases. A partir da fase aquosa, o DNA foi precipitado com 450 µL de isopropanol seguido de resfriamento a -20°C e centrifugação. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e secado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em TE 1X e armazenado a -20°C.

3.11. Técnica de spoligotyping

A técnica foi realizada conforme padronizado por Kamerbeek *et al.* (1997). Foram utilizados os *primers* DRa e DRb que anelam nas extremidades da sequência DR visando amplificar as sequências espaçadoras entre duas DRs. DRa: 5' biotilado GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3'; DRb: 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3' (Kamerbeek *et al.*, 1997).

As reações de amplificação foram realizadas com 10µL de DNA extraído das amostras clínicas e aproximadamente 100 ng de DNA extraído de cultura, 20 pmoles de cada um dos *primers*, 200 µM de desoxiribonucleosídeos trifosfato (Invitrogen™ Life Technologies), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (CBIOT-UFRGS). As amplificações pela PCR foram realizadas em um termociclador (Mini Cycler - MJ Research) sob as seguintes condições:

1ª etapa: 1 ciclo a 96°C por 3 min

2ª etapa: 20 ciclos a 96°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 30 seg;

3ª etapa: 1 ciclo a 72°C por 5 min.

Para amplificação de DNA extraído de amostras clínicas o número de ciclos foi aumentado para 40. Os produtos amplificados foram hibridizados com um conjunto de 43 oligonucleotídeos imobilizados em uma membrana comercial previamente preparada, cada um correspondendo a uma das sequências únicas dos espaçadores dentro do locus DR (Isogen, Bioscience BV, Holanda).

Para a hibridização, 35 µL dos produtos da PCR foram diluídos em 150 µL de SSPE 2X (0,02 M Na₂HPO₄ * 2 H₂O, 0,36 M NaCl, 2mM EDTA – pH 7,4)– SDS 0,1% e desnaturados. As amostras diluídas foram aplicadas em canais paralelos de um *miniblotter* (Isogen, Bioscience BV, Holanda), de modo que ficassem perpendiculares

às linhas de oligonucleotídeos previamente imobilizados. A hibridização foi realizada por 60 min a 60°C em forno de hibridização (Hybaid Instruments, Holbrook, NY), após a membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2X- SDS 0,5% por 10 min a 60°C. Em seguida foi incubada com um conjugado de estreptavidina-peroxidase diluído (1:4.000) por 50 min a 42°C. A membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2X- SDS 0,5% por 10 min a 42°C e 2 vezes com 250 mL de SSPE 2X por 5 min à temperatura ambiente.

A detecção foi realizada pela sensibilização de um filme autoradiográfico através de uma reação de quimioluminescência, utilizando o kit ECLTM (Amersham Biosciences, Inglaterra).

3.12. Precauções

A extração de DNA das amostras de escarro, a extração de DNA da cultura de *M. tuberculosis*, a preparação das reações de PCR, e a técnica de *spoligotyping* foram realizadas em salas separadas. Foram utilizadas capelas de fluxo exclusivas para cada procedimento, ponteiras com filtro e pipetas exclusivas. Os reagentes foram preparados em salas livres de DNA de micobactéria e autoclavados quando necessário.

3.13. Análise Estatística

Os dados dos pacientes, coletados através de questionário epidemiológico, foram analisados através do programa SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL). Os valores foram expressos como médias \pm desvio padrão (DP) ou números e porcentagens. As médias foram comparadas pelo teste de ANOVA e para as comparações de grupos de variáveis

categóricas foi utilizado o qui-quadrado ou teste Exato de Fisher bicaudal. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.14. Geolocalização dos pacientes

O endereço residencial dos pacientes foi localizado em mapa, através do programa Google Maps. Um Símbolo representando o perfil de *spoligotyping* da cepa de cada paciente foi inserido no mapa.

3.15. Considerações Éticas

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (protocolo 161/05) e Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (protocolo 27/2006).

CAPÍTULO II

4. RESULTADOS

4.1. Descrição da População Estudada

Um estudo de coleta prospectiva foi realizado incluindo pacientes com suspeita de TB, atendidos no ambulatório do Hospital Sanatório Partenon (HSP). Foram incluídos neste estudo 202 pacientes, dos quais 142 foram diagnosticados com TB e 60 não tinham a doença. Cento e trinta e cinco pacientes tinham TB pulmonar (95%). Sete pacientes (5%) foram diagnosticados com TB pulmonar e extrapulmonar, destes, três tinham TB pleural, dois tinham TB ganglionar, um paciente tinha TB linfática e outro paciente tinha TB na laringe concomitantemente.

Não houve diferença na proporção de homens e mulheres em relação à doença nem estado civil dos indivíduos. Entre os pacientes com TB, 69% eram do sexo masculino. A média de idade dos pacientes com TB foi $36,96 \pm 12,17$ e variou de 18 a 75 anos, mais baixa que a média dos pacientes sem a doença, que foi de $44,54 \pm 6,05$ e variou de 20 a 83 anos ($p < 0,001$). Cento e dezoito (83%) pacientes com TB tinham entre 18 e 47 anos. Os pacientes brancos representaram 56% dos indivíduos analisados, porém entre os não brancos, havia uma proporção maior de indivíduos diagnosticados com TB (tabela 4).

Tabela 4: Comparação de pacientes com e sem TB em relação ao sexo, idade, cor e estado civil.

		Não TB	TB	Total	<i>p</i>
Sexo (n=202)	Masculino	38 (63,3)	98 (69%)	136 (67,3%)	0,51
	Feminino	22 (37,7%)	44 (31%)	66 (32,7%)	
Idade (anos) (n=201)	18 - 25	8 (13,6%)	35 (24,6%)	43 (21,4%)	0,01
	26 - 36	12 (20,3%)	38 (26,8%)	50 (24,9%)	
	37 - 47	16 (27,1%)	45 (31,7%)	61 (30,3%)	
	48 - 60	13 (22%)	18 (12,7%)	31 (15,4%)	
	> 60	9 (15,3%)	6 (4,2%)	15 (7,5%)	
Cor (n=200)	Branco	43 (74,1%)	69 (48,6%)	112 (56%)	0,001
	Não-Branco	15 (25,9%)	73 (51,4%)	88 (44%)	
Estado civil (n=198)	Casado	29 (50,8%)	58 (41,1%)	87 (43,4%)	0,26
	Solteiro	28 (49,2%)	83 (58,8%)	111 (78,7%)	

Não houve diferença na escolaridade entre os pacientes com e sem TB e quase 60% dos indivíduos tinham de 4 a 8 anos de estudo. Entre os pacientes com TB, 50% tinham até 5 anos de estudo, que foi a moda com 24 (17%) pacientes, seguido de 4 e 8 anos de estudo, 18 (12,7%) pacientes em cada categoria. A renda familiar dos pacientes com TB foi menor do que dos indivíduos sem a doença ($p=0,02$) e 32,6% dos pacientes com TB não tinham renda. Entre os pacientes com TB, 43% estavam desempregados, proporção maior do que entre os que não tinham a doença ($p=0,013$) (tabela 5). Em relação à ocupação, dos 119 pacientes com TB com esta informação (foram excluídos estudantes, donas de casa e pacientes sem o dado), 61 (51,3%) tinham empregos informais.

Tabela 5: Comparação da população estudada com e sem TB em relação à escolaridade, rendimentos e trabalho.

		Não TB	TB	Total	<i>p</i>
Escolaridade (anos de estudo) (n=196)	Analfabetismo	2 (3,7%)	2 (1,4%)	4 (2%)	0,37
	1 - 3	8 (14,8%)	28 (19,7%)	36 (18,4%)	
	4 - 8	29 (53,8%)	87 (61,3%)	116 (59,2%)	
	9 - 11	13 (24%)	23 (16,2%)	36 (18,4%)	
	> 11	2 (3,7%)	2 (1,4%)	4 (2%)	
Renda familiar (salários mínimos) (n=198)	Sem renda	8 (14%)	46 (32,6%)	54 (27,3%)	0,02
	< 1	4 (7%)	15 (10,6%)	19 (9,6%)	
	1 - 3	33 (57,9%)	64 (45,4%)	97 (49%)	
	> 3	12 (21,1%)	16 (11,4%)	22 (14,1%)	
Desemprego (n=200)	Sim	14 (24,1%)	61 (43%)	75 (37,5%)	0,013
	Não	44 (75,9%)	81 (57%)	125 (62,5%)	

Não houve diferença na frequência de abuso de álcool ou tabagismo em relação aos pacientes com ou sem TB. Histórico de encarceramento (significância limítrofe – $p=0,053$) e uso de drogas ($p=0,007$) foram mais frequentes entre os pacientes com a doença (tabela 6). Dos 53 pacientes com TB que reportaram uso de drogas, 25 (47,2%) usavam somente maconha, 13 (25%) usavam principalmente cocaína, 14 (26,4%) usavam principalmente crack e um não tinha a informação.

Tabela 6: Comparação entre pacientes com e sem TB em relação a grupos de vulnerabilidade para a doença.

		Não TB	TB	Total	<i>p</i>
Alcoolismo (n=200)	Sim	14 (24,1%)	31 (21,8%)	45 (22,5%)	0,72
	Não	44 (75,9%)	111 (78,2%)	155 (77,5%)	
Tabagismo (n=200)	Sim	40 (69%)	87 (61,3%)	127 (63,5%)	0,30
	Não	18 (31%)	55 (38,7%)	73 (36,5%)	
Uso drogas (n=199)	Sim	10 (17,5%)	53 (37,3%)	63 (31,6%)	0,007
	Não	47 (82,5%)	89 (62,7%)	136 (68,4%)	
Histórico de encarceramento (n= 201)	Sim	7 (11,9%)	34 (24%)	41 (20,4%)	0,053
	Não	52 (88,1%)	108 (76%)	160 (79,6%)	

Os indivíduos foram questionados sobre o tempo de sintomas respiratórios (tosse e escarro). A média de tempo de sintomas dos indivíduos sem TB foi de 10,9 semanas e dos pacientes com a doença foi de 11 semanas, em ambos os grupos variou de 1 a 48 semanas, com mediana de 8 semanas, não havendo diferença. Através do cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), foi observada uma frequência próxima de um valor significativo de pacientes desnutridos entre aqueles diagnosticados com TB ($p=0,07$). A proporção de indivíduos com episódio prévio de TB foi semelhante entre os grupos. Os indivíduos com diagnóstico de TB relataram com maior frequência ter tido contato com paciente com TB (significância limítrofe - $p=0,057$), além disso, foi observado que os pacientes que tiveram contato intradomiciliar e em prisões apresentaram maior risco de adoecimento do que aqueles que tiveram contato familiar ou outro tipo de contato (ex: amigo, vizinho, colega de trabalho) (tabela 7).

Tabela 7: Comparação entre pacientes com e sem TB em relação a dados da linha de base da doença.

		Não TB	TB	Total	p
Tempo sintomas	Média ± DP	10, 9 ± 9,81	11,08 ± 10,29	11,03 ± 10,13	0,92
IMC (n=191)	< 18,5	7 (13%)	34 (24,8%)	41 (21,5%)	0,07
	> 18,5	47 (87%)	103 (75,2%)	150 (78,5%)	
TB prévia (n=199)	Sim	13 (22,8%)	31 (21,8%)	44 (22,1%)	0,88
	Não	44 (77,2%)	111 (78,2%)	155 (77,9%)	
Contato com TB (n=199)	Sim	29 (50%)	91 (64,5%)	120 (60,3%)	0,057
	Não	29 (50%)	50 (35,5%)	79 (39,7%)	
Tipo Contato (n=120)	Intradomiciliar	6 (20,7%)	27 (29,7%)	33 (27,5%)	0,018
	Familiar	13 (44,8%)	15 (16,5%)	28 (23,3%)	
	Prisão	6 (20,7%)	33 (36,2%)	39 (32,5%)	
	Outro	4 (13,8%)	16 (17,6%)	20 (16,7%)	

DP = Desvio padrão.

Entre os 142 pacientes diagnosticados com TB, 141 (99,3%) realizaram teste para HIV e a co-infecção foi de 21,1%, sendo que 93% dos casos tinham entre 26 e 47 anos de idade. Cento e vinte e sete (89,4%) pacientes foram testados para HCV, e 23 (18,1% dos testados) foram positivos, sendo que 74% tinham entre 26 e 47 anos e 26% de 48 a 60 anos de idade. O teste para presença de HBV foi realizado em 119 (83,8%) pacientes, dos quais dois (1,7% dos testados) foram positivos (tabela 8).

Tabela 8: Pacientes com TB associada a outros grupos de vulnerabilidade.

	HIV	HCV	HBV
Sim	30 (21,1%)	23 (16,2%)	2 (1,4%)
Não	111 (78,2%)	104 (73,2%)	117 (82,4%)
Ignorado	1 (0,7%)	15 (10,6%)	23 (16,2%)

Quanto ao desfecho do tratamento, 101 (71,1%) pacientes tiveram alta por cura, 16 (11,3%) abandonaram o tratamento, 10 (7%) pacientes foram transferidos, nove (6,3%) apresentaram falência, quatro (2,8%) faleceram e um paciente não retornou à unidade para realizar o tratamento. Entre os pacientes que abandonaram o tratamento, sete (43,8%) eram usuários de drogas e sete (43,8%) eram alcoolistas, sendo que três relataram as duas condições. A proporção de alcoolistas foi significativamente maior entre os pacientes que abandonaram o tratamento do que entre os pacientes que tiveram alta por cura ($p=0,04$) (tabela 9).

Tabela 9: Comparação do desfecho do tratamento com grupos de vulnerabilidade.

		Cura (n=101)	Abandono (n=16)	<i>p</i>
Alcoolismo	Sim	18 (17,8%)	7 (43,8%)	0,042
	Não	83 (82,2%)	9 (56,2%)	
Uso drogas	Sim	29 (28,7%)	7 (43,8%)	0,25
	Não	72 (71,3%)	9 (56,2%)	
HIV	Sim	18 (17,8%)	3 (18,8%)	1
	Não	83 (82,2%)	13 (81,2%)	

Não houve diferença na média de idade, renda familiar, alcoolismo, uso de drogas, histórico de encarceramento ou desemprego em relação aos pacientes brancos e não-brancos. Entretanto a média de anos de estudo dos pacientes não-brancos foi mais baixa que dos pacientes brancos ($p=0,049$) e infecção por HIV ($p=0,019$) e HCV ($p=0,002$) foi mais frequente nos pacientes não-brancos.

Tabela 10: Comparação das características de pacientes brancos e não brancos.

