



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Faculdade de Medicina

Adalgiza da Silva Rocha

Doenças micobacterianas de relevância máxima:

I - Tuberculose humana e *Mycobacterium bovis*.

II – Hanseníase, recidiva, re-infecção e resistência bacteriana a drogas dos esquemas terapêuticos propostos pela Organização Mundial da Saúde.

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Adalgiza da Silva Rocha

Doenças micobacterianas de relevância máxima:

I - Tuberculose humana e *Mycobacterium bovis*.

II – Hanseníase, recidiva, re-infecção e resistência bacteriana a drogas dos esquemas terapêuticos propostos pela Organização Mundial da Saúde.

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós - graduação em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dr. Neio Lucio Boéchat

Dr. Philip Noel Suffys

Rio de Janeiro, 09 de Novembro de 2009.

Rocha, Adalgiza da Silva

Doenças micobacterianas de relevância máxima : I- tuberculose humana e *Mycobacterium bovis* [;] II- hanseníase, recidiva, re-infecção e resistência bacteriana a drogas dos esquemas terapêuticos... / Adalgiza da Silva Rocha. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2009.

xxiii, 308 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Neio Lucio Boéchat e Philip Noel Suffys.

Tese (doutorado) – UFRJ / Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica (Pneumologia), 2009.

Referências bibliográficas: f. 171-190.

1. *Mycobacterium bovis* - genética. 2. *Mycobacterium tuberculosis* - genética. 3. Tuberculose - epidemiologia. 4. *Mycobacterium leprae* - genética. 5. Análise de Sequência de DNA. 6. Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo. 7. Hanseníase - epidemiologia. 8. Resistência Microbiana a Medicamentos. 9. Humanos. 10. Animais. 11. Masculino. 12. Feminino. 13. Reação em Cadeia da Polimerase. 14. Clínica Médica – Tese. I. Boéchat, Neio Lucio. II. Suffys, Philip Noel. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. IV. Título.

Adalgiza da Silva Rocha

Doenças micobacterianas de relevância máxima:

I – Tuberculose humana e *Mycobacterium bovis*.

II – Hanseníase, recidiva, re-infecção e resistência bacteriana a drogas dos esquemas terapêuticos propostos pela Organização Mundial da Saúde.

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós - graduação em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em

Dr. Neio Lucio Boéchat

CPT, Instituto de Doenças do Tórax e Laboratório Multidisciplinar, HUCFF

Dr. José Roberto Lapa e Silva

CPT, Instituto de Doenças do Tórax e Laboratório Multidisciplinar, HUCFF-UFRJ

Dra. Maria Armanda M. da S. Vieira (Revisora)

Programa de Controle da Tuberculose Hospitalar (PCTH), HUCFF-UFRJ

Dra. Maria Leide W. de Oliveira

Dermatologia, HUCFF-UFRJ

Dra. Fernanda Carvalho de Queiroz Mello

Programa de Controle da Tuberculose Hospitalar (PCTH), HUCFF-UFRJ

Suplentes:

Dr. José Augusto Nery (Revisor)

Laboratório de Hanseníase, IOC, FIOCRUZ

Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Laboratório de Microbiologia Celular, IOC. FIOCRUZ.

"A minha filha Mariana e a minha mãe, pelo carinho, paciência, amor e por terem sobrevivido a essa caminhada, muito obrigada!"

“Toda competência e especialização no mundo nos setores de serviço, constituem o desenvolvimento da boa vontade. Bastam o sincero propósito de cooperação e a noção de responsabilidade para que sejamos iniciados, com êxito, em qualquer trabalho novo”.

Psicografado por Francisco Cândido Xavier
Pelo espírito de Andre Luis.

Agradecimentos.

Pedimos muito, queremos muito, exigimos muito, sempre...

Por isso é muito importante saber agradecer, agradeço a Deus todos os dias por ter permitido que eu chegasse até aqui... E...

Aos meus orientadores Dr. Philip Noel Suffys e Dr. Neio Lucio Fernandes Boéchat, por terem permitido que eu amadurecesse... Muito obrigada!

A Dra. Maria Leide por seu apoio, confiança, por acreditar... Eu poderia falar muitas coisas, mas não seriam suficientes... Muito obrigada!!!

A Dra. Euzenir Nunes Sarno, por ter me ensinado que para levarmos até o fim o que acreditamos certo, precisamos de capacidade, dedicação e determinação.

A Dra. Maria Cristina Pessolani, pelo apoio e ajuda sempre que lhe busquei.

Ao Dr. José Augusto Nery e a toda equipe do Ambulatório Souza Araujo, por estarem comigo em parte dessa empreitada. Muito obrigada!

Aos amigos, Patrícia, Atiná, Alexandre, Diego e Lia que estiveram comigo todo o percurso, os meus sinceros agradecimentos, não tenho palavras para expressar o quanto vocês foram fundamentais para a finalização deste estudo!

A Aline e Andressa que sempre estiveram presentes durante este longo percurso recebendo minhas placas sempre com sorrisos, muito obrigada a vocês e a plataforma de seqüenciamento da FIOCRUZ!

A minha família que sempre esteve presente me apoiando e dando ânimo para continuar.

Têm várias pessoas a quem gostaria de agradecer por toda a força e amizade durante esta caminhada, aos meus amigos e colaboradores, Maria Eugênia, Alice, Helen, Vânia, Márcia Aparecida, Antônio, Raquel, Marcio, Elizabete, Creusa, Luiz Clovis, Andrea, Alessandra, Anna Grazia, Daniel, Tereza Gouda, Paulo, Benedita...

Desculpem-me se esqueci alguém, foram tantas as pessoas que me ajudaram que com certeza posso ter deixado de citar algumas.

Muito obrigada!



Equipe.

Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias - FIOCRUZ

Rio de Janeiro.

Dr. Philip Noel Suffys

Bióloga Atiná Ribeiro Elias

Mestre Alexandre Araujo Cunha dos Santos

Biólogo Diego Fonseca

Bióloga Lia Lima Gomes

Centro de Pesquisa em Tuberculose (CPT), Instituto de Doenças do Tórax (IDT) e Laboratório Multidisciplinar, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dr. Neio Lucio Boéchat

Laboratório de Micobacteriologia – IDT - UFRJ

Anna Grazia Marsico

Faculdade de Medicina de Campos e Programa de Controle da Tuberculose, Campos dos Goytacazes RJ.

Dr. Luiz Clovis Parente

EMBRAPA Gado de Leite – Belo Horizonte – Minas Gerais.

Doutorando Marcio Roberto Silva

Laboratório Central- Hospital de Messejana- Secretaria de Saúde do estado do Ceará

Dra. Creusa L. Campelo

Dra. Elizabete C. Barroso

Curso de Pós-Graduação em Medicina – Dermatologia- HUCFF - UFRJ.

Dra. Maria Leide W. Oliveira

Laboratório de Hanseníase – Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Dra. Euzenir Nunes Sarno

Serviço de dermatologia Santa Casa de Misericórdia – EMESCAM – Vitória/ES, Marilda Vieira - Secretaria Estadual da Saúde - Espírito Santo

Dra. Lucia Martins Diniz

Centro de Referência Dermatologia Sanitária D. Libânia – CDERM - Ceará

Dra. Maria Araci Pontes Aires

Laboratório Dermato-Imunologia UEPA/Centro de Referência Marcelo Candia - Pará

Dr. Cláudio Guedes Salgado

Fundação de Dermatologia Tropical Alfredo da Matta – FUAM - Amazônia

Dra. Maria da Graça Cunha

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT - Amazônia

Dra. Ana Teresa Orsi

Resumo.

A tuberculose bovina é uma doença de distribuição global. No passado o *Mycobacterium bovis* era um agente freqüente de tuberculose humana, sobretudo devido ao consumo do leite não pasteurizado. Atualmente, a tuberculose humana resultante da infecção por *M. bovis* é rara, e ocorre quase que exclusivamente pela inalação de aerosol ou pela ingestão de leite contendo o bacilo. Investigou-se através de ferramentas de biologia molecular a existência de casos de tuberculose humana atribuíveis ao *Mycobacterium bovis*. Utilizou-se do estado do Rio de Janeiro 1427 isolados em cultura referentes a 701 pacientes e 303 lâminas de baciloscopias referentes a 140 pacientes, do estado do Ceará 285 isolados em cultura referentes a 279 pacientes; e de Minas Gerais 177 lâminas referentes a 97 pacientes. Investigou-se a presença de *M. bovis* utilizando a reação em cadeia da polimerase e análise de restrição dos genes *pncA*, *gyrB*, seqüenciamento do gene *rpoB* (resistência a rifampicina) e *spoligotyping*, e para confirmação de alguns perfis a análise da variabilidade de fragmentos repetitivos (MIRU/VNTR) nos isolados de cultura. Nas lâminas, após extrair-se o DNA com suspensão de Chelex, sequenciou-se os genes *oxyR* e *gyrA*. Apesar do grande número de amostra analisada, nenhum caso de *M. bovis* foi identificado, tanto nas culturas quanto nas lâminas. Todo material analisado foi identificado como *M. tuberculosis* e confirmou-se a importância epidemiológica nas regiões estudadas de famílias, tais como, LAM. H e T pelo *spoligotyping*. A segunda parte da tese trata da hanseníase, uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* e é um dos maiores problemas de saúde nos países da Ásia, América Latina e, África. Os dados da Organização Mundial de Saúde informam que as taxas de recidiva em hanseníase após os tratamentos poliquimioterápicos com duração fixa preconizada de acordo com a classificação operacional variam de 4.0% a 0.12% por ano. Estes dados estão sujeitos a críticas em virtude da falta de padronização de critérios para um caso de recidiva e pelas diferentes condições operacionais dos estudos. Como uma das causas

de recidiva é a resistência medicamentosa, investigamos a presença de mutações seqüenciando parte dos genes *rpoB*, *folP* I (associada com resistência a dapsona) e *gyrA* e *gyrB* (associadas a resistência ao ofloxacina). Para isto, extraímos DNAs de biopsias de pacientes com recidiva, enviadas de cinco estados brasileiros, Amazônia, Pará, Ceará, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Dos 230 pacientes com recidiva do estudo investigados para resistência medicamentosa, detectamos SNPs indicando resistência medicamentosa apenas em quatro pacientes (6,6%), um proveniente do estado do Pará, um proveniente do Espírito Santo e dois da Amazônia, foram observadas nos genes *folP*1 (códon 55) e no gene *rpoB* (códon 531) e dois pacientes (1 PA e 1 AM) foram MDR. A baixa prevalência de casos de resistência medicamentosa nos casos de recidiva em nosso estudo sugere que a MDR não seja a principal causa de re-adoecimento e, que outros fatores de risco estejam envolvidos. No futuro usaremos ferramentas adicionais de genotipagem molecular para investigarmos a existência de heteroresistência.

Abstract.

Bovine tuberculosis is a disease with global distribution. In the past, *Mycobacterium bovis* was a frequent infectious agent of human tuberculosis (TB), above all due to the consumption of unpasteurized milk. Nowadays, human TB, resulting from infection with *M. bovis* is rare and almost exclusively due to aerosol inhalation or ingestion of contaminated milk. We therefore investigated the contribution of *M. bovis* to human TB using molecular biology tools. From the state of Rio de Janeiro, we performed genotyping of 1427 *Mycobacterium* isolate cultures, referring to 701 patient, and 303 microscopic slides for bacterioscopy, from 140 patient. We also analyzed samples from other States of Brazil, including 285 cultures from 279 patient from Ceará and 177 samples from 97 patients of Minas Gerais. The presence of *M. bovis* was investigated using PCR and analysis of restriction of the genes *pncA* and *gyrB*, by sequencing of the gene *rpoB* (resistance the rifampin), and by spoligotyping and in some cases for genotype resolution, MIRU-VNTR typing. We also submitted bacterial slides to extracting of DNA using a suspension of Chelex-100 and performed sequencing the part of the genes *oxyR* and *gyrA*. In spite of the great number of analyzed sample, not a single case of *M. bovis* was identified in any of the cultures or the slides. All isolates were identified as *M. tuberculosis* and the epidemic importance was confirmed in the studied areas of families, such as, LAM. H and T for the spoligotyping. The second part of the thesis considers the evaluation of the contribution of drug resistance to leprosy relapse. Leprosy is a chronic infectious disease caused by infection with *M. leprae* and is a major health problem in several countries of Asia, Latin America and Africa. The World Health Organization informs that disease relapse after cure obtained by completion of multidrug therapy (MDR) varies between 4.0% and 0.12% per year. These data need confirmation due to the lack of standardization of criteria for a case of relapse and for

the different operational conditions of the studies. As one of the factors that could contribute to relapse is drug resistance, we investigated by sequencing for the presence of mutations in part of the genes *rpoB* (associated with resistance to rifampin); *folP* I (associated with resistance to dapsona) and *gyrA* and *gyrB* (associated with resistance to ofloxacin). For this, we performed DNA extraction of skin biopsy samples from patients diagnosed in five different States of Brazil, including Amazonia, Pará, Ceará, Espírito Santo and Rio de Janeiro. Among the 230 patients with confirmed disease relapse, we detected SNPs indicative for drug resistance in four (6.6%) cases only, one patient from Pará, another from Espírito Santo and two more from Amazonia. Mutations were observed in codon 55 of gene the *folP*1 and in codon 531 of the gene *rpoB*, two of the cases were MDR. The low level of drug resistance suggested by this experimental approach in relapse cases suggests that this is not the major contributor for developing the disease a second time and those other risk factors are involved. An additional genotyping approach for genotyping will be used in the future to verify the existence of heteroresistance.

Sumário.

1.	Introdução	25
1.1	Um Olhar sobre o Gênero <i>Mycobacterium</i>	25
2.	Revisão da literatura: O gênero <i>Mycobacterium</i> . Considerações taxonômicas e filogenéticas.	29
2.1	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	33
2.1.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
2.1.2	<i>Mycobacterium microtti</i> .	34
2.1.3	<i>Mycobacterium africanum</i> .	35
2.1.4	<i>Mycobacterium canettii</i> .	35
2.1.5	<i>Mycobacterium bovis</i> .	35
2.2.	Aspectos epidemiológicos.	39
2.2.1	<i>Mycobacterium bovis</i> , tuberculose bovina e humana	39
2.2.2	Aspectos imuno-patológicos e clínico-patológicos.	41
2.2.3	Ecologia e importância em medicina humana e veterinária.	41
2.2.4	Teste Cutâneo à Tuberculina (TST).	42
2.2.5	<i>Mycobacterium bovis</i> , bovinos, contagiosidade e infecciosidade.	43
2.2.6	<i>M. bovis</i> , contagiosidade e infecciosidade.	44
2.2.6.1	Transmissão para seres humanos.	44
2.2.6.2	Transmissão para o gado a partir de seres humanos.	45
2.2.6.3	Transmissão entre seres humanos.	46
2.2.6.4	Imunodepressão - incluindo a infecção pelo HIV – e seu impacto sobre a transmissão.	46
2.3	Teste de sensibilidade (TS).	47
2.4	Método das proporções.	47
2.5	Diagnóstico molecular e genotipagem.	48
2.5.1	Amplificação e polimorfismo do gene <i>pncA</i> .	48
2.5.2	Amplificação e detecção do polimorfismo do gene <i>oxyR</i>	49
2.5.3	Análise do gene <i>gyrB</i> - MTUB.	49
2.5.4	<i>Spoligotyping</i>	49
2.5.5	Unidades Repetitivas Intercaladas no genoma da Micobactéria – Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU).	50
2.6	Resistência em tuberculose.	50
2.7	<i>Mycobacterium leprae</i> , a doença lepra X hanseníase.	52
2.7.1	A hanseníase no Brasil.	54
2.7.2	Classificação da hanseníase:	56
2.7.3	Formas clínicas – abordaremos a classificação de Ridley e Jopling por ser uma classificação espectral e que deveria ser utilizada apenas em centro de referência.	57
2.7.3.1	Manifestações clínicas	57
2.7.3.2	Forma indeterminada (I).	57
2.7.3.3	Forma tuberculóide (TT).	57
2.7.3.4	Forma borderline tuberculóide (BT).	58
2.7.3.5	Forma borderline borderline (BB).	58
2.7.3.6	Forma borderline lepromatosa (BL).	58
2.7.3.7	Forma lepromatosa lepromatosa (LL).	58
2.8	Estados reacionais	59

2.9	Diagnóstico.	60
2.9.1	Exame baciloscópico.	60
2.9.1.1	O índice bacteriológico/baciloscópico (IB)	60
2.9.1.2	O índice morfológico (IM).	61
2.9.2	Tratamento da hanseníase: recidiva e resistência medicamentosa.	61
2.10	Mecanismos de ação dos antimicrobianos.	63
2.10.1	Primária.	65
2.10.2	Secundária ou adquirida.	65
2.10.3	Resistência à dapsona.	65
2.10.4	Resistência à rifampicina.	67
2.10.5	Resistência à ofloxacina.	68
2.10.6	Resistência à clofazimina.	69
3	Justificativa	70
4	Objetivo	71
4.1	Objetivo parte 1	71
4.2	Objetivo parte 2	71
5	Metodologia	72
5.1	Tipo de estudo 1 – <i>M. bovis</i> e tuberculose humana.	73
5.1.1	Amostras	73
5.1.2	Métodos de Micobacteriologia clássica: cultura, identificação de espécie e de resistência a drogas anti-tuberculosas..	74
5.1.2.1	Meio Löwenstein–Jensen	74
5.1.2.2	Meio Löwenstein-Jensen com piruvato.	75
5.1.2.3	Identificação de micobactérias a partir de uma cultura de micobactérias.	76
5.1.2.4	Método das proporções em Löwenstein-Jensen (L-J) - teste indireto.	76
5.1.2.5	Controles	77
5.1.3	Métodos de isolamento de DNA.	77
5.1.3.1	Extração rápida de DNA.	77
5.1.3.2	Extração de DNA de Lâminas de baciloscopia com suspensão de Chelex (ácido iminodiacético).	77
5.1.3.3	Método CTAB/NaCl para extração de DNA.	78
5.1.4	Métodos de diagnóstico molecular e de genotipagem.	78
5.1.4.1	Amplificação e polimorfismo do gene <i>pncA</i> .	78
5.1.4.2	Amplificação e detecção do polimorfismo do gene <i>oxyR</i>	79
5.1.4.3	Análise do gene <i>gyrB</i> – MTUB	80
5.1.4.4	<i>Spoligotyping</i>	80
5.1.4.5	Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU).	82
5.1.4.6	PCR e sequenciamento dos genes <i>rpoB</i> TB e <i>gyrA</i> TB.	83
5.1.5	Local do estudo	83
5.1.6	Comitê de ética	83
5.2	Estudo 2 – <i>M. leprae</i> e resistência medicamentosa.	85
5.2.1	Investigação de resistência em <i>M leprae</i> .	85
5.2.2	Recebimento das amostras clínicas.	85
5.2.3	Protocolo de recebimento de amostras	85
5.2.4	Processamento das amostras.	87
5.2.4.1	Purificação do DNA com Sephagles	87

5.2.4.2	Purificação do DNA através da utilização kit Qiagen DNeasy tecido (spin-coluna) N° catálogo 69506.	87
5.2.5	Métodos moleculares.	88
5.2.5.1	PCR e seqüenciamento dos genes <i>rpoB</i> , <i>folPI</i> , <i>gyrA</i> e <i>gyrB</i> de <i>M. leprae</i>	88
5.2.5.2	Metodologia de seqüenciamento.	90
5.2.5.3	Protocolo de purificação de Produto de PCR com acetato de amônio.	90
5.2.5.4	Precipitação do produto de seqüenciamento em placa.	90
5.2.5.5	Seqüenciamento e análise.	91
5.2.6	Local do estudo.	91
5.2.7	Comitê de ética.	91
5.2.8	Análise estatística	91
6	Resultados	92
6.1	Infecção humana com espécies do Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	93
6.1.1	Experimentos de controle.	93
6.1.2	Resultados do crescimento de isolados clínicos em meio Löwenstein-Jensen com glicerol e/ou piruvato.	94
6.1.3	Caracterização genética dos isolados recebidos do HUCFF-UFRJ Rio de Janeiro.	94
6.1.3.1	Amplificação e polimorfismo do gene <i>pncA</i> .	95
6.1.3.2	Análise do gene <i>gyrB</i> – MTUB	98
6.1.3.3	<i>Spoligotyping</i>	99
6.1.3.3.1	Rendimento, reprodutibilidade, qualidade dos perfis e composição genética da população.	99
6.1.3.4	Genotipagem: <i>Spoligotyping</i> e Mycobacterial interspersed repetitive units (<i>MIRU</i>)-Variable Number Tandem Repeat (<i>VNTR</i>) análise – Característica de transmissão.	103
6.1.4	Análise de isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> do Estado do Ceará.	109
6.1.4.1	<i>Spoligotyping</i> .	109
6.1.4.2	Análise do gene <i>rpoB</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	113
6.1.4.3	Deteção e Caracterização molecular de DNA extraído de lâminas de baciloscopia de pacientes com tuberculose do município de Campos dos Goytacazes – RJ e do estado de Minas Gerais.	118
6.1.4.3.1	Amostragem e características.	118
6.1.4.3.2	Caracterização genética.	119
6.1.4.4	Amplificação e detecção do polimorfismo do gene <i>oxyR</i> .	119
6.1.5	Biopsias.	121
6.1.6	Gene <i>gyrA</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	121
6.2	Resultados hanseníase	130
6.2.1	Hanseníase: casos diagnosticados como recidiva.	130
6.2.2	Análise genética.	131
6.2.2.1	Extração de DNA.	131
6.2.3	PCR e seqüenciamentos.	133
6.2.3.1	Gene <i>folP1</i> .	133
6.2.3.2	Gene <i>rpoB</i> .	135
6.2.3.3	Gene <i>gyrA</i> .	138
6.2.3.4	Gene <i>gyrB</i>	139

6.2.4	Pacientes com primeira biopsia (diagnóstico de hanseníase) e segunda biopsia após alta por cura (recidiva).	140
6.2.5	Amostra de pacientes com recidiva de hanseníase inoculada no coxim plantar de Balb/c.	143
6.2.6	Infecção de <i>M leprae</i> em tatu.	143
7	Discussão	151
7.1	Discussão parte 1.	151
7.2	Discussão parte 2	159
8	Conclusão.	167
8.1	Conclusões parte 1.	167
8.2	Conclusões parte 2	168
9	Limitações	169
9.1	Limitações parte 1	169
9.2	Limitações parte 2	169
10	Perspectivas	170
10.1	Perspectivas Parte 1	170
10.2	Perspectivas Parte 2	170
11	Referências	171
12	Artigos submetidos	191
12.1	Artigo 1 Submetido: Genotyping analysis did not evidence any contribution of infection with <i>Mycobacterium bovis</i> to human tuberculosis in Rio de Janeiro	192
12.2	Artigo 2 Submetido: Genotyping of <i>Mycobacterium leprae</i> from Brazilian leprosy patients suggest the occurrence of re-infection or of bacterial population shift during disease relapse.	218
13	Comitê de ética	239
13.1	Anexo 1 - Comitê de ética parte 1	240
13.2	Anexo 2 - Comitê de ética parte 2	241
14	Apêndice A	242
	Apêndice B	290
	Anexo 3 Sequência do gene <i>rpoB</i> do <i>M. tuberculosis</i>	297
	Anexo 4 Sequência do gene <i>oxyR</i> do <i>M. tuberculosis</i> .	298
	Anexo 5 Sequência do gene <i>rpoB</i> do <i>M. leprae</i> .	299
	Anexo 6 Sequência do gene <i>folP1</i> do <i>M. leprae</i> .	300
	Anexo 7 Sequência do gene <i>gyrA</i> do <i>M. leprae</i> .	300
15	Fichas de investigação de recidiva de hanseníase.	301

Abreviaturas.

hTb – Tuberculose humana

bTb – Tuberculose bovina

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*

MNT – Micobactéria não tuberculosa

MOTT – Micobactéria outras não tuberculosas

MTBC – complexo *Mycobacterium tuberculosis*

RFLP – Polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição

HPLC – Cromatografia de alta resolução

PRA – PCR e análise de restrição

TB – Tuberculose

PPD – Derivado protéico purificado

L-J – Löwenstein – Jensen

L-J Piruvato – Löwenstein – Jensen contendo piruvato

LAM – Latin-American and Mediterranean (LAM1-LAM11)

H – Haarlem

CAS – Central and Middle Eastern Asia

EAI – East-African Indian

T – família T (T1-T4)

X – família X, dividida em três famílias (X1, X2 e X3)

PB - Paucibacilar

MB - Multibacilar

I – Indeterminada

TT – Tuberculóide tuberculóide

BT – Borderline tuberculoide

BB – Borderline borderline

BL – Borderline lepromatoso

LL – Lepromatosa lepromatosa

ENH – Eritema nodoso hansênico

IB – Índice baciloscópico

IM – Índice morfológico

PQT – Poliquimioterapia

RMP – Rifampicina

R – rifampicina

I – Isoniazida

E – Etambutol

S – Estreptomicina

DDS – Diamino-diphenyl-sulfone (dapsona)

OFL – Ofloxacina

CLZ – Clofazimina

PABA – Ácido para-amino-benzóico

PCR – Reação em cadeia da polimerase

bp – pares de base

DNA – Ácido desoxiribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

dNTPs – Desoxinucleosídeos trifosfatos

SSCP – Polimorfismo em DNA de fita simples (Single Strand Conformation Polymorphism)

SNPs – Polimorfismos de base única (Single – nucleotide polymorphism)

MS – Ministério da Saúde

SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação

PNCH – Programa Nacional de Controle da Hanseníase

Lista de Tabelas, Fluxograma, Quadros e Gráficos.

Tabela 1.	Situação da infecção por <i>M bovis</i> .	38
Tabela 2	Aspectos imunológicos associados à infecção por <i>M. bovis</i> em diferentes espécies de animais.	41
Tabela 3	Características clínicas – patológicas da infecção por <i>M. bovis</i> em diferentes espécies.	41
Tabela 4	Casos novos de hanseníase detectados em 2007.	54
Tabela 5	Correlação entre as classificações de Madrid, Ridley & Jopling e OMS.	56
Tabela 6	Percentual de recidivas de hanseníase no total de entradas no SINAN entre casos novos 2001 – 2008.	63
Tabela 7	APÊNDICE A. Perfil das famílias de <i>spoligotyping</i> identificado nas amostras do HUCFF-UFRJ.	242
Tabela 8.	Famílias identificadas pelo <i>spoligotyping</i> nos isolados analisados do HUCFF-UFRJ.	100
Tabela 9	Tipos dentro da família LAM9 que circulam no Rio de Janeiro.	102
Tabela 10 A	Frequência de <i>clusters</i> idênticos <i>versus clusters</i> diferentes dos pacientes do HUCFF-UFRJ de acordo com os perfis de classificação do <i>spoligotyping</i> .	104
Tabela 10 B	Infecções com diferentes tipos de uma mesma família.	104
Tabela 11	Diferentes famílias encontradas no <i>spoligotyping</i> e perfil de MIRU de 36 pacientes.	105
Tabela 12	Famílias identificadas pelo <i>spoligotyping</i> nos isolados do Ceará.	110
Tabela 13	Tipos dentro da família LAM6 que circulam no Ceará.	112
Tabela 14	Pacientes com índice de baciloscopia (1+ a 3+) – Campos dos Goytacazes	118
Tabela 15	Pacientes com índice de baciloscopia (1+ a 3+), Minas Gerais	118
Tabela 16	Resultado do seqüenciamento do gene <i>oxyR</i> das lâminas de Campos dos Goytacazes.	119
Tabela 17A-B	Resultado do seqüenciamento gene <i>oxyR</i> das amostras enviadas de Minas Gerais	120
Tabela 18A	Pacientes de Campos de Goytacazes	124

Tabela 19	Resultado de seqüenciamento do gene <i>folP1</i> de DNA de biopsias com IB conhecido.	132
Tabela 20	Resultado de seqüenciamento do gene <i>rpoB</i> de DNA de biopsias com IB conhecido.	135
Tabela 21	Resultado de seqüenciamento do gene <i>gyrA</i> de DNA de biopsias com IB conhecido.	138
Tabela 22	Resultado de seqüenciamento do gene <i>gyrB</i> de DNA de biopsias com IB conhecido.	139
Tabela 23	Pacientes com duas biopsias (1ª. diagnóstico e 2ª. recidiva).	141
Tabela 24	Resultado de seqüenciamento das amostras recebidas de pacientes com recidiva de hanseníase.	145
Fluxograma	Isolamentos nos meios Löwenstein-Jensen (L-J) glicerol e L-J piruvato	95
Quadro 1	Espécies de micobactérias segundo diferentes classificações fenotípicas..	31
Quadro 2	Concentrações de cloreto de magnésio utilizadas nos PCRs.	82
Quadro 3	Taxa de detecção de casos novos por estado envolvido no estudo	84
Quadro 4	Crescimento de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> nos vários meios de cultura utilizados no estudo.	93
Quadro 5	Mutações encontradas no gene <i>rpoB</i> do <i>M. tuberculosis</i> após amplificação e seqüenciamento	114
Quadro 6	Mutações encontradas no gene <i>rpoB</i> do <i>M. tuberculosis</i>	117
Gráfico 1	Distribuição da endemia – hanseníase – no Brasil.	55
Gráfico 2	Famílias identificadas pelo <i>spoligotyping</i> nos isolados analisados do	101

HUCFF-UFRJ.

Gráfico 3	Tipos dentro da família LAM9 que circulam no Rio de Janeiro.	103
Gráfico 4	Famílias identificadas pelo <i>spoligotyping</i> nos isolados do estado do Ceará.	111
Gráfico 5	Tipos dentro da família LAM6 que circulam no Ceará.	112
Gráfico 6	Resultado de PCR e seqüenciamento do gene <i>rpoB</i> das culturas previamente identificadas pelo método das proporções.	113

Lista de Figuras.