		Branco (n=69)	Não-Branco (n=73)	Total	p
Idade	Média ± DP	37,26 ± 13,36	36,68 ± 11,02	36,96 ± 12,17	0,77
Escolaridade	Média ± DP	6,38 ± 2,85	5,44 ± 2,78	5,89 ± 2,84	0,049
Renda Familiar	Sem renda	23 (33,3%)	23 (31,9%)	46 (32,6%)	0,55
	> 1	5 (7,3%)	10 (13,9%)	15 (10,6%)	
	1 - 3	34 (49,3%)	30 (41,7%)	64 (45,4%)	
	< 3	7 (10,1%)	9 (12,5%)	16 (11,4%)	
Alcoolismo	Sim	11 (15,9%)	20 (27,4%)	31 (21,8%)	0,099
	Não	58 (84,1%)	53 (72,6%)	111 (78,2%)	
Histórico encarceramento	Sim	20 (30%)	14 (19,2%)	34 (23,9%)	0,17
	Não	49 (70%)	59 (80,8%)	108 (76,1%)	
Uso drogas	Sim	28 (41%)	25 (34,2%)	53 (37,3%)	0,43
	Não	41 (59%)	48 (65,8%)	89 (62,7%)	
Desemprego	Sim	29 (42%)	32 (43,8%)	61 (43%)	0,82
	Não	40 (58%)	41 (56,2%)	81 (57%)	
HIV	Sim	9 (13%)	21 (28,8%)	30 (21,3%)	0,019
	Não	60 (87%)	51 (71,2%)	111 (78,7%)	
HCV	Sim	5 (7,5%)	18 (29,5%)	23 (18,1%)	0,002
	Não	61 (92,5%)	43 (70,5%)	104 (81,9%)	

DP = Desvio padrão.

4.2. Artigo Científico

Neste item estão descritos os principais resultados em forma de artigo científico, aceito para publicação na revista “Canadian Journal of Microbiology” doi: 10.1139/W09-033.

NOTE / NOTE

Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis

Patricia Izquierdo Cafrune, Lia Gonçalves Possuelo, Andrezza Wolowski Ribeiro, Marta Osório Ribeiro, Gisela Unis, Carla Adriane Jarczewski, Maria Lúcia Rosa Rossetti, and Arnaldo Zaha

Abstract: A prospective study was designed to evaluate the clinical usefulness of spoligotyping applied directly to sputum samples. Patients suspected of having tuberculosis were recruited at the Hospital Sanatorio Partenon in Porto Alegre, Brazil. Of the 197 samples included in the analysis, 175 (88.8%) yielded a spoligotyping result that fully matched that obtained from culture. Low bacillary samples presented lower accuracy (50%). From 135 *Mycobacterium tuberculosis* spoligopatterns, we identified 44 different spoligotypes, of which 21 were shared patterns and 23 were unique. T1 was the most frequent subfamily. The genotyping strategy proposed here presents a short turnaround time and could be helpful in providing rapid information on strain identities in a clinical setting.

Key words: spoligotyping, sputum samples, *Mycobacterium tuberculosis*, prospective study, southern Brazil.

Résumé : Une étude prospective a été conçue pour évaluer l'utilité clinique du spoligotypage (pour *spacer-oligonucleotide-typing*) appliqué directement à des échantillons d'expectoration. Des patients soupçonnés de tuberculose ont été recrutés à l'*Hospital Sanatorio Partenon* à Porto Alegre, Brésil. Des 197 échantillons inclus dans l'analyse, 175 (88,8 %) ont généré un résultat de spoligotypage qui concordait parfaitement avec les résultats obtenus en culture. Les échantillons faiblement bacillaires présentaient une fiabilité plus faible (50 %). À partir des 135 patrons de spoligotypage de *Mycobacterium tuberculosis*, nous avons identifié 44 spoligotypes différents, parmi lesquels 21 étaient partagés et 23 étaient uniques. T1 constituait la sous-famille la plus fréquente. La stratégie de génotypage proposée ici offre un temps de réalisation court et pourrait être utile en générant rapidement de l'information sur l'identité des souches dans un cadre clinique.

Mots-clés : spoligotypage, échantillons d'expectoration, *Mycobacterium tuberculosis*, étude prospective, sud du Brésil.

[Traduit par la Rédaction]

Despite a national tuberculosis (TB) control program, Brazil ranks 16th among the 22 countries estimated to be responsible for 80% of all TB cases worldwide (WHO 2008). In 2006, Brazil notified 83 293 cases of the disease, corresponding to an incidence of 44 cases per 100 000 population and an estimated mortality rate of 4 per 100 000 population (WHO 2008).

Porto Alegre is the capital of Rio Grande do Sul (RS)

State, situated at the southern end of Brazil. This city reports around 1600 new cases of TB annually, which gives an incidence of 112 per 100 000 population; the rate of TB-HIV co-infection is around 26% (CEVS-RS 2007).

Rapid diagnosis, adequate treatment, and contact tracing to arrest further transmission are key factors in the control of this infectious disease (Broekmans 1994). The advent of techniques for molecular detection and differentiation of

Received 13 November 2008. Revision received 12 February 2009. Accepted 26 February 2009. Published on the NRC Research Press Web site at cmj.nrc.ca on 16 July 2009.

P.I. Cafrune¹ and L.G. Possuelo. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

A.W. Ribeiro and M.L.R. Rossetti. Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, CDCT/FEPPS, Avenida Ipiranga 5400, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil.

M.O. Ribeiro. Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, IPB-LACEN/FEPPS, Avenida Ipiranga 5400, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil.

G. Unis and C.A. Jarczewski. Hospital Sanatório Partenon, Avenida Bento Gonçalves 3722, Porto Alegre, RS 90650-003, Brazil.

A. Zaha. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Campus do Vale, Prédio 43421, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

¹Corresponding author (e-mail: patricia_cafrune@hotmail.com).

Table 1. Accuracy of spoligotyping results according to culture grading.

Culture ^a	No. of samples	Matching pattern	Nonmatching pattern ^b	Accuracy (%)
Negative	60	59	1	98.3
Positive 3+	79	71	8 (5 ss–3 ic)	89.9
Positive 2+	35	30	5 (1 ss–4 ic)	85.7
Positive 1+	13	10	3 (3 ic)	76.9
Positive (<20 colonies)	10	5	5 (5 ic)	50
Total	197	175	22	88.8

^aCulture grading: positive 1+, 20–100 colonies; positive 2+, >100 separate colonies; positive 3+, confluent growth, positive <20 colonies.

^bss, single spacer of difference; ic, incomplete pattern.

strains of members belonging to *Mycobacterium tuberculosis* complex have proved to be very useful in providing a better understanding of the various aspects of the epidemiology and transmission of TB (Moström et al. 2002; Mathema et al. 2006).

IS6110 restriction fragment length polymorphism (IS6110-RFLP) has been used for genotyping *M. tuberculosis* strains. This technique is highly discriminatory, but it requires large amounts of purified DNA, and the results are usually retrospective (Moström et al. 2002; Gori et al. 2005). Spoligotyping is a PCR-based technique, which exploits the variability of the direct repeat region, developed to simultaneously detect and type *M. tuberculosis* (Kamerbeek et al. 1997). Strain discrimination is lower than that of IS6110-RFLP, but the possibility of applying it directly to clinical samples represents a significant advantage when rapid results are required, allowing the tracking of mycobacterial strains within a clinically useful time frame (Goyal et al. 1997; Hayward and Watson 1998).

The aim of this study was to assess the accuracy and utility of spoligotyping applied directly to clinical samples of patients suspected of having TB in a prospective study, and to characterize the spoligopatterns obtained according to the SITVIT world database.

Hospital Sanatório Partenon is a public hospital for the treatment of TB in the RS State. It is situated in Porto Alegre and assists patients from the east area of the city, which comprises ~25% of the total population. Patients suspected of having TB were recruited at the outpatient department of Hospital Sanatório Partenon from 1 August 2005 to 30 April 2007. They were enrolled in the study after signing an informed consent, answering a questionnaire, and providing a sputum sample. This project was approved by the Research Ethics Committee from the School of Public Health of Rio Grande do Sul State (protocol No. 161/05) and the Research Ethics Committee from the State Foundation for Production and Research in Health of Rio Grande do Sul State (protocol No. 27/2006).

The clinical samples were microscopically analysed after Ziehl–Neelsen staining (Brasil 2008) and cultured in Ogawa solid media (Kudoh and Kudoh 1974). Acid-fast bacilli (AFB) smears and culture results were graded according to the Brazilian Manual for Bacteriology of Tuberculosis (Brasil 2008). A 500 µL aliquot of clinical specimens was liquefied and decontaminated with a solution of 0.5% *N*-acetyl-L-cysteine and 2% NaOH (Brasil 2008). DNA was extracted and purified from the sputum samples using a silica

resin (Marligen Biosciences, Inc., Ijamsville, Maryland) (Rossetti et al. 1997), and DNA from culture was extracted by the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (van Embden et al. 1993).

Spoligotyping was performed using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Isogen Biosciences B.V., The Netherlands) (Kamerbeek et al. 1997). A 10 µL aliquot of DNA extracted from sputum and ~100 ng of DNA extracted from culture were used for amplification of the direct repeat region. For the amplification of DNA extracted from clinical samples, the number of PCR cycles was increased from 20 to 40, and 35 µL of the PCR product was applied to the membrane.

The spoligopatterns obtained were entered in a binary format as Excel spreadsheets (Microsoft, Redmond, Washington), compared with patterns in the SITVIT database (available from <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:0881/SITVITDemo/>) to identify the shared international types (SITs), and families were identified according to the SpolDB4 (Brudey et al. 2006). Statistical analyses were done using EpiInfo, version 6.04d (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia). Fisher's exact test and χ^2 test were used, and a *p* value of <0.05 was considered significant.

A total of 204 sputum samples were analysed in this study, from which 60 belonged to patients with a negative diagnosis for TB and 144 from patients with a positive diagnosis of TB. Seven patients with a clinical diagnosis of TB presented AFB smear and culture negative and a truncated spoligotyping hybridization pattern. They were excluded from further analyses because they were not expected to produce a readable spoligopattern because of the very low bacillary load. Among the 60 negative samples, one showed evidence of contamination by the hybridization of some spacers with low and uneven signal, resulting in an unreadable pattern, and 17 (28.3%) presented spots in the spoligotyping analysis, which means 1–3 hybridizing spacers. Those spacers did not hybridize in the same position in other negative samples from the same extraction. From 137 samples of patients with a positive diagnosis for TB and culture positive, 116 (84.7%) yielded a complete spoligotyping pattern, and they matched the pattern obtained from culture of those samples. Six samples (4.4%) presented a pattern with only 1 hybridizing spacer of difference, from which 4 were still classified as belonging to the same family (SpolDB4) as the culture pattern. Incomplete patterns (3 or more spacers missing) were presented by 15 (10.9%) sam-

ples. In the general evaluation, the results agreed for 175 (88.8%) samples. Among the samples that presented <20 colonies in culture, 6 were AFB-smear negative and 2 yielded a complete spoligopattern matching the culture. The results according to culture grading are shown in Table 1. The accuracy of spoligotyping applied to sputum samples with high bacillary load did not differ: 1+ (76.9%), 2+ (85.7%), and 3+ (89.9%) (1+ vs. 2+, $p = 0.37$; 1+ vs. 3+, $p = 0.18$; and 2+ vs. 3+, $p = 0.36$). The accuracy of high bacillary load samples (87.4%) was higher than that of those with a low bacillary load (<20 colonies), which was 50% ($p < 0.01$).

Of the 137 positive samples, 135 isolates were considered for family classification because 1 patient had 3 samples analysed (all presenting the same pattern); thus, 2 were excluded from comparison with the world database. A total of 44 different spoligotypes were identified; 112 isolates (83%) were included in 21 shared patterns and 23 (17%) were unique patterns. The Latin American and Mediterranean (LAM) family was the most frequent family found in the study: 50 (37%) strains presented this pattern, from which 14 (28%) were LAM2, 13 (26%) were LAM9, 12 (24%) were LAM1, 5 (10%) were LAM3, and 6 (12%) presented other LAM types. The T family was represented by 37 strains (27.4%): 18 (48.7%) were T1, 14 (37.8%) were T1 (T4-CE1-ancestor), and 5 (13.5%) presented other T types. The Haarlem family comprised 15 (11.1%) strains, of which 8 (53.3%) were H3, 5 (33.3%) were H1, and 2 (13.4%) presented other Haarlem types. Families U, S, and X comprised 12 (8.9%), 8 (6%), and 3 (2.2%) strains, respectively. In addition, 10 (7.4%) strains presented with 7 different unknown patterns, which means that they did not match any SIT in the SITVIT database. Table 2 shows the frequency of each SIT found in the study and their spoligopattern and subfamily.

Spoligotyping has been successfully applied to paraffin-wax-embedded tissues, fresh sputum samples, decayed lung tissues, mummies, freshly prepared slides, and archival Ziehl-Neelsen stained sputum smears (van der Zanden et al. 1998; Goyal et al. 1999; Qian et al. 1999; Zink et al. 2003; Gori et al. 2005; Suresh et al. 2007). The accuracy reported for fresh sputum samples was 90.9%, and it does not differ statistically from our findings, which were 88.8% of agreeing results ($p = 0.51$) (Goyal et al. 1999). In addition, we designed a prospective study, without selecting samples according to their AFB-smear grading.

In paucibacillary samples, the sensitivity of the technique was lower (50%); 60% were AFB-smear negative, and many samples resulted in incomplete patterns, which might be due to single copies of fragments of the partial direct repeat region or amounts of DNA too close to the PCR detection limit (Kamerbeek et al. 1997; Goyal et al. 1997; van der Zanden et al. 1998, 2003; Suresh et al. 2007). Although smear-negative patients can also be contagious (Behr et al. 1999; Tostmann et al. 2008), AFB smear-positive patients are the main targets for outbreak investigation, transmission dynamics, and other epidemiological studies because they are the most relevant sources of infection (WHO 1991; ATS 2000).

In 28.3% of negative samples, we observed few (1–3) spacers hybridizing and another negative sample presented

a more extensive hybridization with a low and uneven signal. It did not characterize cross-contamination once the spots and the more extensive hybridization did not appear in negative samples from the same extraction or negative control. Furthermore, it did not affect the positive samples, as confirmed by the genotyping of cultured samples.

This study was carried out in a single health center in Porto Alegre, and we observed that the spoligopatterns family distribution was similar to that reported for South America in general (Brudey et al. 2006), except that we did not find any of the Beijing or East-African-Indian genotypes. SITs 53 and 65, belonging to the T family, were the most frequent types (21.5% of all isolates). Both are ubiquitous, and SIT53 is the second most frequent type in SpolDb4 and the most frequent in 2 other cities from the RS State (Borsuk et al. 2005); however, SIT65 is not among the 50 most frequent types in the database (Brudey et al. 2006). In Portugal, LAM1 is the subfamily most frequently found (David et al. 2007), followed by LAM9, which is the most frequent in Brazil (Brudey et al. 2006). In our study, LAM2 was the most frequent (28%), followed by LAM9 (26%) and LAM1 (24%). This might reflect the effects of different colonization and (or) migratory flow in southern Brazil.

Strain typing itself does not provide direct information about drug susceptibility, but a register of patterns from known multidrug-resistant isolates may be particularly useful in providing early warning of possible infection with these strains (Goyal et al. 1997). Spoligotyping is known to be less discriminatory than IS6110-RFLP and other fingerprinting systems (Kremer et al. 2005). Although groups of isolates sharing the same SIT may represent chains of recent transmission, they may also represent broad genetic similarities in isolates sharing a distant common ancestor. Meanwhile, isolates with different spoligotyping patterns can be confidently assumed to represent distinct genotypes (although 1 spacer of difference may be a result of technical difficulties) (Hayward and Watson 1998). Spoligotyping alone has been applied mainly to help in discarding epidemiological links rather than in confirming them. However, because of its rapidity, it is useful for screening a large number of isolates, and can be associated to a secondary PCR-based typing technique, such as the recently standardized MIRU-VNTR (Kremer et al. 2005; Supply et al. 2006).

In conclusion, we successfully applied spoligotyping to DNA extracted directly from fresh sputum samples of patients suspected of having TB, thus demonstrating the utility of this strategy to shorten the time to obtain information about strain identities. This information can be used together with clinical and epidemiological information to allow better follow-up of patients, planning of appropriate management of TB cases, and in making an intervention during the course of disease if needed.

Acknowledgements

P.I.C. and L.G.P. were supported by fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors would like to thank the staff from Hospital Sanatório Partenon for helping during patient recruitment, especially Dr. C.A.A. Espina,

and the staff from the Laboratory of Bacteriology of Tuberculosis from IPB/LACEN-FEPPS for helping with processing the samples and culture management, especially Mrs. G.A. Dias. Special thanks are due to Dr. A. Schrank and Dr. L.F. Baethgen for critical review of the manuscript. This work was supported by CNPq (grant No. 410528/2006-4) and FEPPS.

References

- ATS. 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**(4 Pt 1): 1376–1395. PMID:10764337.
- Behr, M.A., Warren, S.A., Salamon, H., Hopewell, P.C., Ponce de Leon, A., Daley, C.L., and Small, P.M. 1999. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*, **353**(9151): 444–449. doi:10.1016/S0140-6736(98)03406-0. PMID:9989714.
- Borsuk, S., Dellagostin, M.M., Madeira, S. de G., Lima, C., Boffo, M., Mattos, I., et al. 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. *Microbes Infect.* **7**(13): 1338–1344. doi:10.1016/j.micinf.2005.05.009. PMID:16039895.
- Brasil. 2008. National Manual for the Laboratory Surveillance of Tuberculosis and other Mycobacteria. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica- Brasília: Ministério da saúde. Available from http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1133.
- Broekmans, J.F. 1994. Control strategies and programme management. In *Tuberculosis. Back to the future.* Edited by J.D.H. Porter and P.W.J. McAdam. John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 171–192.
- Brudey, K., Driscoll, J.R., Rigouts, L., Prodinger, W.M., Gori, A., Al-Hajj, S.A., et al. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* **6**(1): 23. doi:10.1186/1471-2180-6-23. PMID:16519816.
- CEVS-RS. 2007. Boletim Epidemiológico. Vol 9, No.5, dez 2007. Available from <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=organograma&cod=4486>.
- David, S., Ribeiro, D.R., Antunes, A., Portugal, C., Sancho, L., and de Sousa, J.G. 2007. Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Infect. Genet. Evol.* **7**(5): 609–617. doi:10.1016/j.meegid.2007.05.007. PMID:17625987.
- Gori, A., Bandera, A., Marchetti, G., Degli Esposti, A., Catozzi, L., Nardi, G.P., et al. 2005. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Infect. Dis.* **11**(8): 1242–1248. PMID:16102314.
- Goyal, M., Shaw, R.J., Banerjee, D.K., Coker, R.J., Robertson, B.D., and Young, D.B. 1997. Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* **10**(5): 1120–1124. doi:10.1183/09031936.97.10051120. PMID:9163656.
- Goyal, M., Lawn, S., Afful, B., Acheampong, J.W., Griffin, G., and Shaw, R. 1999. Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. *J. Infect.* **38**(3): 171–175. doi:10.1016/S0163-4453(99)90246-3. PMID:10424797.
- Hayward, A.C., and Watson, J.M. 1998. Typing of mycobacteria using spoligotyping. *Thorax*, **53**(5): 329–330. PMID:9708218.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., et al. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**(4): 907–914. PMID:9157152.
- Kremer, K., Arnold, C., Cataldi, A., Gutiérrez, M.C., Haas, W.H., Panaiotov, S., et al. 2005. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J. Clin. Microbiol.* **43**(11): 5628–5638. doi:10.1128/JCM.43.11.5628-5638.2005. PMID:16272496.
- Kudoh, S., and Kudoh, T.A. 1974. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull. World Health Organ.* **51**(1): 71–82. PMID:4218139.
- Mathema, B., Kurepina, N.E., Bifani, P.J., and Kreiswirth, B.N. 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**(4): 658–685. doi:10.1128/CMR.00061-05. PMID:17041139.
- Moström, P., Gordon, M., Sola, C., Ridell, M., and Rastogi, N. 2002. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**(11): 694–704. doi:10.1046/j.1469-0691.2002.00460.x. PMID:12445006.
- Qian, L., Van Embden, J.D., Van Der Zanden, A.G., Weltevreden, E.F., Duanmu, H., and Douglas, J.T. 1999. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. *J. Clin. Microbiol.* **37**(2): 471–474. PMID:9889247.
- Rossetti, M.L.R., Jardim, S.B., Rodrigues, V.F.S., Moura, A.R., Oliveira, H., and Zaha, A. 1997. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J. Microbiol. Methods*, **28**: 139–146. doi:10.1016/S0167-7012(97)00978-0.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsich-Gerdes, S., Willery, E., et al. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**(12): 4498–4510. doi:10.1128/JCM.01392-06. PMID:17005759.
- Suresh, N., Arora, J., Pant, H., Rana, T., and Singh, U.B. 2007. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Archival Ziehl–Neelsen-stained sputum smears. *J. Microbiol. Methods*, **68**(2): 291–295. doi:10.1016/j.mimet.2006.09.001. PMID:17070946.
- Tostmann, A., Kik, S.V., Kalisvaart, N.A., Sebek, M.M., Verver, S., Boeree, M.J., and van Soolingen, D. 2008. Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands. *Clin. Infect. Dis.* **47**(9): 1135–1142. doi:10.1086/591974. PMID:18823268.
- van der Zanden, A.G.M., Hoentjen, A.H., Heilmann, F.G.C., Weltevreden, E.F., Schouls, L.M., and van Embden, J.D.A. 1998. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Mol. Pathol.* **51**(4): 209–214. doi:10.1136/mp.51.4.209. PMID:9893747.
- van der Zanden, A.G., Te Koppele-Vije, E.M., Vijaya Bhanu, N., Van Soolingen, D., and Schouls, L.M. 2003. Use of DNA extracts from Ziehl–Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **41**(3): 1101–1108. doi:10.1128/JCM.41.3.1101-1108.2003. PMID:12624036.
- van Embden, J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., et al. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* **31**(2): 406–409. PMID:8381814.

- WHO. 1991. Tuberculosis surveillance and monitoring. Report of a WHO Workshop. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available from <http://www.who.int/tb/publications/1991/en/index.html>.
- WHO. 2008. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008. WHO/HTM/TB/2008.393.
- Zink, A.R., Sola, C., Reischl, U., Grabner, W., Rastogi, N., Wolf, H., and Nerlich, A.G. 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* **41**(1): 359–367. doi:10.1128/JCM.41.1.359-367.2003. PMID:12517873.

4.2.1. Análise dos perfis de spoligotyping e geolocalização

Dos 142 pacientes diagnosticados com TB, 135 tiveram os isolados de *M. tuberculosis* genotipados por spoligotyping, pois 7 deles apresentaram resultado negativo pela cultura e padrões incompletos na análise da amostra clínica. A figura 2 apresenta a distribuição das famílias e subfamílias dos perfis de acordo com o SpolDB4.

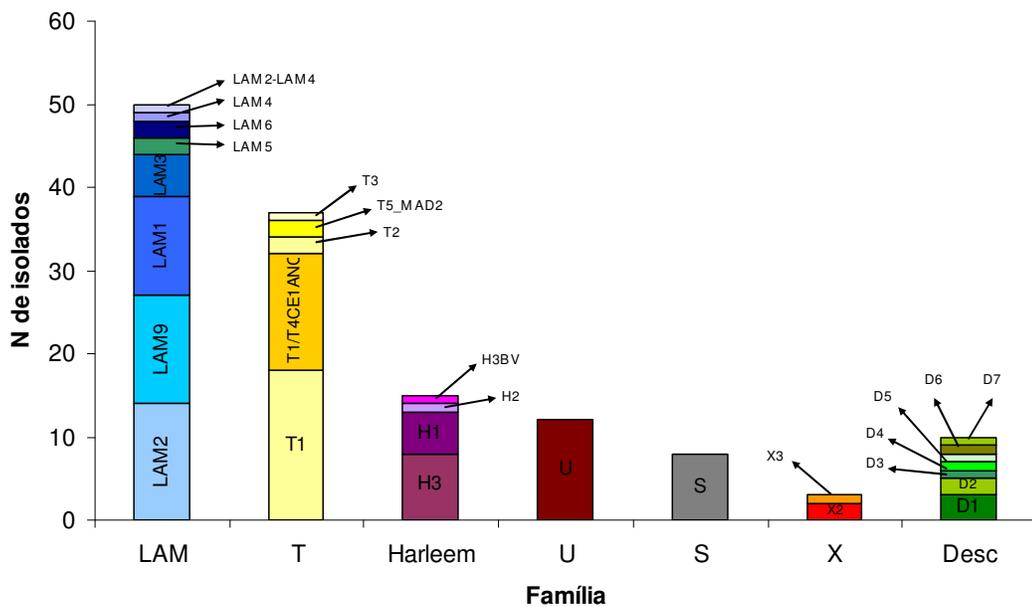


Figura 2: Frequência de cada família e subfamílias de spoligotyping.

Devido ao pequeno número de pacientes agrupados em cada padrão de spoligotyping, a tabela 11 apresenta de forma descritiva as principais características dos pacientes incluídos nos 9 SITs mais frequentes (5 ou mais pacientes). Estes incluem 62,2% dos pacientes estudados.

Tabela 11: Características dos SITs mais frequentes no estudo.

	SIT 53 (n=15)	SIT 65 (n=14)	SIT 17 (N=14)	SIT 729 (N=11)	SIT 42 (N=8)	SIT 863 (N=6)	SIT 401 (N=6)	SIT 50 (N=5)	SIT 33 (N=5)
Masculino	13 (86,7%)	8 (57,2%)	8 (57,2%)	9 (81,8%)	6 (75%)	6 (100%)	4 (66,7%)	5 (100%)	4 (80%)
Idade	37,47 ± 14,49	36,50 ± 14,71	34,79 ± 11,67	34,18 ± 12,13	43,75 ± 11,44	27,50 ± 7,66	39,83 ± 12,62	36,40 ± 10,80	41,20 ± 9,17
Histórico de encarceramento	4 (26,7%)	1 (7,1%)	3 (21,4%)	8 (72,7%)	3 (37,5%)	6 (100%)	0	1 (20%)	0
Usuário de Drogas	4 (26,7%)	5 (35,7%)	6 (42,9%)	6 (54,5%)	2 (25%)	6 (100%)	2 (33,3%)	1 (20%)	0
HIV +	1 (6,7%)	1 (7,7%)	3 (21,4%)	1 (9%)	2 (25%)	1 (16,7%)	3 (50%)	0	1 (20%)
Alcoolismo	0	5 (35,7%)	5 (35,7%)	0	22 (25%)	3 (50%)	3 (50%)	1 (20%)	2 (40%)

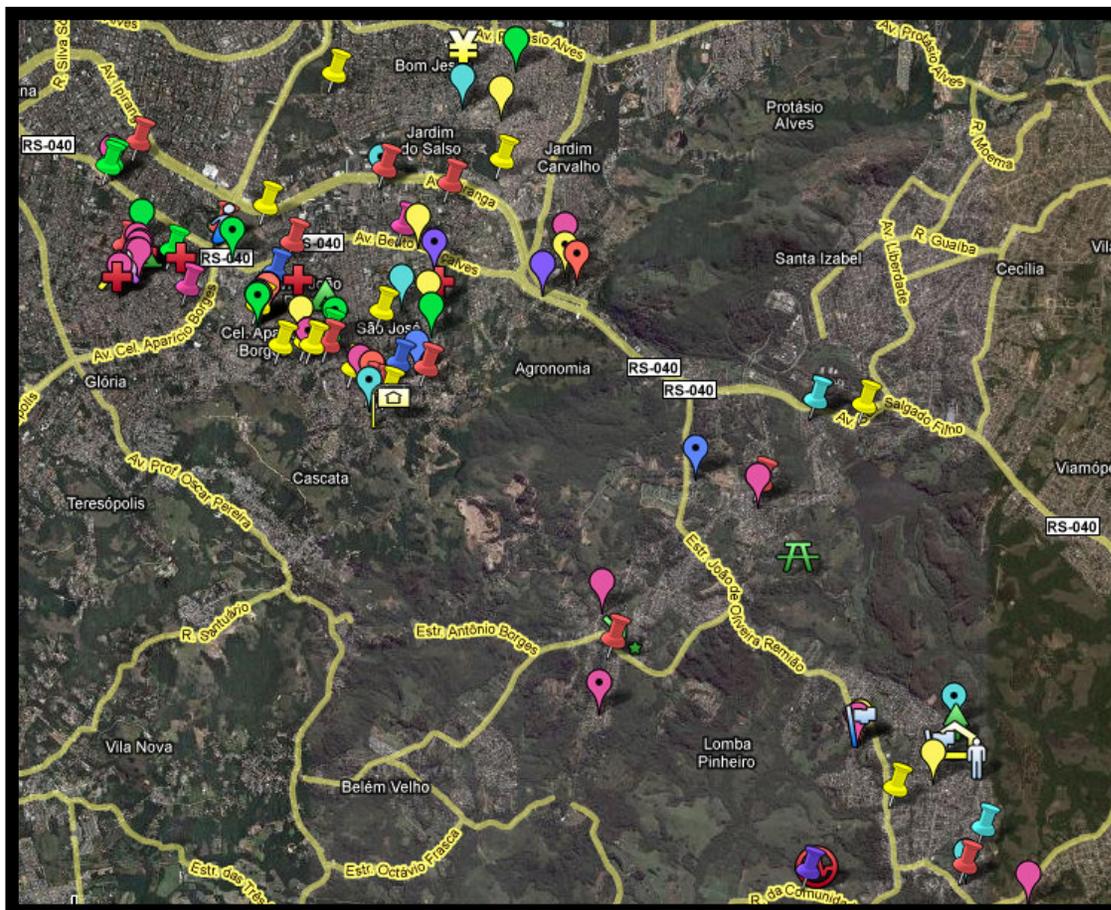
Dos 135 isolados de *M. tuberculosis* de pacientes genotipados por *spoligotyping*, 101 estão apresentados na figura 3. Não foi possível localizar o endereço de residência fornecido por 15 pacientes e 19 eram apenas de instituições situadas no município de Charqueadas.