Figura 1	Pioneiros na pesquisa da tuberculose.	33
Figura 2	Ciclo da transmissão do <i>M. bovis</i> entre o gado e humanos.	45
Figura 3	O <i>M. leprae</i> corado pelo método Ziehl-Neelsen (Z-N).	52
Figura 4	A descoberta dos antibióticos.	64
Figura 5	Alvos na bactéria e agente antimicrobiano.	64
Figura 6	Região do genoma do <i>M. leprae</i> que contém o gene <i>folP1</i> .	66
Figura 7	Região do genoma do <i>M. leprae</i> que contém o gene <i>rpoB</i> .	67
Figura 8	Região do genoma do <i>M. leprae</i> que contém o gene <i>gyrA</i> .	68
Figura 9	Gene <i>pncA</i> e localização dos iniciadores utilizados no PCR.	79
Figura 10	Algoritmo de diferenciação dos membros do complexo <i>M. tuberculosis</i> .	80
Figura 11	Perfis de spoligotyping de <i>M. bovis</i> .	81
Figura 12	Produtos amplificados de MIRU-VNTR locus 24 em gel de agarose 2%.	83
Figura 13	Cromatograma	90
Figura 14 A	Culturas em meio L-J glicerol – controles.	93
Figura 14 B	Culturas em meio L-J piruvato – controles.	94
Figura 15 A	PCR e restrição do gene <i>pncA</i> de culturas provenientes de humanos.	96
Figura 15 B	PCR e restrição do gene <i>pncA</i> de culturas provenientes de bovinos e búfalos.	96
Figuras 15 C	O <i>M. tuberculosis</i> identificado em amostra isolada de bovino e búfalo pelo método <i>pncA</i> .	97
Figura 16	O <i>M tuberculosis</i> identificado pelo método MTUB – produtos amplificados digeridos pela enzima <i>Rsa I</i> .	98
Figura 17	Perfil de restrição do <i>M. bovis</i> e do <i>M. tuberculosis</i> digeridos pela enzima <i>Rsa I</i> .	99
Figura 18	Mutações encontradas no gene <i>rpoB</i> do <i>M tuberculosis</i> após amplificação e seqüenciamento de um fragmento de 289 bp.	114
Figura 19	Seqüência do gene <i>oxyR</i> diferenciando o <i>M. bovis</i> e do <i>M. tuberculosis</i> .	121
Figura 20	Seqüência do gene <i>gyrA</i> de DNA de <i>M. tuberculosis</i> extraído de	122

	lâmina.	
Figura 20A	Seqüências de <i>M. tuberculosis</i> com Citosina ou Guanina no nucleotídeo 95.	123
Figura 21A, B e C	PCR de DNA extraído de biopsia em diferentes meios de conservação.	130
Figura 22	Gradiente de temperatura de anelamento – PCR gene <i>rpoB</i> .	131
Figura 23	Controles positivos para o gene <i>folP1</i> .	133
Figura 24	Mutação no gene <i>folP1</i> localizada no códon 55 – paciente 147R.	133
Figura 25	Picos duplos em seqüência do gene <i>folP1</i> .	134
Figura 26A, B, C e D	Mutação no gene <i>rpoB</i> localizada no códon 531 – pacientes 147R, 164R, 185R e 195R.	136-137
Figura 27	Teste de sensibilidade do PCR gene <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i> .	137
Figura 28A	SNP encontrada na seqüência do gene <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i> .	140
Figura 28B e C	SNP encontrada na seqüência do gene <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i>	141
Figura 29	Seqüência do gene <i>rpoB</i> de <i>M. leprae</i> de DNA extraído de coxim plantar de camundongo Balb/c.	142
Figura 30	SNP na seqüência do gene <i>gyrA</i> de <i>M. leprae</i> de DNA extraído de Tatu encontrado livre no ambiente no Ceará.	143

1 Introdução

1.1 Um Olhar sobre o Gênero *Mycobacterium*.

A família *Mycobacteriaceae* compreende somente um gênero; *Mycobacterium*, que foi introduzido por Lehmann e Neumann (“Atlas de Bacteriologia”, 1896) para incluir as espécies causadoras da hanseníase (lepra) e da tuberculose (TB), bactérias que haviam sido classificadas respectivamente como *Bacterium leprae* e *Bacterium tuberculosis*. O nome *Mycobacterium*, foi derivado do modo como o bacilo da TB cresce, como uma película de mofo na superfície de meio líquido (WRITGHT & WALLACE, 1994).

Há séculos especula-se a propósito de uma possível associação entre a *phthisis*, consunção ou tuberculose humana (hTb) e uma forma definida de doença crônica, debilitante do gado, hoje conhecida como tuberculose bovina (bTb).

A hTb é considerada o maior problema de saúde pública do mundo. Na América, a tuberculose parece ter chegado antes de Colombo e outros europeus; como e quando a doença chegou ao Novo Mundo ainda não é conhecido. Significativamente, lesões tuberculosis-like são encontradas em "fragmentos" de comunidades baseada na agricultura e raro em alguns grupos de caçadores e coletores que presumivelmente foram menos expostos ao grupo. Fica assim claro que tuberculose, é uma doença dependente da densidade populacional (POTER & MCADAM, 1993).

Em termos históricos e contemporaneidade, o *Mycobacterium tuberculosis* é indiscutivelmente o mais bem sucedido patógeno humano. A Paleoarqueologia molecular demonstrou o *M. tuberculosis* como causador de lesões em múmias com mais de 5000 anos (KATO-MAEDA, 2001).

No início do século XIX a ocorrência de linfadenopatias cervicais em crianças - então conhecida sob a denominação de escrófula - foi claramente relacionada com o consumo de leite de vaca por Camichael em 1810. Pouco depois, os trabalhos de R. Laennec e P. Louis em 1825 propunham a discriminação entre TB e outras condições clínicas pulmonares. Mais que isto, fundamentados na existência do tubérculo como lesão antomo-patologica comum, propuseram ainda a unificação conceitual da *phthisie* pulmonar, da linfadenite cervical

crônica, do tumor branco dos ossos e de algumas outras doenças menos freqüentes. Na segunda metade do séc. XIX, J. A. Villemin publicou em 1868 os resultados de seus experimentos – realizados em coelhos inoculados com material provenientes de lesões tuberculosas - que demonstraram a transmissibilidade tanto da hTb quanto da bTb. Ainda no século XIX, o isolamento do bacilo da tuberculose por Robert Koch estabeleceu o fim da longa controvérsia sobre a identidade nosológica e a contagiosidade da *phtisis*.

Paradoxalmente, um dos maiores obstáculos ao estabelecimento dos programas de controle e eliminação da tuberculose bovina resultou justamente de uma afirmação de Robert Koch. Em 1898, T. Smith publicou certas diferenças que ele havia observado entre o bacilo da tuberculose originário de humanos e de bovinos. Neste mesmo trabalho, ele denominou-os como bacilos da tuberculose variantes bovina e humana; apesar de reconhecer que o poder de causar infecção e doença destes patógenos não estariam restritos a seus respectivos hospedeiros primários. Entretanto, pouco depois - durante o Congresso Britânico de Tuberculose em 1901 - Koch afirmaria que os humanos eram tão resistentes ao bacilo da TB de origem bovina que eventuais medidas de controle da propagação da infecção bovina ao homem eram desnecessárias. Apesar da enorme reputação desfrutada por Robert Koch no meio médico e científico, muitos veterinários presentes ao Congresso de 1901 estavam convencidos do contrário e, com o apoio do cirurgião (correspondente e amigo de L. Pasteur) J. Lister, foram capazes de convencer o governo britânico a estabelecer uma comissão com a finalidade de analisar esta questão (Royal Commission on Tuberculosis, 1901). Após 10 anos de trabalho, os comissionados estabeleceram que, indubitavelmente, as populações humanas eram suscetíveis ao bacilo da tuberculose de origem bovina. Assim, estes estudos estão na origem das políticas sanitárias anteriores de teste diagnóstico e sacrifício do animal contaminado (*test-and-slaughter*) visando a erradicação da tuberculose bovina. Esta política de teste e sacrifício associada à pasteurização do leite constitui, sem dúvida, uma das mais bem sucedidas campanhas de controle de uma doença bacteriana (GRANGE, 2001).

O *M. bovis* afeta principalmente o gado. Uma das maiores razões apontadas para justificar o grande interesse despertado pela tuberculose bovina é, sem dúvida, a susceptibilidade humana ao mesmo agente causal, *M. bovis*. Esta informação é atualmente tão óbvia e bem reconhecida que muitas vezes parece difícil apreciar o enorme esforço empenhado tanto no estabelecimento deste fato quanto na concepção de medidas práticas de profilaxia da infecção e do adoecimento (GRANGE, 2001; MODA e cols., 1996).

Infelizmente em várias nações a hanseníase é ainda endêmica, entre eles o Brasil, Índia e o continente Africano. É uma bactéria com forma de bacilo, álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório. O *M. Leprae* tem crescimento extremamente lento quando comparado com o de outras bactérias. O *M. leprae* é capaz de infectar grande número de pessoas (alta infectividade), mas poucos adoecem, (baixa patogenicidade). O poder imunogênico do bacilo é responsável pelo alto potencial incapacitante da hanseníase (WHO, 1989).

O homem tem sido reconhecido como a principal fonte de infecção, e até agora o mais importante reservatório para saúde pública. Outros reservatórios, ainda em estudo, estão sendo investigados, como alguns animais, em especial o tatu (*Dasypus novemcinctus*) (KERR-PONTES e cols., 2004; MATSUOKA, e cols., 1999; MEYERS, 1992).

Diferentes das espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*, as micobactérias não – tuberculosas (MNT) podem se subdividir em diferentes espécies variando, divergência evolucionária, características bioquímica, apresentação clínica, relevância clínica e susceptibilidade a antibióticos. As MNT são geralmente de vida livre no ambiente. As doenças causadas por MNT são conhecidas como micobacterioses, e consideradas oportunistas.

O gênero *Mycobacterium* contém quatro grupos de micobactérias patogênicas para seres humanos, que podem ser identificados com base genética, morfológica, clínica e por suas características epidemiológicas.

1. Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. cannetii*, *M. pinnipedii* e *M. microti*).
2. *M. leprae*.
3. MNT de crescimento lento (fotocromogênicas, escotocromogênicas e noncromogênicas ou grupo de Runyon I, II e III, respectivamente).
4. Micobactérias de crescimento rápido (grupo de Runyon IV).

Atualmente se tem conhecimento de mais de 100 espécies (AUSINA e cols., 1992; KIRSCHNER e cols., 1992; BUTLER e cols., 1993; SPRINGER e cols., 1993; DOMENECH e cols., 1999; SCHRÖDER e cols., 1997; SOINI & MUSSER, 2001; BROWN-ELLIOTT e cols., 2002). Quadro 1.

A identificação das micobactérias foi tradicionalmente baseada em testes bioquímicos e na característica de crescimento. No entanto, como a micobactéria se multiplica lentamente esta identificação pode demorar semanas.

Com a introdução de novos métodos de identificação, sequenciamento do 16S DNA ribossomal, cromatografia de alta resolução (HPLC), PCR e análise de restrição do gene *hsp65* (PRA), o número de novas espécies de MNT tem aumentado dramaticamente nos últimos anos, com a identificação recente de espécies, tais como, *M. genavense*, *M. interjection*, *M. triplex*, *M. celatum* e *M. lentiflavum* (BROWN-ELLIOTT e cols., 2002).

2 Revisão da literatura: O gênero *Mycobacterium*. Considerações taxonômicas e filogenéticas.

O gênero *Mycobacterium* (Gr. n. *myces*, cogumelo; Gr. neut. dim. n. *bakterion*, bastonete; M. L. neut. n. *Mycobacterium*, cogumelo em forma de bastonete) está certamente entre os *taxa* bacterianos mais importantes sob o ponto de vista médico e, igualmente entre os mais intensamente estudados. As micobactérias pertencem à ordem dos *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*.

A história taxonômica do gênero *Mycobacterium* é complexa e imbricada, particularmente com, *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Foi em 1896 que Lehmann e Neumann propuseram o gênero *Mycobacterium* incluindo os bacilos da hanseníase (lepra) e da tuberculose, anteriormente classificados como sendo *Bacterium leprae* e *Bacterium tuberculosis*. Posteriormente, algumas centenas de espécies micobacterianas foram descritas, entretanto apenas 41 foram incluídas na “Approved Lists of Bacterial Names”, publicadas no *International Journal of Systematic Bacteriology* (Skerman V. B. D. e cols., 1980). Atualmente, mais de uma centena de espécies são descritas e consideradas por muitos como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*. Entretanto, uma recente revisão considera 85 espécies micobacterianas como convenientemente validadas (RASTOGI e cols., 2001).

As micobactérias são bactérias em forma de bastonetes, que raramente formam ramificações. Estas células são caracterizadas por uma propriedade tintorial: a álcool-ácido resistência. A exceção do *M. leprae* e do *M. lepraemurium*, ainda com dificuldades para serem cultivadas *in vitro*, as micobactérias são distribuídas em dois grandes grupos taxonômicos segundo suas velocidades de crescimento em condições ótimas de cultura. As micobactérias de crescimento rápido apresentam um tempo de geração de 2 a 5 horas e formam colônias visíveis em meio sólido em 7 dias (ou menos), enquanto as micobactérias ditas como de crescimento lento apresentam um tempo de geração médio de 24 horas e necessitam de mais de uma semana para formarem uma colônia (BROSCH e cols., 2004).

Desde o fim do século XIX, o enorme interesse despertado pelo bacilo de Koch foi responsável pelo viés clínico que favoreceu a idéia de subdivisão taxonômica das micobactérias fundamentada essencialmente nos vínculos destas bactérias com *M. tuberculosis*. Deste fato decorre a ampla utilização, ainda hoje, das denominados

micobactérias atípicas e anteriormente micobactérias outras não tuberculosas para as micobactérias que não são identificáveis como *M. bovis* ou *M. tuberculosis*. Somente na década de 1950 foi proposta uma classificação para as micobactérias. Assim, segundo Runyon, as micobactérias atípicas, anônimas ou não classificadas são artificialmente divididas em 4 grupos, conforme suas velocidades de crescimento e produção de pigmentos Quadro 1 (RUNYON, 1959) Quadro 1 – espécies de micobactérias segundo diferentes classificações fenotípica.

Quadro 1 – espécies de micobactérias segundo diferentes classificações fenotípica.

Espécies de micobactérias. Classificação de Runyon Pigmentadas de crescimento lento <i>M. bohemicum</i> <i>M. celatum</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. doricum</i> <i>M. heckeshornense</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. intermedium</i> <i>M. kubicae</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. palustre</i> <i>M. tsucia</i> Não-pigmentadas de crescimento lento <i>M. branderi</i> <i>M. tuberculosis complex, "M. canettii"</i> <i>M. genavense</i> <i>M. heidelbergense</i> <i>M. locus</i> <i>M. shottsii</i> <i>M. triplex</i> Pigmentadas de crescimento rápido <i>M. elephantis</i> <i>M. hassiacum</i> <i>M. novocastrense</i> Não-pigmentadas de crescimento rápido <i>M. abscessus</i> <i>M. alvei</i> <i>M. brumae</i> <i>M. confluens</i> <i>M. goodii</i> <i>M. holsaticum</i> <i>M. immunogenum</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. septicum</i> <i>M. wolinskyi</i> Espécies exclusivamente ambientais <i>M. botniense</i> <i>M. chlorophenolicum</i> <i>M. cookii</i> <i>M. frederiksbergense</i> <i>M. hiberniae</i> <i>M. hodleri</i> <i>M. madagascariense</i> <i>M. murale</i> <i>M. vanbaalenii</i> <i>Micobactéria "virtual"</i> <i>"M. visibilis"</i> Novas espécies <i>M. avium subsp. avium</i> <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> <i>M. avium subsp. silvaticum</i> <i>M. avium subsp. hominissuis</i> <i>M. bovis subsp. caprae</i> <i>M. pinipedii</i>	Espécies de micobactérias. Classificação de Woods & Washington Patogênicas <i>M. tuberculosis</i>; <i>M. bovis</i>; <i>M. leprae</i>; <i>M. africanum</i>; <i>M. avium</i>; <i>M. celatum</i>; <i>M. farcinogenes</i>*; <i>M. genavense</i>; <i>M. haemophilum</i>; <i>M. interjectum</i>; <i>M. intermedium</i>; <i>M. intracellulare</i>; <i>M. kansasii</i>; <i>M. abscessus</i>; <i>M. chelonae</i>; <i>M. fortuitum</i>; <i>M. peregrinum</i>; <i>M. porcinum</i>; <i>M. senegalense</i>; <i>M. lepraemurium</i>*; <i>M. malmoense</i>; <i>M. marinum</i>; <i>M. microti</i>*; <i>M. paratuberculosis</i>*; <i>M. scrofulaceum</i>; <i>M. shimoidei</i>; <i>M. simiae</i>; <i>M. szulgai</i>; <i>M. ulcerans</i>; <i>M. xenopi</i>. Não-patogênicas <i>M. asiaticum</i>; <i>M. Aichiense</i>; <i>M. alvei</i>; <i>M. aurum</i>; <i>M. austroafricanum</i>; <i>M. brumae</i>; <i>M. chitae</i>; <i>M. chubuense</i>; <i>M. confluens</i>; <i>M. diernhoferi</i>; <i>M. duvali</i>; <i>M. fallax</i>; <i>M. flavescens</i>; <i>M. gadium</i>; <i>M. gilvum</i>; <i>M. komossense</i>; <i>M. madagascariense</i>; <i>M. methulovorum</i>; <i>M. moriokaense</i>; <i>M. neoaurum</i>; <i>M. obuense</i>; <i>M. parafortuitum</i>; <i>M. phlei</i>; <i>M. poriferae</i>; <i>M. pulveris</i>; <i>M. rhodesiae</i>; <i>M. shanghaiense</i>; <i>M. smegmatis</i>; <i>M. mageritense</i>; <i>M. sphagni</i>; <i>M. thermoresistibile</i>; <i>M. tokaiense</i>; <i>M. vaccae</i>; <i>M. yunnanense</i>; <i>M. cookie</i>; <i>M. gastri</i>; <i>M. gordonae</i>; <i>M. hiberniae</i>; <i>M. nonchromogenicum</i>; <i>M. terrae</i>; <i>M. triviale</i>. Novas espécies <i>M. hassiacum</i>; <i>M. celatum</i>; <i>M. mageritense</i>; <i>M. heidelbergense</i>; <i>M. genavense</i>; <i>M. holderi</i>; <i>M. novocastrense</i>; <i>M. pinnipedii</i>*; <i>M. lepromatosis</i>. * Geralmente patogênicas para animais. Modificada de Shinnick & Good, 1994. Classificação fenotípica das micobactérias de acordo com o esquema simplificado de Runyon (1959). Reproduzida de: Tortoli (2003). Classificação fenotípica segundo critérios de patogenicidade de acordo com o esquema de Woods & Washington (1987).
--	--

Depois do estabelecimento das classificações fenotípicas, as micobactérias foram classificadas de acordo com critérios genéticos. O DNA micobacteriano apresenta um elevado percentual de guanina (G) e de citosina (C), que varia de 62 a 70%, exceto no caso de *M. leprae* cujo cromossoma contem 58% de G+C. Tanto o sequenciamento do RNAr 16S de muitas espécies micobacterianas quanto o posterior sequenciamento do genoma completo de diferentes micobactérias permitiram demonstrar que suas seqüências nucleotídicas são muito semelhantes. Mais que isto, confirmaram que a divisão das micobactérias segundo suas velocidades de crescimento corresponde efetivamente a uma segregação filogenética (SHINNICK & GOOD, 1994; COLE e cols., 1998; BROSCHE e cols., 2001).

Os genomas micobacterianos são constituídos de um único cromossoma circular de 4.4 megabases (Mb), 4.35 Mb e 2.8 Mb respectivamente para *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG Pasteur e *M. leprae*. O genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, a cepa de referência mais amplamente utilizada em experimentação e que conservou sua virulência para animais de laboratório desde seu isolamento em 1905, é composto de 4.411.529 pares de bases (Brosch e cols., 2001). Este genoma exibe um conteúdo médio de G+C de 65,6%, e certas regiões apresentam um conteúdo de G+C superior a 80%. Ele apresenta uma elevada capacidade de codificação (superior a 90%), comparável ao do genoma de outras bactérias sequenciadas. A análise de bio-informática permitiu a identificação de 50 genes que codificam RNAs estáveis e 3924 genes que codificam proteínas (COLE e cols., 1998).

A recente publicação do genoma completo de *M. bovis* abre novas possibilidades para a pesquisa voltada para o desenvolvimento de ferramentas eficazes no controle da bTb. O genoma de *M. bovis* é 99.95% idêntico ao genoma de *M. tuberculosis* (seqüência de nucleotídeos) mostrando co-linearidade e ausência de importantes translocações, duplicações ou inversões. As 11 regiões de deleções (RDs 1-11) previamente descritas (entre 1-12.7 kb), foram confirmadas pelo sequenciamento (GARNIER e cols., 2003).

A diferenciação genética do complexo *M. tuberculosis*, tem sido baseada nos princípios de hibridização. São utilizados fragmentos do gene RNAr 23S, do gene *gyrB*, e região RD específica-espécie (RICHTER e cols., 2003).

2.1 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

As manifestações clínicas da tuberculose representam um complexo de interações entre o organismo causador, *M. tuberculosis*, e a resposta imune do hospedeiro. O teste da tuberculina foi inicialmente utilizado com o objetivo de cura em pacientes com tuberculose, mas logo se verificou que não era efetivo.



Mas devido a sua importância em identificar indivíduos com TB, Robert Koch ganhou o prêmio Nobel em 1905. Embora Robert Koch tenha ficado frustrado e envergonhado pela tuberculina não ter efeito de cura, ele demonstrou pela primeira vez, a resposta imune mediada por célula que ainda hoje tem importância para o diagnóstico epidemiológico da TB (HERZOG & BASEL, 1998; SCHLUGER, 2005).

Figura 1. Pioneiros na pesquisa da tuberculose (H. Herzog & Basel 1998).

O complexo *M. tuberculosis* inclui membros que são patógenos exclusivos do homem (*M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canetti*); um patógeno de roedores (*M. microti*); em leão marinho (*M. pinnipedii*); o *M. bovis* que causa tuberculose no gado e em outros animais, podendo infectar também o homem; o *M bovis* Bacille Calmette – Guérin (BCG), um isolado atenuado que é usado para vacinação (HUARD e cols., 2006; PEREIRA e cols. 2007).

Cada membro do complexo *M tuberculosis* está associado com um hospedeiro específico, embora infecções em hospedeiros alternativos ocorram (GILLESPIE, 2007; COUSINS e col., 2003).

2.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*.

Há uma década, a Organização Mundial da Saúde (OMS) - <http://www.who.int/health-topics/tb.htm> - declarou a TB em estado de emergência no mundo, sendo ainda hoje a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos. Segundo estimativas da OMS, dois bilhões de pessoas correspondendo a um terço da população mundial, está infectada pelo *M. tuberculosis*. Destes, 8 milhões desenvolverão a doença e 2 milhões morrerão a cada ano. O Brasil ocupa o 18º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 82.000 casos novos e 6.000 óbitos ocorrendo anualmente, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), correspondendo a um coeficiente de incidência de 42/ 100.000 habitantes no Brasil. O aumento ou diminuição de casos de TB tem sido dependente da situação econômica do país e a piora da TB em certas áreas do mundo tem sido associada à infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o surgimento de micobactérias multidrogas resistente (TSUYUGUCHI, 1996).

Um terço da população mundial está infectada com o *M. tuberculosis* sem demonstrar sintomas. Estudos demonstraram que sexo masculino, historia familiar de TB, tabagismo, má nutrição, uso de esteróides, tratamento de câncer e, infecção com HIV são fatores de risco para infecção por *M. tuberculosis*. O tabagismo e infecções virais reduzem a atividade ciliar e produção de muco por células, à primeira linha de defesa das vias respiratórias, aumentando a susceptibilidade ao *M. tuberculosis* (LEVIN & NEWPORT, 2000; LEINHARDT e cols.2003 e 2005).

2.1.2 *Mycobacterium microti*.

Descrito em 1937 por Wells, *M. microti* foi inicialmente denominado *M. tuberculosis* subsp. *muris* e mais tarde também conhecido como “*vole bacillus*”. O *M. microti* raramente é encontrado e pode ser considerado um biovariante ou patovariante do *M. tuberculosis*; baseado apenas em testes bioquímicos é difícil distingui-lo dos demais componentes do complexo *M. tuberculosis*. Não foi possível a caracterização bioquímica de isolados de pacientes na Holanda, devido ao seu crescimento extremamente lento em Löwenstein-Jensen; a identificação é feita utilizando técnicas, tais como, IS6110-RFLP e “spoligotyping” (VAN SOOLINGEN, 1998; WAYNE, 1984).

2.1.3 *Mycobacterium africanum*.

O *M. africanum* foi descrito por Castets e colaboradores em 1968. A cepa tipo (ATCC 25420) foi isolada de escarro de um paciente com tuberculose no Senegal, considerado um “biovariante” do *M. tuberculosis*. Esta espécie tem grande variabilidade nas características bioquímicas, ocupando uma posição intermediária entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* (WOLINSKY, 1980; WAYNE, 1984). Collins e colaboradores usando a redução de nitrato dividiram o *M. africanum* em dois grupos, African I (negativo) e African II (positivo); os isolados pertencentes ao grupo I geralmente associado com o Oeste da África, e grupo II associados ao Leste africano, embora já se tenha identificado os dois grupos em igual proporção na Guiné Bissau – oeste africano. Raramente isolado em outros continentes e em modelos experimentais, o *M. africanum* é menos virulento quando comparado com o *M. tuberculosis* (FROTHINGHAM e cols 1999).

2.1.4 *Mycobacterium canettii*.

Um “taxon” novo pertencendo ao complexo *M. tuberculosis*: o *M. canettii* (VAN SOOLINGEN e cols., 1997). Este organismo tem a sequência do 16S rRNA e o comportamento bioquímico idêntico ao *M. tuberculosis*, mas difere na morfologia e na velocidade de crescimento. Além disto, uso de marcadores genéticos como, por exemplo, a sequência de inserção IS1081 indica que o *M. canettii* é um “taxon” separado. Com base em critérios moleculares, sugere-se neste trabalho que os membros do MTBC pertencem a uma única espécie, chamada de “*M. tuberculosis*”. O nicho ecológico e o mecanismo de transmissão de *M. canettii* são ainda desconhecidos.

2.1.5 *Mycobacterium bovis*.

A tuberculose bovina, doença contagiosa, causada pelo *M. bovis*, é uma zoonose que tem como principal reservatório os bovinos, mas infecta uma grande variedade de espécies animais. Há 100 anos era bastante comum doença pulmonar causada por *M. bovis*, hoje rara, devido ao processo de pasteurização do leite, o extermínio gado infectado e a ausência de um hospedeiro selvagem. Pessoas imunologicamente deprimidas podem ser infectadas pelo *M. bovis* ao beber leite contaminado ou por permanecerem em ambiente fechado contendo gado

com doença pulmonar, os principais sítios afetados em caso de doença disseminada são: a medula e as articulações. O *M. bovis* pode causar tuberculose pulmonar indistinguível do *M. tuberculosis* (SAURET e cols., 1992; WRIGHT & WALLACE, 1994; WOLINSKY, 1980; OLIVEIRA e cols., 2008). Embora infecção pulmonar causada pelo *M. bovis* aparentemente tenha sido erradicada na América Latina e grandes cidades do mundo, casos de pacientes imunologicamente deprimidos com tuberculose proveniente de *M. bovis* têm sido relatados na Inglaterra, França, Espanha e nos Estados Unidos (BLÁZQUEZ e cols. 1997; GUERRERO e cols. 1997; GUTÉRREZ e cols. 1997). Além disto, existem relatos de *M. bovis* multi-resistente (MDR) (GUERRERO e cols., 1997; THOEN, LOBUE & DE KANTOR, 2006).

No Brasil a doença é endêmica, e afeta cerca de 20% das propriedades de rebanho leiteiro. Sendo a transmissão normalmente respiratória, o confinamento predispõe à doença, que assim, atinge mais o gado de leite de estábulo, do que o gado de corte, usualmente criado em sistema extensivo. No Estado do Rio de Janeiro identificou-se 12,7% de positividade para bTb (LILENBAUM e cols., 1998) e, no Sul do país, a doença foi detectada em 60% dos municípios testados (RICCETTI e cols., 1989), com 40 isolamentos de *M. bovis* (ANDRADE e cols., 1991).

Curiosamente, são excepcionalmente raros os casos de tuberculose humana relacionados à *M. bovis* no Brasil em geral e no Rio de Janeiro em particular. Sabe-se que a incidência era elevada nas primeiras décadas do século passado. Há referência de um caso na Guanabara (Rio de Janeiro) em 1938, cujo paciente apresentava alterações intestinais. No Rio Grande do Sul, em 1940, foram identificados quatro casos; em São Paulo em 1941, foram identificados 16 casos (13,2%) de *M. bovis* em 121 pacientes com meningite tuberculosa; e em Minas Gerais em 1955, foram identificados 2 casos (3,8%) de *M. bovis* em 52 pacientes. No Rio de Janeiro em 1968, foi descrito um caso em um homem de 39 anos de idade, que havia trabalhado como lavrador até os 18 anos, e ele apresentava tuberculose pulmonar. Em São Paulo, no período de setembro de 1970 a outubro de 1973, 200 amostras de micobactérias foram isoladas de diferentes casos, com diagnóstico clínico de tuberculose, sendo que sete (3,5%) eram de *M. bovis* (PARREIRAS, 2003). E nos últimos 3 anos, apenas 2 casos foram identificados pelo Centro Nacional de Referência de Micobactérias Prof. Hélio Fraga – CRPHF (Barreto Werneck A., comunicação pessoal) e, nenhum no Hospital Universitário da UFRJ – Centro Nacional de Referência para AIDS e Tuberculose.

Ainda não existe um programa específico para o controle da bTb; essa atividade está inserida num programa genérico denominado Programa de Controle das Doenças Animais, desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Secretarias Estaduais de Agricultura e entidades afins.

Em 1991 a prevalência da doença nas propriedades foi estimada em 5,4% e nos animais em 1,2%, apresentando uma tendência de alta desde 1989. Esses dados de ocorrência são questionáveis, pois foram obtidos através do exame de uma parcela da população sem os devidos cuidados relativos à amostragem. Esses números, se admitidos como estimativa razoável, não apontaram para uma situação catastrófica, mas eram preocupantes. O crescimento contínuo da população de bovinos - de 1985 a 1989 numa taxa de aproximadamente 3% ao ano. - e a inexistência de um programa específico para o controle da doença foram pressões que favorecem a sua disseminação, e que os dados, embora precários, já indicaram estar ocorrendo (FERREIRA NETO & BERNARDI, 2005).

O Brasil reúne algumas condições que favoreceriam a implantação de um programa de controle da tuberculose bovina, dentre as quais poderiam ser destacadas a existência de serviços veterinários com experiência no controle de doenças animais, de laboratórios capacitados para a produção de antígenos e realização de diagnóstico e, além disso, a existência de bacias leiteiras relativamente organizadas.

Por outro lado, dentre os fatores que dificultariam tal ação, poderiam ser lembrados: a dimensão do rebanho bovino brasileiro estimado em 151 milhões de cabeças em 1994, maior rebanho comercial do mundo; a grande extensão territorial; a existência de fronteiras com outros dez países; as grandes diferenças regionais quanto à infra-estrutura e condições sócio-econômicas; a grande heterogeneidade das criações quanto ao modo de produção e situação sanitária; a insuficiência dos recursos financeiros destinados aos órgãos oficiais que se ocupam da saúde animal (FERREIRA NETO & BERNARDI, 2005).

No nosso país algumas cooperativas de produtores perceberam os benefícios que traria o controle da doença, se adiantaram as ações oficiais e iniciaram seus próprios programas, configurando uma regionalização e privatização do processo. Atitude louvável e, sobretudo inteligente, pois é economicamente interessante. Essa conduta deveria ser de alguma maneira estimulada, pois parece ser o caminho mais indicado para controlar a doença no Brasil (FERREIRA NETO & BERNARDI, 2005).

Observando a Tabela 1, constata-se que somente uma mínima fração de animais confirmados positivos são enviados a estabelecimentos de abate com regime de inspeção oficial, sendo que a parcela restante tem por provável destinação o abate clandestino.

A distinção entre *M tuberculosis* e *M bovis* tem implicações epidemiológicas, já que animais infectados pelo *M bovis* podem ser a origem da infecção humana, e implicações terapêutica, pois cepas de *M bovis* são resistentes a pirazinamida (FROTHINGHAM e cols., 1999).

Tabela 1 – Situação da infecção animal por *M. bovis*.

Autor	Estado	Número (%)
Langenegger, J e cols. Tratamento massal da tuberculose bovina com isoniazida. Pesquisa Veterinária Brasileira. V. 11: 21-23, 1991.	Rio Grande do Norte	409 / 932 (43,9%)
Coelho, HE e cols. Tuberculose em bovinos diagnóstica em Uberlândia – MG, durante 10 anos (1986-1995). Higiene Alimentar. V.11:9-10, 1997.	Minas Gerais	65 / 1.131 (5%)
Wanderley, MS. Produtores e técnicos controlam tuberculose e deixam lição de como enfrentá-la. Balde Branco. P. 38-41, Janeiro 1998.	São Paulo	4.388 / 6.770 (64, 8%)
Lilenbaun, W e cols. Tuberculose bovina. Prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção na região dos Lagos do Estado do Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Medicina Veterinária. V. 20: 120-123, 1998.	Rio de Janeiro	207 / 1.632 (12, 7%)
Leite, RMH & Lage, AP. Controle da tuberculose bovina em bovinos da raça Sindí pelo tratamento com Isoniazida: avaliação e análise do custo. Ciências Veterinárias nos Trópicos. V. 2: 21-28, 1999.	Paraíba	27 / 107 (25, 2%)
Oliveira, VM e cols. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.60, n.3, p.574-579, 2008.	Rio de Janeiro 1959 a 1989.	104 / 209 (49, 8%)

Modificada de TbBovNet - <http://www.mgar.vet.br/buiatria/TbBovNet> e Fernandes, J. O. M. e cols., 2003

2.2 Aspectos epidemiológicos.

2.2.1 *Mycobacterium bovis*, tuberculose bovina e humana.

Os primeiros contatos da micobactéria com a raça humana provavelmente foram esporádicos e causados pelo ato de comer carne crua ou inadequadamente cozida. Entre 8.000 e 10.000 anos atrás, com o hábito de domesticar animais e de suplementar a dieta com carne, leite e queijo, especula-se que tenha aumentado a frequência de infecção das crianças com o *M. bovis* a partir do leite. Embora a doença resultante geralmente se limitasse ao aumento e drenagem dos linfonodos cervicais (escrófula), ocasionalmente comprometia outros órgãos e podia ser fatal. A dúvida sobre se uma infecção inicial pelo *M. bovis* conferiria proteção contra a tuberculose foi objeto de debate a partir dos trabalhos de Marfan em 1886 (CAMPOS, 1999).

A convivência do homem com o gado foi proposta como o fator que gerou a evolução do *M. tuberculosis*. Durante os invernos, as pessoas dividiam suas casas com seus animais para a conservação do calor. Uma vaca tossindo poderia expor uma família a uma infecção aerógena pelo *M. bovis*. Isso criou um nicho para o desenvolvimento de um mutante mais patogênico para humanos e menos agressivo para a maior parte dos animais. Da mesma forma que o *M. bovis*, o *M. tuberculosis* não podia sobreviver no meio ambiente, e sua sobrevivência dependia da transmissão de hospedeiro para hospedeiro. Entretanto, isolamentos geográficos, tanto por desertos, como por oceanos ou montanhas, mantiveram as populações razoavelmente isentas das pressões seletivas do *M. tuberculosis* por séculos. Estudos genéticos das micobactérias revelam enormes semelhanças entre os DNAs do *M. bovis* e do *M. tuberculosis*, e mesmo do *M. microti* e do *M. africanum*, indicando que essa teoria evolutiva possa ser real.

A bTb é uma doença de distribuição global, representa um importante problema de saúde pública e resulta em importante e negativo impacto econômico em diversas regiões do mundo. Estima-se que nos cinco continentes, o número de bovinos infectados por *M. bovis* ultrapasse a marca de 50 milhões de animais e que as perdas econômicas decorrentes sejam da ordem de 3 bilhões de dólares (HEWINSON, 2001). Os prejuízos ocasionados pela doença estão relacionados não somente a uma redução entre 10-20% da produção leiteira como também a perdas indiretas oriundas da infertilidade, do abate sanitário e da condenação das carcaças. De modo geral, a perda na produtividade causada pela doença em uma determinada

propriedade é estimada como sendo da ordem de 10-25%, não estando incluídas nesta cifra as perdas relacionadas à mortalidade (RITACCO e cols., 1987).

Nos últimos anos, em muitos países, incluindo países desenvolvidos como o Reino Unido, a incidência da bTb tem aumentado. No Brasil esta infecção é endêmica e pode constituir um importante problema econômico e de saúde pública, sobretudo nas regiões do país onde as bacias leiteiras são numerosas. Embora se estime que 10% do rebanho brasileiro - constituído de 150 milhões de cabeças – devam estar infectados, a verdadeira incidência da bTb é desconhecida em nosso país; trata-se muito provavelmente de falta de notificação (LILENBAUM e cols., 1999).

Atualmente, a hTb resultante da infecção por *M. bovis* é comparativamente rara, especialmente no contexto dos países desenvolvidos. Neste contexto, todavia, ela permanece como motivo de preocupação do ponto de vista de saúde pública humana em grupos de indivíduos mais suscetíveis, sob risco de infecção e adoecimento em função de particularidades imunológicas ou ocupacionais. Quanto aos países em desenvolvimento, apesar da falta de estudos dedicados a esta condição específica, os poucos dados existentes parecem indicar que a tuberculose relacionada ao *M. bovis* permanece como um importante problema de medicina humana e veterinária, de saúde pública e gera impacto econômico. A manutenção de reservatórios animais em hospedeiros domésticos - sobretudo gado bovino - e selvagens, endemicamente infectados, constitui um problema adicional na erradicação desta doença (DE LISLE e cols., 2001; COUSINS e cols., 2001).

No Brasil a prevalência de TB bovino dependendo da região e do tipo de produção varia de 0,9 e 2,9% (KANTOR & RITACCO, 1994). Entre 1989 e 1998, dados de notificação oficial indicavam uma prevalência de 1,3 % à 5% de animais infectados (BRASIL 2009; NASSAR e cols., 2007).

2.2.2 Aspectos imuno-patológicos e clínico-patológicos.

Como assinalado anteriormente, *M. bovis* apresenta um notável espectro de hospedeiros. Nas diferentes espécies o bacilo parece apresentar patogenicidade ou virulência desigual e induz alterações imunopatológicas e manifestações clínico-patológicas distintas (WEDLOCK e cols., 2004) Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela. 2: Aspectos imunopatológicos associados à infecção por *M. bovis* em diferentes espécies animais:

Hospedeiro	Imunopatologia ^a		
	Necrose + infiltração neutrofílica	Encapsulamento fibroso / calcificação	Presença do bacilo
Humanos	+	++	+
Bovinos	+	++	+
Gamba e texugos	+++	±	+++

a ±, raramente ; +, infreqüentemente; ++, freqüentemente; +++, quase sempre encontrados nas lesões.

Adaptado de WEDLOCK e cols., 2004.

Tabela 3: Características clínico-patológicas da infecção por *M. bovis* em diferentes espécies:

Hospedeiro	Localização das lesões	
	TB Primária	TB Secundária
Humanos	Pulmões e linfonodos (LNs) mesentéricos e cervicais	Rins, Ossos e meninges
Bovinos	Pulmões e LNs cefálicos*	LNs torácicos e outros, úbere
Gambas e texugos	Pulmões	LNs superficiais, rins fígado e baço.

Adaptado de Wedlock e cols., 2004.

2.2.3 Ecologia e importância em medicina humana e veterinária.

A maioria das micobactérias são espécies saprófitas, encontradas na água e no solo. Assim, a pele e as membranas mucosas - particularmente o epitélio respiratório e digestivo - das diversas espécies animais são freqüentemente expostas à micobactérias ambientais. Testemunhando a presença das micobactérias em numerosos ecossistemas, diferentes cepas de *Mycobacterium spp.* capazes de degradar xenobióticos, tais como, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o tolueno ou o inseticida endossulfan foram caracterizadas (SCHNEIDER e cols., 1996 ; SHUTERLAND e cols., 2002). Muitas micobactérias podem

ser isoladas nos pássaros e em diversos animais domésticos e selvagens. Particularmente *M. bovis* apresenta um notável espectro de animais hospedeiros, causando tuberculose bovina e tuberculose em diversos outros mamíferos domesticados como cabras, búfalo aquático asiático, camelos, alpacas e lhamas, podendo causar igualmente a tuberculose no homem e em outros primatas, em mamíferos carnívoros, em suínos e em certas aves de rapina (WEDLOCK e cols., 2002). Apesar de sua ampla distribuição na natureza, algumas espécies micobacterianas e, de modo similar, algumas cepas são mais freqüentemente identificadas em regiões geográficas específicas.

2.2.4 Teste Cutâneo à Tuberculina (TST).

Os testes para diagnóstico da tuberculose bovina baseiam-se em testes alérgicos, pela detecção direta da bactéria, necropsia (principalmente durante a inspeção de carnes) e exame de tecidos lesados.

O teste de tuberculinização tem sido utilizado para diagnóstico de tuberculose em bovinos, por mais de um século. Atualmente, duas modalidades de testes têm sido utilizadas: o intradérmico simples e o comparado. Estes testes detectam bovinos infectados ou doentes por meio do aumento da espessura da pele no local onde foi introduzida a tuberculina nos animais. Nos animais que tiveram contato com a bactéria tuberculosa, a pele adquire um aumento de volume. A tuberculinização (TST) comparada é utilizada para evitar o descarte de bovinos falso-positivos por reações inespecíficas a outras bactérias (como as que causam tuberculose nas aves).

Um método complementar ao TST para se controlar a tuberculose bovina é o trabalho realizado pela inspeção de carnes pelo serviço oficial. Essas fiscalizações em matadouros procuram a partir das carcaças e vísceras desviadas ao departamento de inspeção final (DIF), identificar alterações anatômicas e patológicas características da tuberculose bovina. No entanto, existem situações em que bovinos tuberculino - positivos não apresentam lesões visíveis à necropsia, como em animais que se encontram em estágios iniciais da doença e em casos de lesões localizadas em partes do corpo que geralmente não são examinadas durante o

trabalho de inspeção. Para confirmação de algumas lesões detectadas na inspeção, são necessários testes microbiológicos ou histopatológicos.

O uso do diagnóstico clínico para determinar a prevalência da infecção possui apenas valor relativo, pois o animal pode estar infectado e apresentar-se clinicamente sadio.

2.2.5 *Mycobacterium bovis*, bovinos, contagiosidade e infecciosidade.

A melhor indicação da via de transmissão de *M. bovis* no gado é o padrão de lesões anatomo-patológicas, observado nos animais sacrificados. No Reino Unido, as lesões visíveis nos animais sacrificados, reativos ao teste cutâneo à tuberculina (TST) e cultura positivos para *M. bovis* foram descritas majoritariamente nos linfonodos broncomediastinais e cefálicos,



sugerindo fortemente que a principal via de infecção é respiratória (PHILIPS e cols., 2003). A transferência de organismos do rumen para o trato respiratório é teoricamente possível como consequência de eructação (MULLENAX e cols., 1964). Entretanto, a presença de lesões nos linfonodos mesentéricos não é habitualmente identificada. Todavia, cabe lembrar que os experimentos conduzidos na primeira metade do séc. passado, utilizando a estratégia de contaminação artificial de pastagens identificaram uma importante proporção de animais com lesões no trato alimentar (MADDOCK, 1934; SCHELLNER, 1956 – citados por PHILLIPS e cols., 2003). A diferença nos sítios alvos da infecção observada quando comparamos os primeiros experimentos com os estudos mais recentes se devem provavelmente a grande dose de bacilos ingerida pelos animais nos experimentos iniciais.

Na Austrália, antes do recente sucesso no controle da doença, nas regiões temperadas, a maioria das lesões eram encontradas no abdômen dos bovinos, enquanto na região nordeste do país a maioria das lesões eram observadas no tórax (LEPPER & PEARSON, 1973). Este fato foi atribuído a uma maior facilidade na transmissão de *M. bovis* via pastagens contaminadas nas regiões de clima mais quente e úmido quando comparada a região nordeste e semi-árida (PHILLIPS e cols., 2003).

Nas situações onde o gado infectado é eliminado e as pastagens contaminadas são raras, a infecção instala-se provavelmente pela via respiratória. De modo similar à infecção humana por *M. tuberculosis*, a dose infecciosa mínima necessária para o estabelecimento da

infecção via aerossol é muito pequena e talvez apenas um bacilo seja suficiente, ao contrário do descrito para a via oral, onde alguns milhões de bacilos são necessários. Nos países onde as condições sanitárias são favoráveis e as políticas e práticas de controle são aplicadas, a transmissão entre o gado foi minimizada, uma vez, que os animais infectados são rotineiramente eliminados do rebanho a partir da identificação de um teste tuberculínico positivo (WILESMITH & WILLIAMS, 1986). Na Europa, *M. bovis* é caracteristicamente resistente à pirazinamida mas é sensível aos outros tuberculostáticos. A transmissão pseudo-vertical de *M. bovis* é possível a partir da ingestão de leite de vacas contaminadas e clinicamente assintomáticas ou oligossintomáticas, tipicamente excretando 10^3 cfu/ml (ZANINI e cols., 1998). As micobactérias sobrevivem facilmente em meio aquoso e esta é a maior fonte das infecções MNT (DAILLOUX e cols., 1999). O bacilo da bTb pode sobreviver até aproximadamente 400 dias em água corrente e culturas de *M. bovis* em solução salina fisiológica e em meios a base de ovos são capazes de ser manterem viáveis por 300-400 dias e por cerca de 6 anos, respectivamente. Entretanto, em um inquérito epidemiológico realizado na Irlanda, a presença de recursos hídricos naturais não constituiu um fator de risco importante (GRIFFINE cols., 1993). O uso compartilhado pelo gado e animais selvagens de fontes de água, poderia servir de meio para transmissão da infecção. Por outro lado, a provável maior exposição à micobactérias ambientais poderia conferir ao gado algum grau de proteção contra a infecção tuberculosa (PHILLIPS e cols., 2002).

2.2.6 *M. bovis*, contagiosidade e infecciosidade.

2.2.6.1 Transmissão para seres humanos.

A infecção de humana por *M. bovis* ocorre quase que exclusivamente pela inalação de aerossol ou pela ingestão de leite contendo o bacilo (GRANGE, 2001). Em seu inquérito dos casos de tuberculose humana causados por *M. bovis* entre os anos de 1901-1932, Griffith (1937) citado por Grange em 2001, observou que a grande maioria dos casos eram extra-pulmonares; ele sugeriu que esta distribuição se devia ao fato da grande maioria dos pacientes serem originários de regiões urbanas. Em 1945, no Reino Unido, *M. bovis* foi isolado em cerca de 8% das batedeiras próprias para elaboração de manteiga e na quase totalidade das amostras provenientes de tanques volumosos (FRANCIS, 1947; citado por GRANGE 2001). O leite era considerado a fonte habitual de infecção dos habitantes das áreas urbanas enquanto trabalhadores de fazendas de gado eram considerados como infectados provavelmente através

da inalação de *M. bovis*. De fato, bacilos álcool-ácido-resistentes eram identificáveis nas secreções respiratórias bovinas, desidratadas e presentes nas superfícies das paredes e janelas dos estábulos (GRANGE, 2001).

2.2.6.2 Transmissão para o gado a partir de seres humanos.

Seres humanos portadores de lesões tuberculosas devidas a *M. bovis*, sobretudo as cavitárias ou abertas podem infectar o gado ocasionando não só conversão do teste tuberculínico como também doença ativa. Existem múltiplos relatos de gado contaminados por trabalhadores de fazendas (GRANGE & YATES, 1994). A infecção bovina por *M. tuberculosis* de origem humana também foi descrita e resulta em uma conversão transitória da prova tuberculínica. Menos frequentemente foram observadas lesões discretas e auto-limitadas nos pulmões e intestinos de bezerros. Somente em raras ocasiões foi descrita doença de caráter clínico grave e progressivo (GRANGE, 2001)- Figura 2.

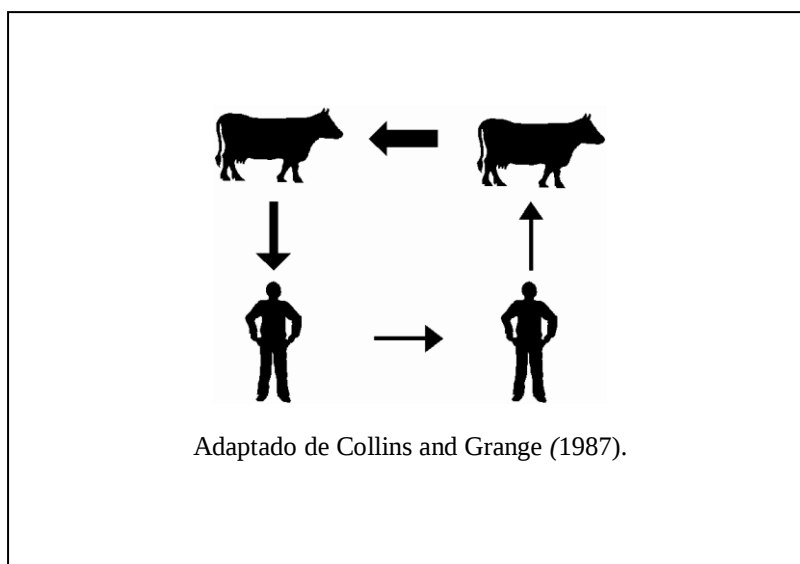


Figura 2. Ciclo da transmissão do *Mycobacterium bovis* entre o gado e Humanos.

2.2.6.3 Transmissão entre seres humanos.

Possivelmente como consequência da idéia que *M. bovis* é menos virulento para o homem que *M. tuberculosis*, admite-se que transmissão de *M. bovis* entre seres humanos causando adoecimento não ocorre ou ocorreria raramente. Alguns casos esporádicos humanos têm sido descritos (KUBIN e cols., 1984). Todavia, parece que na ausência de imunodepressão a transmissão entre humanos é realmente um evento excepcional. Figura 2.

2.2.6.4 Imunodepressão - incluindo a infecção pelo HIV – e seu impacto sobre a transmissão.

Indivíduos imuno - deprimidos são mais suscetíveis de desenvolver tuberculose ativa após a infecção por *M. bovis*, independente da origem dos bacilos. Nos Estados Unidos, dois pacientes alcoólatras e desnutridos desenvolveram doença pulmonar após terem sido expostos a um caso de tuberculose humana por *M. bovis* (O'DONAHUE e cols., 1985). Diversas séries de pacientes HIV positivos apresentando tuberculose por cepas MDRs de *M. bovis* têm sido descritas, sobretudo na França e Inglaterra (GRANGE e cols., 1994; Samper e cols., 1997). Um número bem maior de casos tem sido observados entre pacientes HIV positivos de origem hispânica na região limítrofe entre os Estados Unidos e o México (DANKNER e cols., 1993). Certos fatores de risco parecem estar associados ao desenvolvimento de tuberculose MDR por *M. bovis* entre os pacientes HIV positivos (COBO e cols., 2001). *M. bovis* é caracteristicamente resistente à pirazinamida mas é sensível aos outros tuberculostáticos. Entretanto, diversas epidemias envolvendo pacientes HIV positivos e cepas multi-resistentes tem sido descritas; em uma série observada na Espanha, todos os 19 casos identificados eram resistentes a 11 drogas anti-tuberculose (GUERREIRO e cols., 1997).

No início dos anos 1970 Trainin e associados, descreveram um estado de imunodeficiência em bovinos, comprometendo tanto a resposta mediada por células quanto a humoral (TRAININ & KLOPFER, 1971; UNGAR-WARON e cols., 1999). O vírus da leucemia bovina (BLV) também denominado leucose enzoótica bovina, está entre os agentes infecciosos que mais afetam o gado em todo o mundo (KAYBEA & ONUMA, 2001) e, nos faz questionar se alguns dos casos de infecção por *M. bovis* bovino não estariam relacionados com imunodepressão.

2.3 Teste de sensibilidade (TS).

O teste de sensibilidade (TS) é o exame laboratorial realizado para detectar a resistência/sensibilidade dos isolados de *M. tuberculosis* às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose. Resistência às drogas antituberculose é definida pelos resultados dos testes bacteriológicos, como a diminuição da sensibilidade *in vitro* de um isolado de *M. tuberculosis* comparado a um isolado que nunca entrou em contato com a droga (BRASIL, 2008).

2.4 Método das proporções.

Esse método foi criado por Canetti, Ris e Grosset em 1963 (teste padrão) e em 1969 (teste simplificado). A versão simplificada do teste, com apenas uma concentração da droga, é a mais utilizada. Consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes contidos em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente a uma concentração da droga que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não o das células resistentes – “concentração crítica”. Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente – “proporção crítica”. Considera-se que uma droga de primeira linha não tem atividade no tratamento da TB quando ela é testada frente a um isolado de *M. tuberculosis* que contém mais de um 1% de bacilos resistentes a uma concentração crítica da determinada droga, previamente estabelecida (BRASIL, 2008).

O método das proporções pode ser realizado diretamente a partir de escarro positivo à baciloscopia (teste direto) ou a partir do isolado bacteriano (teste indireto).

O teste indireto é feito a partir do crescimento em meio de cultura e deve ser realizado em isolados bacterianos identificado como *M. tuberculosis*. É mais demorado do que o direto, com a vantagem de apresentar menor risco de contaminação. O teste direto é aquele feito a partir da amostra clínica que já passou pelo processo de descontaminação. Deve-se diluir o material homogeneizado, antes de inocular nos meios de cultura, de acordo com o resultado da baciloscopia (BRASIL, 2008).

2.5 Diagnóstico molecular e genotipagem.

Nos últimos dez anos, diferentes técnicas baseadas em análise da composição de seqüências de ácidos nucleicos têm sido desenvolvidas para melhor caracterização de organismos pertencendo ao MTBC ou para diferenciação de isolados de *M. tuberculosis* e *M. bovis* (HADDAD e cols., 2004).

Uma série de pequenas diferenças genéticas entre isolados de *M. bovis* e *M. tuberculosis* têm sido descritas, inclusive mutações pontuais nos genes *oxyR* (SREEVATSAN e cols, 1996), *pncA* (SCORPIO & ZHANG 1996), *gyrB* (NIEMANN e cols. 2000) e *hupB* (PRABHACAR e cols. 2004), presença ou não do gene *mtp40* (LIÉBANA e cols. 1996), a presença do ORF Rv1510 (HUARD e cols. 2003) e a presença ou ausência dos espaçadores 39-43 na região direct repet (DR) (ARANAZ e cols. 1996). A visualização destas diferenças é feita através de métodos diferentes, incluindo reação em cadeia da polimerase e análise de restrição (PCR-RFLP), PCR multiplex e spoligotyping e MIRU-VNTR.

2.5.1 Amplificação e polimorfismo do gene *pncA*.

Por natureza, *M. tuberculosis* é sensível a pirazinamida enquanto a maioria das cepas de *M. bovis* (menos *M. bovis caprae* e uns casos raros de *M. bovis*) é resistente a pirazinamida. A resistência a pirazinamida em *M. bovis* está associada à mutação pontual C para G na posição 169 do gene *pncA*, causando a substituição da histidina (CAC) por ácido aspártico (GAC) na posição 57 do amino ácido, resultando em resistência a pirazinamida (SCORPIO & ZHANG 1996).

2.5.2 Amplificação e detecção do polimorfismo do gene *oxyR*

Foi descrito por Sreevatsan e colaboradores em 1996, um polimorfismo de base única na posição 285 do gene *oxyR*, sendo que somente *M. bovis* (BCG) tem uma adenine (**A**) nesta posição; o resto dos organismos do complexo apresentam guanina (**G**).

2.5.3 Análise do gene *gyrB* - MTUB.

Kasai e colaboradores descreveram em 2000, um método baseado em PCR para diferenciar quatro espécies do complexo *M. tuberculosis*. A sequência descrita do gene *gyrB* compreende 1,020 pares de base, com posições específicas para as quatro espécies: *M. bovis* (resistente ou suscetível a pirazinamida), *M. africanum* tipo I e tipo II, *M. tuberculosis* e *M. microti*.

2.5.4 Spoligotyping.

Esta técnica envolve dois passos (KAMERBEEK e cols., 1997): o primeiro passo consiste na amplificação da região DR e os espaçadores entre as repetições; o segundo na hibridização dos produtos amplificados numa membrana contendo oligonucleotídeos complementares aos 43 espaçadores mais frequentemente encontrados em *M. tuberculosis*. Esta técnica é particularmente interessante, pois pode ser aplicada diretamente em amostras clínicas, permitindo simultaneamente a identificação da bactéria e tipagem, sem prévio isolamento primário. No caso do *M. bovis*, os espaçadores 3, 9, 16 e 39 – 43 são sempre ausentes (KAMERBEEK e cols., 1997; NIEMANN e cols., 2000), o que permite, além de aplicar o método para diferenciação de cepas da mesma espécie, reconhecer isolados do complexo *M. tuberculosis*, tais como, *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

2.5.5 Unidades Repetitivas Intercaladas no genoma da Micobactéria – *Mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRU).

Descrito recentemente por Supply e colaboradores (1997, 2000), possui como alvo seqüências repetitivas, encontradas no genoma das espécies do complexo *M. tuberculosis*. Estas seqüências são denominadas “variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units” (MIRU-VNTR) – unidades repetitivas intercaladas no genoma da micobactéria e agrupadas em número de cópias variáveis. Os MIRUs são pequenos elementos de DNA encontrados freqüentemente como repetições em “*tandem*” e dispersos em regiões intergênicas no genoma do complexo *M. tuberculosis*, são detectados e identificados elementos de DNA de 40 a 100 pares de base “*tandem*”. O perfil de MIRU-VNTR de diferentes isolados de *M. tuberculosis* era determinado inicialmente através da técnica de PCR em 12 locis variáveis, sendo os MIRUs: 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40 (Figura 11; Tabela 8). Hoje eles são determinados em 24 locis variáveis, os códigos facilitam comparações entre os laboratórios (NARAYANAN, 2003).

2.6 Resistência em tuberculose.

Com a introdução dos primeiros fármacos anti-TB nas décadas de 40 e 50, vislumbrou-se o controle da doença e até mesmo sua erradicação. Houve um declínio nas taxas de prevalência da TB, porém em 1985, estas taxas voltaram a aumentar em todo o mundo (SEPKOWITZ e cols., 1995; HIJJAR e cols., 2001; MISHIMA & NOGUEIRA, 2001). Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a tuberculose uma emergência global (WHO, 1993).

Existem diversos fármacos que podem ser utilizados no tratamento da TB, sendo que os primeiros a serem introduzidos foram: a estreptomicina, em 1946, ácido *p*-aminossalicílico, em 1946 e isoniazida, em 1952. E no ano de 1955, uma combinação foi adotada de quimioterápicos: estreptomicina, ácido *p*-aminossalicílico e isoniazida. Nos anos seguintes foram introduzidos: a rifampicina (RFP), a pirazinamida, a etionamida e o etambutol (JANIN, 2007).

O tratamento anti-TB, no Brasil, consiste da administração das chamadas drogas de primeira linha: isoniazida, rifampicina e pirazinamida por dois meses, seguidas pela administração, por um período de quatro meses, de isoniazida e rifampicina. Em caso de

falha deste esquema, o tratamento foi com a administração das chamadas drogas de segunda linha, são elas: estreptomicina, etambutol, etionamida e pirazinamida por três meses, seguidas por etambutol e etionamida por mais nove meses (GOMES, 2006).

Os pacientes infectados com cepas resistentes aos fármacos apresentam menor chance de cura, pois, geralmente o diagnóstico é tardio e, permanecem por períodos maiores transmitindo tuberculose MDR para seus familiares, através de contatos sociais ou em ambientes fechados. As drogas utilizadas contra micobactérias podem ser divididas em dois grupos: (I) – drogas que tem ampla ação contra micobactérias e outras espécies bacterianas, cicloserina, fluoroquinolones, rifamicinas, macrolídeos e estreptomicinas; (II) – drogas que têm ação específica contra micobactérias, etionamida, isoniazida, etambutol, ácido *p*-aminossalicílico, tiacetazona e clofazimina. São divididos de acordo com o alvo que atingem (CHOPRA & BRENNAN, 1998).

A resistência medicamentosa pode ser: primária ou secundária; na tuberculose é bastante preocupante o surgimento de casos de TB-MDR, uma vez, que são resistentes as principais drogas do tratamento, rifampicina (RMP) e isoniazida. Em 2000, estimava-se que 3,2% dos casos novos de tuberculose no mundo eram TB-MDR (OMS, 2004).

A isoniazida e a rifampicina são as drogas mais efetivas contra o *M. tuberculosis*, sendo responsáveis pela eliminação de 99% dos bacilos logo nos dois primeiros meses de tratamento. E devido a isso atualmente uma variedade de métodos moleculares vem sendo testados para uma detecção rápida das cepas resistentes: seqüenciamento, PCR-SSCP, PCR-Heteroduplex, INNO-LiPA, GenoType MTBDRplus, DNA – Microarray, RIFO assay e Rifoligotyping (SOINI & MUSSER, 2001; Willians e cols., 1994; SOMOSKOVI e cols., 2006; KREMER e cols., 1997; TELENTI, 1993; TORTOLI & MARCELI, 2007)

2.7 *Mycobacterium leprae*, a doença lepra X hanseníase.

O *M. leprae* é uma bactéria com forma de bacilo, álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório que se identifica com a técnica de Ziehl-Nielsen, descoberta em 1873 por Armauer Hansen na Noruega. A *M. Leprae* (Figura 3) é de crescimento extremamente lento quando comparado com o de outras bactérias. Tanto o *M. leprae* quanto o *M. tuberculosis*, têm parede celular muito rica em lipídios. O *M. leprae* é capaz de infectar grande número de pessoas (alta infectividade), mas poucos adoecem, (baixa patogenicidade). O poder imunogênico do bacilo é responsável pelo alto potencial incapacitante da hanseníase (WHO, 1989).

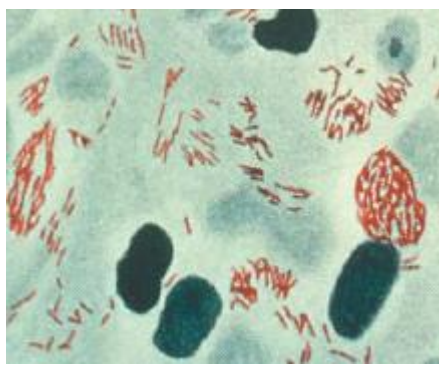


Figura 3 - *M. leprae*.

A mudança da terminologia “lepra” para “hanseníase” foi proposta pelo professor Abrão Rotberg visando à diminuição do estigma da doença. Essa medida foi então corroborada pelo então secretário de saúde do estado de São Paulo, Dr. Valter Leser e, também pelo comitê técnico deste órgão, que publicou uma resolução determinando a criação de um novo vocabulário para classificar essa doença em dezembro de 1970. Desde então a doença passou a denominar-se oficialmente hanseníase para a Secretaria de Estado de São Paulo (OPROMOLLA, PA & MARTELLI, 2005).

Em 1975, o Ministério da Saúde do Brasil adotou o termo “hanseníase” pelo Decreto nº 76.078, de 04/08/1975 (publicado no Diário Oficial da União, de 05/08/1975), do governo do presidente da república Ernesto Geisel. Em 1995, por intermédio da lei federal número 9.010, tornou-se obrigatório o uso da terminologia “hanseníase” em substituição ao termo “lepra” (OPROMOLLA, PA & MARTELLI, 2005).

Alguns autores levantam a hipótese de que o *M. leprae* pode persistir e, presumivelmente, também proliferar, num ambiente em associação com certas plantas e água. A infecção também poderia resultar do contato repetido e prolongado com fontes ambientais que contenham o bacilo viável. Entretanto, como o *M. leprae* não pode ser cultivado, esta hipótese se torna de difícil validação experimentalmente e pode ser que as evidências possam ser obtidas apenas indiretamente, através de estudos epidemiológicos (KAZDA, 2000).

A micobactéria parasita, os macrófagos e as células de Schwann que formam a mielina dos nervos periféricos. A destruição da mielina leva à disfunção dos nervos. O sistema imunitário reage eficazmente às micobactérias pela formação de granulomas. O tipo de reação imunitária ao *M. leprae* é extremamente importante na progressão da doença. Esta bactéria sobrevive à fagocitose e multiplica-se dentro dos macrófagos. Se houver uma reação TH1, citotóxica, com formação de granulomas sequestradores da bactéria e com destruição dos macrófagos infectados, a doença torna-se quase benigna e não é capaz de progredir: é a lepra tuberculóide. Se no entanto, for ativada uma resposta TH2, com produção de anticorpos, não há formação de granulomas e a bactéria dissemina-se, surgindo a lepra típica, ou lepra lepromatosa. (DUTHIE e cols. 2008; ORSINE e cols. 2008).