O SIT 863 foi encontrado exclusivamente em pacientes com histórico de encarceramento e todos eles eram usuários de drogas. Entre os pacientes infectados com *M. tuberculosis* SIT 729, 72,7% também tinham histórico de encarceramento e 54,5% eram usuários de drogas.

Houve uma grande diversidade de perfis genéticos, 35 spoligotipos diferentes foram localizados na região da GD7. No albergue Pio Buck, entre os cinco pacientes, observa-se quatro SITs diferentes, na Casa Albergue feminino, de cada uma das três pacientes foi isolado um bacilo com genótipo diferente e no Instituto Penal Miguel Dario, entre três pacientes foram observados dois SITs.

Entretanto, no bairro Partenon foram localizados cinco pacientes infectados com *M. tuberculosis* SIT 17 com menos de 500 metros de distância entre suas residências (figura 4). Não foi encontrada outra característica comum a estes pacientes, somente a proximidade de suas residências. Em relação aos 6 pacientes infectados com *M. tuberculosis* SIT 401, cabe salientar que 3 deles tinham relação epidemiológica confirmada, moravam na mesma casa, uma mulher de 42 anos, HIV+, o irmão desta, um homem de 36 anos também portador de HIV e a esposa deste, mulher de 42 anos HIV-. Outros dois pacientes residiam a menos de 800 metros deste grupo.

Os SITs 53 e 65, que foram os mais frequentes no estudo, estavam distribuídos em todos os bairros analisados.



Legenda:

45	47	194	99	137
60	65	U7	75	401
177	729	863	1664	U5
1241	58	33	50	U4
42	53	1253	U6	U3
U1	106	487	2	388
17	U2	64	827	396

Figura 3: Mapa com a localização por endereço de residência dos pacientes de acordo com o spoligotipo (SIT) do isolado de *M. tuberculosis*.

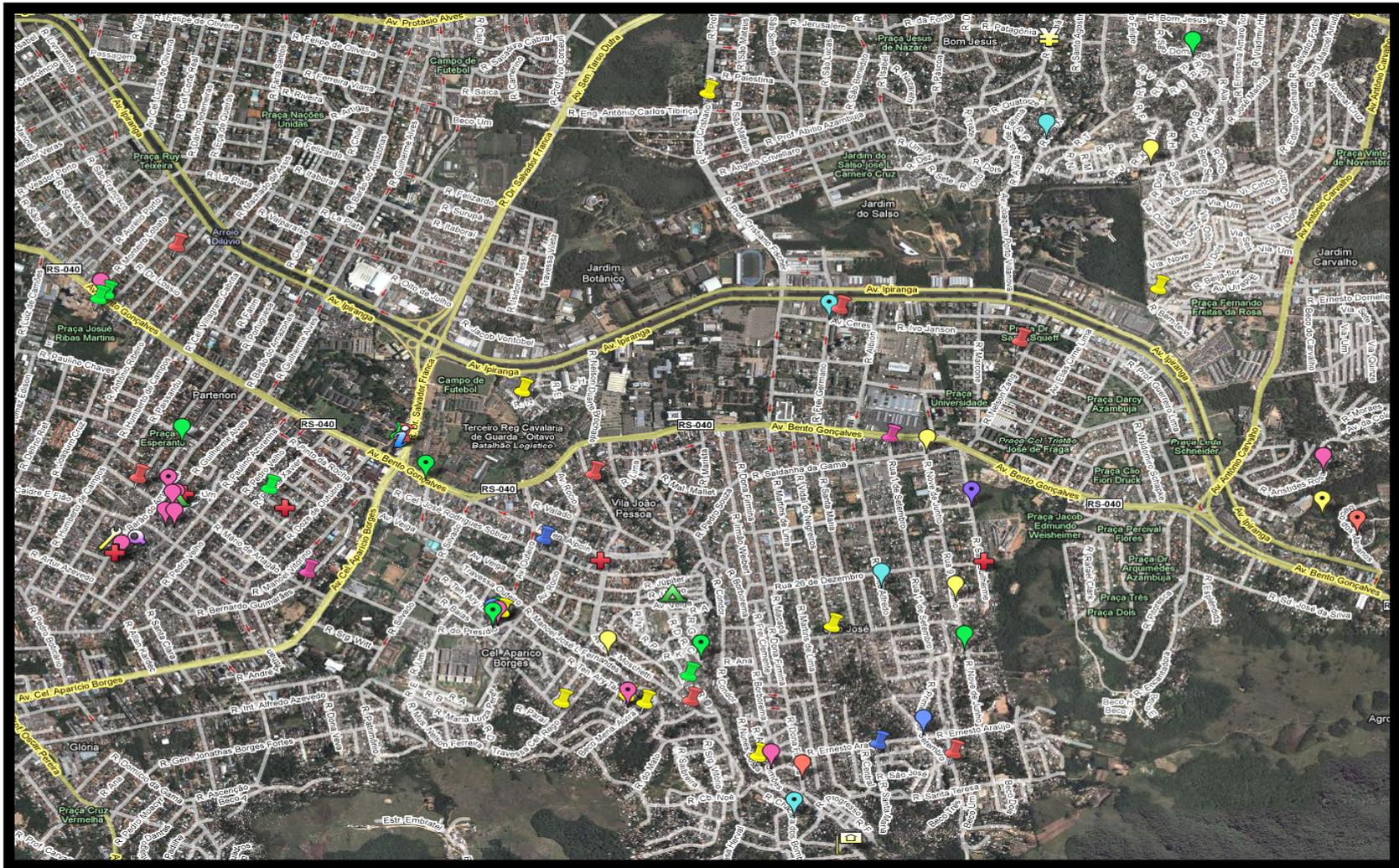


Figura 4: Mapa com maior aproximação nos Bairros Partenon, Coronel Aparício Borges, São José, Jardim Botânico, Jardim Carvalho e Bom Jesus em relação ao mapa da figura 3.

PARTE III

5. DISCUSSÃO

5.1. Características dos pacientes

As características sexo, estado civil, escolaridade, alcoolismo, tabagismo, tempo de sintomas e episódio prévio de TB não diferiram entre os indivíduos com e sem a doença.

No presente estudo foi observado que quase 70% dos pacientes eram do sexo masculino. Proporção semelhante tem sido relatada em diversos estudos realizados em pacientes com TB no RS (Aerts & Jobim; 2004; Borsuk *et al.*, 2005; Valim *et al.*, 2006; Piccon *et al.*, 2007; Possuelo *et al.*, 2008), no Brasil (Dalcolmo *et al.*, 1999; Ferrazoli *et al.*, 2000; Tindó *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2008) e em diferentes países (Gutiérrez *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2000; Diel *et al.*, 2002; Easterbrook *et al.*, 2004). Em alguns casos esta diferença pode estar relacionada com questões culturais onde as mulheres tenham menos acesso a serviços de saúde, mas este padrão abrangente também é um sinal das diferenças epidemiológicas reais entre os sexos, tanto em exposição à infecção quanto na suscetibilidade ao desenvolvimento da doença (Dye, 2006). Em um estudo realizado no município de Bagé (RS), apesar de 70% dos pacientes com TB serem homens, foi observado que as mulheres procuraram atendimento com maior frequência, sugerindo que no RS as questões culturais não expliquem esta diferença (Silveira *et al.*, 2007).

Em relação à escolaridade, apenas 1,4% dos pacientes com TB eram analfabetos, mas 50% tinham até 5 anos de estudo. Estes números diferem bastante de um estudo realizado em um município do estado do Piauí e outro em Bagé (RS), onde 68,5% e 16%

dos pacientes eram analfabetos, respectivamente (Mascarenhas *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2007). Mesmo assim a escolaridade dos pacientes, de um modo geral, é baixa.

A frequência de alcoolismo não diferiu entres os grupos com e sem TB, mas foi observado que esta condição estava significativamente associada ao abandono do tratamento (Pablos-Méndez *et al.*, 1997). Em um estudo realizado em um hospital de Belo Horizonte, 57,1% dos pacientes que reportaram episódio prévio de TB havia abandonado o tratamento, sendo que 53,8% da população estudada era alcoolista (Lima *et al.*, 2008). Picon *et al.* (2007b) relataram que o alcoolismo está associado significativamente com o uso ierregular da medicação, mas não encontraram associação entre alcoolismo e recidiva da doença, que é uma possível consequência do abandono do tratamento. Entretanto isto pode ter ocorrido devido ao pequeno número de episódios de recidiva estudados, que foram 26 em uma população de 610 pacientes.

Em Porto Alegre, segundo o Ministério da Saúde, 24% da população é tabagista (INCA/MS, 2004). Neste estudo 61,3% do total de indivíduos eram tabagistas, mas não houve diferença na proporção de tabagistas entre os pacientes com e sem TB. Naquele relatório o tabagismo estava associado à baixa escolaridade (INCA/MS, 2004).

O tempo de sintomas foi semelhante entre os grupos com e sem TB, em média 11 semanas e semelhante àquele relatado por Picon *et al.* (2007b) que foi em torno de 90 dias. Estes dados ressaltam a demora dos pacientes em procurar atendimento após o estabelecimento dos sintomas, retardando o diagnóstico e início do tratamento. A maior parte da transmissão ocorre entre o aparecimento da tosse e o início do tratamento, portanto o entendimento e identificação de fatores que levam a este retardo no diagnóstico e tratamento tem sido alvo de muitos estudos (Storla *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Scatena *et al.*, 2009). Os sintomas da TB, principalmente tosse crônica e escarro são bastante

prevalentes na maioria das sociedades e este pode ser um fator que influencie na procura de serviços de saúde especializados, pois TB não é a suspeita inicial (Sanchez *et al.*, 2005; Storla *et al.*, 2008).

A média de idade dos pacientes com TB foi menor do que entre os indivíduos sem a doença, o que está de acordo com a observação que a TB é uma doença que acomete principalmente pessoas jovens, que estão na plenitude da sua capacidade produtiva, geralmente entre 15 e 59 anos de idade (Snider *et al.*, 1994; Aerts & Jobim, 2004; Tindó *et al.*, 2004). Foi observado que 83% dos pacientes com TB tinham entre 18 e 47 anos de idade, semelhante ao reportado por Costa *et al.* (1998) em estudo realizado em Pelotas, onde quase 80% dos pacientes tinham até 49 anos de idade. Rosso (2008) avaliando TB pleural também observou que os pacientes com outro diagnóstico (não TB) tinham uma média de idade mais alta. Estes dados sugerem que os pacientes idosos tenham com mais frequência outros agravos respiratórios com sintomas semelhantes ao da TB.

A população do RS é predominantemente branca, mais de 80% (IBGE, 2000). Pouco mais da metade dos indivíduos incluídos no estudo (56%) eram brancos, indicando que a distribuição de cor na população de estudo é diferente da população em geral. Foi observado que entre os pacientes com TB o número de pacientes brancos e não-brancos foi semelhante e entre os indivíduos sem TB havia uma proporção significativamente menor (25,9%) de indivíduos não brancos. Quando comparamos as características dos grupos, observamos que não houve diferença na idade, desemprego, renda familiar, alcoolismo, uso de drogas ou histórico de encarceramento entre brancos e não-brancos. Porém a média de escolaridade foi menor entre os não brancos e a co-infecção com HIV (28,8 vs. 13%) e HCV (29,5 vs. 7,5%) foi mais alta neste grupo, como já relatado anteriormente (El-Serag *et al.*, 2003; Serpa *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que há diferenças tanto em exposição à

infecção, que neste caso podem estar relacionadas com fatores sócio-culturais, quanto na suscetibilidade genética ao desenvolvimento da TB e outras doenças infecciosas (Ma *et al.*, 2007).

A TB é uma doença que está associada a populações que sofrem com privações sócio-econômicas (Mendes *et al.*, 2007; Pelaquin *et al.*, 2007; French *et al.*, 2009) e esta é a realidade de boa parte dos pacientes atendidos no HSP. A renda familiar de 49% dos indivíduos era de 1 a 3 salários mínimos e entre os pacientes com TB havia uma proporção maior de indivíduos desempregados e sem renda. Esta observação levanta a questão se os pacientes estavam desempregados quando desenvolveram TB ou se ficaram desempregados em função da doença, uma vez que uma grande parte destes pacientes (51,3%) trabalha informalmente. Em estudo realizado em Bagé, foi relatado que 24% dos pacientes tinham empregos informais (Silveira *et al.*, 2007).

Histórico de encarceramento foi mais frequente entre os pacientes com TB. Pode haver um viés neste dado, pois o número de pacientes encarcerados sem TB foi muito baixo. A procura por atendimento para este grupo não ocorre da mesma forma que para a população em geral, isto é, estes pacientes dependem de vários fatores para receber atendimento e possivelmente somente aqueles com suspeita muito forte de TB cheguem à unidade de saúde. Entretanto, os apenados são reconhecidamente um grupo de vulnerabilidade bastante importante devido às características dessa população e a incidência de TB é muitas vezes maior do que na população em geral (Larouzé *et al.*, 2008). Além dos apenados, em sua maioria, serem provenientes de grupos com alto risco para a doença, as condições das prisões como superlotação, ventilação inadequada, condições sanitárias adversas, entre outras, favorecem tanto a reativação de uma infecção latente quanto o

desenvolvimento da TB por transmissão recente (Oliveira & Cardoso, 2004; Fournet *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2005; Legrand *et al.*, 2008).