O homem tem sido reconhecido como a principal fonte de infecção, os doentes multibacilares sem tratamento – hanseníase virchowiana e hanseníase dimorfa – são capazes de eliminar grande quantidade de bacilos para o meio exterior (carga bacilar de cerca de 10 milhões de bacilos presentes na mucosa nasal), e até agora o mais importante reservatório para saúde pública. Outros reservatórios, ainda em estudo, estão sendo investigados, como alguns animais, em especial o tatu (*Dasypus novemcinctus*), o macaco mangabeí, o chimpanzé e a água (KERR-PONTES e cols. 2004; MATSUOKA e cols. 1999; MEYERS, 1992; Ministério da Saúde, 2005).

A hanseníase é uma das doenças mais antigas que acomete o homem. As referências mais remotas datam de 2000 a.C. e procede da Ásia, que, juntamente com a África. A melhoria das condições de vida e o avanço do conhecimento científico modificaram significativamente esse quadro e, hoje, a hanseníase tem tratamento e cura (PORTAL SAÚDE – WWW.SAUDE.GOV.BR - VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. 2009; ROBBINS e cols. 2009).

2.7.1 A hanseníase no Brasil.

De acordo com os dados da OMS em 2007, o Brasil é o responsável pela endemia nas Américas e o segundo país do mundo em número de casos novos detectados, com 39.125¹ casos, suplantado apenas pela Índia, onde foram registrados 137.685 casos, e o primeiro dentre os países da América. Os casos novos detectados no Brasil em 2007 corresponderam a 15,37% do total registrado no mundo (www.saude.gov.br/svs; WHO, 2008).

Tabela 4 – Casos novos de hanseníase detectados no ano de 2007 em várias regiões do mundo.

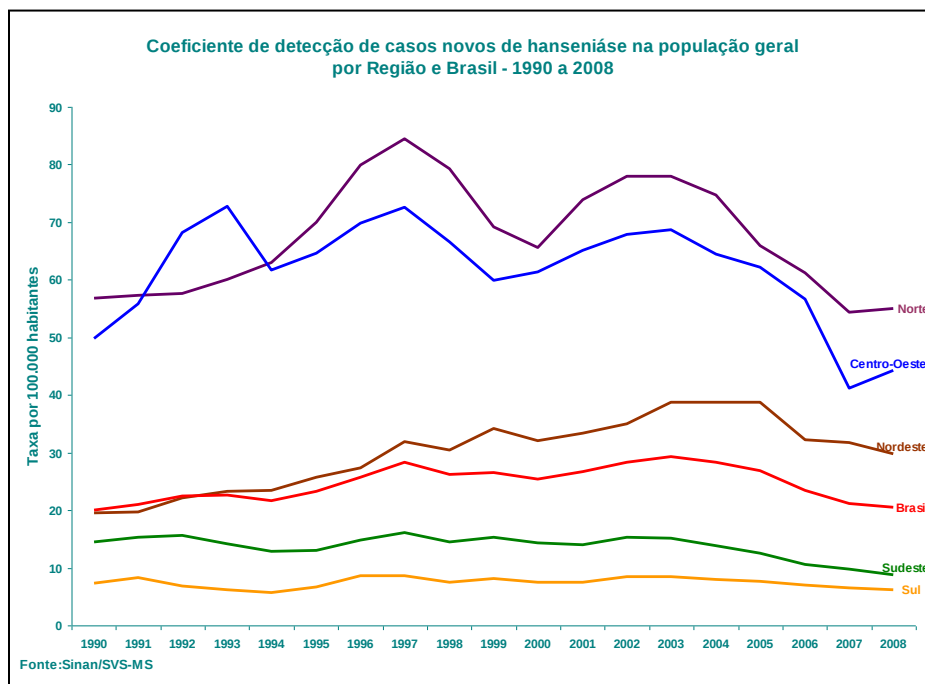
Região da OMS	Prevalência registrada em 2007 n (taxa de prevalência)*	Casos novos detectados em 2006 n (taxa de detecção)**
África	36.124 (0,52)	34.480 (4,92)
Américas	64.715 (0,76)	47.612 (5,58)
Sudeste Asiático	116.663 (0,70)	174.118 (10,51)
Mediterrâneo Oriental	3.986 (0,09)	3.261 (0,71)
Pacífico ocidental	9.873 (0,06)	6.190 (0,35)
Total	231.361	265.661

Fonte: Adaptado de WHO Global Leprosy Situation, jun. 2007. Nota: N: número de casos; *número de casos/10.000 habitantes; **número de casos novos/100.000 habitantes

A doença é endêmica em todo território nacional, embora com distribuição irregular. As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país são as regiões que registram o maior número de casos ressaltando-se a redução lenta nas regiões sul e sudeste (Gráfico 1).

¹ Os dados do SINAN para o ano de 2007, revistos em 31/7/2008, posteriormente aos utilizados no informe da OMS, registram 39.921 casos.

Gráfico 1 – Distribuição da endemia no Brasil.



Tanto pela sua magnitude quanto pelas seqüelas que a doença acarreta e conseqüentes transtornos emocionais e sociais para o doente e sua família, a hanseníase é, ainda hoje, um dos mais sérios problemas de saúde pública do Brasil e do mundo. A política pública brasileira para o controle da hanseníase vem recomendando a ampliação da rede de diagnóstico, tratamento e vigilância de contatos, mediante a descentralização das atividades para os serviços de atenção básica à saúde. Paralelo a isto, a divulgação dos sinais e sintomas da doença para a população em geral constitui-se um instrumento para a detecção precoce dos casos, já que a doença tem evolução insidiosa. As mudanças propostas nesse novo modelo de organização dos serviços de saúde pretendem facilitar o acesso aos serviços de saúde e aumentar a demanda espontânea, como também a proporcionar ações de busca ativa pelos agentes de saúde, nos focos conhecidos em cada território do programa de saúde da família. No que diz respeito às intervenções sobre a hanseníase, para o planejamento dos recursos a serem alocados e para o diagnóstico das necessidades da população, a definição de área de abrangência de uma unidade de saúde, e o conseqüente conhecimento da população necessitada, é indispensável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; LAPA e cols. 2006).

O controle da hanseníase é baseado no diagnóstico precoce dos casos, seu tratamento e cura, bem como a vigilância dos contatos, visando eliminar fontes de infecção e evitar seqüelas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2.7.2 Classificação da hanseníase:

Atualmente várias classificações são utilizadas para caracterizar esta doença, como exemplo: Classificação de Madri de 1953; Classificação de Ridley e Jopling 1962 e mais atualmente em uma proposta de aumentar a detecção de casos novos foi criado à classificação da OMS que baseasse na ausência ou presença do bacilo na linfa que é datada de 1982 e, mais recentemente a classificação operacional que divide a pacientes em paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), relacionados pelo número de lesões até 5 lesões (PB) e acima de 6 (MB)

Tabela 5 – Correlação entre as classificações de Madrid, Ridley & Jopling e, OMS adotadas para hanseníase.

Madrid	I	T	D	V
Ridley & Jopling		TT DT DT*	DD DV	VV
OMS	Paucibacilar	Multibacilar		
	Até 5 lesões de pele	Mais que 5 lesões de pele		

I- Indeterminado, T- Tuberculóide, D- Dimorfo, V- Virchowiano, TT- Tuberculóide, DD – Dimorfo-dimorfo, DV- Dimorfo-virchowiano, VV- Virchowiano-virchowiano.

*Operacionalmente, DT é classificado como paucibacilar pela OMS para fins de tratamento, se a baciloscopia for negativa.

2.7.3 Formas clínicas – abordaremos a classificação de Ridley e Jopling por ser uma classificação espectral e que deveria ser utilizada apenas em centro de referência.

2.7.3.1 Manifestações clínicas

Muitas pessoas que são infectadas pelo o *M leprae* desenvolvem infecção sub_ clínica: e podem se curar naturalmente sem sintomas ou sinais da doença. A doença vai depender de como o hospedeiro responde ao organismo. A reação do hospedeiro tem um papel fundamental não somente na determinação da resistência ou susceptibilidade a infecção pelo *Mycobacterium leprae*, como também nas manifestações clínicas da doença, principalmente resultando em alterações cutâneas e neurológicas, presentes em todas as formas da doença.

2.7.3.2 Forma indeterminada (I).

Considerada forma inicial da hanseníase, pode passar despercebida durante meses devido à descrição de seus sinais, podendo desaparecer mesmo sem tratamento. Manifesta-se como uma ou poucas máculas hipocrômicas ou eritematosas, ovuladas, de tamanho variável de 1 a 5 cm de diâmetro e hipoestésicas. Às vezes, apresenta-se apenas como área hipoestésica com diminuição do suor e dos pêlos sugerindo comprometimento neurológico do sistema autonômico.

2.7.3.3 Forma tuberculóide (TT).

Caracteriza-se em geral por lesões em placas eritêmato-infiltradas anulares, normalmente com diâmetro não superior a 10 cm e bordos de limites precisos. Geralmente são lesões únicas ou em número reduzido (até 5), distribuídas de forma assimétrica. A alteração da sensibilidade está sempre presente, com hipoestesia ou anestesia e anidrose. O envolvimento de troncos nervosos, quando ocorre pode ser agressivo, mas em geral constituído de mono neuropatia.

2.7.3.4 Forma borderline tuberculóide (BT).

Lesões em placas eritemato-infiltradas, múltiplas, em número de 2 a 10, com distribuição assimétrica, contornos arredondados ou policíclicos, limites precisos, tamanho variável e geralmente maiores que as placas da forma TT. Hipoestesia ou anestesia sempre presente. É muito freqüente o comprometimento de troncos nervosos, periférico com mono neurite múltipla e agressiva.

2.7.3.5 Forma borderline borderline (BB).

Caracterizada por lesões numerosas e exuberantes, em placas anulares características, infiltradas, de cor ferruginosa, com o centro da pele aparentemente normal. Os bordos externos são imprecisos e os internos nítidos, dando à lesão um aspecto de "queijo suíço". Pode ou não haver hipoestesia. O comprometimento de troncos nervosos periféricos, com mono neurite múltipla e agressiva é também freqüente.

2.7.3.6 Forma borderline lepromatosa (BL).

Mais próximas do espectro polar anérgico constitui-se por numerosas lesões, com distribuição simétrica e bilateral, com características das lesões anulares da forma BB e outras com aspectos de hansenomas da forma LL. A sensibilidade pode estar preservada, mas o comprometimento de troncos nervosos periféricos, embora insidiosos, se traduz por mono ou polineuropatia.

2.7.3.7 Forma lepromatosa lepromatosa (LL).

As lesões são numerosas e muitas vezes o comprometimento é difuso e em todo tegumento. Quando há lesões individualizadas costumam ter distribuição simétrica e bilateral, com aspecto de pápulas ou nódulos eritematosos ou eritemato-acastanhados, conhecidos como hansenomas, que podem confluir e formar grandes placas. O envolvimento difuso da face e pavilhão auricular confere o aspecto leonino. Na face também é característica a madarose (alopecia do terço externo dos supercílios). O comprometimento de troncos nervosos periféricos, embora insidiosos, se traduz por polineuropatia grave extensa tardiamente,

quando não tratada. Edema com infiltração difusa das mãos e dos pés é achado freqüente. Além das alterações cutâneas a forma lepromatosa pode acometer os linfonodos, testículos, medula óssea, músculos, ossos, laringe e olhos. A complicação mais grave nos olhos é a iridociclite aguda ou crônica, que pode evoluir para cegueira (<http://www.emmanuelfranca.com.br/imgatlas/hanseníase.html>).

2.8 Estados reacionais

A hanseníase é uma doença crônica podendo apresentar episódios inflamatórios agudos e subagudos, que acometem tanto os casos Paucibacilares como os Multibacilares. São reações do sistema imunológico do doente ao *Mycobacterium leprae* podem ocorrer antes, durante e depois da alta terapêutica. Os estados reacionais, ou reações hansênicas, podem ser de dois tipos: a) **Reação tipo 1** ou reação reversa é quadro clínico, que se caracterizam por apresentar novas lesões dermatológicas (manchas ou placas), infiltração, alterações de cor e edema nas lesões antigas, bem como dor ou espessamento dos nervos (neurites). b) **Reação tipo 2** é quadro clínico manifestado principalmente como Eritema Nodoso Hansênico (ENH) que se caracteriza por apresentar nódulos vermelhos e dolorosos, febre, dores articulares, dor e espessamento nos nervos e mal-estar generalizado. Geralmente as lesões antigas permanecem sem alteração.

As reações tipo 1 podem ocorrer nas formas borderlines BT e BB e a reação tipo 2 nas formas LL e LB. A ocorrência de manifestações reacionais, após alta terapêutica é referida por vários autores (GALLO, 1998; GOULART, 2002). Estas ocorrências, bastante freqüentes, principalmente nos primeiros anos após a alta terapêutica, exigem um diagnóstico diferencial com as recidivas, sendo necessários recursos clínicos e laboratoriais.

Os estados reacionais são as principais causas de lesões dos nervos e de incapacidades provocadas pela hanseníase. Portanto, é importante que o diagnóstico dos mesmos seja feito precocemente, para se dar início imediato ao tratamento, visando prevenir essas incapacidades (NERY, 1995; Portaria N°. 125/SVS-SAS, de 26 de Março de 2009).

2.9 Diagnóstico.

O diagnóstico de hanseníase é baseado ainda hoje, pelo exame clínico dermatoneurológico, associado ao exame baciloscópico (coloração para BAAR – bacilo álcool ácido resistente) do esfregaço dérmico de sítios específicos e pelo exame histopatológico de biópsias da lesão de pele. Porém, nas formas paucibacilares, por terem poucos bacilos, nem sempre é possível detectá-los por estes dois métodos convencionais. Devido a isso a sensibilidade é baixa (BHATIA, 1993). Da mesma forma, nos métodos sorológicos cujos testes fazem a mensuração de anticorpos IGM contra o Glicolípídeo fenólico, da parede do *M.leprae* (BUHRER-SÉKULA, 2003).

2.9.1 Exame baciloscópico.

Utiliza-se o raspado de 4 locais, que podem ser: os lóbulos das orelhas, um dos cotovelos e uma lesão cutânea. Após ser feito o esfregaço, este é corado pelo Ziehl-Neelsen, fazendo-se a contagem dos bacilos pela microscopia óptica com a lente de imersão, onde são calculados os índices bacteriológicos e morfológicos. Os bacilos se coram de vermelho e poderão se apresentar de duas formas: homogêneos ou íntegros, que correspondem aos bacilos viáveis, e granuloso ou fragmentado, que são os não-viáveis.

2.9.1.1 O índice bacteriológico/ baciloscópico (IB)

Corresponde ao número de bacilos encontrados por campo, independentemente de sua morfologia e é expresso pela escala logarítmica de Ridley.

- = ausência de bacilo.
- 1+ = 1 a 10 bacilos / 100 campos
- 2+ = 1 a 10 bacilos / 10 campos
- 3+ = 1 a 10 bacilos por campo
- 4+ = 10 a 100 bacilos por campo
- 5+ = 100 a 1000 bacilos por campo
- 6+ = mais de 1000 bacilos por campo

2.9.1.2 O índice morfológico (IM)

É a porcentagem de bacilos homogêneos encontrada. Nas formas multibacilares, virgem de tratamento, o IM estará positivo, sendo raramente maior que 10 e usualmente menor que 5. O IM pode cair para zero em um paciente LL após 4 semanas de tratamento por MDT.

2.9.2 Tratamento da hanseníase: recidiva e resistência medicamentosa.

O termo: recidiva refere-se à recorrência ou o aparecimento da doença após a cura da mesma (REDDY & CHERIAN, 1991; SEHGAL e cols., 1996; DESIKAN,1997). Na hanseníase, é considerado um caso de recidiva o paciente que após ter recebido alta do tratamento por cura, desenvolve novos sinais e sintomas da doença, afastada a possibilidade de estados reacionais pela ausência de resposta ao corticóide (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

A recidiva pode acontecer devido a vários fatores: a) os ligados ao bacilo, tais como, persistência e resistência bacteriana; b) os ligados ao hospedeiro, tais como, imunossupressão, gravidez e formas virchowianas avançadas; c) os ligados às regiões endêmicas: re-infecção e d) os ligados à operacionalidade, por exemplo: diagnóstico tardio, terapêutica inadequada ou irregular da doença e erro de classificação (BRAKEL e cols., 1989; OLIVEIRA, 1997; KLIOZE & RAMOS-CARO, 2000; GANAPATI e cols., 2001).

Em meados de 70, publicações em todo o mundo registram a resistência a sulfona, então único fármaco para tratamento da hanseníase. Ainda nessa década surgem outras drogas específicas como a clofazimina e a rifampicina, além das primeiras recomendações dos esquemas terapêuticos associados, utilizando dois ou três quimioterápicos e posteriormente com a RMP (DE SOUZA LIMA & OPROMOLLA, 1963). No Brasil, Talhari e cols. detectaram os primeiros casos de sulfono resistência secundária e também de resistência

primária, na Amazônia, em 1985. O Ministério da Saúde adota então o esquema associado-DNDS¹ - que foi difundido na rede de saúde pública, a partir de 1978².

A Poliquimioterapia (PQT)³ tratamento vigente para a hanseníase é recomendada desde 1982 pela OMS, mas teve implantação gradual no Brasil a partir de 1986, passando a único esquema nacional em 1991. No início dos anos 90, o Ministério da Saúde implantou a dose fixa de tratamento PQT, adotando o termo alta por cura, para os doentes que completassem este esquema dentro dos prazos estabelecidos: seis doses PB em até nove meses e 24 doses MB em até 36 meses. Em 1998, a OMS reduziu o tratamento MB para 12 doses fixas, a serem completadas em até 18 meses, adotado pelo Brasil em 1993. Na mesma época foram disponibilizadas as drogas ofloxacina e Minociclina, para esquemas alternativos, em substituição a RMP e DDS respectivamente (Ministério da Saúde, 1994-2009).

Para a detecção de resistência em *Mycobacterium tuberculosis*, usa-se o teste de sensibilidade em meio de cultura contendo as drogas de interesse quimioterápico, já se tratando do *M. leprae*, o teste de sensibilidade é mais complexo, a biopsia cutânea é processada e inoculada no coxim plantar de camundongos Balb/c (isogênicos e imuno-competentes), para verificar a resistência e viabilidade do mesmo, de acordo com a técnica de Shepard.

As drogas utilizadas nos esquemas padronizados pela OMS e MS são a rifampicina (única bactericida dos esquemas padrões), dapsona e clofazimina que têm fornecimento gratuito em todo o país.

Monitorizar a existência de resistência a rifampicina é muito importante, pois é a única droga bactericida da PQT muito efetiva contra o *M. leprae*.

De acordo com a tabela 6, o percentual de casos notificados como recidiva entre os casos novos de hanseníase, no período de 2001-2008 passa de 2,4 a 4,00%. Essa informação, no entanto, necessita validação, tendo em vista a não uniformidade dos critérios diagnósticos de recidiva (www.portal.saude.gov.br/portal/svs/sinan).

² Esquema DNDS: Rifampicina (RMP) 600mg/dia, 90 dias +Dapsona(DDS) 100mg/dia,-5 anos após negativar

³ PQT/MB: RMP600mg + Clofazimina (CLZ) 300mg/mês(supervisionado)+ DDS100mg + CLZ 50mg/dia, 12 em até 18 meses
PQT/PB: RMP600mg/mês(supervisionado)+ DDS100mg/dia, 6 doses/mensais em até 9 meses

Tabela 6 - Percentual de recidivas de hanseníase no total de entradas no SINAN e entre os casos novos-2001-2008

Entradas / Recidiva SINAN-*	Anos							
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
% Recidivas no Total de novas entradas	2,3	2,5	2,6	2,8	3,1	3,1	31,	3,8
% Recidivas no Total de Casos Novos	2,4	2,5	2,7	3,0	3,2	3,3	3,6	4,0

2.10 Mecanismos de ação dos antimicrobianos.

A introdução dos antibióticos contra infecções tem sido um dos mais importantes investimentos médicos nos últimos cinquenta anos (Figura 4). Entretanto, foram surgindo resistência a antibióticos criando-se a necessidade de novas drogas antibacterianas mais potentes. O desenvolvimento de antimicrobianos tem sido um sucesso nos componentes essenciais das cinco áreas do metabolismo bacteriano: síntese de parede celular, síntese de proteínas, síntese de RNA, síntese de DNA e metabolismo intermediário (HOOPER, 2001; CHOPRA I e cols. 2002). As bases moleculares da ação dos antibióticos são bem estudadas e seus principais alvos (Figura 5). Existem dois tipos de resistência medicamentosa:

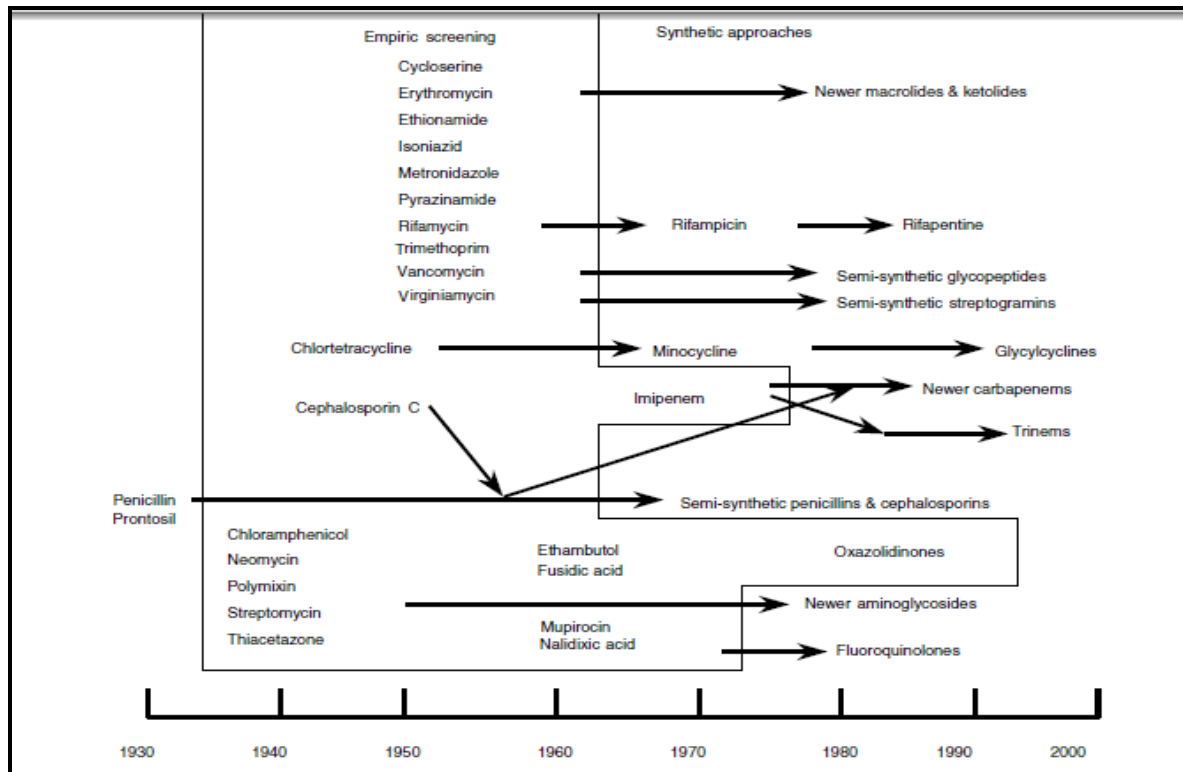


Figura 4. A descoberta dos antibióticos, Chopra (2002).

Drug/class	Function inhibited	Molecular target
β -Lactams	Peptidoglycan synthesis	Transpeptidases and carboxypeptidases
Bacitracin	Peptidoglycan synthesis	Undecaprenyl pyrophosphate
D-Cycloserine	Peptidoglycan synthesis	D-alanine racemase and D-alanyl-D-alanine synthetase
Fosfomicin	Peptidoglycan synthesis	UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase
Glycopeptides	Peptidoglycan synthesis	Cell wall peptidoglycan
Quinolones	DNA replication/transcription	Gyrase and topoisomerase IV
Rifamycins	Transcription	RNA polymerase
Aminoglycosides	Protein synthesis	30S ribosomal subunit
Chloramphenicol	Protein synthesis	50S ribosomal subunit
Fusidic acid	Protein synthesis	Elongation factor G
Macrolides	Protein synthesis	50S ribosomal subunit
Oxazolidinones	Protein synthesis	50S ribosomal subunit
Streptogramins	Protein synthesis	50S ribosomal subunit
Tetracyclines	Protein synthesis	30S ribosomal subunit
Mupirocin	Charging of isoleucyl tRNA	Isoleucyl tRNA synthetase
Sulphonamides	Folate synthesis	Dihydropteroate synthetase
Trimethoprim	Folate synthesis	Dihydrofolate reductase

Figura 5. Alvos na bactéria e agente antimicrobiano – Chopra (2002).

2.10.1 Primária.

Observada em pacientes que não foram previamente tratados com quimioterápicos, mas que possivelmente, foram infectados com bacilos resistentes a drogas, provenientes de pacientes portadores de resistência secundária.

2.10.2 Secundária ou adquirida.

É a mais freqüente, onde inicialmente ocorre melhora com o quimioterápico utilizado, mas posteriormente observa-se queda na resposta medicamentosa. Pode ser devido ao uso de terapia inadequada (JI, 1985), levando a um processo seletivo, onde a maioria sensível às drogas morre e, os mutantes sobrevivem e multiplicam-se. Como a divisão celular e multiplicação do *M leprae* é lenta, os casos de recidiva levam aproximadamente 4 a 10 anos para serem diagnosticados.

Estudos moleculares dos mecanismos de resistência em micobactérias têm sido realizados para o desenvolvimento de métodos moleculares de detecção de resistência a rifampicina e quinolonas em *M. leprae* (CAMBAU e cols. 2002; MATSUOKA e cols. 2000; HONORÉ & COLE, 1993).

2.10.3 Resistência à dapsona.

A Diamino-diphenyl-sulfone (DDS), ou dapsona, foi o primeiro antibiótico efetivo contra a hanseníase em todo mundo (VINNICOMBE & DERRICK, 1999; JI, 1985; PEARSON e cols. 1976; PETTIT & REES, 1964; SHEPARD e cols. 1968). Desde que a dapsona foi usada como monoterapia 20 anos atrás, o *Mycobacterium leprae* resistente a dapsona aumentou em torno de 80% nas pessoas com recidiva (resistência secundária) e 40% nos novos casos (resistência primária) (JI, 1985; PEARSON e cols. 1976). Após a multi droga terapia, a resistência a dapsona está menos comum, embora a prevalência não seja sabida ao certo, pois existem poucos trabalhos.

A dapsona age inibindo a síntese de ácido fólico, pela competição com o ácido para-amino-benzóico (PABA) na bactéria, devido a sua similaridade estrutural, inibindo assim, a formação de DNA e RNA, impedindo a replicação e transcrição do mesmo. O PABA é

essencial para o *M leprae*, para a síntese de ácido fólico e com isso a síntese de purinas, envolvidas diretamente na formação de DNA e RNA.

Resistência a dapsona foi detectada em 1964 e envolve duas mutações no gene *folP1* – Figura 6 (DALLAS e cols., 1992; DALLAS e cols., 1993; KAI e cols. 1999; WILLIAMS e cols. 2000).

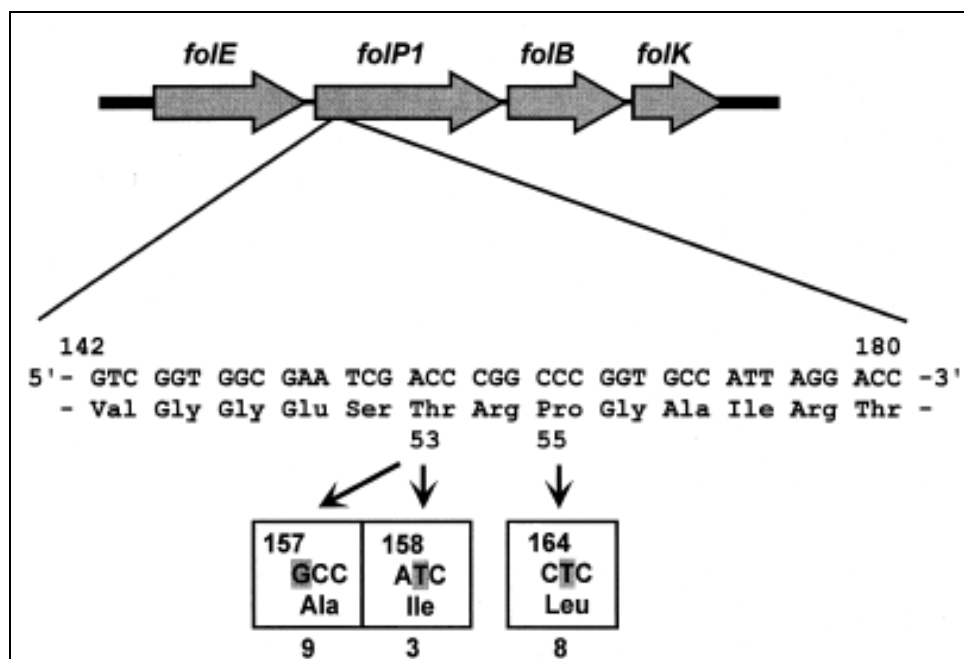


Figura 6 – Mutações no gene *folP1*: nos códons 53 e 55

2.10.4 Resistência à rifampicina.

Rifampicina: É um agente bactericida excepcionalmente potente contra o *M. leprae* e o *M. tuberculosis*. É rapidamente absorvida com grande distribuição pelos tecidos, atravessando as membranas lipídicas, sem perder sua ação antimicrobiana em meio ácido, o que a torna extremamente importante em infecções onde a bactéria sobrevive dentro das células como acontece com a hanseníase e a tuberculose. As rifamicinas são umas classes de componentes lipofílicos que são absorvidos rapidamente no envelope celular hidrofóbico da micobactéria. O mais conhecido membro deste grupo é a rifampicina, uma droga de primeira linha para o tratamento da tuberculose, hanseníase e outras doenças causadas por micobactérias. A RNA polimerase é um complexo de enzima que existe em duas formas: a parte central da enzima (consistindo de duas subunidades α , e uma cópia de cada uma das subunidades β , β' e ω) Y. L. Janin 2007. O alvo da rifampicina é a subunidade beta do DNA dependente da RNA polimerase, que codifica para o gene *rpoB* bloqueando a transcrição. A região do genoma de *M. leprae* contendo o gene *rpoB* (Figura 7) foi uma das primeiras a serem seqüenciadas e analisadas (HONORÉ e cols. 1992). As mutações ocorrem em uma região curta em torno de 27 códons (TELENTI, 1993; COLE e cols. 1994).