O uso de drogas é outro obstáculo importante para os PCTs, pois os pacientes muitas vezes têm outros fatores de risco associados como pobreza, desemprego, falta de moradia, encarceramento, infecção por HIV, desnutrição e altas taxas de abandono do tratamento (Pablos-Méndez *et al.*, 1997; Figueroa-Munoz & Ramon-Pardo, 2008). Geralmente os estudos focam os usuários de drogas injetáveis, mas na população atendida no HSP, uma droga bastante devastadora está em expansão, o crack. Neste estudo, uso de drogas foi significativamente mais frequente entre os pacientes com TB, mas não estava associado ao abandono do tratamento. Isto pode ter ocorrido porque quase 50% dos pacientes reportaram uso apenas de maconha. Além disso o número de pacientes que abandonou o tratamento (16) é muito pequeno para que se possa estratificar por tipo de droga. Uma estratégia sugerida é que os PCTs forneçam apoio psicossocial aos grupos com dificuldades de adesão ao tratamento da TB (Figueroa-Munoz & Ramon-Pardo, 2008).

Através do cálculo do IMC foi observado que entre os pacientes com TB, havia uma proporção maior de indivíduos desnutridos. Desnutrição é um fator de risco para desenvolvimento da doença (Lönnroth *et al.*, 2009), mas neste estudo não foi possível avaliar se os pacientes estavam desnutridos quando desenvolveram a doença ou se o o IMC abaixo de 18,5 na época do diagnóstico era decorrente da TB, pois emagrecimento é um dos sintomas da doença.

Ter tido contato com TB foi mais frequente entre os pacientes com a doença, mas 35,5% deles não reportaram contato, sugerindo que a transmissão pode ter ocorrido em contatos casuais. Entre os pacientes sem a doença, 50% havia tido contato com um paciente com TB, evidenciando a alta prevalência da doença na região de estudo (SMS/POA, 2008).

Nestes foi significativamente mais frequente o contato com um familiar, enquanto nos pacientes com TB ocorreu com mais frequência contato em prisões e intradomiciliar, onde há uma exposição prolongada ao agente infeccioso (Lönroth *et al.*, 2009).

O diagnóstico da TB em pacientes HIV positivos é mais difícil devido à maior frequência de BK negativo ou com baixas cargas bacilares. Estes pacientes têm uma maior frequência de efeitos adversos aos fármacos e problemas de adesão ao tratamento (Aerts & Jobim, 2004; Cohen, 2007; Idemyor, 2007; de Carvalho *et al.*, 2008; Possuelo *et al.*, 2008). No presente estudo, 21,1% dos pacientes com TB tinham sorologia positiva para HIV. Em estudo realizado em Belo Horizonte a co-infecção reportada foi de 12,5% (Lima *et al.*, 2008). Segundo a SES/RS, em torno de 26% dos pacientes com TB em Porto Alegre estão co-infectados por HIV (SES/RS, 2007). Porto Alegre está entre os cinco maiores coeficientes de AIDS do país e a região da GD7 onde está o HSP apresenta a incidência mais alta de Porto Alegre (Aerts & Jobim, 2004; SMS/POA, 2008). Entretanto, não houve associação entre HIV e abandono do tratamento neste estudo ($P=1$).

A co-infecção com HCV foi de 18,1% (dos pacientes testados). Foi observado que os pacientes com HIV eram predominantemente jovens, com idades entre 26 e 47 anos, enquanto entre os pacientes com HCV, 26% tinham entre 48 e 60 anos de idade.

A interação deletéria entre TB e co-morbididades como HIV e HCV ressalta a importância de integração dos programas para tratar conjuntamente estas doenças infecciosas (Aerts & Jobim, 2004).

5.2. Aplicação de *spoligotyping* em amostras clínicas

A técnica de *spoligotyping* mostrou-se útil quando aplicada a tecidos preservados em parafina, amostras de escarro, tecidos pulmonares deteriorados, múmias, lâminas de esfregaços recentes e lâminas antigas coradas com ZN (van der Zanden *et al.* 1998; Goyal *et al.* 1999; Qian *et al.* 1999; Zink *et al.* 2003; Gori *et al.* 2005; Suresh *et al.* 2007).

Em um estudo realizado em Gana, 175 amostras de escarro foram extraídas pelo método de fenol/clorofórmio (Van Soolingen *et al.*, 1991) e analisadas por *spoligotyping*. Padrões completos foram obtidos em 159 (90,9%) amostras (Goyal *et al.*, 1999). A acurácia relatada para amostras de escarro foi de 90,9% e não diferiu estatisticamente dos resultados deste estudo, que foram 88,8% de resultados concordantes ($P=0.51$) (Goyal *et al.* 1999). Além disso, o presente estudo foi prospectivo e as amostras não foram selecionadas de acordo com os resultados de baciloscopia, visando a aproximar-se das condições de rotina.

De um modo geral o rendimento foi proporcional à carga bacilar das amostras, assim como relatado anteriormente (Suresh *et al.* 2007). Não houve diferença significativa entre as amostras com alta carga bacilar com diferentes positivities. Nas amostras paucibacilares, a sensibilidade da técnica foi mais baixa (50%). De quatro amostras que apresentaram BK positivo, três apresentaram padrão completo de *spoligotyping*, e de seis que apresentaram BK negativo, duas resultaram em um padrão completo de *spoligotyping*. Isto pode ser devido a cópias únicas de fragmentos da região DR parciais ou quantidades de DNA próximas ao limite de detecção da PCR (Kamerbeek *et al.* 1997; Goyal *et al.* 1997; van der Zanden *et al.* 1998; van der Zanden *et al.* 2003; Suresh *et al.* 2007). Van der Zanden *et al.* (2003) descreveram resultados semelhantes em um estudo utilizando DNA extraído de lâminas coradas por ZN, de cinco amostras com cultura positiva e baciloscopia

negativa, três resultaram em padrões completos de *spoligotyping*, e uma amostra com alta carga bacilar resultou em um padrão incompleto. Isto pode ocorrer em função da homogeneização das amostras, quando os bacilos não estão uniformemente distribuídos na mesma.

Pacientes com baciloscopia negativa também podem ser contagiosos. Em estudos que utilizaram o RFLP do IS6110 para avaliar transmissão, foi observado que entre 12 a 17% da transmissão ocorreu a partir de um paciente com BK negativo (Behr *et al.* 1999, Tostmann *et al.* 2008). Entretanto, pacientes com baciloscopia positiva são os alvos principais para investigações de surtos, dinâmica de transmissão e outros estudos epidemiológicos, pois são as fontes de infecção mais relevantes (WHO 1991; ATS 2000).

A preparação das amostras clínicas, extração e purificação do DNA, é uma etapa importante na otimização dos procedimentos a partir de amostras clínicas para obtenção de DNA em quantidade suficiente para análise e com maior grau de pureza. Neste trabalho a metodologia utilizada foi descrita por Rossetti *et al.* (1997). Estratégia similar foi seguida por diferentes autores, pois o procedimento de purificação do DNA de *M. tuberculosis* com sílica antes da amplificação por PCR, possibilita uma eficaz remoção dos possíveis inibidores provenientes de sangue, escarro e outros materiais biológicos que possam prejudicar a performance da *Taq* DNA polimerase (Al-Soud & Rädström, 2001; Boddinhaus *et al.*, 2001, Piersimoni *et al.*, 2009). Esta técnica de purificação, quando utilizada para o diagnóstico de TB, possibilitou a detecção de quantidades de DNA referentes a 50 UFCs em amostras de escarro (Rossetti *et al.*, 1997).

As sete amostras com BK e cultura negativa resultaram em padrões truncados, portanto quando a carga bacilar foi muito baixa o *spoligotyping* não foi capaz de gerar padrões completos.

Apesar das precauções tomadas para evitar contaminação, como a realização de cada etapa em salas separadas e utilização de material exclusivo para cada procedimento, em 28,3% das amostras negativas foram observados de um a três espaçadores hibridizados e uma amostra negativa apresentou uma hibridização mais extensiva com um sinal fraco e irregular. Não foi considerada contaminação cruzada uma vez que os *spots* e também a hibridização mais extensiva, não ocorreu em amostras negativas da mesma extração ou no controle negativo. Além disso, o padrão das amostras positivas não foi afetado, o que foi confirmado pela genotipagem do DNA extraído da cultura destas amostras. Entretanto seria interessante aumentar as precauções para evitar carreamento de DNA, como por exemplo, utilizar dUTP e uracil DNA glicosilase (Suresh *et al.*, 2007; van der Zanden *et al.*, 2003).

A utilidade do *spoligotyping* aumenta quando comparada com os dados de outros pacientes com TB e com um banco de perfis de isolados de *M. tuberculosis*. A tipagem de cepas por si só não fornece informações sobre suscetibilidade aos fármacos, mas ter um registro de padrões de cepas reconhecidas como MDR pode ser especialmente útil em fornecer um alerta sobre a possível infecção com tais cepas (Goyal *et al.*, 1997; Gori *et al.*, 2005). A técnica de *spoligotyping*, apesar de estar sendo muito utilizada, tem um poder discriminatório menor do que o RFLP do IS6110 e outros sistemas de genotipagem (Kremer *et al.*, 2005). Grupos de isolados compartilhando o mesmo SIT podem representar cadeias de transmissão recente, mas eles também podem representar similaridades genéticas mais amplas em isolados que compartilham um ancestral comum distante. Ao mesmo tempo, isolados com padrões diferentes de *spoligotyping* podem ser considerados genótipos distintos (apesar de que um espaçador de diferença pode ser resultante de dificuldades técnicas) (Hayward & Watson 1998).

O *spoligo*typing como única técnica de genotipagem tem sido aplicado principalmente para ajudar a descartar ligações epidemiológicas ao invés de confirmá-las. Entretanto, devido a sua rapidez e praticidade, é útil na realização de uma triagem de um número grande de isolados e poderia ser associado a uma técnica secundária de tipagem também baseada na PCR, como por exemplo, a genotipagem por MIRU-VNTR (Kremer *et al.*, 2005; Supply *et al.*, 2006) nas situações que fosse necessário uma maior grau de discriminação.

A técnica de *spoligo*typing pode ser utilizada em uma rotina clínica, como proposto no presente estudo, pois permite a amplificação de DNA diretamente da amostra clínica, com uma boa acurácia. Pode ser utilizada como um método auxiliar na detecção e diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*. As informações geradas podem ser correlacionadas com os dados clínicos do paciente e ser aplicadas em diferentes situações epidemiológicas, como em casos de recidiva da doença (Warren *et al.*, 2002b) ou de contatos de um paciente com TB resistente (Gori *et al.*, 2005). Pela rapidez que estas análises podem ser realizadas, podem auxiliar na decisão dos procedimentos mais adequados durante o curso da doença. Os dados gerados podem ser facilmente armazenados em bancos de dados para consultas posteriores.

5.3. Análise dos SITs e geolocalização

Este estudo foi realizado em um único centro de saúde em Porto Alegre (HSP) e foram identificados 44 padrões diferentes de *spoligo*typing, destes 35 foram geolocalizados, apontando a grande diversidade de genótipos circulantes na GD7. A distribuição das famílias de spoligotipos foi semelhante àquela descrita na América do Sul em geral (Dalla

Costa *et al.*, 2009; Brudey *et al.*, 2006). As três famílias genotípicas principais, LAM, T e Harleem englobaram 75% de todos os isolados analisados. Não foram encontrados isolados com os genótipos Beijing ou EAI e a proporção de isolados pertencentes à família LAM foi um pouco menor, apesar de também ter sido a família mais freqüente (37% dos isolados).

As cepas do genótipo Beijing frequentemente estão associadas com resistência aos fármacos para tratamento da TB e foram encontradas em várias partes do mundo, mas principalmente na Ásia e Europa Oriental (Qian *et al.*, 1999, Glynn *et al.*, 2002, Kremer *et al.*, 2004; Mokrousov, 2008). Nos países da América do Sul este genótipo não é encontrado com muita frequência (Dalla Costa *et al.*, 2009; Ritacco *et al.*, 2008). Ritacco *et al.* (2008) analisaram 1.202 isolados de *M. tuberculosis* da América do Sul, e apenas 19 (1,6%) eram do genótipo Beijing, sendo que 11 (57,9%) foram isolados de pacientes do Peru. Além disso, naquele estudo, não foi encontrada associação entre o genótipo Beijing e resistência aos fármacos (Ritacco *et al.*, 2008). No Brasil, um pequeno número de isolados com o genótipo Beijing foi encontrado em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Dalla Costa *et al.*, 2009; Ritacco *et al.*, 2008; Brudey *et al.*, 2006).

Em Portugal, a subfamília LAM1 é a mais prevalente, seguida por LAM9, que é a mais prevalente no Brasil (David *et al.*, 2007; Brudey *et al.*, 2006). No presente estudo, LAM2 foi a subfamília mais freqüente (28%), seguida por LAM9 (26%) e LAM1 (24%). Isto pode refletir os efeitos de diferenças na colonização ou fluxos migratórios no sul do Brasil. Baethgen *et al.* (2008), em um estudo de doença meningocócica no RS observaram que um dos genótipos mais frequentes no estado não havia sido relatado em outras regiões do Brasil, sugerindo que além de *M. tuberculosis*, outros agentes de doenças infecciosas podem ter características genéticas distintas no RS.

Os SITs 53 e 65, pertencentes à família T, foram os tipos mais frequentes e englobaram 21,5% de todos os isolados analisados. Ambos são ubíquos, o SIT 53 é o segundo mais frequente no SpolDb4 e o mais frequente em outras duas cidades do RS (Pelotas e Rio Grande) (Borsuk *et al.*, 2005). Foi relatado que os isolados do SIT 53, quando analisados por RFLP, apresentam uma grande diversidade de padrões (Borsuk *et al.*, 2005; Stravum *et al.*, 2009), sugerindo estas cepas sejam mais antigas em termos evolutivos e assim tenham tido mais tempo para sua disseminação e evolução, ou que haja um efeito fundador em algumas populações com disseminação subsequente acompanhando os padrões de migração humana (Glynn *et al.*, 2008). Porém o SIT 65 não aparece entre os 50 tipos mais frequentes no banco mundial (Brudey *et al.*, 2006), e foi o sétimo mais freqüente no estudo realizado por Borsuk *et al.* (2005). Esta alta freqüência do SIT 65 em nosso meio pode sugerir que esta seja uma cepa emergente, que esteja sendo transmitida recentemente (Tanaka & Francis, 2006), mas outra técnica de genotipagem está sendo aplicada nestes isolados para confirmar esta hipótese. Através da geolocalização foi observado que os SITs 53 e 65 estavam distribuídos em todos os bairros analisados.

Através do mapeamento dos casos foi possível observar áreas onde havia um agrupamento de casos com o mesmo perfil de *spoligotyping* (SITs 17 e 401), ressaltando a importância de aumentar a vigilância e investigação nesta região.