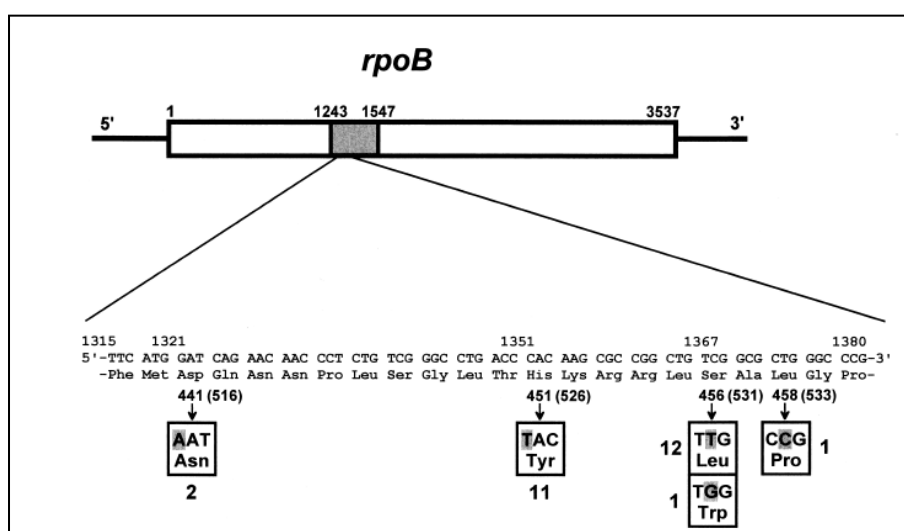


Figura 7 – Mutações no gene *rpoB*: nos códons 516, 526, 531 e 533

2.10.5 Resistência à ofloxacina.

Ambos, procariotos e eucariotos, apresentam topoisomerases de tipo I e de tipo II capazes de remover superenrolamentos do DNA. O DNA girase é responsável, em parte, pela manutenção da topologia do DNA dentro da célula bacteriana. O DNA girase catalisa o ATP dependente de uma super torção negativa que facilita o desenrolamento da dupla hélice de DNA, o que estimula muitas reações do DNA, incluindo a iniciação da transcrição e da replicação (BERNARD & MAXWELL, 2001). O DNA girase consiste de duas proteínas, *gyrA* e *gyrB*, que formam um complexo de enzima ativa A_2B_2 . A girase introduz mudanças na topologia do DNA circular fechadas por clivagem da hélice de ambas as fitas, formando 4 bases fracas, passando adicional segmento de DNA. As quinolonas enxertam a toxicidade na célula bacteriana por estabilizar a fenda da dupla hélice de DNA desfavorecendo a ligação da girase, afetando a replicação, transcrição e reparo. Mutações na subunidade *gyrA* e/ou *gyrB* confere resistência ou hipersensibilidade para quinolonas (GOOTZ e cols. 1990) Figura 8.

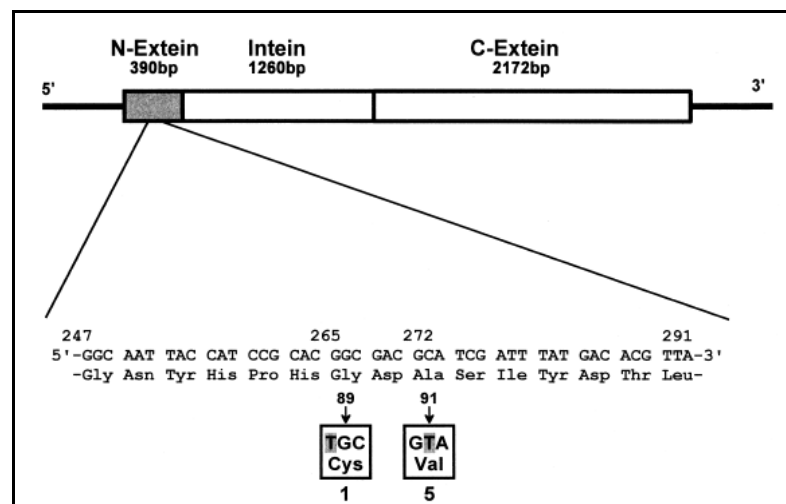


Figura 8- Mutações no gene *gyrA*: nos códons 89 e 91.

2.10.6 Resistência a clofazimina.

E uma droga que faz parte do conjunto da PQT, entretanto, não foi objeto de estudo. **Ainda não se tem conhecimento do alvo molecular da clofazimina envolvido em resistência medicamentosa.**

Segundo Baohong (2002) o uso irregular das drogas (auto-administradas) pode levar ao surgimento de resistência a rifampicina (supervisionada). O progresso da biologia molecular oferece oportunidade para a identificação do *Mycobacterium leprae* e o diagnóstico de resistência a drogas do mesmo. Ainda um tema recente na área da lepra, torna-se uma prioridade em 2008, para a WHO 2008.

3. Justificativa

Em muitos países, incluindo países desenvolvidos como o Reino Unido, a incidência da tuberculose bovina vem aumentando nos últimos anos. No Brasil a infecção por *M. bovis* é endêmica e estima-se que 10% do rebanho estejam infectados. Entretanto, a verdadeira incidência da tuberculose bovina é desconhecida: entre novembro de 2003 e junho de 2004 um “excesso de casos” foi registrado na região norte do estado do Rio de Janeiro nas regiões dos municípios de Aperibe e Conceição do Macabu (Comunicação pessoal, 2004, Rossana Oliveira, Controle de Zoonoses, Secretaria Estadual de Saúde – RJ).

Não havia sido realizado até o momento, nenhum estudo sistemático dedicado ao problema da tuberculose humana relacionada ao *M. bovis* no Brasil. Os números assim como a importância atual – e, portanto, igualmente, da projeção de impacto futuro - desta condição na saúde pública brasileira são completamente ignorados.

Não foi descrito uma avaliação destes métodos para diferenciar isolados brasileiros de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, a não ser um pequeno número de cepas no estado de Minas Gerais pela metodologia PCR-RFLP *pncA* (Barouni, A S e cols., 2004).

A recidiva em hanseníase é definida como ocorrência de sinais de atividade clínica, após alta por cura e ausência de resposta aos corticosteróides. Ainda pode ser considerado um evento raro, na era da poliquimioterapia (dapsona, rifampicina e clofazimina). As informações sobre recidiva no Brasil são obtidas pelo SINAN.

Portanto, verificar a existência de resistência a rifampicina é muito importante, pois o potencial bactericida sobre o *M. leprae* torna essa droga de grande importância no esquema poliquimioterápico vigente. Segundo Baohong Ji (2002), o uso irregular das drogas pode levar ao surgimento de resistência a rifampicina e/ou a dapsona. Estudos recentes têm demonstrado que isolados de biopsias de pacientes foram resistentes a várias concentrações de dapsona, rifampicina ou clofazimina, a uma delas ou a várias delas (Williams & Gillis, 2004). Com o avanço de diversas técnicas moleculares, tais como, PCR e seqüenciamento de partes do gene micobacteriano, tem sido possível investigar e detectar resistência medicamentosa e a epidemiologia da hanseníase.

4. Objetivo.

4.1 Parte 1.

Identificar a existência de casos de tuberculose humana atribuíveis a *M. bovis* em casos classificados como tuberculose no Rio de Janeiro, MG e Ceará por métodos moleculares.

Descrever resistência a rifampicina através de seqüenciamento do gene *rpoB* em isolados identificados pelo método das proporções como resistentes a drogas anti-tuberculose oriundos do Ceará.

4.2 Parte 2.

Identificar cepas de *M. leprae* resistentes às drogas rifampicina, dapsona e ofloxacina dos casos de recidiva de hanseníase de 5 estados brasileiros, através de métodos moleculares.

Demonstrar a natureza e frequência das mutações nos diferentes genes correlacionando com informações clínica e epidemiológica para verificação de resistência medicamentosa.

5 **Materiais e Métodos**

5 Metodologia.

5.1 Tipo de estudo 1 – *M. bovis* e tuberculose humana.

Estudo Observacional, com amostra de conveniência, uma vez, que não controlamos nem a exposição nem a alocação das culturas provenientes dos casos de tuberculose. O estudo foi conduzido no contexto de uma situação dada, a partir da observação dos resultados.

5.1.1 Amostras

A população de amostras do estudo para diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* e a comparação dos diversos métodos moleculares constituiu-se em:

- Amostras do Estado do Rio de Janeiro

1427 isolados referentes a 701 pacientes da região metropolitana do Rio;

9 isolados em cultura L-J glicerol de MTB resistentes catalogados como MDR provenientes do Centro de Referência Prof. Hélio Fraga – Curicica, Rio de Janeiro.

303 lâminas de baciloscopia coradas pelo Ziehl-Neelsen (ZN) (MS, 1998) referentes a 140 pacientes do Município de Campos dos Goytacazes.

85 isolados de bovinos e bubalinos do Estado de Minas Gerais.

- Amostras do Estado de Minas Gerais

177 lâminas de baciloscopia coradas pelo método de ZN (MS, 1998) referentes a 97 pacientes provenientes das cidades: Uberaba, Juiz de Fora, Monte Claro, Teófilo Otoni e Passos – Minas Gerais;

16 biopsias de linfonodos em blocos de parafina de 16 pacientes provenientes do Hospital João Penido, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais.

- Amostras do Estado de Ceará

285 isolados em cultura L-J glicerol referentes a 279 pacientes provenientes do Laboratório Central, Hospital de Messejana, Secretaria de Saúde do estado do Ceará.

A população de amostras do estudo para análise molecular de resistência constituiu-se em:

84 isolados em cultura L-J glicerol de MTB resistentes catalogados como multidrogaresistentes (MDR) provenientes do Laboratório Central – Hospital de Messejana – Secretaria de Saúde do estado do Ceará.

5.1.2 Métodos de Micobacteriologia clássica: cultura, identificação de espécie e de resistência a drogas anti-tuberculosas.

5.1.2.1 Meio Löwenstein–Jensen.

Os isolados foram cultivados em meio de cultura tradicional Löwenstein-Jensen (L-J), adicionado de glicerol (*M. tuberculosis*) ou piruvato (*M. bovis*). Este meio é preparado, resuspendendo 37,2 g da base pronta (Difco) em 600 ml de água contendo 12 ml de glicerol (*M. tuberculosis*). A solução é aquecida até ferver sob agitação constante e autoclavada e, após esfriar até uma temperatura entre 45-60 °C, e acrescentado à base estéril 1 litro do homogeneizado de ovo fresco previamente esterilizado externamente com álcool etanol 70 %, durante a noite/ 15 minutos. Após homogeneização, o meio é distribuído em tubos de cultura e coagulado a 85 °C por 50 minutos (Ministério da Saúde, 2008.).

5.1.2.2 Meio Löwenstein-Jensen com piruvato.

Para o isolamento de *M. bovis* e de *M. africanum* utilizou-se meio Löwenstein-Jensen modificado, substituindo o glicerol por 0,5 % de piruvato de sódio (David, H. e cols., 1989).

Protocolo de preparo.

Misturar 500 ml de solução mineral, 20 ml de solução de verde malaquita a 2% e, 1000 ml de ovos homogeneizados;

Sob agitação constante distribuir 7 ml do meio em tubos 16 X 150 mm com tampa de rosca;

Colocar os tubos inclinados, no soro coagulador à temperatura de 80 a 85 °C até completa solidificação (aproximadamente de 50 a 90 minutos);

Rendimentos de aproximadamente 230 tubos;

Solução mineral:

Pesar 3,5 g de KH_2PO_4 para 500 ml de água destilada/deionizada;

Pesar 2,0 g de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para 500 ml de água destilada/deionizada;

Pesar 6,25 g de **piruvato de sódio** para 500 ml de água destilada/deionizada;

Transferir para balão volumétrico, acrescentar metade do volume de água, homogeneizar até completa dissolução e completar para o volume desejado com água destilado/deionizada;

Autoclavar a 110 °C por 15 minutos e reservar.

Solução aquosa de verde malaquita a 2%.

Pesar 1 g de verde malaquita para 50 ml de água destilada/deionizada; acrescentar metade do volume de água destilada/deionizada e homogeneizar até completa dissolução; completar o volume desejado com água destilada/deionizada e homogeneizar até completa dissolução. Esterilizar a 100 °C, em vapor fluente, por 30 minutos e reservar.

Ovos homogeneizados.

22 a 24 ovos frescos. Lavá-los com água e detergente neutro com auxílio de gaze, deixá-los mergulhados em água destilada por aproximadamente 3 minutos e, posteriormente, colocá-los imersos em um recipiente com ácido per acético 0,03% por 10 minutos e depois em um recipiente com álcool 70 % durante 10 minutos. Homogeneizar com a batedeira e

filtrar através de gaze 8 dobras em uma proveta estéril de 1000 ml; fazer em bancada limpa, quebrar os ovos com auxílio de pinça estéril –reservar.

5.1.2.3 Identificação de micobactérias a partir de uma cultura de micobactérias.

A análise fenotípica baseou-se nas características, tais como, morfologia de colônia, velocidade e temperatura de crescimento, o crescimento ou não na presença de antibiótico e outros componentes.

A separação do complexo *M. tuberculosis* das micobactérias MNTs é realizada com a análise macroscópica da cultura, análise microscópica, teste da niacina e crescimento em Löwenstein-Jensen contendo ácido p-nitrobenzóico (L-J PNB) – Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias, 2008.

5.1.2.4 Método das proporções em Löwenstein-Jensen (L-J) - teste indireto.

A versão do método das proporções em meio L-J é a mais utilizada em países da América Latina, incluindo o Brasil. O método das proporções pode ser realizado a partir de escarro positivo à baciloscopia (teste direto) ou a partir de isolado bacteriano já identificado como *M. tuberculosis* (teste indireto). As drogas são incorporadas ao meio antes da coagulação, as drogas utilizadas no teste de sensibilidade são as do esquema de tratamento de primeira linha. Emprega-se o meio sem droga e com droga, o meio sem droga permite conhecer o número total de bacilos semeados e o meio com droga o número de mutantes à droga correspondente.

5.1.2.5 Controles

Utilizamos cepas de referência *Mycobacterium bovis* ATCC19210 e ATCC 35736; *Mycobacterium tuberculosis* Ra ATCC 25177 e o *M. tuberculosis* Rv ATCC 27294; *Mycobacterium bovis* AN5 e *Mycobacterium tuberculosis* de infecção humana, para estabelecermos um controle de crescimento dos organismos do estudo em meio Löwenstein-Jensen com piruvato (L-J piruvato).

5.1.3 Métodos de isolamento de DNA.

A diferenciação foi baseada na amplificação de certas regiões do genoma de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Logo, não houve necessidade de se obter DNA de alta pureza. Porém, as culturas foram submetidas a um método de extração rápida de DNA e quando foi observada a falta de amplificação, foi realizada uma extração mais rigorosa para obter DNA mais puro.

5.1.3.1 Extração rápida de DNA.

Uma pequena quantidade de massa micobacteriana foi colocada em eppendorf juntamente com TE-Triton (1%) e logo em seguida agitada em vortex. Após centrifugação, todas as amostras foram colocadas a 100 °C em banho-maria durante 10 minutos.

5.1.3.2 Extração de DNA de Lâminas de baciloscopia com suspensão de Chelex (ácido iminodiacetídico).

Após observação em microscópio da lâmina corada ZN o óleo foi retirado com xilol. O material corado ZN foi retirado da lâmina após serem adicionados 25 µl de água destilada, e o mesmo foram transferidos para um eppendorf contendo 75 µl da suspensão de 15% Chelex, após misturar as amostras, estas foram colocadas durante 30 minutos a 97 °C. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e guardado a freezer – 20 °C até ser usado no PCR (Van der Zanden, A. G. M. e cols. 1998; Van der Zanden, A. G. M e cols. 2003).

5.1.3.3 Método CTAB/NaCl para extração de DNA.

O método utilizando CTAB (cetil trimetil amonium bromide)/NaCl foi descrito por van Embden e colaboradores (1993). Em resumo, algumas colônias foram transferidas para um tubo eppendorf com 500 µl de TE e as bactérias inativadas pelo aquecimento a 80°C por 20 minutos. Após mistura com 50 µl de lisozima (10mg/ml) e incubação por uma hora a 37°C, a solução foi misturada com 70 µl de 10% SDS/proteinase K e incubada durante 10 minutos a 65°C. Adicionamos 100 µl de NaCl 5M e 100 µl CTAB e após mistura, incubaremos por 10 minutos a 65°C. A extração do DNA foi feita através da mistura por 10 segundos com 750 µl de clorofórmio-álcool isso amílico (24:1) e transferência da fase aquosa após centrifugação. Esta fase foi misturada com 450 µl de isopropanol e após incubação durante 10 minutos, centrifugada durante 15 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. O pellet de DNA foi lavado com álcool e após secar, dissolvido em 20 µl de tampão TE e guardado em freezer a -20°C.

5.1.4 Métodos de diagnóstico molecular e de genotipagem.

5.1.4.1 Amplificação e polimorfismo do gene *pncA*.

A presença ou não da mutação foi visualizada por PCR-RFLP, como descrito por Barouni, A S e cols., 2004. Usamos dois grupos de iniciadores como mostra a **figura 9**. O grupo de iniciadores P1 (5' GTC GGT CAT GTT CGC GAT CG 3') – anelando de -105 a 86 pares de base da região não - codificante anterior (upstream) ao gene *pncA* e P6 (5' GCT TTG CGG CGA GCG CTC CA 3') – anelando de 60 a 79 pares de base, na região não - codificante após (downstream) o gen *pncA*. Os produtos amplificados de 726 bp foram digeridos com a enzima de restrição *Eco065I* (*BstE* II) e, após a digestão foram analisados em gel de agarose 5%. Condições do PCR: 4 minutos a 95 °C; 35 ciclos (1 minuto a 95 °C; 2 minutos a 68 °C e 1 minuto a 72°C) e 10 minutos a 72 °C.

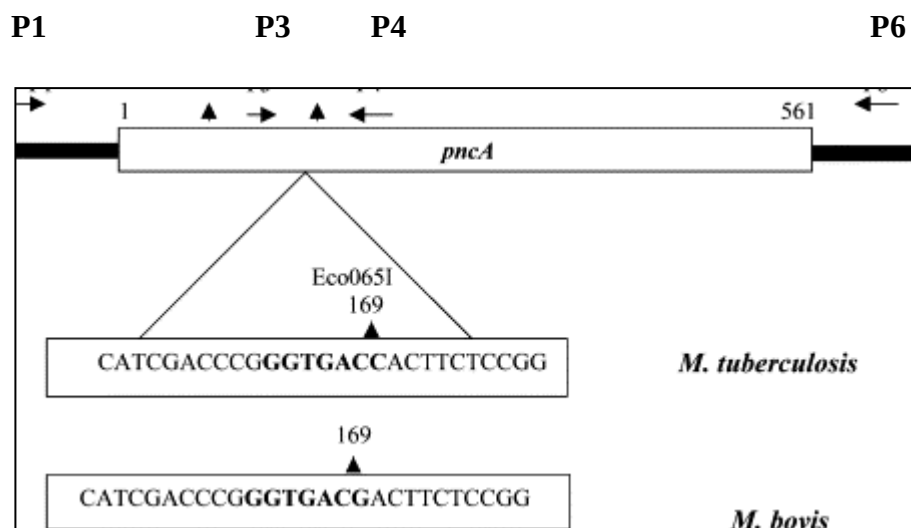


Figura 9 – Posição do gene *pncA* e dos oligos usados para gerar os produtos de PCR.

5.1.4.2 Amplificação e detecção do polimorfismo do gene *oxyR*

Devido à possibilidade das cepas de *M. bovis* serem sensíveis a pirazinamida e a seleção de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a droga pelo tratamento inadequado e a transmissão delas (resistência primária), outros métodos de diferenciação entre as espécies foram aplicados. Foi descrito por Sreevatsan e colaboradores em 1996, um polimorfismo de base única na posição 285 do gene *oxyR*, sendo que somente *M. bovis* (BCG) tem uma adenine (**A**) nesta posição; o resto dos organismos do complexo apresentam guanina (**G**).

Usamos os iniciadores *oxyR* Tb1 5'- CGCGCTGTCAGAGCTGAC TTT – 3' e *oxyR*Tb2 5'- TCTGCGGAATCAGTGTACC – 3'. Após amplificação os produtos de 150 bp foram verificados em gel de agarose 3% e seqüenciados em seguida.

Condições do PCR: 1 minuto a 94 °C, 45 ciclos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C e 1 minuto a 72 °C) e 10 minutos a 72 °C.

5.1.4.3 Análise do gene *gyrB* - MTUB.

Usamos o grupo de iniciadores MTUB-f (TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC) e MTUB-r (ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG). Após a amplificação e visualização do produto de 1020 bp estes foram digeridos com as enzimas de restrição *RsaI*, *TaqI* e *SacII* e, analisado em gel de agarose 2%.

Condições do PCR: 10 minutos 95 °C; 35 ciclos (1 minuto a 94 °C; 1 minuto a 65 °C e 1,5 minutos a 72 °C) e 10 minutos 72 °C.

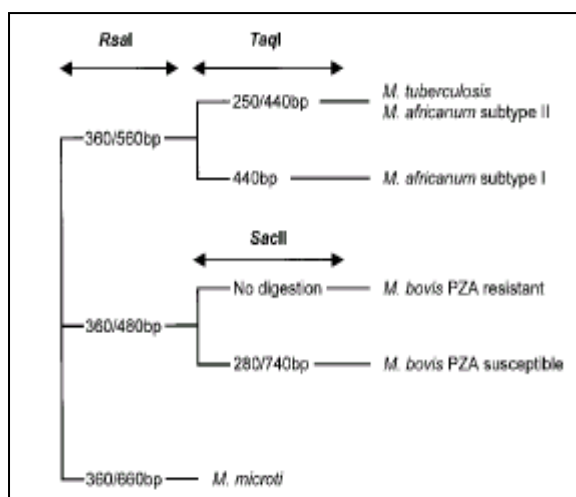


Figura 10 – Algoritmo do RFLP para diferenciação dos membros do complexo *M. tuberculosis*.

5.1.4.4 Spoligotyping

As concentrações utilizadas de cada reagente para a reação de PCR foram de 10 a 20 ng de DNA alvo, 20 pmol de cada iniciador (Dra e Drb), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatos, 1 unidade de enzima Taq polimerasa, tampão de enzima 1X e água destilada (q.s.p.). Em cada reação foram utilizados dois controles negativos e dois positivos, sendo estes últimos BCG Moureau e H37Rv *M. tuberculosis*.

Condições de PCR: 3 minutos a 96 °C; 35 ciclos (1 minuto a 96 °C, 1 minuto a 55 °C e 30 segundos a 72 °C) e 5 minutos a 72 °C.

Para hibridização dos produtos de PCR, alíquotas de 30µl do produto de PCR amplificado foram diluídas em 150 µl de tampão 2X SSPE (0,2M Na₂HPO₄, 3,6M NaCl, 20Mm EDTA, pH 7.4) / 0,1% SDS e desnaturadas a 99°C durante 10 minutos, em seguida foram imediatamente colocadas em banho de gelo. Esta mistura foi então aplicada ao “miniblotter” (Immunetics, Cambridge-MA). A hibridização foi realizada a 60° C por um período de 60 minutos em uma superfície horizontal sem agitação. Após este período a membrana foi lavada duas vezes com 200 mL de tampão 2X SSPE/0,5% SDS a 60°C por 10 minutos, e então incubada com 10µL do conjugado estreptavidina-peroxidase a 42° C por um período de 45 a 60 minutos. Em seguida a membrana foi lavada mais duas vezes com 2X SSPE a temperatura ambiente. Ao final das lavagens, a membrana foi incubada com aproximadamente 20 mL do líquido de detecção ECL (Kit ECL Amerhans – Pharmacia Biotech) para em seguida detectar-se por quimiluminescência a presença na membrana de produto de PCR híbrido após 60 minutos da exposição da membrana a um filme sensível à luz. Figura 11.

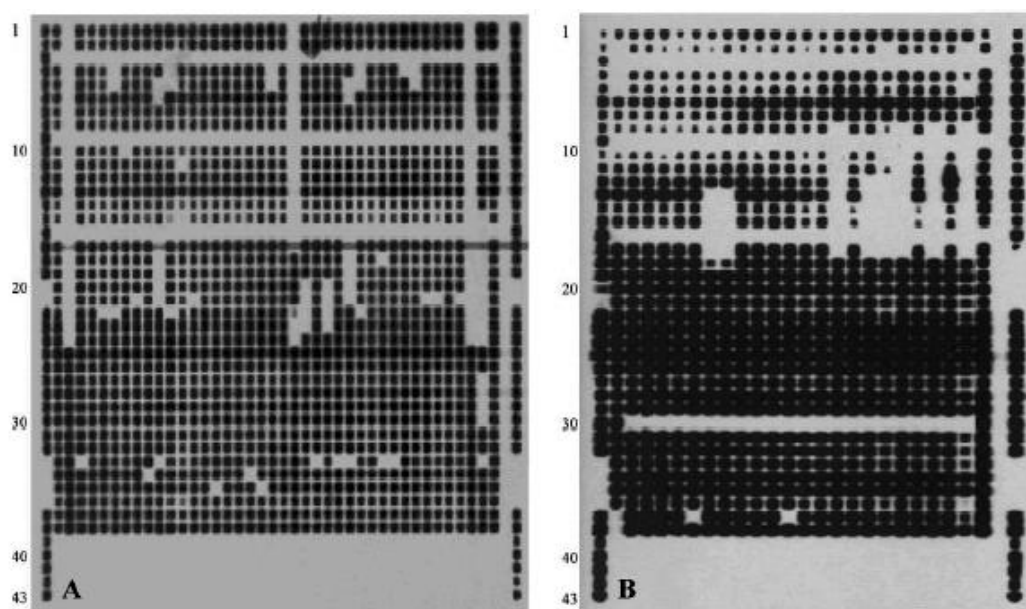


Figura 11 – Exemplos de spoligotypes de *M. bovis* da França (Haddad e cols., 2001) e dos Camarões (Njanpop-Lafourcade e cols., 2001).

5.1.4.5 Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU).

O perfil de MIRU-VNTR de diferentes isolados de *Mycobacterium tuberculosis* era determinado inicialmente através da técnica de PCR em 12 loci variáveis, sendo os MIRUs: 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40 (Figura 11; Tabela 8). Hoje eles são determinados em 24 locis variáveis, os códigos facilitam comparações entre os laboratórios (Narayanan S, 2003).

Quadro 2 – Concentrações de cloreto de magnésio utilizada nos PCRs.

Locus	Primers de PCR (5' para 3')	Concentração de MgCl ₂
MIRU 2	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT	2mM
MIRU 4	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGTCAGC	2mM
MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	2mM
MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	2mM
MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	1,5mM
MIRU 23	CAGCGAAACGAAGTGTGCTATCAC CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT	2,5mM
MIRU 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	1,5mM
MIRU 26	CCCGCCTTCGAAACGTCGCT TGGACATAGGCGACCAGGCGAATA	3,0mM
MIRU 27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA	1,5mM
MIRU 31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	2mM
MIRU 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT	2,5mM
MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	2mM

Condições do PCR: 5 minutos a 95°C, 40 ciclos (1 minuto a 94°C, 1 minuto a 59°C e 1.5 minutos a 72°C) e extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. A quantidade de repetições para cada VNTR foi determinada através de

comparação com marcador de tamanho molecular de 100 pares de base - Figura 12. SUPPLY e cols., 2000.

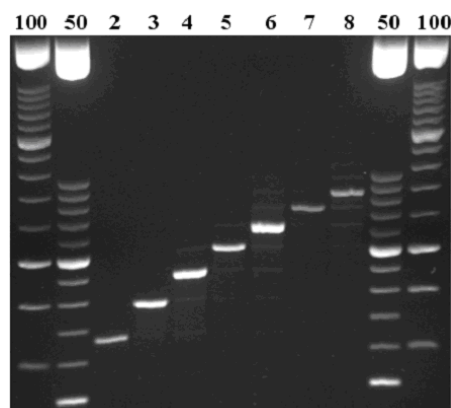


Figura 12 – Produtos de PCR de MIRU 24 em gel de agarose 2%.

5.1.4.6 PCR e seqüenciamento dos genes *rpoB* TB e *gyrA* TB

Uma unidade de Taq DNA polimerase, 100 µM de cada dNTP, 30 pM/µl dos iniciadores *rpoBTbF* 5' -GGT GGT CGC CGC GAT CAA G-3', *rpoBTbR* 5' – TTT GCG GTA CGG TGT TTC G -3' (163 bp); *gyrATbF* 5` – CCC GGA CCG TAG CCA CGC TAA GTC – 3, *gyrATbR* 5` – CAT CGC TGC CGG TGG GTC ATT A – 3 (187 bp), 1,5 mM de MgCl₂.

Condições de PCR: 94°C durante 5 minutos, 6 ciclos (45 segundos a 94°C, 45 segundos de 68 – 63°C e 90 segundos a 72°C); 35 ciclos (45 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C e durante 90 segundos a 72°C) e 10 minutos a 72°C. Após amplificação os produtos foram verificados em gel de agarose 3% e seqüenciados em seguida.

5.1.5 Local do estudo.

A parte metodológica do estudo foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada A Micobactérias – IOC – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

5.1.6 Comitê de ética. Em anexo.

Como as amostras foram obtidas na rotina clínica de diagnóstico e acompanhamento de tratamento dos pacientes não foi necessário o Termo de consentimento Livre e Esclarecido. A

confidencialidade dos pacientes foi mantida em todo o protocolo de estudo, pois eram codificadas por números. (anexo 1)

5.2 Estudo 2 – *M. leprae* e resistência medicamentosa.

5.2.1 Investigação de resistência em *M leprae*.

Tipo de estudo: Laboratorial

A proposta desse estudo estava inserida no projeto “Magnitude e caracterização das recidivas de hanseníase em pacientes submetidos aos esquemas poliquimioterápicos / OMS e apoio à identificação de cepas resistentes do *M. leprae* em 5 estados brasileiros” para padronizar a definição de recidiva e avaliar a magnitude do problema no Brasil. Projeto multicêntrico, com envio de biópsias para a FIOCRUZ, aprovado pelo edital MCT-CNPq / MS-SCTIE-DECIT – Nº 35/2005.

5.2.2 Recebimento das amostras clínicas.

Utilizamos amostras dos pacientes com recidiva de hanseníase de cinco estados brasileiro: Rio de Janeiro, Ceará, Pará, Espírito Santo e Amazônia. Quadro 3.

5.2.3 Protocolo de recebimento de amostras, informação clínica/epidemiológica e estocagem (Anexo 8).

As amostras (biópsias) estavam em eppendorf de 1,5 µl contendo etanol 70% com os respectivos índices baciloscópicos e informação clínica/epidemiológica.

Quadro 3. Taxa de detecção de casos novos por estado envolvido no estudo:

Região e UF	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
N	5,68	5,73	5,76	6,01	6,30	7,00	7,99	8,44	7,92	7,87	7,35	7,10	7,80	7,90	7,46	6,60	6,45	54,34
Amazonas	7,63	8,00	5,91	6,66	6,79	6,31	5,97	6,10	5,31	4,96	4,17	4,30	4,60	3,70	3,35	2,90	2,78	22,96
Pará	4,55	4,64	4,94	4,83	5,61	6,60	7,48	8,68	8,55	8,61	8,42	8,10	9,00	9,30	9,01	7,90	6,97	61,90
NE	1,96	1,98	2,21	2,33	2,34	2,58	2,73	3,19	3,05	2,92	2,90	3,20	3,30	3,70	3,83	3,90	3,36	31,75
Ceará	2,41	2,48	2,45	2,65	2,72	3,01	2,82	3,53	3,59	2,93	2,90	3,40	3,20	3,60	3,46	3,40	3,62	30,17
SE	1,45	1,54	1,56	1,41	1,29	1,31	1,47	1,62	1,44	1,46	1,24	1,40	1,50	1,50	1,39	1,30	1,17	9,76
Espírito Santo	3,64	3,31	4,25	3,18	3,53	3,99	4,22	4,99	4,11	4,13	4,20	4,60	5,30	5,60	4,86	4,60	3,75	34,52
Rio de Janeiro	2,19	2,48	2,34	1,80	1,73	1,86	2,31	2,73	2,40	2,24	1,33	2,10	2,30	2,10	1,99	1,80	1,63	14,31

Fonte: Sinan/SVS/MS – dados atualizados em 26/11/2008. Excluídas as duplicidades 2001 a 2006

5.2.4 Processamento das amostras.

5.2.4.1 Purificação do DNA com Sephagles.

As biópsias foram maceradas com beads antes de começar a extração do DNA.