Foram encontrados 2 SITs associados a pacientes com histórico de encarceramento. O SIT 729 estava associado a pacientes com esta condição em 73% dos casos. O SIT 863 foi encontrado exclusivamente em 6 pacientes com histórico recente de encarceramento. Este spoligotipo não é relatado com muita freqüência, foi encontrado um isolado deste tipo nos EUA, dois em Pelotas e mais recentemente dois isolados na Venezuela (Borsuk *et al.*, 2005; Sequera *et al.*, 2008). Em outros estudos que estão sendo realizados pelo grupo do

CDCT, foram observados isolados com estes perfis. Em um estudo de prevalência da doença com pacientes da Penitenciária Estadual do Jacuí (PEJ), de 63 amostras de pacientes analisadas, cinco (8%) estavam infectados com cepas pertencentes ao SIT 863 e 17 (27%) eram do SIT 729 (Khuleis, D. – comunicação pessoal, dados não publicados). Um estudo que está sendo realizado com cepas MDR identificou 3 isolados com o padrão 863 e um dos pacientes era presidiário (Perizzolo, P. –comunicação pessoal, dados não publicados). Estes dados indicam a importância de empregar uma técnica com maior poder discriminatório para confirmar se os isolados de cada SIT são uma única cepa que está se disseminando no RS, principalmente por já terem sido encontrados isolados MDR com o perfil 863 e estes SITs estarem associados a um grupo de vulnerabilidade importante como os apenados.

6. CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados demonstram que a população atendida no HSP apresenta altos índices de alcoolismo, drogadição, desemprego e co-infecção por HIV e HCV, provavelmente correlacionados com as altas incidências de TB na região.

A técnica de *spoligotyping* apresentou um rendimento de quase 90% quando aplicada diretamente em amostras clínicas, podendo ser utilizada como método auxiliar na detecção e diferenciação de *M. tuberculosis*. Juntamente com os métodos convencionais de diagnóstico e dados clínicos-epidemiológicos, pode ser aplicada em uma rotina clínica para gerar informações epidemiológicas muito mais rapidamente.

A distribuição das famílias de spoligotipos foi semelhante àquela descrita na América do Sul. As três famílias genóticas principais, LAM, T e Harleem englobaram 75% dos isolados analisados. Não foram encontrados os genótipos Beijing ou EAI e a proporção de isolados da família LAM foi um pouco menor, apesar de também ter sido a família mais freqüente.

A geolocalização auxiliou a entender a distribuição dos casos na GD7 de acordo com cada spoligotipo e a determinar alguns agrupamentos de pacientes infectados com cepas de mesmo genótipo, direcionando investigações futuras.

Este trabalho demonstra a importância de estudos que englobem desde o atendimento ao paciente até a aplicação de métodos de biologia molecular ao patógeno, além da localização e distribuição espacial dos casos na população estudada, sendo a interdisciplinariedade um fator chave para a tomada de decisões como a continuidade de estudos e no controle de doenças importantes em saúde pública como é o caso da TB.

7. PERSPECTIVAS

Analisar os isolados deste estudo pela técnica de MIRU-VNTR (em andamento) para obter um maior grau de discriminação e identificar cada cepa. Correlacionar estas informações com os dados dos pacientes visando a identificar a relação epidemiológica entre aqueles infectados com a mesma cepa. Fazer novamente a geolocalização dos casos de acordo com o genótipo de MIRU-VNTR.

Validar e utilizar a técnica de *spoligotyping* diretamente em amostras clínicas para auxiliar no diagnóstico e caracterização molecular precoce em casos onde estas informações sejam necessárias.

Montar um banco de perfis de *spoligotyping* e dados dos pacientes com os isolados do presente estudo juntamente com os isolados de estudos prévios e estudos em andamento no CDCT.

8. REFERÊNCIAS

- Aerts D, Jobim R.** The epidemiological profile of tuberculosis in southern Brazil in times of AIDS. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; **8**(6):785–791.
- Allix C, Supply P, Fauville-Dufaux M.** Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis.* 2004; **39**(6):783-789.
- Al-Shorbaji N.** Use and potential of geographic information systems for health mapping in the Eastern Mediterranean Region. Disponível em <http://www.emro.who.int/HIS/ehealth/healthmapping.pdf>. Acesso em janeiro de 2009.
- Al-Soud WA, Rådström P.** Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**(2):485-493.
- Andersen AB, Thybo S, Godfrey-Faussett P, Stoker NG.** Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993; **12**(12):922-927.
- Andersen AB, Hansen EB.** Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1989; **57**(8):2481-2488.
- ANVISA.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/rconsulta_produto_internet.asp acessado em 24/08/2008.
- Aranaz A, Lienana E, Gomez-Mampaso E, Galan, JC, Cousin D, Ortega A, Blanquez J, Blaquero F, Mateos A, Suarez G, Doinguez L.** *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; **49** Pt 3:1263-1273.
- Arnold C.** Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. 2006. *Clin Microbiol Infect*; 2007. **13**(12):120–128.
- ATS.** American Thoracic Society and Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; **161**(4 Pt 1):1376-1395.
- Baethgen LF, Weidlich L, Moraes C, Klein C, Nunes LS, Cafrune PI, Lemos AP, Rios SS, Abreu MF, Kmetzsch C, Sperb AF, Riley LW, Rossetti ML, Zaha A.** Epidemiology of meningococcal disease in southern Brazil from 1995 to 2003, and

molecular characterization of *Neisseria meningitidis* using multilocus sequence typing. Trop Med Int Health. 2008; **13**(1):31-40.

Barrera L. In: **Palomino JC; Leão SC, Ritacco V.** Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 1ª ed. 2007.

Bates JH. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. Clin Chest Med. 1980; **1**(2):167-174.

Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, Small PM. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. Lancet. 1999; **353**(9165):444-449. Errata em: Lancet. 1999; **353**(9165):1714.

Boddinghaus B, Wichelhaus TA, Brade V, Bittner T. Removal of PCR Inhibitors by Silica membranes: Evaluating the Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Kit. J Clin Microbiol. 2001; **39**(10):3750-3752.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, van Dillen PMEW, van der Noorda J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 1990; **28**(3):495-503.

Borsuk S, Dellagostin MM, Madeira Sde G, Lima C, Boffo M, Mattos I, Almeida da Silva PE, Dellagostin OA. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. Microbes Infect. 2005; **7**(13):1338-1344.

Brasil. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica- Brasília: Ministério da saúde. 2008. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1133.

Brasil. Ministério da Saúde. II Consenso Brasileiro de tuberculose. Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. J Bras Pneumol. 2004; **30**:1-85.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual Técnico para o Controle da Tuberculose: cadernos de atenção básica 2002. 6ª Ed. rev. e ampl.: Brasília: Ministério da Saúde.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica. Tuberculose. Dados e indicadores. Epidemiologia da TB no Brasil. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/saude>. Acesso em: 23 abr 2004.

Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, Bonete R, Pialoux G, Gicquel B, Garrigue G. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet. 1991; **338**(8763):364-6.

- Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levyfrebault V, Nassif X, Hance AJ.** Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*. 1989; **2**(8671):1069-1071.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Guttierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofo-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rüsck-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C.** *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*. 2006; **6**:23.
- Cataldi A, Romano M.** *In: Palomino JC; Leão SC, Ritacco V.* Chapter 8: Tuberculosis caused by Other Members of the *M. tuberculosis* Complex. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care*. 1^a ed. 2007.
- CEVS/RS.** Coordenadoria Estadual de Vigilância Sanitária do Rio Grande do Sul. Boletim Epidemiológico. v.9, n.5, dez 2007. Disponível em <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=organograma&cod=4486>.
- Chan ED, Iseman MD.** Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; **21**(6):587–595.
- Cheng VCC, Yew WW, Yuen KY.** Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; **24** (11):711–720.
- Clark CM, Driver CR, Munsiff SS, Driscoll JR, Kreiswirth BN, Zhao B, Ebrahimzadeh A, Salfinger M, Piatek AS, Abdelwahab J.** Universal genotyping in tuberculosis control program, New York City, 2001–2003. *Emerg Infect Dis*. 2006; **12**(5):719–724.
- Cohen GM.** Access to diagnostics in support of HIV/AIDS and tuberculosis treatment in developing countries. *AIDS*. 2007; **21**(4): 81–87.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmer K, Gas S, Barry CE, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrel BG.** Deciphering the

- biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998; **393**(6685):537-544. Errata em: Nature 1998; **396**(6707):190.
- Carvalho BM, Monteiro AJ, Neto RJP, Grangeiro TB, Frota CC.** Factors Related to HIV/Tuberculosis Coinfection in a Brazilian Reference Hospital. Braz J Infect Dis. 2008; **12**(4): 281-286.
- Cowan LS, Crawford JT.** Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. Emerg Infect Dis. 2002; **8**(11):1294-1302.
- Dahle UR, Sandven P, Heldal E, Mannsaaker T, Caugant DA.** Deciphering an outbreak of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2003; **41**(1):67-72.
- Dalcolmo MP, Fortes A, Melo FF, Motta R, Netto JI, Cardoso N, Andrade M, Barreto AW, Gerhardt G.** Estudo da efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. Pneumol. 1999; **25**:70-77.
- Daley CL, Small PM, Schecter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr., Hopewell PC.** An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. N Engl J Med. 1992; **326**(4):231-235.
- Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PE, Fonseca Lde S, Ho JL, Kritski AL, Rossetti ML.** Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. BMC Microbiol. 2009. **19**:39.
- de Waard JH, Robledo J.** In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Chapter 12: Conventional Diagnostic Methods. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 1^a ed. 2007.
- Diel R, Schneider S, Meywald-Walter K, Ruf CM, Rüsç-Gerdes S, Niemann S.** Epidemiology of tuberculosis in Hamburg: long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques. J Clin Microbiol. 2002; **40**(2):532-539.
- Driscoll JR.** Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Methods Mol Biol. 2009; **551**:117-28
- Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D.** Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2003; **3**(3):141-147.

- Dye C.** Domsday postponed? Preventing and reversing epidemics of drug-resistant tuberculosis. *Nat Rev Microbiol.* 2009; **7**(1):81-87.
- Dye C.** Global Epidemiology of tuberculosis. *Lancet.* 2006; **367**(9514):938-940.
- Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Mehran Hosseini S, Raviglione MC.** Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA.* 2005; **293**(22):2767-2775.
- Easterbrook PJ, Gibson A, Murad S, Lamprecht D, Ives N, Ferguson A, Lowe O, Mason P, Ndudzo A, Taziwa A, Makombe R, Mbengeranwa L, Sola C, Rastogi N, Drobniewski F.** High Rates of Clustering of Strains Causing Tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a Molecular Epidemiological Study. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**(10):4536-4544. Errata em: *J Clin Microbiol.* 2004;**42**(12):5965.
- Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT.** Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Inf Dis.* 1990; **161**(5):977-981.
- El-Serag HB, Anand B, Richardson P, Rabeneck L.** Association between hepatitis C infection and other infectious diseases: a case for targeted screening? *Am J Gastroenterol.* 2003; **98**(1):167-174.
- Evans JT, Hawkey PM, Smith EG, Boese KA, Warren RE, Hong G.** Automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by a combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**(9):4175-80.
- Fandinho FCO, Kritski AL, Hofer C, Conde Jr H, Ferreira RMC, Saad MHF, Silva MG, Riley LW, Fonseca LS.** RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; **94**(3):271-275.
- Fang Z, Morrison N, Watt B, Doig C, Forbes KJ.** IS6110 Transposition and evolutionary scenario of the Direct Repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Bacteriol.* 1998; **180**(8):2102-2109.
- Ferdinand S, Sola C, Verdol B, Legrand E, Goh KS, Berchel M, Aubéry A, Timothée M, Joseph P, Pape JW, Rastogi N.** 2002. Molecular Characterization and Drug Resistance Patterns of Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Patients in an AIDS Counseling Center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-Year Study. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**(2):694-702.
- Ferrazoli L, Palaci M, Marques LRM, Jamal LF, Afiune JB, Chimara E, Martins M C, Telles MAS, Oliveira CAF, Palhares MC, Spada DTA, Riley L.** Transmission of

- tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2000; **4**(1):1-8.
- Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valétudie G, Dang DA, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ, Brudey K, Cataldi A, Cooksey RC, Cousins DV, Dale JW, Dellagostin OA, Drobniewski F, Engelmann G, Ferdinand S, Gascoyne-Binzi D, Gordon M, Gutierrez MC, Haas WH, Heersma H, Kassa-Kelembho E, Ho ML, Makristathis A, Mammina C, Martin G, Moström P, Mokrousov I, Narbonne V, Narvskaya O, Nastasi A, Niobe-Eyangoh SN, Pape JW, Rasolofo-Razanamparany V, Ridell M, Rossetti ML, Stauffer F, Suffys PN, Takiff H, Texier-Maugein J, Vincent V, de Waard JH, Sola C, Rastogi N.** Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**(5):1963-1970.
- Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valétudie G, Anh DD, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ, Brudey K, Cataldi A, Cooksey RC, Cousins DV, Dale JW, Dellagostin OA, Drobniewski F, Engelmann G, Ferdinand S, Gascoyne-Binzi D, Gordon M, Gutierrez MC, Haas WH, Heersma H, Källenius G, Kassa-Kelembho E, Koivula T, Ly HM, Makristathis A, Mammina C, Martin G, Moström P, Mokrousov I, Narbonne V, Narvskaya O, Nastasi A, Niobe-Eyangoh SN, Pape JW, Rasolofo-Razanamparany V, Ridell M, Rossetti ML, Stauffer F, Suffys PN, Takiff H, Texier-Maugein J, Vincent V, De Waard JH, Sola C, Rastogi N.** Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002; **8**(11):1347-1349.
- Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N.** Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2000; **38**(7):2520-2524.
- Flores LL, Pai M, Colford JM Jr, Riley LW.** In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol.* 2005. **5**:55.
- Fomukong N, Beggs M, el Hajj H, Templeton G, Eisenach K, Cave MD.** Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. *Tuberc Lung Dis.* 1997; **78**(2):109-116.
- Fournet N, Sanchez A, Massari V, Penna L, Natal S, Biondi E, Larouzé B.** Development and evaluation of tuberculosis screening scores in Brazilian prisons. *Public Health.* 2006; **120**(10):976-983.
- Foxman B, Riley L.** Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol.* 2001; **153**(12):7-13.