Foram adicionados 150 – 200µl de sephaglas a biópsia de 5µm, agitou-se gentilmente por 1 minuto para dissolver o pellet.

As amostras foram centrifugadas a velocidade máxima por 15 segundos e retirou-se o sobrenadante sem mexer com o pellet.

Lavou-se o pellet com sephaglas adicionando-se 200µl tampão de lavagem (vortexou-se gentilmente para ressuspender o pellet), centrifugou-se 2 – 3 minutos a velocidade máxima, e removeu-se o sobrenadante.

Adicionou-se 300 µl de etanol 70 %, ressuspendeu-se o pellet e centrifugou-se por 2 – 3 minutos a velocidade máxima, removeu-se o sobrenadante.

Ressuspendeu-se parcialmente o pellet e o deixou secar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Adicionou-se 50 -100 µl de água milli-Q ou TE 1X para ressuspendeu-se o pellet, incubou, por 5 minutos a temperatura ambiente (vortexou-se ocasionalmente para manter a sephaglas em suspensão).

Centrifugou-se a velocidade máxima por 1 minuto, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Se por acaso for sephaglas, tornar a centrifugar.

Os DNAs foram armazenados no freezer a – 20°C.

5.2.4.2 Purificação do DNA através da utilização kit Qiagen DNeasy tecido (spin-coluna) N° catálogo 69506.

A biopsia foi cortada em pequenos pedaços e colocada em eppendorf de 1,5 ml contendo 180 µl de tampão ATL. Adicionou-se 20 µl de proteinase K, misturou-se utilizando o vortex e, incubou-se a 56 C durante a noite para completa lise.

Vortexou-se durante 15 segundos e, adicionou-se 200 µl de tampão AL na amostra. Misturou-se completamente por vortex e após adicionou-se 200 µl de etanol (96 – 100%).

A mistura foi colocada na coluna mini spin acoplada ao tubo coletor de 2 ml, centrifugou-se a 8.000 rpm (6.000 xg) durante 1 minuto e descartou-se o fluído e o tubo coletor.

Colocou-se a coluna em outro tubo coletor de 2 ml e, adicionou-se 500 µl de AW1; centrifugou-se a 8.000 rpm durante 1 minuto. Descartou-se o fluído e tubo coletor.

A coluna foi colocada em outro tubo coletor e, adicionou-se 500 µl de tampão AW2; centrifugou-se durante 3 minutos a 14.000 rpm. Descartou-se o fluído e o tubo coletor.

A coluna foi colocada em outro tubo coletor – tubo eppendorf de 1,5 ml ou 2 ml e, adicionou-se 200 µl de tampão AE para eluir. Incubou-se durante 1 minuto a temperatura ambiente e após centrifugou-se durante 1 minuto a 8.00 rpm.

Os DNAs foram armazenados no freezer a – 20 °C.

5.2.5 Métodos moleculares.

5.2.5.1 PCR e seqüenciamento dos genes *rpoB*, *folPI*, *gyrA* e *gyrB* de *M leprae*:

Os DNAs purificados das biópsias de pacientes com recidiva, estão sendo usados na amplificação e seqüenciamento dos genes *rpoB*, *folPI* e *gyrA* e *gyrB* (Ramasoota P. e cols., 2000; You, E-Y e cols., 2005; Cambau E e cols 2002).

Recebemos DNAs controles para a mutação no gene *rpoB* e, após amplificarmos e seqüenciarmos encontramos mutações nos códons: **507**: Thr ACC → ATC Ile; **516**: Asp GAT → TAT Tyr e **531**: Ser TCG → TTG Leu, fornecido pelo Dr. Masanori Matsuoka (Centro de pesquisa de Hanseníase, Instituto nacional de Doenças Infecciosas – Tóquio, Japão).

Primers e condições de PCR.

rpoB externo: 1 U de Taq DNA polimerase, 100 µM de cada dNTP, 0,5 µM/µl dos iniciadores: **Mlres1** 5' – ATA TCG ACC ACT TCG GCA AC – 3' e **Mlres2** 5' - GTG GCG AGA CAT CCA TGT AA – 3', 2 mM de MgCl₂.

Condições de PCR: 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos (45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 61,9 °C e 90 segundos a 72 °C) e 7 minutos a 72 °C.

Após a amplificação os produtos de 640 bp foram visualizados em gel de agarose a 2%, seguido de seqüenciamento.

rpoB interno: 1 U de Taq DNA polimerase, 100 µM de cada dNTP, 0,5 µM/µl dos iniciadores: **MrpoBF** 5' – GGT GGT CGC CGC TAT CAA G – 3' e **MrpoBR** 5' – TTT GCG GTA CGG TGT TTC G – 3'', 2,5 mM de MgCl₂.

Condições do PCR: 5 minutos a 94°C, 6 ciclos (45 segundos a 94°C, 45 segundos de 65 a 60°C e 90 segundos a 72°C); 30 ciclos (45 segundos a 94°C, 45 segundos a 59°C e 90 segundos a 72°C) e 7 minutos a 72°C durante (Ramasoota, P. e cols., 2000). Após a amplificação os produtos de 289 bp foram visualizados em gel de agarose a 2%, seguido de seqüenciamento.

folPI, gyrA e gyrB: 1 U de Taq DNA polimerase, 100 µM de cada dNTP, 30 pM/µl dos iniciadores: **folP F** 5' - TAC TTA CTG TAA TCC CCT GTG CTG - 3', **folP R** 5' - TTG ATC CTG ACG ATG CTG TC - 3' (173 bp), **gyrAF** 5' – CCC GGA CCG TAG CCA CGC TAA GTC – 3', **gyrAR** 5' – CAT CGC TGC CGG TGG GTC ATT A – 3'(187 bp), **gyrBF** 5' - ACT GAT CCT CGA AGT TCT GAA CTG – 3', **gyrBR** 5'- CAA TGC CGT AAT AAT TGC TTG AA – 3'(178 bp), 1,5 mM de MgCl₂.

Condições de PCR: 94°C durante 5 minutos, 6 ciclos (45 segundos a 94°C, 45 segundos de 68 a 63°C e 90 segundos a 72°C); 35 ciclos (45 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C e durante 90 segundos a 72°C) e 10 minutos a 72°C. Modificação das condições de PCR descritas em You et al, 2005.

Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 3% e corados por brometo de etídio. Seguido de purificação do produto com kit da Invitrogen ChargeSwitch PCR Clean-Up e após reação de seqüenciamento.

5.2.5.2 Metodologia de seqüenciamento.

Condições do PCR de seqüenciamento.

Reação de seqüenciamento

DNA (produto purificado) = 1 μ l

Primer (ITS 1, ITS 2 ou ITS 3) 3,2 pmol = 1 μ l

BigDye = 0,5 μ l

Tampão 5X = 1,5 μ l

H₂O qsp 10 μ l = 6 μ l

96 °C por 10 segundos	} 40 ciclos
50 °C por 5 segundos	
60 °C por 4 minutos	

5.2.5.3 Protocolo de purificação de Produto de PCR com acetato de amônio.

Transferiu-se o conteúdo do PCR para um eppendorf. Adicionou-se ½ volume (25 ml para volume final 50 ml) de acetato de amônio 7,5 M, deixou 15 minutos no gelo. Adicionou-se 2 volumes de etanol e centrifugou-se 20 minutos à 13000 rpm. Lavou-se o pellet com etanol 70 % e secou a temperatura ambiente. Ressuspendeu-se em H₂O Milli – Q (~50 μ l).

5.2.5.4 Precipitação do produto de seqüenciamento em placa.

Adicionou-se 30 μ l de isopropanol 75%, agitou-se rapidamente durante 10 segundos – repouso durante 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 4000 rpm 45 minutos a 20 °C. Inverteu em papel toalha, deu-se uma leve agitação para cair tudo (spin rapidamente para limpar a parede com a placa invertida em papel klinex – 500 rpm). Adicionou-se 50 μ l de etanol 75%, centrifugou-se a 4000 rpm por 15 minutos. Inverteu a placa em papel toalha Klinex e deu-se um spin rápido (como no passo anterior até chegar a 500 rpm). Secou-se o pellet a 60 °C por 10 minutos no próprio termociclador. Ressuspende-se em 10 μ l de formamida (ultra pura), deixou-se no termociclador durante 3 minutos a 95 °C e coloca-se no gelo úmido logo após (choque – térmico para desnaturação). Nesse passo a placa vai direto para o seqüenciador.

5.2.5.5 Sequenciamento e análise.

A reação de sequenciamento é similar à de PCR, onde uma pequena amostra de DNA é amplificada milhares de vezes “in vitro”, porém, de forma diferente da reação de PCR, apenas um primer é utilizado para síntese das fitas, no sequenciamento de DNA. A reação de sequenciamento foi realizada com BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems).

As seqüências foram colocadas no programa SeqScape (Figura 13) e alinhadas usando a seqüência de referência gene *rpoB* número de acesso NC 002677 e Z14314; gene *folP* número de acesso AL023093 e gene *gyrA* número de acesso NC002677 retiradas do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>).

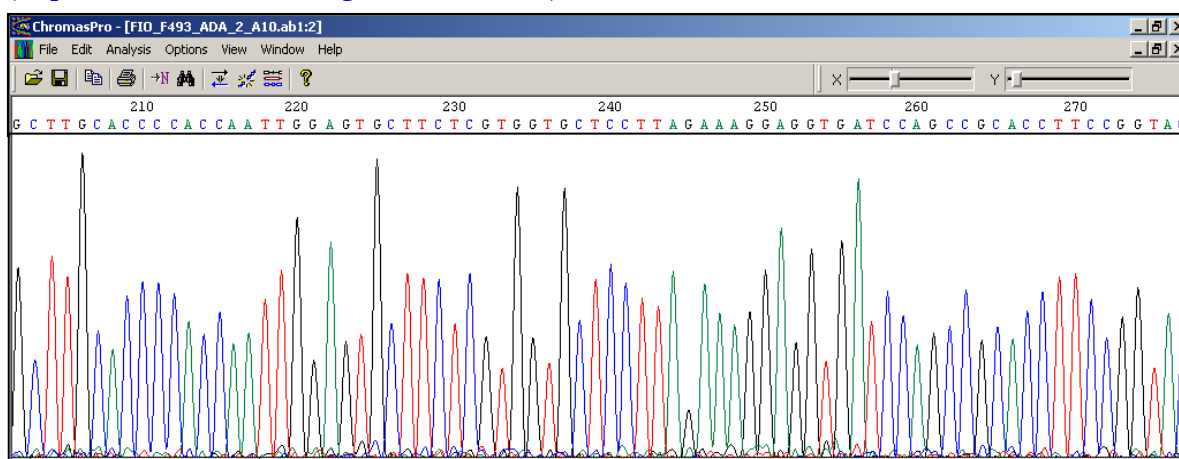


Figura 13 – Cromatograma de seqüência do gene *rpoB* de *M. leprae* isolado de biópsia de paciente

5.2.6 Local do estudo.

A parte metodológica do estudo foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada A Micobactérias – IOC – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

5.2.7 Comitê de ética. Em anexo 2.

5.2.8 Análise estatística.

Foi utilizado o teste qui-quadrado para a comparação estatística dos grupos e adotado nível de significância de 5%. Quando as tabelas de dupla entrada (2X2) continham frequência esperada <5 e simultaneamente N <10 foi utilizada a prova exata de Fisher.

6 Resultados.

6.1 Infecção humana com espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

6.1.1 Experimentos de controle.

Foram inoculados três tubos de cada cepa controle: *M bovis* ATCC 19210 e ATCC 35736; *M bovis* AN5; *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 e H37Rv ATCC 27294; *M. bovis* infecção animal e *M. tuberculosis* infecção humana em meio L-J piruvato e L-J glicerol. O *M. bovis* AN5 e o *M. bovis* infecção bovina não cresceram em nenhum tubo de meio L-J glicerol, demonstrando crescimento apenas no meio L-J piruvato. O quadro 4 sumariza o resultado de crescimento das cepas de controle do estudo.

Espécies utilizadas no controle	L-J Glicerol	L-J Piruvato
<i>Mycobacterium bovis</i> ATCC 19210	-/+	+
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG 35736	+	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	+	+
<i>Mycobacterium bovis</i> AN5	-	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> infecção humana	+	+
<i>Mycobacterium bovis</i> infecção bovina	-	+

Legenda: + = >200 colônias; +/- = 1-19 colônias; - = nenhum crescimento foi observado

Quadro 4. O crescimento do *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* nos vários meios de cultura utilizados no estudo.



Figura 14A - Culturas em meio Löwenstein-Jensen com glicerol – controles.

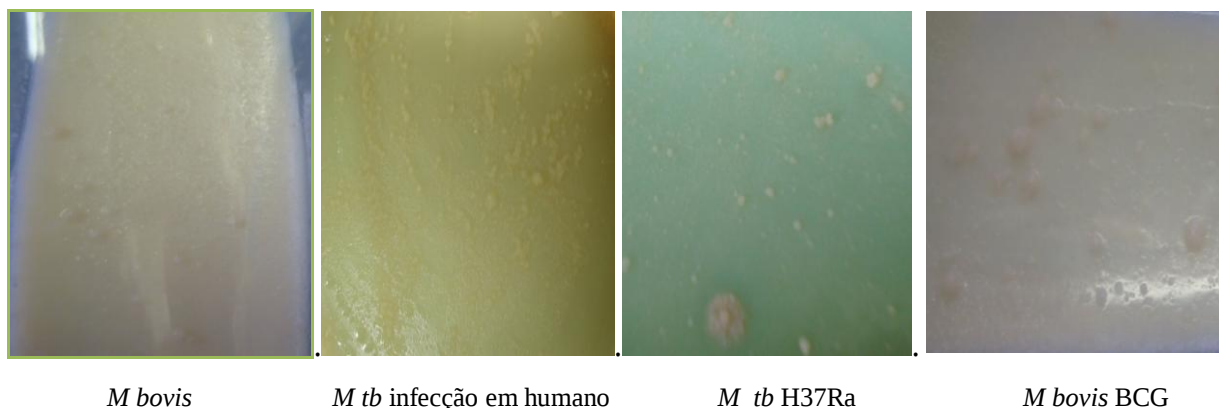


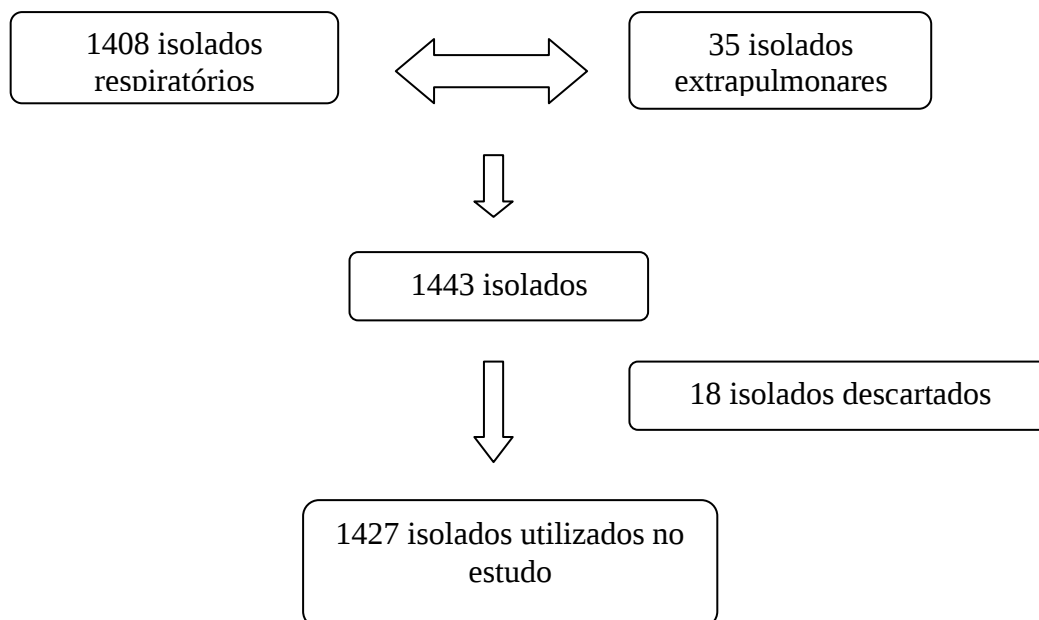
Figura 14 B - Culturas em meio Löwenstein-Jensen com piruvato – controles.

6.1.2 Resultados do crescimento de isolados clínicos em meio Löwenstein-Jensen com glicerol e/ou piruvato.

Recebemos para a análise genotípica um total de 1443 isolados de cultura em Löwenstein-Jensen complementado com piruvato em substituição ao glicerol (1408 espécimes respiratórios e 35 espécimes extrapulmonares). Após autoclavação e descarte de alguns isolados, apenas 1.427 isolados (referentes a 701 pacientes) foram submetidos à extração de DNA rápida seguida das identificações pelos métodos de biologia molecular (Fluxograma 1). Recebemos 285 isolados em meio de cultura L-J glicerol do estado do Ceará, provenientes de 279 pacientes (Tabela 8 A e B e Tabela 10 – APÊNDICE A).

6.1.3 Caracterização genética dos isolados recebidos do HUCFF-UFRJ Rio de Janeiro.

Utilizamos técnicas baseadas em análise da composição de seqüências de ácidos nucleicos para: a) melhor caracterização de organismos pertencendo ao MTBC; b) para diferenciação (tipagem molecular) de isolados de *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Haddad e cols., 2004); e c) para determinar a acurácia e poder discriminatório dos diferentes métodos.

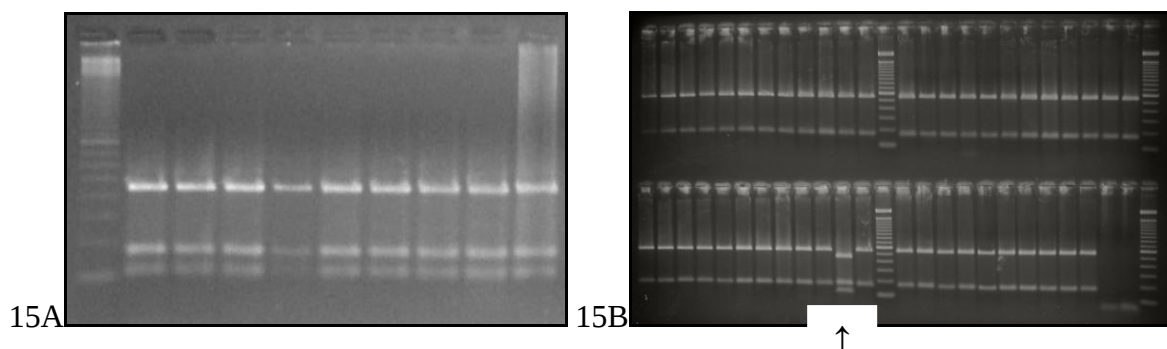


Fluxograma 1 - Isolamentos nos meios: L-J glicerol e L-J piruvato entre Janeiro 2005 e Novembro 2006.

6.1.3.1 Amplificação e polimorfismo do gene *pncA*.

Dos 1427 isolados, um total de 270 (5,3%) isolados não amplificaram para o gene de estudo *pncA* (APÊNDICE A).

Para determinar a capacidade do método de realmente identificar o *M bovis*, uma vez que só havíamos trabalhado com isolados identificados como *M. tuberculosis* (Figura 15A), analisamos 85 amostras controle, e duas (1,7%) foram identificadas como *M. tuberculosis* (Figuras 15B e 15C). Os isolados que identificamos como *M tuberculosis* pelo *pncA*, no MIRU 24 amplificaram apenas uma cópia o que é característica de *M. tuberculosis* e, haviam gerado perfis de spoligotyping não reconhecido pelo banco SITVIT.

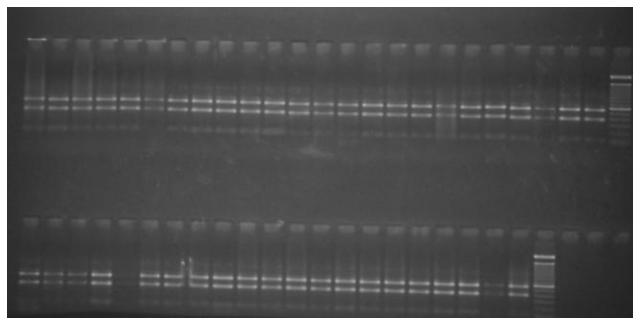


Legenda: 15A – Marcador de peso molecular 50 bp, 2 ao 10 – *M. tuberculosis*; 15B – Marcador de peso molecular 100 bp, isolados de bovinos e bubalinos – *M. bovis* e um com o perfil de *M. tuberculosis*

Figura 15A. PCR – RFLP gene *pncA* de culturas provenientes de humanos e 15B PCR – RFLP gene *pncA* culturas provenientes de bovinos e búfalos.

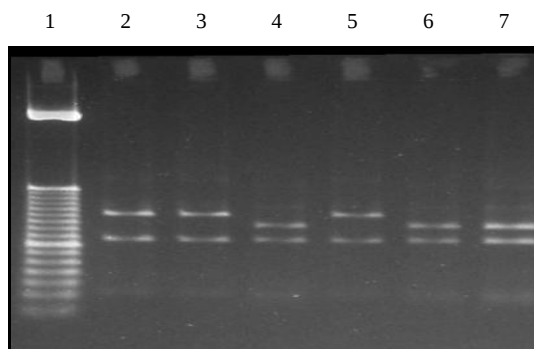
6.1.3.2 Análise do gene *gyrB* – MTUB

De todos os isolados recebidos do Hospital Clementino Fraga Filho – UFRJ e do estado do Ceará – 250 isolados foram submetidos ao sistema MTUB (Figura 16). Amplificamos um fragmento de DNA de 1020 bp, que após digestão com as enzimas *Rsa* I, *Taq* I e *Sac* II é capaz de diferenciar o complexo *M. Tb* em: *M tuberculosis*, *M africanum* tipos I e II, *M bovis* sensível ou resistente a pirazinamida e *M microti* identificados como complexo *M. tuberculosis*. Apenas os controles *M bovis*, *M bovis* BCG, *M bovis* AN5, apresentaram perfil de *M. bovis*, todos os demais isolados foram identificados como o *M. tuberculosis/M. africanum* (Figura 17). Embora a análise deste gene fosse eficiente para a diferenciação entre *M bovis* e os demais organismos do Complexo *M tuberculosis*, analisamos também o genótipo de alguns isolados através de PCR-RFLP do gene *gyrB* (MTUB).



Marcador de peso molecular ladder 100bp; Produto amplificado digerido com a enzima de restrição *Rsa* I gerando fragmentos de 360 bp e 560 bp (*Mycobacterium tuberculosis*/*Mycobacterium africanum* subtipo II).

Figura 16– Produtos amplificados digeridos com a enzima *Rsa* I.



1 – Marcador de peso Molecular de 50 bp; as amostras digeridas com a enzima de restrição *Rsa* I : 2,3 e 5 – Complexo *M tuberculosis*; 4 6 e 7 – *M bovis* resistente a pirazinamida, pois essas amostras não digeriram com a enzima *Sac* II (dados não mostrados).

Figura 17. Perfil de *M bovis* e *M tuberculosis* digerido com a enzima de restrição *Rsa*I.

6.1.3.3 Spoligotyping

Em conjunto com os métodos de genotipagem apresentados anteriormente, gene *pncA* e MTUB que permitem o reconhecimento e diferenciação do *M bovis* dos demais membros do complexo *M tuberculosis*, submetemos todos os isolados deste estudo a ferramenta de Spoligotyping.

6.1.3.3.1 Rendimento, reprodutibilidade, qualidade dos perfis e composição genética da população.

Dos 1427 isolados do estudo, apenas 989 (69,3%) isolados do Rio de Janeiro funcionaram neste método, deixando sem resultado de spoligotyping 438 (30,7%) isolados. Dos 989 isolados analisados pelo método do spoligotyping, estes foram subdivididos em 33 grupos: LAM9 (166 isolados – 16,8%), seguida de H3 (117 isolados – 11,8%), T1 (117 isolados – 11,8%), H1 (62 isolados – 6,3%), LAM6 (56 isolados – 5,7%), LAM2 (58 isolados – 5,9%); LAM3 (44 isolados – 4,4%); LAM1 (40 isolados – 4%); U (34 isolados – 3,4%); LAM5 27 isolados – 2,7%); T3 (22 isolados – 2,2%); LAM4 (17 isolados – 1,7%); X2 (19 isolados – 1,9%); T2 (12 isolados – 1,2%); T2-T3 (12 isolados – 1,2%); S e LAM3 and S/convergent (9 isolados cada – 0,9%); T4-CEU1 (5 isolados – 0,5%), T5_MAD2 (6 isolados – 0,6%); X3 (5 isolados cada – 0,5%); EAI5 (4 isolados – 0,4%), U (likely H), LAM1-LAM4 , LAM2-LAM4 e X1 (3 isolados cada – 0,3%); H2 (2 isolados – 0,2%), T5, EAI6_BGD1, H4, T4 e MAMU2 (1 isolado cada – 0,1%) e, perfis de spoligotyping novos foram o equivalente a

131 (13,2%) isolados que tiveram seus perfis confirmados pelo menos duas vezes (APENDICE A, Tabela 8 e Gráfico 2).

Tabela 8. Famílias encontradas nos isolados analisados do HUCFF – Rio de Janeiro.

Famílias	n	%
EAI5	4	0,4
EAI6_BGD1	1	0,1
H1	62	6,3
H2	2	0,2
H3	117	11,8
H4	1	0,1
LAM1	40	4,0
LAM1-LAM4	3	0,3
LAM2	58	5,9
LAM2-LAM4	3	0,3
LAM3	44	4,4
LAM3 and S/convergent	9	0,9
LAM4	17	1,7
LAM5	27	2,7
LAM6	56	5,7
LAM9	166	16,8
MAMU2	1	0,1
S	9	0,9
T1	117	11,8
T2	12	1,2
T2-T3	12	1,2
T3	22	2,2
T4	1	0,1
T4-CEU1	5	0,5
T5	1	0,1
T5_MAD2	6	0,6
U	34	3,4
U (likely H)	1	0,1
X1	3	0,3
X2	19	1,9
X3	5	0,5
Novos	131	13,2
total	989	100,0

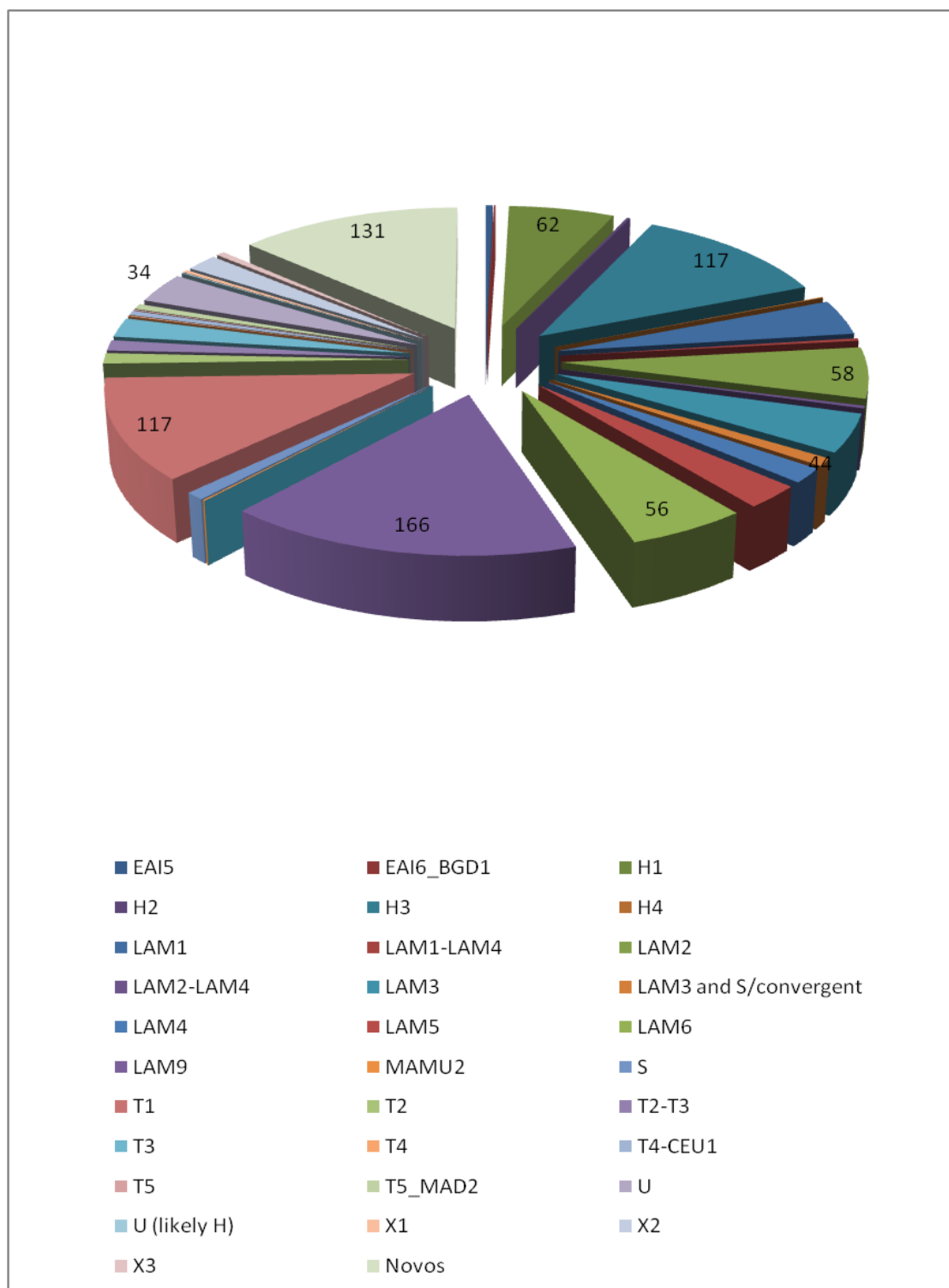


Gráfico 2 – famílias de spoligotyping encontradas nos isolados do HUCFF –UFRJ.

Mas quando verificamos os perfis encontrados dentro das famílias, encontramos representantes de uma única família com tipos variados: dos 166 isolados da família LAM9, 114 isolados (68,6%) correspondiam ao tipo 42 (gráfico 2), na família H3 o tipo 50 foi

encontrado em 92 dos 117 isolados (78,6%), na família T1 o tipo 53 foi encontrado em 52 dos 117 isolados (45,3%), a família H1 o tipo 47 foi encontrado em 52 dos 62 isolados (83,9%), na família LAM6 o tipo 64 foi encontrado em 49 dos 56 isolados (87,5%), na família LAM3 o tipo 33 foi encontrado em 41 dos 44 isolados (93,2%), na família LAM2 o tipo 17 foi encontrado em 47 dos 58 isolados (81%), na família LAM1 o tipo 20 foi encontrado nos 40 isolados – 100%). Na família U não houve diferença entre os tipos.

Tabela 9. Tipos dentro da Família LAM9 que circulam no estado do Rio de Janeiro.