- French CE, Kuijshaar ME, Jones JA, Abubakar I.** The influence of socio-economic deprivation on tuberculosis treatment delays in England, 2000–2005. *Epidemiol and Infect.* 2009; **137**(4):591-596.
- Frothingham R, Meeker-O’Connell WA.** Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 1998; **144**(Pt5):1189–1196.
- Gillespie SH.** Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. *Biochem Soc Trans.* 2007; **35**(Pt5): 1217-1320.
- Girardi E, Sabin CA, d’Arminio Monforte A, Hogg B, Phillips AN, Gill MJ, Dabis F, Reiss P, Kirk O, Bernasconi E, Grabar S, Justice A, Staszewski S, Fatkenheuer G, Sterne JA.** Incidence of tuberculosis among HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy in Europe and North America. *Clin Infect Dis.* 2005; **41**(12):1772–1782.
- Glynn JR, Crampin AC, Traore H, Chaguluka S, Mwafulirwa DT, Alghamdi S, Ngwira BM, Yates MD, Drobniewski FD, Fine PE.** Determinants of cluster size in large, population-based molecular epidemiology study of tuberculosis, northern Malawi. *Emerg Infect Dis.* 2008; **14**(7):1060-1066.
- Goguet de la Salmonière YO, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden J, Gicquel B.** Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1997; **35**(9):2210-2214.
- Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli Esposti A, Catozzi L, Nardi GP, Gazzola L, Ferrario G, van Embden JD, van Soolingen D, Moroni M, Franzetti F.** Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis.* 2005; **11**(8):1242-1248.
- Goulding JN, Stanley J, Sauders N, Arnold C.** Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2000; **38**(3):1121-1126.
- Goyal M, Shaw RJ, Banerjee DK, Coker RJ, Robertson BD, Young DB.** Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J.* 1997; **10**(5):1120-1124.
- Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C.** Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. *J Clin Microbiol.* 2009; **47**(3):569-576.
- Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C.** Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax.* 2006; **61**(9):783-790.

- Gutiérrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, Le Pendeven C, Le Pennec MP, Mathieu D, Offredo C, Pangon B, Pierre-Audigier C.** Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol.* 1998; **36**(2): 486-492.
- Haase I, Olson S, Behr MA, Wanyeki I, Thibert L, Scott A, Zwerling A, Ross N, Brassard P, Menzies D, Schwartzman K.** Use of geographic and genotyping tools to characterize tuberculosis transmission in Montreal. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; **11**(6):632–638.
- Hermans PW, Schuitema AR, van Soolingen D, Verstynen CP, Bik EM, Kolk AH, van Embden JD.** Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; **28**(6):1204-1213.
- Heyderman RS, Goyal M, Roberts P, Ushewokunze S, Zizhou S, Marshall BG, Makombe R, van Embden JDA, Mason PR, Shaw RJ.** Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by spoligotyping. *Thorax.* 1998; **53**(5):346-350.
- IBGE.** Censo 2000. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2000. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/SIDRA>, tabela 136.
- Idemyor V.** HIV and Tuberculosis Coinfection: Inextricably Linked Liaison. *J Nat Med Assoc.* 2007; **99**(12):1414-1419.
- INCA/MS.** Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos não Transmissíveis, Conprev/INCA/MS. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. 2004. Disponível em <http://www.inca.gov.br/inquerito>.
- Jassal M, Bishai WR.** Extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2009; **9**(1):19-30.
- 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.* 1997; **35**(4):907-914.
- Kox LF, Noordhoek GT, Kunakoen M, Mulder S, Sterrnburg M, Kolk AH.** Microwell hybridization assay for detection of PCR products from *Mycobacterium tuberculosis* complex and the recombinant *Mycobacterium smegmatis* strain 1008 used as an internal control. *J Clin Microbiol.* 1996; **34**(9):2117-20.
- Kox LF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, van Heusden S, Kuijper S, Kolk AH.** A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1994; **32**(3): 672-678.

- Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, Niemann S, Kurepina NE, Kreiswirth BN, Bifani PJ, van Soolingen D.** Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**(9):4040-4049.
- Kritski AL Conde MB, Muzy-Souza G.** Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. 3ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu. 2005.
- Kudoh S, Kudoh TA.** A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bulletin of the WHO.* 1974; **51**(1):71-82.
- Larouze B, Sánchez A, Diuana V.** Tuberculosis behind bars in developing countries: a hidden shame to public health. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; **102**(9):841-842.
- Leão SC, Portales F.** In: **Palomino JC; Leão SC, Ritacco V.** Chapter 1: History. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care.* 1ª ed. 2007.
- Legrand J, Sanchez A, Le Pont F, Camacho L, Larouze B.** Modeling the Impact of Tuberculosis Control Strategies in Highly Endemic Overcrowded Prisons. *PLoS ONE* 2008. **3**:e2100.
- Lillebaek T, Dirksen A, Baess I, Strunge B, Thomsen VØ, Andersen ÅB.** Molecular evidence of endogenous reactivation *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. *J Infect Dis.* 2002; **185**(3):401-404.
- Lima SSS, Clemente WT, Palaci M, Rosa RV, Antunes CMF, Serufo JC.** Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo. *J Bras Pneumol.* 2008; **34**(12):1056-1062.
- Lin HP, Deng CY, Chou P.** Diagnosis and treatment delay among pulmonary tuberculosis patients identified using the Taiwan reporting enquiry system, 2002–2006. *BMC Public Health.* 2009; **9**:55.
- Ling DI, Flores LL, Riley LW, Madhukar P.** Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. *PLoS ONE* 2008; **3**:e1536.
- Lönnroth K, Jaramillo E, Williams BG, Dye C, Raviglione M.** Drivers of tuberculosis epidemics: The role of risk factors and social determinants. *Soc Sci Med.* 2009; **68**(12):2240–2246.
- Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM.** Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS ONE.* 2007; Dec **19**:e1318.

- Manjunath N, Shankar P, Rajan L, Bhargava A, Salula S, Shriniwas.** Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle*. 1991; **72**(1):21-27.
- Martin A, Portales F.** *In: Palomino JC; Leão SC, Ritacco V.* Chapter 19: Drug Resistance and Drug Resistance Detection. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care*. 1^a ed. 2007.
- Martinez AN, Rhee JT, Small PM, Behr MA.** Sex differences in the epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; **4**(1):26–31.
- Mascarenhas MDM, Araújo LM, Gomes KRO.** Perfil epidemiológico da tuberculose entre casos notificados no Município de Piripiri, Estado do Piauí, Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*. 2005; **14**(1):7-14.
- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN.** Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clin Microbiol Rev*. 2006; **19**(4):658–685.
- Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; **98**(4):1901-1906.
- Mendes JM, Machado SMA, Lourenço MC, Ferreira RMC, Fonseca LS, Saad MHF.** Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in a slum area of Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2008. **34**(12):1063-1068.
- Mendes JM, Fonseca LS, Lourenço MC, Ferreira RMC, Saad MHF.** A retrospective study of the epidemiological aspects of tuberculosis in the Complexo de Manguinhos, an urban slum area in Rio de Janeiro, Brazil, 2000-2002. *J Bras Pneumol*. 2007; **33**(5):443-447.
- Mokrousov I.** Genetic geography of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multifacet mirror of human history? *Infect Genet Evol*. 2008; **8**(6):777-785.
- Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N.** Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; **8**(11):694-704.
- Nguyen LN, Gilbert GL, Marks GB.** Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis. *Respirology*. 2004; **9**(3):313-319.
- Nicol MP, Wilkinson RJ.** The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008; **102**(10):955-965.

- Nolte FS, Metchock B, McGowan JE Jr, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, Mitchell PS, Plikaytis B, Shinnick T.** Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol.* 1993; **31**(7): 1777-1782.
- Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM.** New diagnostic methods for tuberculosis *Curr Opin Infect Dis.* 2009; **22**(2):174-82.
- Oliveira HB, Cardoso JC.** Tuberculose no sistema prisional de Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev Panam Salud Publica.* 2004; **15**(3):194-199.
- Pablos-Méndez A, Knirsch CA, Barr RG, Lerner BH, Frieden TR.** Nonadherence in tuberculosis treatment: predictors and consequences in New York City. *Am J Med.* 1997; **102**(2):164-170.
- Pelaquin MHH, Silva RS, Ribeiro SA.** Factors associated with death from tuberculosis in the eastern part of the city of São Paulo, 2001. *J Bras Pneumol.* 2007; **33**(3):311-317.
- Picon PD, Caramori ML, Bassanesi SL, Jungblut S, Folgieri M, Porto Nda S, Rizzon CF, Ferreira RL, Freitas TM, Jarczewski CA.** Differences in the clinical and radiological presentation of intrathoracic tuberculosis in the presence or absence of HIV infection. *J Bras Pneumol.* 2007a; **33**(4):429-436.
- Picon PD, Bassanesi SL, Caramori MLA, Ferreira RLT, Jarczewski CA, Vieira PRB.** Fatores de risco para a recidiva da tuberculose. *J Bras Pneumol.* 2007b; **33**(5):572-578.
- Piersimoni C, Gherardi G, Nista D, Bornigia S.** Impact of a Chemistry-Based DNA Extraction Method on Performance of a Commercial Amplification Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Clin Microbiol.* 2009; **47**(1):282-283.
- Piersimoni C, Scaparo C.** Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**(12):5355-5365.
- Possuelo LG, Castelan JA, de Brito TC, Ribeiro AW, Cafrune PI, Picon PD, Santos AR, Teixeira RL, Gregianini TS, Hutz MH, Rossetti ML, Zaha A.** Association of slow N-acetyltransferase 2 profile and anti-TB drug-induced hepatotoxicity in patients from Southern Brazil. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008; **64**(7): 673-681.
- Rastogi N, Sola C.** *In: Palomino JC; Leão SC, Ritacco V.* Chapter 2: Molecular Evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care.* 1^a ed. 2007.
- Raviglione MC.** The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis (Edinb).* 2003; **83**(1-3):4-14.

- Raviglione MC, Snider DE, Kochi A.** Global epidemiology of tuberculosis – Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*. 1995; **273**(3):220-226.
- 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*. 2008; **103**(5):489-492
- Roring S, Scott AN, Glyn Hewinson R, Neill SD, Skuce RA.** Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol*. 2004; **101**(1):65–73.
- Rossetti MLR, Jardim SB, Rodrigues VFS, Moura AR, Oliveira H, Zaha A.** Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J Microbiol Met*. 1997; **28**:139-146.
- Rosso F.** Contribuição da detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras para o diagnóstico de tuberculose pleural. 2008. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular. Disponível em <http://hdl.handle.net/10183/15497>.
- Ruffino-Netto A.** Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; **35**(1):51-58.
- Sanchez A, Gerhardt G, Natal S, Capone D, Espinola A, Costa W, Pires J, Barreto A, Biondi E, Larouzé B.** Prevalence of pulmonary tuberculosis and comparative evaluation of screening strategies in a Brazilian prison. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; **9**(6):633–639.
- Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Gómez LI, Lafoz MC, Jiménez MS, Ortega A, Lezcano MA, van Soolingen D, Martín C, The Spanish Working Group on MDR-TB.** Systematic Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates from Spain. *J Clin Microbiol*. 2005; **43**(3):1120-1127.
- Santos AR, Miranda AB, Lima LM, Suffys PN, Degraeve WM.** Method for high yield preparation in large and small scale of nucleic acids from mycobacteria. *J Microbiol Met*. 1992; **15**: 83-94.
- Scatena LM, Villa TCS, Ruffino-Netto A, Kritski AL, de Figueiredo TMRM, Vendramini SHF, Assis MMA, da Motta MCS.** Dificuldades de acesso a serviços de saúde para diagnóstico de tuberculose em municípios do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2009; **43**(3):389-397.
- Scherer LC, Sperhake RD, Jarczewski C, Cafrune PI, Minghelli S, Ribeiro MO, Mello FC, Ruffino-Netto A, Rossetti ML, Kritski AL.** PCR colorimetric dot-blot

- assay and clinical pretest probability for diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in smear-negative patients. *BMC Public Health*. 2007; **7**:356.
- Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D.** Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol*. 1995; **8**(2):180-199.
- Sequera CM, Delgado SV, Araque MW, Torrealba OM, Núñez MR, da Mata JO, Abadía PE, Takiff H, de Waard J.** *Mycobacterium tuberculosis*: Espoligotipos en el Estado Carabobo, Venezuela. *Rev Chil Infect* 2008; **25**(5):362-367.
- Serpa JA, Teeter LD, Musser JM, Graviss EA.** Tuberculosis disparity between US-born blacks and whites, Houston, Texas, USA. *Emerg Infect Dis*. 2009; **15**(6):899-904.
- SES/RS.** Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. Coordenação de Atenção Integral à Saúde, Coordenação de Pneumologia Sanitária, Tuberculose. 2007.
- Shawar RM, El-Zaatari FA, Clarridge JE.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two step polymerase chain reaction and non-isotopic hybridization methods. *J Clin Microbiol*. 1993; **31**(:61-65.
- Silveira MPT, de Adorno RFR, Fontana T.** Profile of patients with tuberculosis: evaluation of the Brazilian national tuberculosis control program in Bagé, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2007; **33**(2):199-205.
- 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**(24):1703-1709.
- Small PM, van Embden JDA. In Bloom BR.** Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, DC. 1994; 569-582.
- Smith PG, Moss AR. In Bloom, B. R.** Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, DC. 1994; 47-59.
- SMS/POA.** Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde. Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre. Boletim Epidemiológico - Ano X, Nº 36, Fev 2008. Disponível em http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/sms/usu_doc/boletim_36_fevereiro_2008.pdf.
- SMS/POA.** Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde. Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre. Boletim Epidemiológico - Ano IX, Nº 35, Nov 2007. Disponível em http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/sms/usu_doc/boletim_n_35.pdf.
- Snider Jr. DE, Raviglione M, Kochi A, in Bloom BR.** Tuberculosis: patogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, DC. 1994; 3-11.

- Sperhacke RD, Mello FCQ, Zaha A, Kritski AL, Rossetti MLR.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; **8**(3):312-317.
- Storla DG, Yimer S, Bjune GA.** A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *BMC Public Health.* 2008; **8**:15.
- Stavrum R, Mphahlele M, Øvreås K, Muthivhi T, Fourie PB, Weyer K, Grewal HMS.** High Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes in South Africa and Preponderance of Mixed Infections among ST53 Isolates. *J Clin Microbiol.* 2009; **47**(6):1848-1856.
- Sun YJ, Bellamy R, Lee AS, Ng ST, Ravindran S, Wong SY, Loch C, Supply P, Paton NI.** Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**(5):1986–1993.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes 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 MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D.** Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006; **44**(12):4498-4510.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Loch C.** Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000; **36**(3):762–771.
- Tanaka MM, Francis AR.** Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; **103**(41):15266-15271.
- Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gigquel B.** Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990. **28**(12):2668-2673.
- Tindó H, Cavalcante SC, Werneck-Barroso E.** Gender differences in tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; **8**(3):388–390.
- Tiwari RP, Hattikudur NS, Bharmalb RN, Kartikeyanc S, Deshmukhd NM, Bisen PS.** Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: Promises and challenges ahead. *Tuberculosis.* 2007; **87**(3):193–201.
- Tortolli E, Palomino J.C.** *In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V.* Chapter 14: New Diagnostic Methods. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care.* 1^a ed. 2007.