LAM9	N	Porcentagem
tipo 42	114	68,6%
tipo 177	13	7,8%
tipo 216	2	1,2%
tipo 388	2	1,2%
tipo 435	7	4,2%
tipo 753	1	0,6%
tipo 1106	1	0,6%
tipo 1176	8	4,8%
tipo 1337	13	7,8%
tipo 1528	1	0,6%
tipo 822	1	0,6%
tipo 866	1	0,6%
tipo 1706	2	1,2%
Total	166	100,0%

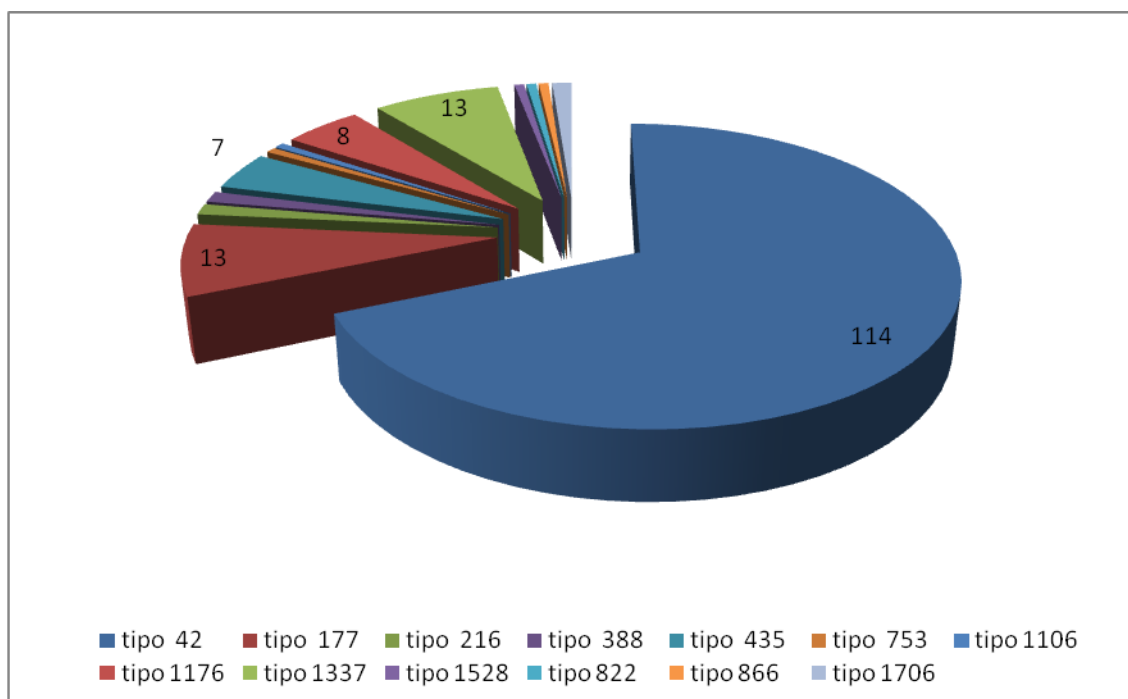


Gráfico 3. Tipos dentro da Família LAM9 que circulam no estado do Rio de Janeiro

6.1.3.4 Genotipagem: Spoligotyping e Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)-Variable Number Tandem Repeat (VNTR) análise – Característica de transmissão.

Das amostras de 701 pacientes analisadas pelo spoligotyping encontramos 89 pacientes com múltiplas infecções. Recebemos culturas para diagnósticos e de controle de tratamento.

Como não dispúnhamos de informações epidemiológicas sobre os casos como: as classificações se eram casos virgens de tratamento ou casos de recidiva; presença de co-infecção com o HIV; ou história de tabagismo ou de etilismo, que ajudasse na escolha dos pacientes; escolhemos 36 pacientes ao acaso para serem avaliados pelo método MIRU a fim de confirmar os resultados de spoligotyping. Observamos que 22 (61,1%) pacientes apresentaram diferentes perfis tanto no MIRU quanto no Spoligotyping (Tabelas 11A ,11B e 12); onde verificamos no spoligotyping diferença de até seis espaçadores e no MIRU diferença de uma a três cópias mostrando claramente a diferença entre os isolados. Entre os perfis diferentes encontrados, a família LAM foi predominante seguida da família Haarlem,

onde os pacientes números 3, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27, 30, 31, 32, 33 e 35 (Tabela 12) apresentaram infecção mista confirmada pelo MIRU. Alguns pacientes foram identificados como resistentes pelo método das proporções: os números 1, 21 e 30 à estreptomicina, o número 13 à isoniazida e etionamida, o número 20 à estreptomicina e etionamida, o número 24 à isoniazida, assinalados com * na tabela.

Tabela 10 A– Frequência de *clusters* idênticos versus *clusters* diferentes dos pacientes do HUCFF-UFRJ de acordo com os perfis de classificação do spoligotyping.

Pacientes do Rio de Janeiro	Número (%)	Homens (%)	Mulheres (%)	p-valor
Única infecção	422 (60,4)	259 (57,1)	163 (64,4)	
Múltiplas infecções	89 (12,6)	67(14,9)	22 (8,7)	0,008*
Sem perfil Spoligotyping	190 (27,0)	122 (27,2)	68 (26,9)	
Total	701 (100)	448 (64,0)	253 (36,0)	

*p-valor < 0,05, múltiplas infecções significativo nos homens. Teste qui quadrado

Tabela 10 B - Infecções com diferentes tipos de uma mesma família.

Família	N
LAM9	1 (0,2)
LAM2	1 (0,2)
T1	1 (0,2)
H1	1 (0,2)
Total	4 (0,8)

N	data inóculo	Espécime	Perfil spoligo	Tipo	MIRU/PERFIL
12	23/11/2005	23	███████	Novo	124326153224
	17/11/2005	23	███████	Novo	225225153223
	30/11/2005	23	███████	H1	225325153223
13*	3/8/2005	23	███████	Novo	125326161222
	19/7/2005	23	███████	LAM5	125326161222
14	23/11/2005	17	███████	T1	121326153224
	7/12/2005	17	███████	Novo	224325153323
15	21/12/2005	17	███████	Novo	123326153221
	3/1/2006	23	███████	LAM5	123326153221
16	4/11/2005	23	███████	LAM3	223226153323
	14/11/2005	104	███████	Novo	225313153323
17	21/10/2005	17	███████	LAM2	224225163331
	1/11/2005	17	███████	LAM9	224226143321
	19/1/2006	17	███████	LAM2	224225163331
18	23/11/2005	23	███████	Novo	224326163324
	21/11/2005	17	███████	LAM3	224326163314
19	25/8/2005	28	███████	Novo	2253161232211
	25/8/2005	28	███████	Novo	2253161222211
20*	9/12/2005	17	███████	H1	226313163323
	9/12/2005	17	███████	LAM9	223227151321
21*	2/8/2005	10	███████	Novo	226313163332
	30/9/2005	17	███████	H1	226213163323
22	12/1/2006	17	███████	LAM3	225326152313
	12/1/2006	17	███████	Novo	224326153322
23	17/10/005	17	███████	LAM2	225226153321
	8/3/2006	23	███████	S	234225152324

[illegible]

6.1.4 Análise de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* do Estado do Ceará

Recebemos 285 isolados no início de 2006, referentes a 279 pacientes cujas culturas foram enviadas ao Laboratório Central – Hospital de Messejana – Secretaria de Saúde do estado do Ceará. Esses isolados nos foram enviados com o propósito de investigarmos nessa população através do método de spoligotyping a existência de *M. bovis* ou *M. caprae* em meio de cultura tradicional L-J com glicerol sem piruvato que é o meio padrão de rotina daquele laboratório. Além destes, recebemos 84 isolados MDR para análise molecular de resistência.

6.1.4.1 Spoligotyping.

Uma vez, identificadas como complexo *M. tuberculosis* não *M. bovis*/*M. caprae*, utilizamos a ferramenta de Spoligotyping para identificar as famílias.

Dos 285 isolados obtivemos spoligotyping de 211 (74,0%) isolados. Nesses isolados foi verificado que as famílias se agrupavam em 30 grupos: LAM6 que foi o mais encontrado com 36 (17,1%) isolados, LAM9 (33 isolados – 15,6%), seguida de H3 (20 isolados – 9,5%), T1 (18 isolados – 8,5%), LAM3 (10 isolados cada – 4,7%); LAM5 (8 isolados – 3,8%); LAM1 (8 isolados – 3,8%); H1 (7 isolados – 3,3%); T2 e U (4 isolados cada – 1,9%); EAI5 e LAM4 (3 isolados cada – 1,4%); LAM2, S e X3 (2 isolados – 0,9%); T2-T3, T3, LAM2-LAM4, U(LAM3), U(Likely H3) e X2 (1 isolado cada – 0,5%) e, 45 isolados foram perfis novos (21,3%). Tabela 13e Gráfico 4.

Tabela 12 – Famílias de spoligotyping encontradas nos isolados do estado do Ceará.

Famílias	n	%
T1	18	8,5
T2	4	1,9
T2-T3	1	0,5
T3	1	0,5
H1	7	3,3
H3	20	9,5
LAM1	8	3,8
LAM2	2	0,9
LAM2-LAM4	1	0,5
LAM3	10	4,7
LAM4	3	1,4
LAM5	8	3,8
LAM6	36	17,1
LAM9	33	15,6
EAI5	3	1,4
U(LAM3)	1	0,5
U(Likely H3)	1	0,5
S	2	0,9
X2	1	0,5
X3	2	0,9
U	4	1,9
Novos	45	21,3
Total	211	100,0

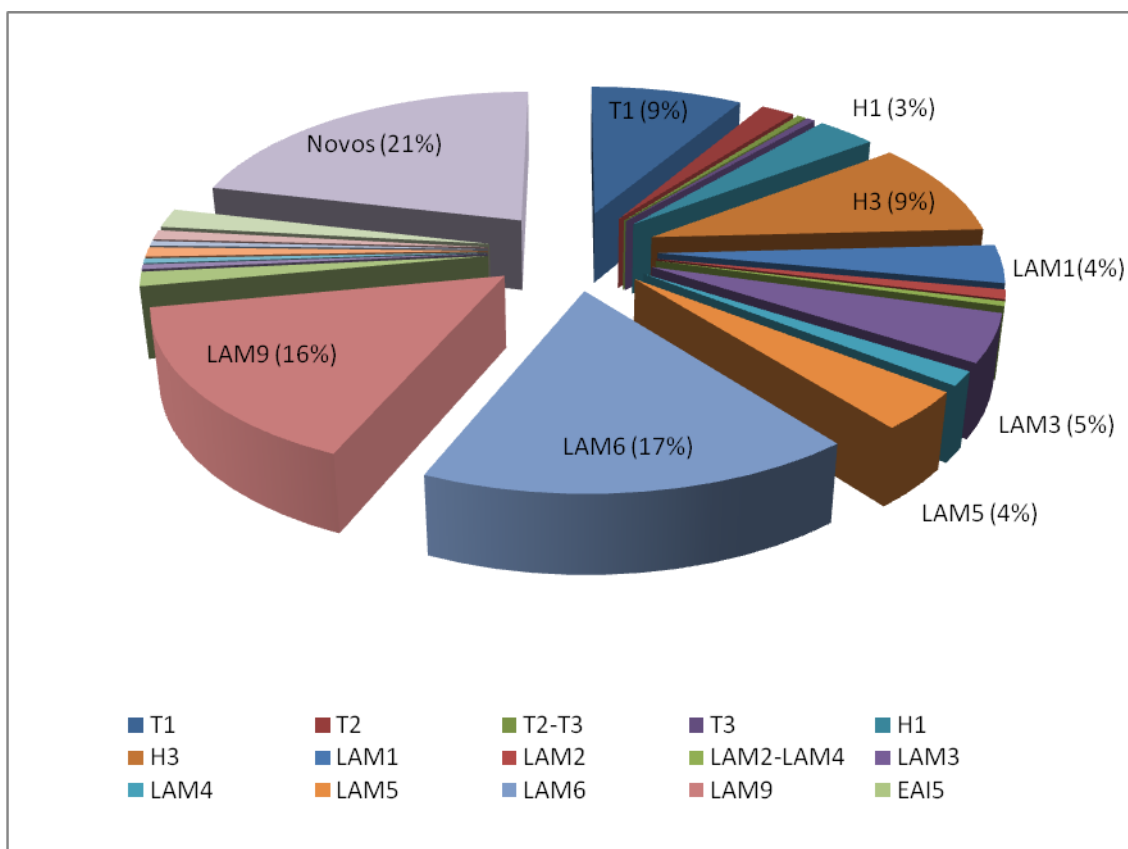
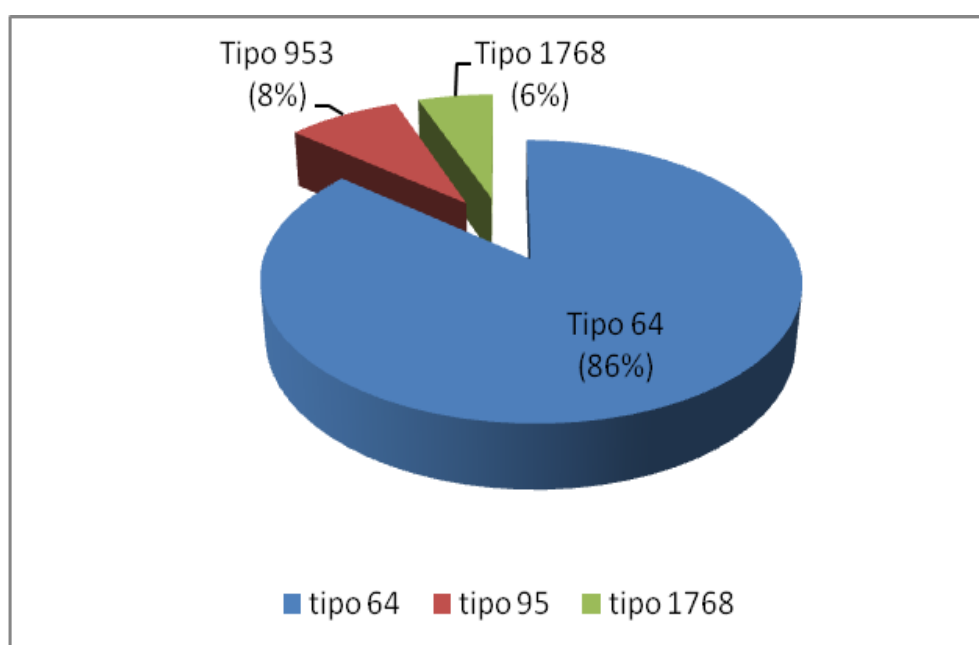


Gráfico 4 – Famílias encontradas nos isolados do Ceará.

Mas quando verificamos as famílias, assim como fizemos com os isolados do estado do Rio de Janeiro, encontramos representantes de uma única família com tipos variados. As famílias foram agrupadas de acordo com a variabilidade encontrada em grupos: dos 36 isolados da família LAM6, 31 (86,1%) isolados correspondiam ao tipo 64 (tabela 14 e gráfico 5), na família LAM9 o tipo 42 foi encontrado em 20 isolados dos 33 (60,6%), na família H3 o tipo 50 foi encontrado em 19 dos 20 (95%), na família T1 o tipo 1284 foi encontrado em 8 dos 18 isolados (44,4%), na família LAM3 o tipo 33 foi encontrado em 7 dos 10 isolados (70%), na família H1 o tipo 47 foi encontrado nos 7 isolados (100%), na família LAM5 o tipo 176 foi encontrado nos 8 isolados (100%), na família LAM1 o tipo 20 (100%).

Tabela 13. Tipos da família LAM6 que circulam no estado do Ceará.

LAM6	N	Porcentagem
tipo 64	31	86
tipo 95	3	8
tipo 1768	2	6
Total	36	100

**Gráfico 5. Tipos da família LAM6 que circulam no estado do Ceará.**

No estado do Ceará com um número de isolados bem inferior ao do estado do Rio de Janeiro, encontramos 3/211 (1,4%) isolados com perfil da família EAI5 predominante na Ásia, enquanto no Rio de Janeiro encontramos apenas 3/989 (0,3%) isolados EAI5 e 1/989 (0,1%) isolado EAI6_BGD1. A família LAM6 foi mais encontrada do que a família LAM9 no Ceará ao contrário do Rio de Janeiro.

6.1.4.2 Análise do gene *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Oitenta e quatro isolados de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes do Ceará e 9 do Rio de Janeiro, previamente identificadas pelo método das proporções como resistentes a rifampicina e isoniazida foram submetidas ao seqüenciamento de um fragmento de 289 bp (pares de base) do gene *rpoB* (Figura 17). Destas amostras, obtivemos PCR positivo em 72 (77,4%), destes 33/93 (35%) mostraram mutação do gene *rpoB*, enquanto 37/93 (40%) não apresentaram mutação. Um dos isolados que não mostrou mutação foi posteriormente identificado como resistente apenas a isoniazida.

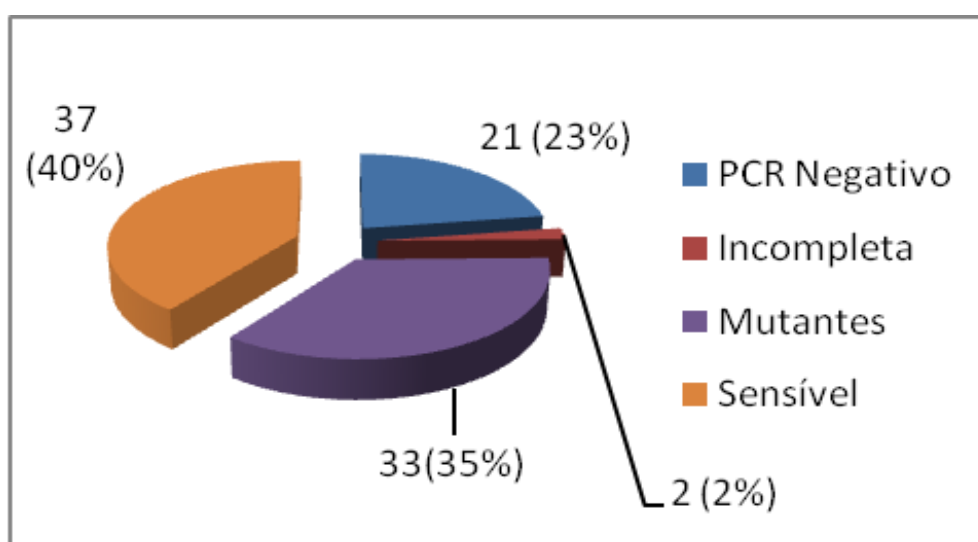


Gráfico 6. Resultado de PCR e seqüenciamento do gene *rpoB* das culturas previamente identificadas pelo método das proporções

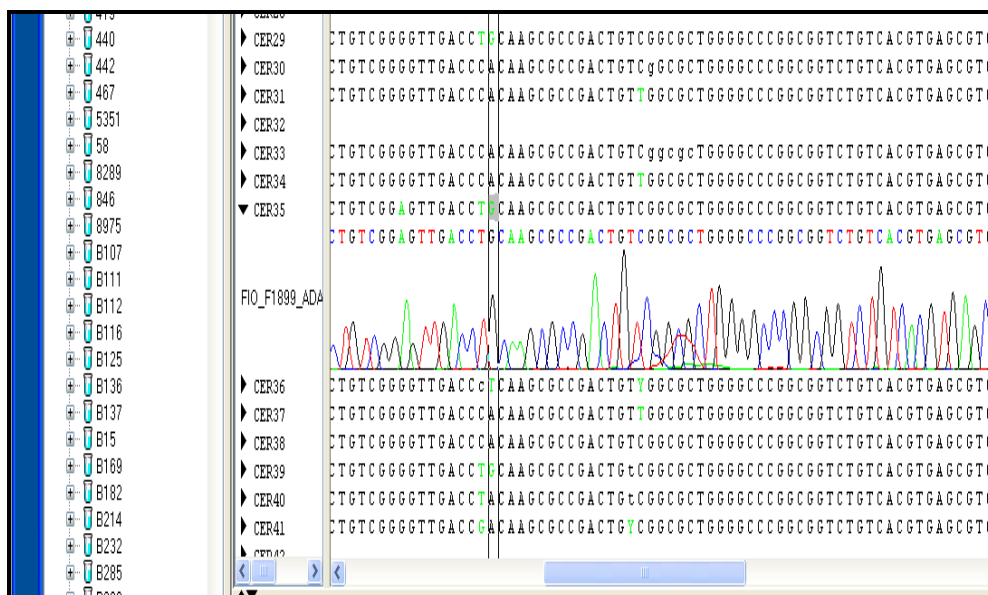


Figura 18 – Mutações encontradas após sequenciamento do gene *rpoB* (289 bp).

Após sequenciamento: 13/84 (15,5%) amostras do Ceará e 2/9 (22,2%) do Rio de Janeiro demonstraram mutações pontuais nos códons 526; 16/84 (19,0%) amostras do Ceará e 4/9 (44,4%) do Rio demonstraram mutações no códon 531; 1/84 (1,2%) amostra do Ceará demonstrou mutação no códon 522; 1/84 (1,2%) no códon 523. Uma das 84 amostras (1,2%) apresentou mutação no códon 564, que ainda não havia sido descrita (Quadro 5 e 6).

Amostra MDR	Sensível / mutante	<i>rpoB</i> 522 TCG	<i>rpoB</i> 523 GGG	<i>rpoB</i> 526 CAC	<i>rpoB</i> 531 TCG	<i>rpoB</i> 564 ATC	Resistência
CER1	-						RI
CER2	Mutante			TGC			RIE
CER3	Sem mutação						RI
CER4	Mutante			*GCC e GAC			RIS
CER5	Mutante				TTG		-
CER6	Sem mutação						RIS
CER7	-						RI
CER8	Mutante			CGC			RI
CER9	Mutante			CGC			RI
CER10	Mutante			**CAC e TGC	TTG		RI
CER11	Mutante				TTG		RI
CER12	Sem mutação						RI
CER13	-						RI
CER14	-						I
CER15	incompleta						RI
CER16	-						RI
CER17	-						RI
CER18	-						RIE

CER19	Sem mutação						RI
CER20	-						
CER21	-						RIS
CER22	-						RI
CER23	-						RI
CER24	-						RI
CER25	-						RI
CER26	Sem mutação						RI
CER27	-						RIE
CER28	-						RI
CER29	Mutante			TGC			RI
CER30	Sem mutação						RI
CER31	Mutante				TTG		RI
CER32	-						RI
CER33	Sem mutação						RI
CER34	Mutante				TTG		RI
CER35	Mutante		GAG	TGC			RI
CER36	Mutante			CTC	**TTG e TCG		RI
CER37	Mutante				TTG		RI
CER38	Sem mutação						
CER39	Mutante			TGC			RI
CER40	Mutante			TAC			RI
CER41	Mutante			GAC			
CER42	-						
CER43	Mutante	GTG		CAA			RI
CER44	-						RIE
CER45	Mutante				TTG		RI
CER46	-						RIS
CER47	Mutante				TGG		RI
CER48	Sem mutação						RI
CER49	Mutante			GAC			RIS
CER50	Mutante				TGG		RI
CER51	Sem mutação						RI
CER52	Sem mutação						RI
CER53	Sem mutação						
CER54	Sem mutação						RI
CER55	Incompleta						RI
CER56	Mutante				TGG		RI
CER57	Mutante				TGG		RI
CER58	Mutante				TTG	GTC	RI
CER59	Sem mutação						
CER60	Sem mutação						I
CER61	Sem mutação						RI
CER62	Sem mutação						
CER63	Sem mutação						RI
CER64	Sem mutação						
CER65	Mutante				TTG		

CER66	Sem mutação						RI
CER67	Sem mutação						RI
CER68	Sem mutação						
CER69	Sem mutação						RI
CER70	Mutante				TGG		RI
CER71	Sem mutação						
CER72	Sem mutação						
CER73	Sem mutação						RI
CER74	Sem mutação						RI
CER75	Sem mutação						RI
CER76	Sem mutação						RIES
CER77	Sem mutação						RI
CER78	Sem mutação						RI
CER79	Sem mutação						
CER80	Sem mutação						
CER81	Sem mutação						
CER82	Mutante				TTG		RIES
CER83	-						RI
CER84	-						RI
Rio Curicica							
287	Mutante				TTG		
3566	Mutante				TTG		
867	Mutante				TTG		
2010	Mutante				TTG		
2876	Mutante			CTC			
2124	Mutante			CTC			
1878	Sem mutação						
1979	Sem mutação						
735	Sem mutação						

(-)Sem amplificação; * picos de mutante e sensível ; ** picos duplos mutantes; R – rifampicina; I – Isoniazida; E – Etambutol; S – Estreptomicina; TCG (serina – Ser); TTG (leucina – Leu) ; TGG(triptofano – Trp) ; CAC (histidina – His); TGC (cisteína – Cys); GCC (alanina – Ala); CGC (arginina – Arg); CTC (Leu); CAA (glutamina – Gln); GAC (ácido aspártico – Asp); TAC (tirosina – Tyr); GGG (glicina – Gly); GAG (ácido glutâmico – Glu); TCG (Ser); GTG (valina – Val); ATC (isoleucina – Ile); GTC (Val).

Quadro 5 - Mutações encontradas no gene *rpoB* do *M. tuberculosis* após amplificação e seqüenciamento.

Mutação gene <i>rpoB</i>	N amostra	Origem	MDR
TCG 531 TTG	15	11 Ceará e 4 Rio	RI e RIES (Ceará)
TCG 531 TGG	5	5 Ceará	RI
531 (60,6%)			
CAC 526 TGC	5	Ceará	RI
CAC 526 GCC	1	Ceará	RI
CAC 526 CGC	2	Ceará	RI
CAC 526 CTC	3	2 Rio e 1 Ceará	RI
CAC 526 CAA	1	Ceará	RI
CAC 526 GAC	3	Ceará	RI e RIS
CAC 526 TAC	1	Ceará	RI
526 (48,5%)			
GGG 523 GAG	1	Ceará	RI
523 (3,03%)			
TCG 522 GTG	1	Ceará	RI
522 (3,03%)			
ATC 564 GTC	1	Ceará	RI
564 (3,03%)			
Total de amostras com mutação		33 isolados	

Em preto: sensível; em vermelho: mutação. TCG (serina – Ser); **TTG** (leucina – Leu) ; **TGG**(triptófano – Trp) ; CAC (histidina – His); **TGC** (cisteína – Cys); **GCC** (alanina – Ala); **CGC** (arginina – Arg); **CTC** (Leu); **CAA** (glutamina – Gln); **GAC** (ácido aspártico – Asp); **TAC** (tirosina – Tyr); **GGG** (glicina – Gly); **GAG** (ácido glutâmico – Glu); TCG (Ser); **GTG** (valina – Val); **ATC** (isoleucina – Ile); **GTC** (Val).

Quadro 6 - Mutações encontradas no gene *rpoB*.

6.1.4.3 Detecção e Caracterização molecular de DNA extraído de lâminas de baciloscopia de pacientes com tuberculose do município de Campos dos Goytacazes – RJ e do estado de Minas Gerais.

6.1.4.3.1 Amostragem e características.

Devido à natureza principal do estudo 1, que era a investigação de infecção e adoecimento por *M. bovis* em humanos de área rural ou peri-rural, incluímos análise de material de baciloscopia – lâminas de esfregaço de escarro – provenientes de regiões onde a realização de culturas não é rotina. Extraímos DNA de 303 lâminas – provenientes de 140 pacientes com baciloscopia variando de 1+ a 3+ diagnosticados durante o período de Junho de 2006 a Junho de 2007, no Centro de Referência de Tuberculose do município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. Recebemos também 177 lâminas BAAR referentes a 97 pacientes dos quais, 83 (85,6%) positivos e 14 (16,7%) foram BAAR negativos, provenientes de dois laboratórios públicos de diagnóstico de tuberculose localizados em Minas Gerais (Tabela 16 e Tabela 17). Não havia informação se as lâminas eram para diagnóstico ou de controle de tratamento.

Tabelas 14 – Pacientes com índice de baciloscopia (1+ a 3+) – Campos dos Goytacazes, RJ.

Lâminas de baciloscopia de escarro utilizadas nos PCRs do gene <i>oxyR</i>	n
Pacientes com IB +	66
Pacientes com IB ++	33
Pacientes com IB +++	41
Total	140

Tabela 15 – Pacientes com índice de baciloscopia (1+ a 3+), Minas Gerais.

Lâminas de baciloscopia de escarro utilizadas nos PCRs do gene <i>oxyR</i>	n
Pacientes com IB +	42
Pacientes com IB ++	30
Pacientes com IB +++	11
Pacientes com IB –	14
Total	97

6.1.4.3.2 Caracterização genética.

Como as chances de amplificarmos um produto longo eram menores, resolvemos utilizar dois sistemas de PCR já descritos, para material de lâminas de baciloscopia. O primeiro amplificou parte do gene *oxyR* a fim de diferenciar o *M. bovis* dos demais componentes do complexo *M. tuberculosis* (Zink A R & Nerlich A G. 2004; Van Der Zanden e cols., 1998; Van Der Zanden e cols., 2003) e o segundo parte do gene *gyrA* para confirmar a presença de *M. tuberculosis* e auxiliar na definição das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* como cepas ancestrais e modernas. Não havia descrição na literatura do emprego destes sistemas diretamente em lâmina de esfregaço de escarro.

6.1.4.4 Amplificação e detecção do polimorfismo do gene *oxyR*.

Após seqüenciarmos estes produtos para que pudéssemos verificar se eram *M. bovis* ou *M. tuberculosis*, uma vez, que o pseudogene *oxyR* separa as duas espécies, já que na posição 285 o *M. tuberculosis* têm uma guanina (G) e o *M. bovis* têm uma adenina (A). Após analisarmos o material referente aos 140 pacientes de Campos dos Goytacazes, conseguimos resultados de seqüenciamento de apenas 49 (35%) pacientes (Tabela 18 e no Anexo 4 seqüência do pseudogene *oxyR* do *M. tuberculosis*).

Tabela 16 – Resultado do gene *oxyR* das lâminas de Campos dos Goytacazes.

Baciloscopia	Resultado no gene <i>oxyR</i> (n)
Baciloscopia +	20
Baciloscopia ++	13
Baciloscopia +++	16
Total	49

Acreditamos que o fato de termos conseguido resultado em apenas 35% dos pacientes, seja devido ao longo tempo de armazenamento das lâminas a temperatura ambiente, em torno de quatro a seis meses. Mesmo assim, em nenhum dos casos estudados de lâminas foi verificado a presença de *M. bovis*, apenas os controles *M. bovis* ATCC 19210 e *M.*

bovis BCG Moreoux ATCC 35736 foram identificados como *Mycobacterium bovis* – Figura 18.

Das lâminas referentes aos 83 pacientes com baciloscopia (IB) positiva analisados do estado de Minas Gerais, apenas 54 foram identificados pelo PCR e seqüenciamento do gene *oxyR* e, dos 14 pacientes com IB negativo, 5 (35,7%) foram positivos no PCR e seqüenciamento. Quatro (80%) destas 5 amostras seqüenciadas foram confirmados com culturas positivas para o *M. tuberculosis* Tabela 19 A e B.

Tabela 17A – Resultado do seqüenciamento gene *oxyR* das amostras enviadas de Minas Gerais.

Pacientes (Minas Gerais) analisados no seqüenciamento gene <i>oxyR</i>	n resultado no seqüenciamento
83 (100%) pacientes com IB positivo	54 (65%)
14(100%) pacientes com IB negativo	5 (35%)
97(100%) pacientes analisados	59 (60,8%) positivos

Tabela 17B – Resultado do seqüenciamento gene *oxyR* das amostras enviadas de Minas Gerais.

Lâminas (Minas Gerais) analisadas no seqüenciamento gene <i>oxyR</i>	n resultado no seqüenciamento
156 (100%) lâminas com IB positivo	91 (58,3%)
21 (100%) lâminas com IB negativo	9 (42,8%)
177(100%) lâminas analisadas	100 (56,5%)

Figura 19 – Sequências do gene *oxyR* representando *M bovis* contendo o nucleotídeo Adenina e *M. tuberculosis* contendo a Guanina na mesma posição do genoma.