- Valim ARM, Possuelo LG, Cafrune PI, Borges M, Ribeiro MO, Rossetti MLR, Zaha A.** Evaluation and Genotyping of Multidrug-Resistant Cases of Tuberculosis in Southern Brazil. *Microb Drug Resis.* 2006; **12**(3):186-191.
- van der Spuy GD, Warren RM, van Helden PD.** The role of molecular epidemiology in low-income, high-burden countries. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009; **13**(4):419-420.
- van Embden JD, van Soolingen D, Small PM, Hermans PWM.** Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Res Microbiol.* 1992; **143**(4):385-391.
- van Soolingen D, Kremer K, and Hermans PWM.** *In: Palomino JC; Leão SC, Ritacco V.* Chapter 9: Molecular Epidemiology: Breakthrough Achievements and Future Prospects. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care.* 1^a ed. 2007.
- van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PEW, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaella F, Top J, Schouls LM, van Embden JD.** A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from África. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; **47**(4):1236-1245.
- van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PWM, Groenen PM, van Embden JD.** Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1993; **31**(8):1987-1995.
- van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Soll DR, van Embden JDA.** Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991; **29**(11): 2578-2586.
- Victor T, du Toit R, van Helden PD.** Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; **30**(6):1514-1517.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991; **10**(4):506-513.
- Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, van der Spuy GD, Johnson R, Chihota VN, Locht C, Supply P, van Helden PD.** Clonal expansion of a globally disseminated lineage of *Mycobacterium tuberculosis* with low IS6110 copy numbers. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**(12):5774–5782.
- Warren RM, Streicher EM, Sampson SL, van der Spuy GD, Richardson M, Nguyen D, Behr MA, Victor TC, van Helden PD.** Microevolution of the direct repeat region

of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. J Clin Microbiol. 2002a; **40**(12):4457–4465.

Warren RM, Streicher EM, Charalambous S, Churchyard G, van der Spuy GD, Grant AD, van Helden PD, Victor TC. Use of spoligotyping for accurate classification of recurrent tuberculosis. J Clin Microbiol. 2002b; **40**(10):3851-385.

WHO. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009. WHO/HTM/TB/2009.411.

WHO World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing: WHO report 2008. WHO/HTM/TB/2008.393.

WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, .financing. Geneva: World Health Organization. 2006:242.

WHO. World Health Organization. TB – A Global Emergency. WHO report on the tuberculosis epidemic. (WHO/TB/94.177). Geneva. Switzerland, 1994.

Wilson SM, Mcnerney R, Nye PM, Godfrey-Fausstt PD, Stoker NG, Voller A. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1993; **31**(4):776-782.

Yang Z, Chaves F, Barnes PF, Burman WJ, Koehler J, Eisenach KD, Bates JH, Cave MD. Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1996; **34**(12): 3044-3048.

Zambardi G, Roure C, Boujaafar N, Fouque B, Freney J, Fleurette J. Comparison of three primer sets for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by polymerase chain reaction. Ann Biol Clin. 1993; **50**(10-11):893-897.

ANEXOS

ANEXO 1 – LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios para leitura e interpretação da baciloscopia de escarro corada pelo método de Ziehl-Neelsen.....	14
Tabela 2: Critérios para leitura e interpretação da cultura em meio sólido.....	15
Tabela 3: Performance dos testes comerciais de AAN.....	19
Tabela 4: Comparação de pacientes com e sem TB em relação ao sexo, idade, cor e estado civil.....	40
Tabela 5: Comparação da população estudada com e sem TB em relação à escolaridade, rendimentos e trabalho.....	41
Tabela 6: Comparação entre pacientes com e sem TB em relação a grupos de vulnerabilidade para a doença.....	42
Tabela 7: Comparação entre pacientes com e sem TB em relação a dados da linha de base da doença.....	43
Tabela 8: Pacientes com TB associada a outros grupos de vulnerabilidade.....	43
Tabela 9: Comparação do desfecho do tratamento com grupos de vulnerabilidade.....	44
Tabela 10: Comparação das características de pacientes brancos e não brancos.....	45
Tabela 11: Características dos SITs mais frequentes no estudo.....	64

ANEXO 2 – LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapas da distribuição de TB e AIDS nas Gerências Distritais de Porto Alegre.....8
- Figura 2:** Frequência de cada família e subfamílias de *spoligotyping*.....63
- Figura 3:** Mapa com a localização por endereço de residência dos pacientes de acordo com o spoligotipo (SIT) do isolado de *M. tuberculosis*.....65
- Figura 4:** Mapa com maior aproximação nos Bairros Partenon, Coronel Aparício Borges, São José, Jardim Botânico, Jardim Carvalho e Bom Jesus em relação ao mapa da figura 3.....66

ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Prontuário Nº: _____

Quest Nº: _____

Data da entrevista: _____

Médico: _____

AMOSTRA CLÍNICA: (1) SANGUE (2) ESCARRO

Questionário Epidemiológico

Nota: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será guardado em arquivos fechados. Seu número será a única conexão à informação coletada.

1. Origem: (1) Hospital (2) Ambulatório
2. Nome : _____
3. Endereço: _____
4. Bairro: _____
5. Cidade: (1) POA (2) Outra: _____ Telefone: _____
6. Renda familiar: () Sem renda () R\$ _____ Nº pessoas na casa: _____
7. Estado civil: (1) Acompanhado (2) Não acompanhado (99) IGN
8. Escolaridade: () Analfabetismo () _____ série do _____ grau (99) IGN
9. Data de Nascimento: ____/____/____
10. Gênero: (1) Masculino (2) Feminino
11. Cor da Pele: (1) Branca (2) Mulata clara (3) Mulata média (4) Mulata escura
(5) Negra (6) Amarela (7) Parda (8) Outra: _____ (99) IGN
12. Profissão: _____ (99) IGN
13. Cicatriz vacinal (BCG): (1) Sim (2) Não (99) IGN
14. Tosse: (1) Sim (2) Não (99) IGN Quanto tempo? _____
15. Escarro: (1) Sim (2) Não (99) IGN Quanto tempo? _____
16. Tabagismo: (1) Sim (2) Não (99) IGN
Cigarros/dia: _____ () IGN
Ex-tabagista: (1) Sim (2) Não (99) IGN
Cigarros/dia: _____ () IGN
17. Usuário de drogas: (1) Sim (2) Não (99) IGN Qual? _____
18. Hepatopatias:
- hepatite B (1) Sim (2) Não (99) IGN

- hepatite C (1) Sim (2) Não (99) IGN

- cirrose (1) Sim (2) Não (99) IGN

19. Uso de Corticóide ou imunossupressores: (1) Sim (2) Não (99) IGN

(>15mg de prednisona, >30 dias consecutivos ou drogas citotóxicas)

20. Diabetes Melito: (1) Sim (2) Não (99) IGN

-uso de insulina: (1) Sim (2) Não (99) IGN

21. Neoplasia maligna: (1) Sim (2) Não (99) IGN

22. Insuficiência renal: (1) sim (2) não (99) IGN

23. Desnutrição (IMC<20): (1) Sim (2) Não (99) IGN

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

24. Gravidez: (1) Sim (2) Não (99) IGN

25. Presidiário: (1) Sim (2) Não (99) IGN

26. Alcoolismo (critérios CAGE): (1) Sim (2) Não (99) IGN

a) Qual o tipo de bebida o Sr (a) prefere?

() Cachaça () Cerveja () Vinho () Whisky () Outro () Nenhuma

Caso o paciente admita o uso de qualquer bebida citada acima, responda as perguntas, relacionadas com alcoolismo, abaixo:

b) O Sr (a) tem facilidade de fazer amizades? (1) Sim (2) Não

c) Alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida?: (1) Sim (2) Não

d) Alguém critica ou já criticou seu modo de beber?: (1) Sim (2) Não

e) Costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca?: (1) Sim (2) Não

f) Sente-se culpado pela maneira que costuma beber?: (1) Sim (2) Não

Caso a resposta tenha sido sim para pelo menos 02 questões (c, d, e ou f), assinale alcoolismo como positivo.

27. Tuberculose anterior: (1) Sim (2) Não (99) IGN

Tipo: (1) Pulmonar (2) Extrapulmonar (3) Ambos (99) IGN

Número de episódios: _____ (99) IGN

Ano do último episódio: _____ (99) IGN

Desfecho do último episódio: (1) Cura (2) Abandono (3) Falência (99) IGN

28. Contato com paciente com tuberculose: (1) Sim (2) Não (99) IGN

Relação com o contato: _____

- Época do contato: _____
29. Quimioprofilaxia: (1) Sim (2) Não (99) IGN
Desfecho: (1) Término (2) Abandono (99) IGN
30. Internação hospitalar nos últimos 2 anos: (1) Sim (2) Não (99) IGN
Local: _____ Motivo: _____
31. HIV: (1) Positivo (2) Negativo (3) NR (99) IGN
32. Uso de anti-retroviral: (1) Sim (2) Não (99) IGN
Onde realiza o tratamento? _____
33. Anti-retroviral em uso : _____
34. Câncer familiar: (1) Sim (2) Não (99) IGN
Tipo de câncer: _____
35. Tipo de TB atual: (1) Pulmonar (2) Extrapulmonar
36. Tipo de TB extrapulmonar: _____
37. Medicamentos para TB atual: (1) RHZ (2) Outro _____ (3) H
38. Outros medicamentos: _____
39. PPD: (1) Sim (2) Não (3) IGN (4) NR
Resultado PPD: (1) Reator forte (2) Reator fraco (2) Não reator
40. Hepatite B: _____
41. Hepatite C: _____
42. HIV: (1) Positivo (2) Negativo (3) NR (4) IGN
43. Carga Viral
CD4: _____
CD8: _____

ANEXO 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do paciente: _____

Número do prontuário: _____ Protocolo N°: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos: PROJETO NAT2/ PROJETO SPOLIGOTYPING

Financiamento: CDCT/FEPPS, CNPq

Investigadores Principais: Msc. Patrícia Cafrune / Lia Gonçalves Possuelo

Objetivos e relevância do estudo

O presente estudo tem o objetivo de testar uma metodologia nova para realizar o diagnóstico juntamente com o estudo do bacilo causador da tuberculose. O diagnóstico mais rápido desta doença permite que o tratamento adequado seja iniciado evitando que a doença se espalhe. O estudo dos bacilos é importante para que se tenha um melhor conhecimento da doença e novas estratégias de combate possam ser desenvolvidas.

Os efeitos colaterais assim como falha terapêutica (escarro positivo ao final do tratamento) constituem um problema importante na prática do profissional da área da saúde. Sabe-se que estas são causas significativas de hospitalização, de aumento do tempo de permanência hospitalar e, até mesmo, de óbito. Alguns estudos demonstram que certas alterações genéticas podem estar relacionadas com efeitos colaterais ou falha terapêutica. Este trabalho tem como objetivo a caracterização de alterações genéticas em genes envolvidos na metabolização de remédios utilizados no tratamento da TB em amostras de pacientes em tratamento para TB e verificar a existência de uma relação entre os genes com o possível desenvolvimento de efeitos colaterais no fígado.

Procedimentos:

Os voluntários que decidirem participar do estudo serão entrevistados para responderem algumas questões relacionadas à sua saúde, seu perfil sócio-econômico, os fatores de risco que estão associados ao adoecimento por tuberculose, o consumo de bebidas alcoólicas e sintomas atuais. O voluntário será submetido à coleta de 10 mL de sangue que será realizada na face anterior do antebraço com agulha e seringa descartáveis, antecedido por anti-sepsia local com álcool e algodão além de uma amostra de escarro (na primeira consulta). A amostra de sangue será utilizada para realização da análise genética do gene *NAT2* além de dosagem de TGO, TGP, bilirrubina e teste para hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV). A amostra de escarro será utilizada para análise bacteriológica e pela técnica de *spoligotyping*. Será coletada também uma amostra de sangue (5 mL) na segunda e na terceira consulta, nos dois primeiros meses de tratamento para análise dos níveis enzimáticos durante o tratamento.

Local do Estudo

Os procedimentos de coleta de sangue, escarro e entrevista serão realizados no Laboratório do Hospital Sanatório Partenon em Porto Alegre e as análises genéticas, bacteriológicas, dosagens enzimáticas e teste para hepatites serão realizados no CDCT (Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da FEPPS).

Riscos e desconfortos

Os riscos e desconfortos aos participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima. A coleta de sangue é de uma pequena quantidade (10mL) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral (1 em cada 1000 pessoas), no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma. A coleta de escarro pode resultar em irritação na garganta caso o paciente tenha que forçá-lo, na falta de ar momentânea e/ou náuseas passageiras. Os demais procedimentos (exames) serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos aos participantes do estudo. Os demais procedimentos (exames) serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos aos participantes do estudo.

Desistência na participação do estudo

A participação de cada indivíduo neste estudo é voluntária, ou seja, quem não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito. Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia no decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

Benefícios

Os procedimentos médicos aos quais o participante do estudo será submetido poderão gerar novos conhecimentos científicos com conseqüente melhoria do tratamento de pacientes que estiverem contaminados pelo bacilo da tuberculose. Se você desejar poderá tomar conhecimento dos resultados obtidos nesta pesquisa.

Gostaria de ser comunicado de resultados desta pesquisa?

() **Sim, gostaria.**

() **Não gostaria** de ser comunicado dos resultados desta pesquisa.

Compensação financeira

Não haverá nenhum pagamento aos indivíduos que concordarem em participar do estudo, bem como os participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e às visitas médicas.

Confidencialidade das informações

Toda a informação que será fornecida pelos participantes do estudo e os resultados dos exames realizados serão considerados confidenciais e serão somente conhecidos pela equipe envolvida no estudo. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código (número) criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo. Este banco será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar, no entanto se houver alguma dúvida estas poderão ser esclarecidas pela equipe do estudo, através da Msc. Lia Gonçalves Possuelo ou da Msc. Patrícia Izquierdo Cafrune em qualquer momento do estudo pelo telefone: 3352-0336.

Em caso de danos

Se o participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação no estudo, o tratamento será fornecido pelo SUS na instituição participante.

Autorização para estocagem de material biológico

Se o voluntário permitir, as sobras das suas amostras serão estocadas (guardadas) para utilização em futuras pesquisas, desde que estas sejam aprovadas pelo comitê de ética em Pesquisa da instituição proponente. O voluntário fica livre para solicitar a destruição da mesma, a qualquer momento, se assim desejar (sem a identificação e/ou mantendo a privacidade).

Permite que as sobras de suas amostras sejam guardadas para outros estudos?

() **Sim, permito.**

() **Não permito** que minha amostra seja utilizada em outro estudo.

O significado de sua assinatura

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do voluntário e/ou responsável (se menores de 18 anos) Data:

Assinatura do entrevistador Data:

Assinatura do coordenador do estudo Data:

Obs.: O presente documento, baseado no item IV das diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)