As 16 biopsias de linfonodos parafinadas provenientes de Minas Gerais tiveram sua parafina retirada, extraído seus DNAs e esses foram submetidos ao sistema de PCR e seqüenciamento do gene *oxyR*. Dessas, 2/16 (12,5%) amostras tiveram suas seqüências compatíveis com a seqüência de *M. bovis*.

Todas as lâminas recebidas de Campos dos Goytacazes também foram analisadas pelo sequenciamento do gene *gyrA*. Este método agrupou as lâminas em duas populações os isolados de *M. tuberculosis*, como descrito em Sreevatsan e colaboradores em 1997 - (Figuras 20, 20A e 20B).

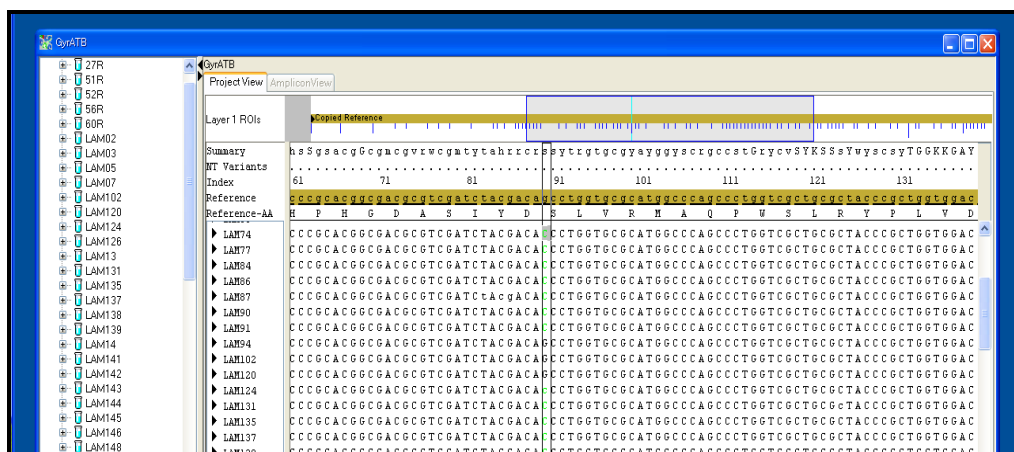


Figura 20 – sequência do gene *gyrA* do DNA de *M. tuberculosis* isolado de lâminas com as mutações.

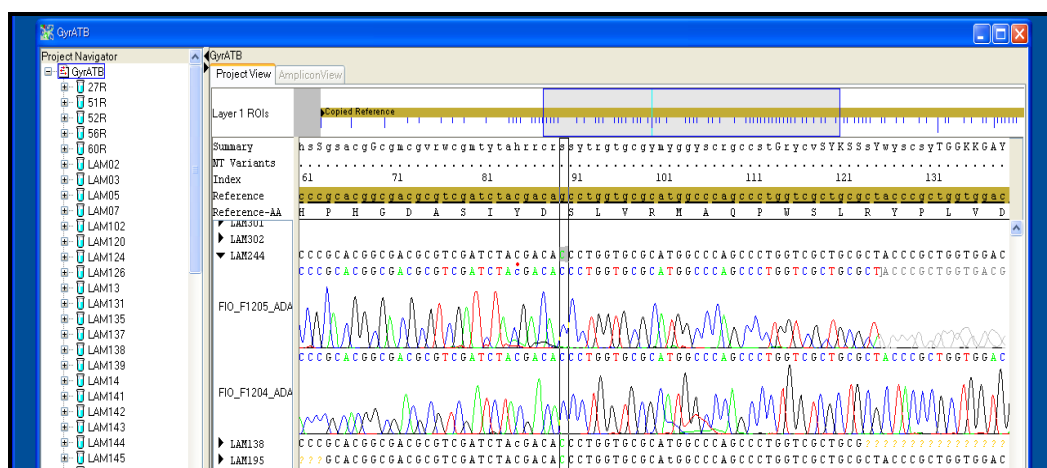


Figura 20A – Sequência *gyrA* *M. tuberculosis* com a Citosina na posição 95.

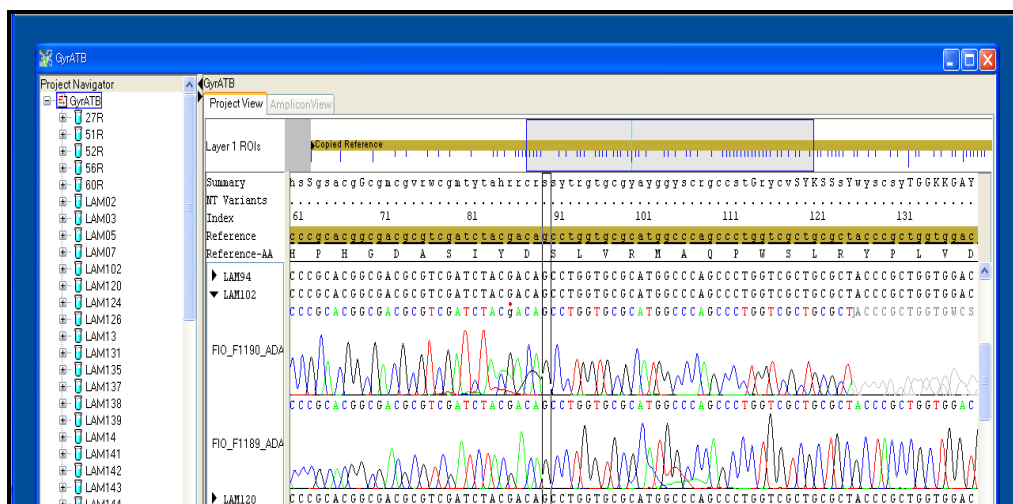


Figura 20B – Sequência gyrA *M. tuberculosis* com a Guanina na posição 95.

Após analisarmos o material referente aos 140 pacientes de Campos dos Goytacazes, obtemos resultados de 67 (47,8%) pacientes – Tabela 20A e 20B. Onde conseguimos resultado em 47,8% dos pacientes. Confirmando os resultados encontrados com o seqüenciamento do gene *oxyR*, em nenhum dos casos estudados provenientes de Campos foi identificado o *M. bovis*, apenas os controles foram identificados como *M. bovis* – Figura 18. Dos 67 pacientes que foram seqüenciados; lâminas referentes a 5 (7,5%) pacientes (homens) mais as cepas de *M. tuberculosis* H37Rv e H37Ra ficaram agrupados no grupo com a **G**uanina e as demais lâminas referentes a 62 (92,5%) pacientes ficaram agrupados no grupo com a **C**itosina na posição *gyrA* (códon 95) e estão agrupadas em grupo 2 (ACC) e grupo 3 (AGC) o que sugeri cepas “Modernas” de *Mycobacterium tuberculosis*. O grupo 3 também ficou em menor número no trabalho de Sreevatson e colaboradores, onde citam que o grupo 3 não ocorre em todas as localidades por isso uma dominância do grupo 2.

Além dos SNPs já descritos no gene *gyrA* encontramos inserções em uma amostra, substituições em duas outras e aparente infecção mista em uma amostra – dados não mostrados.

Tabela 18 – PCR e seqüenciamento genes *gyrA* e *oxyR* de DNA extraídos de lâminas de baciloscopia dos pacientes de Campos Goytacazes.

N paciente	Sexo	Re-infecção TB	Co-infectado HIV	OBS	gene <i>gyrA</i> (95)	gene <i>oxyR</i> posição 285	Escolaridade
1	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo			<i>M. tb</i>	ensino fundamental incompleto
4	Masculino				C	<i>M. tb</i>	
5	Masculino				C		
7	Masculino	Alta por abandono 22/08/2007	Anti-HIV negativo	Bebe	C		ensino fundamental incompleto
8	Masculino					<i>M. tb</i>	
9	Feminino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		C		ensino fundamental completo
10	Masculino					<i>M. tb</i>	
11	Masculino	início:11/2006 esquema 3: retratamento	Anti-HIV negativo	Ex-fumante	C	<i>M. tb</i>	ensino fundamental incompleto
12	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		G		
13	Feminino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		C		ensino médio completo
15	Masculino				C		
16	Masculino	Alta por abandono - transferido	Anti-HIV positivo	Recidiva	C		ensino médio completo
17	Masculino				C	<i>M. tb</i>	
18	Masculino	Recidiva	Anti-HIV negativo	Alcoólatra	G	<i>M. tb</i>	nenhuma

19	Masculino	Alta por cura	não realizado		C	M. tb	ensino fundamental incompleto
20	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		C	M. tb	ensino fundamental incompleto
21	Masculino	Alta por abandono	Anti-HIV negativo	Alcoólatra	C		nenhum
23	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	Fumante	C		Ensino médio completo
25	Masculino				C		
26	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		C		
28	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		C	M. tb	
29	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		C		ensino fundamental incompleto
30	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo		C	M. tb	ensino fundamental incompleto
33	Masculino	Alta por cura	não realizado		C		ensino médio completo
34	Masculino	em tratamento	não realizado	Presidiário	C	M. tb	ensino fundamental incompleto
35	Feminino				C		
37	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV positivo		C		ensino fundamental incompleto
38	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	Trabalhador rural		M. tb	ensino fundamental incompleto
40	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo		C		ensino médio completo
41	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo		C		ensino fundamental incompleto
42	Masculino	Óbito - falência quimioterápica	Anti-HIV negativo	Óbito		M. tb	Analfabeto
43	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		C		Ensino médio completo
44	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo			M. tb	Ensino fundamental incompleto

46	Feminino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		<i>M. tb</i>	Ensino fundamental completo
47	Feminino			C	<i>M. tb</i>	
48	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	C		Ensino fundamental incompleto
49	Masculino				<i>M. tb</i>	
50	Masculino	em tratamento	não realizado	Diabético	<i>M. tb</i>	ensino fundamental incompleto
51	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	C	<i>M. tb</i>	ensino fundamental incompleto
53	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo	Cigano	C	nenhum
54	Masculino			C		
57	Feminino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	Diabético	C	ensino fundamental incompleto
58	Feminino	Alta por cura	não realizado	Diabético	<i>M. tb</i>	Ensino fundamental completo
59	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo	C		ensino fundamental incompleto
60	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		<i>M. tb</i>	ensino médio completo
61	Masculino	Alta por cura	não realizado	C	<i>M. tb</i>	ensino fundamental incompleto
62	Feminino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	C		ensino médio completo
64	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV positivo	C		ensino fundamental incompleto
66	Masculino	Alta por cura	não realizado	Alcoólatra	C	nenhum
67	Masculino	alta 2004/retorno 2006	Anti-HIV negativo	G		Analfabeto
69	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo	C	<i>M. tb</i>	ensino fundamental incompleto
71	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo	C		Analfabeto
72	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	Fumante	C	ensino fundamental incompleto

73	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	Recidiva		M. tb	ensino fundamental incompleto
75	Masculino				C		
76	Masculino				G		
77	Feminino	em tratamento	Anti-HIV negativo			M. tb	Analfabeto
78	Feminino				C		
79	Feminino	em tratamento	Anti-HIV negativo	Esquema III	C		Analfabeta
80	Feminino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		C		ensino médio completo
82	Feminino	Transferida - 2007	Anti-HIV negativo			M. tb	Nível superior completo
85	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo	Esquema III	C		Analfabeto
86	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo	Hipertenso	C	M. tb	ensino fundamental incompleto
87	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	Diabético	C	M. tb	ensino fundamental incompleto
88	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo		C		analfabeto
89	Feminino				C		
90	Masculino				C		
91	Masculino				C		
92	Masculino	Abandono	Anti-HIV positivo			M. tb	analfabeto
96	Feminino					M. tb	
98	Masculino	em tratamento	não realizado		C		ensino fundamental incompleto
99	Feminino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	Hipertensa		M. tb	analfabeta
100	Feminino	em tratamento	Anti-HIV negativo		C		ensino médio incompleto

102	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	C		ensino fundamental incompleto
104	Masculino	Alta por cura	Alta-HIV negativo		M. tb	ensino fundamental incompleto
105	Masculino	em tratamento	Anti-HIV negativo	Fumante	M. tb	ensino fundamental incompleto
106	Masculino			C	M. tb	
108	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV positivo		M. tb	analfabeto
109	Feminino				M. tb	
110	Feminino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	Diabética	M. tb	ensino fundamental incompleto
	Masculino			Diabético e hipertenso		
113		Alta por cura	não realizado	C		não informou
114	Masculino				M. tb	
115	Masculino				M. tb	
116	Feminino			C	M. tb	
118	Feminino				M. tb	
120	Masculino			C	M. tb	
121	Feminino			C	M. tb	
122	Masculino			C		
123	Masculino				M. tb	
124	Masculino				M. tb	
125	Masculino				M. tb	
126	Masculino	Alta por cura	Anti-HIV negativo	Ex-fumante / C		Ensino fundamental completo

ex-alcoólatra		
128	Masculino	C
129	Masculino	G
133	Masculino	<i>M. tb</i>
137	Masculino	C
139	Feminino	C
140	Masculino	<i>M. tb</i>

6.2 Resultados hanseníase

6.2.1 Hanseníase: casos diagnosticados como recidiva.

Foram recebidas 230 biopsias em etanol 70% referentes a 226 pacientes que foram processadas e analisadas para os genes de interesse no estudo. Cinco biopsias de pacientes multibacilares com índice de baciloscopia variando entre 4+ e 6+, para utilizarmos como controles positivos nas reações de PCR, além dos controles enviados pelo Dr. Patrick Brennan e Dra. Varalakshmi Vissa (Colorado State University, Fort Collins, USA), referentes a representantes dos quatro tipos de *M leprae* (1, 2, 3 e 4) segundo VNTR.

De 83 biopsias do Rio de Janeiro, referentes a 75 pacientes com baciloscopia variando de 0 a 6+. A maioria dos pacientes do Rio de Janeiro são moradores de municípios da periferia da região metropolitana, Nova Iguaçu, Nilópolis, São João de Meriti, Belford Roxo, Duque de Caxias, Magé e Niterói. Regiões onde a detecção de casos novos é bastante elevada.

Do Espírito Santo analisamos amostras de 48 pacientes com baciloscopia variando de 0 a 4+. Do Ceará analisamos amostras de 18 pacientes com baciloscopia variando de 0 a 4+. Do Pará recebemos amostras de 32 pacientes, onde 26 pacientes com o IB menor que 2+. Do estado da Amazônia analisamos amostras de 49 pacientes com baciloscopia variando de 0 a 4+.

6.2.2 Análise genética.

6.2.2.1 Extração de DNA.

A primeira fase dessa parte do trabalho foi adaptarmos um método de extração que nos desse um rendimento de DNA suficientemente bom para amplificarmos os genes de interesse. Utilizamos vários métodos de extração de DNA de tecido já publicados na literatura (Yoo-Chul, Shin e cols., 2000; Gillis, T. P e Williams, D. L., 1999) sem o rendimento esperado, então resolvemos adaptar um kit de extração de DNA de plasmídeos com Sephaglas (materiais e métodos) e, só então os resultados começaram a surgir em biópsia fresca, congelada e parafinada, tanto em biópsia inteira quanto com 20 corte de 5 micrometros.

Paralelamente testávamos os métodos de extração também testávamos o sistema de PCR (concentração de magnésio, temperatura e ciclos – condições finais descritas nos materiais e métodos) utilizando inicialmente o sistema de PCR PRA, o qual gerou o artigo publicado por Pignataro e colaboradores em 2004 e, passamos a investir na metodologia de investigação de resistência a rifampicina descrita por Ramasoota, P. e cols., 2000 (Figura 21).

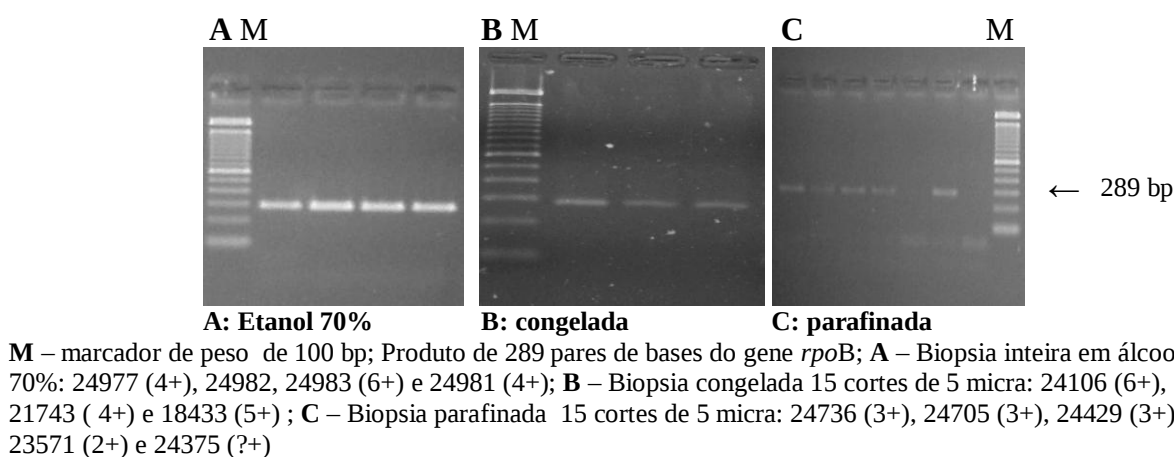


Figura 21 – PCR comparando DNAs extraídos de biópsias com diferentes meios de conservação.

As amplificações do DNAs provenientes de biópsias inteiras (panche) foram mais a intensas.

Com objetivo de verificarmos a frequência de “polimorfismo de base única” (SNPs) como ferramenta de apoio na investigação de resistência medicamentosa aos fármacos utilizados no tratamento de hanseníase, genes já descritos por estarem associados com

resistência a drogas, os genes: *rpoB* (rifampicina), *folP* (dapsona), *gyrA* e *gyrB* (ofloxacin) – Figuras 6, 7 e 8.

Uma vez que tínhamos conseguido amplificar o fragmento de 289 bp da região de interesse do gene *rpoB* começamos a seqüenciar, verificamos nesse momento que estávamos perdendo pelo menos 60 pares de base em cada extremidade e interferindo na análise do seqüenciamento. Então criamos um produtos de 646 bp (já citado nos materiais e métodos) e mais uma vez, todas as fases de padronização de ciclos e concentração de $MgCl_2$ em um PCR gradiente que variava de 55 °C a 65,2 °C de temperatura de anelamento, para garantirmos que teríamos a região de interesse amplificada, onde optamos pela temperatura de 61,9 °C de anelamento (Figura 22).

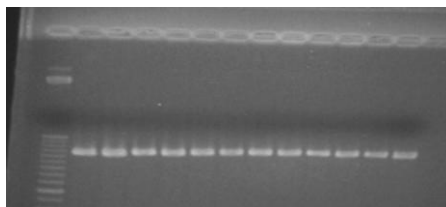


Figura 22. Gradiente para verificar as melhores condições de PCR com os novos iniciadores amplificando um fragmento de 646 bp do gene *rpoB*.

Também testamos as condições estabelecidas com a utilização de um kit da Qiagen para a extração de DNA das biopsias (DNeasy tecido –materiais e métodos).

Essa estratégia foi realizada para os demais genes de estudo e investigação de resistência em *M. leprae* de pacientes com recidiva de hanseníase ou suspeita dos cinco estados.

Quando analisamos a relação entre positividade de PCR, seqüenciamento e o resultado da baciloscopia onde as amostras paucibacilares amplificaram bem menos em comparação com as amostras multibacilares para os sistemas utilizados no estudo. Entretanto, em alguns casos com baciloscopia negativa, obtivemos resultados positivos com predominância de

positividade para o gene *folP1* e o gene *gyrA*, fortalecendo a importância de trabalharmos com a biópsia.

O rendimento do PCR e seqüenciamento para todos os genes de resistência do estudo foi mais expressivo na medida em que a baciloscopia se aproximava de 3+, principalmente os produtos maiores que 289 bp, como os fragmentos do gene *rpoB* externo (646 bp) e do gene *folP1* externo (747 bp).

6.2.3 PCR e seqüenciamentos.

6.2.3.1 Gene *folP1*.

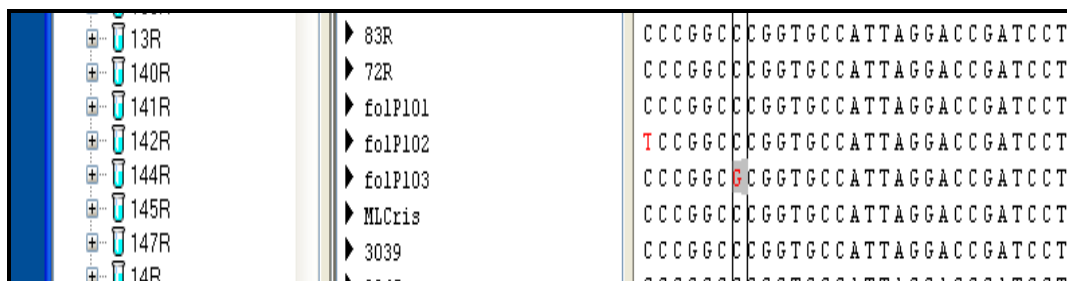
A frequência de positividade no PCR para o gene *folP1* em comparação com o índice de baciloscopia (IB), com IB > 3+ obtemos uma positividade melhor em comparação com os índices menores; dos pacientes que tinham o IB 0 conseguimos resultados de 4/61 (6,55%), com IB variando de 1+ a 3+ conseguimos resultados de 22/41 (53,65%) e quando o IB era acima de 3+, conseguimos de 31/44 (70,45%).

Tabela 19 – Resultado de seqüenciamento do gene *folP1* de DNA extraído de biópsias com IB conhecido.

<i>folP1</i>	0	1	2	p valor
Positivo	4(6,6%)	22(53,7%)	<u>31(70,5%)</u>	<u><0,001</u>
Negativo	57(93,4%)	19(46,3%)	13(29,5%)	
Total: 146	61	41	44	

Ibcat- IB categorizado, 0 – IB 0; 1 – IB >0< 3+ e 2 – IB 3+ >; pvalor < 0,005, qui-quadrado (Fischer corrigido)

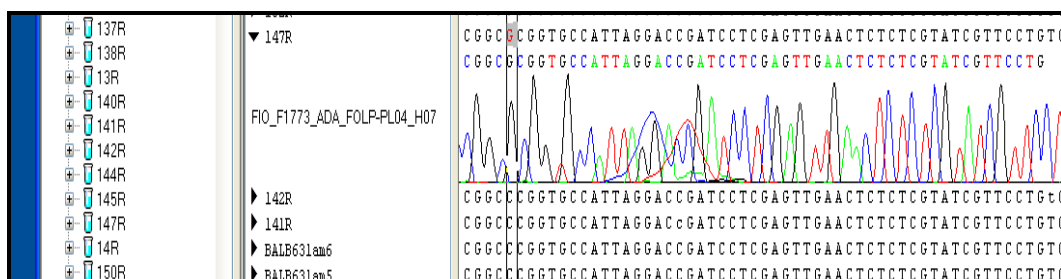
Utilizamos três controles (plasmídeos contendo parte do gene *folP* 101, 102 e 103), o controle *folP*101 sem mutação, os controles *folP* 102 e 103 contêm as substituições de um nucleotídeo respectivamente, nos códons 53 e 55 – Figura 23.



folP 101- cepa sensível; *folP*102 – cepa mutação no códon 53 e *folP*103 – mutação no códon 55

Figura 23 - Controles positivos de resistência no gene *folP*;

Obtivemos seqüências satisfatórias para verificar a presença de SNPs na região de interesse do gene *folP* (nucleotídeo 100 até o nucleotídeo 220) em material de 57 pacientes. Na maioria, encontramos a seqüência sem mutação (selvagem – wt), apresentando ACC na posição 53 e CCC no códon 55. Somente amostras de dois pacientes apresentaram mutação no códon 55, um paciente multibacilar do estado do Pará (residindo no município de Igarapé – Açú) e um paciente do Amazonas, houve uma substituição no códon 55 passando de Pro **CCC** – **CGC** Arg, substituição conhecida por conferir resistência à droga dapsona (Figura 24).



*A amostras do paciente 195R também tem a mutação no códon 55: **CCC** para **CGC** (prolina para argenina)

Figura 24 – localização da mutação no gene *folP* da amostra do paciente 147R*.

Além de SNPs nos códons 53 e 55, verificamos mutações em outras regiões do fragmento do gene *folP* analisado. A presença de um nucleotídeo diferente da sequência WT foi verificada em 5 pacientes com **T** e **G** na mesma posição, apresentando picos duplos na sequência, sendo uma mistura da sequência wt (nucleotídeo **G**) e mutantes (nucleotídeo **T**) - Figura 25.

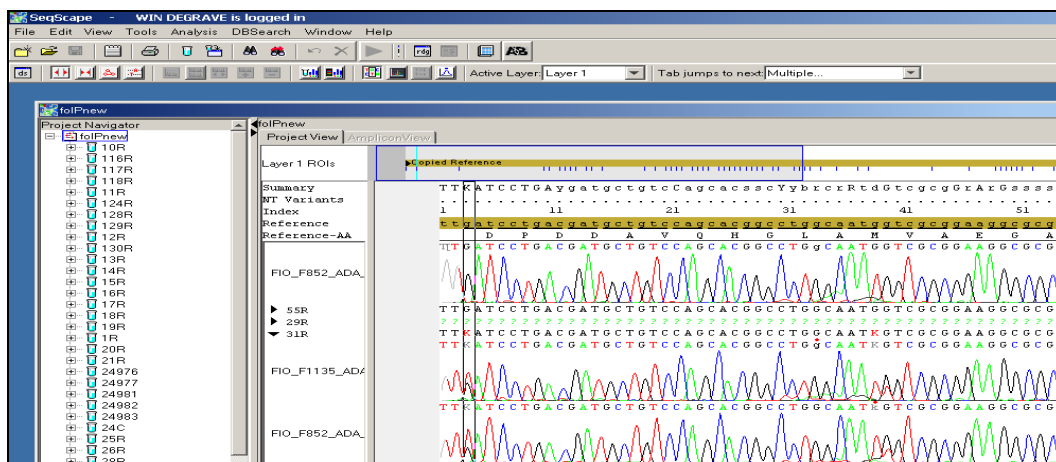


Figura 25 – Picos duplos (suspeita de infecção mista).

6.2.3.2 Gene *rpoB*.

Como observado no gene *folP*1, quanto mais alto o índice de baciloscopia mais positividade no sistema de PCR seguido de sequenciamento. Das biopsias de pacientes com IB 0, conseguimos resultados de sequenciamento de 5/61 (8,2%); dos pacientes com IB de 1+ a 3+ conseguimos 19/41 (46,3%) e quando analisamos as biopsias dos pacientes com IB maior que 3+, conseguimos 33/44 (75,0%).

Tabela 20 – Resultado de seqüenciamento do gene *rpoB* de DNA extraído de biopsias com IB conhecido.

<i>rpoB</i>	0	1	2	p valor
Positivo	5(8,2%)	19(46,3%)	33(75,0%)	<0,001 *
Negativo	56(91,8%)	22(53,7%)	11(25,0%)	
Total: 146	61	41	44	

Ibcat- IB categorizado; 0 – IB 0; 1 – IB >0< 3+ e 2 – IB 3+ >; pvalor < 0,005, qui-quadrado (Fischer corrigido)

Recebemos DNAs controles para a mutação no gene *rpoB* e após amplificarmos e seqüenciarmos encontramos mutações nos códons: **507**: Thr ACC → ATC Ile; **516**: Asp GAT → TAT Tyr e **531**: Ser TCG → TTG Leu, DNAs fornecidos pelo Dr. Masanori Matsuoka (Centro de pesquisa de Hanseníase, Instituto Nacional de Doenças Infecciosas – Tóquio, Japão).

Somente na amostra de quatro pacientes (3 multibacilares e 1 paucibacilar) encontramos substituição no códon 531 do gene *rpoB*, um do estado do Pará (residindo no município de Igarapé – Açu) houve uma substituição no códon 531 passando de serina (ser) TCG – **ATG** (Met) metionina, substituição conhecida por conferir resistência à droga rifampicina (Figura), esse paciente foi identificado como resistente as duas principais drogas de uso no tratamento da hanseníase: a rifampicina e a dapsona. Dois pacientes do Amazonas, onde o paciente 185R houve substituição no códon 531 de TCG para TTG e o paciente 195R onde foi verificada a substituição de TCG para TTC e, nesse paciente também foi verificada mutação no gene *folP* (Figuras 23). Um paciente do Espírito Santo, onde foi verificada no códon 531 a substituição de TCG para TTX (Figura 26 e Tabela 24).

The screenshot shows the SeqScape software interface. On the left, a list of sample IDs is visible, ranging from 170R to 11R. The main window displays a sequence alignment for the file 'FIO_F2290_AD4'. The alignment is shown as a chromatogram with peaks for 'Known Variants' (red) and 'All Variants' (blue). The bottom status bar indicates 'The active layer does not contain a library'.

[illegible]

Figura 26C - 195R (AM): TCG para T_{TC}

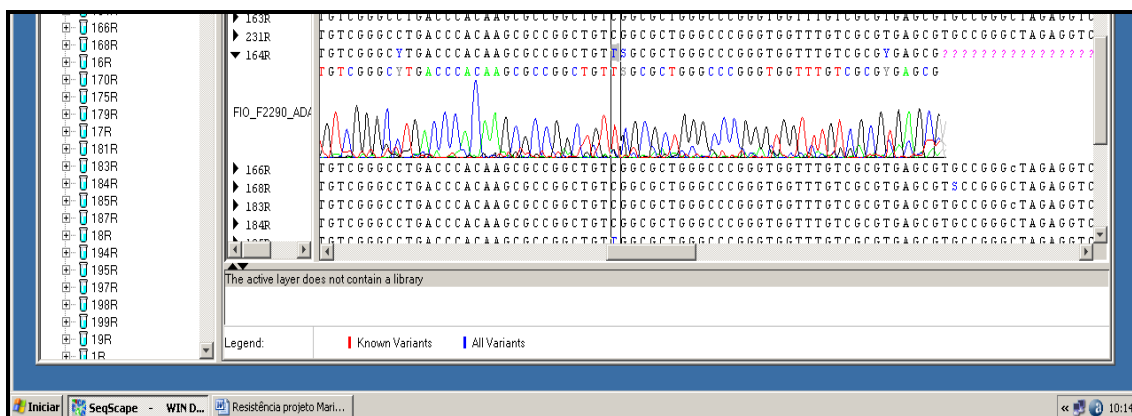
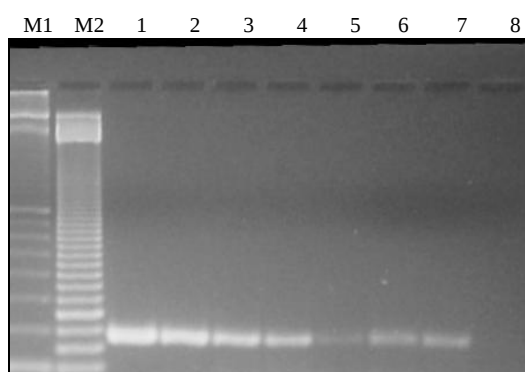


Figura 26D - 164R (ES): TCG para TTX.

6.2.3.3 Gene *gyrA*.

A sensibilidade do PCR do gene *gyrA* foi verificada com DNAs controles de 10ng até 100ag, e o mesmo se mostrou bastante sensível, amplificando até 1fg (Figura 27).



M1- marcador de peso molecular de 100 bp; M2 – marcador de peso molecular de 50 bp; 1 – Amplificação de DNA na concentração de 10ng (189bp); 2 – 100fg; 3 – 10pg; 4 – 1pg; 5 – 100fg; 6 – 10fg; 7 – 1fg e 8 – 100ag.

Figura 27 – Teste de sensibilidade da amplificação da região de interesse do gene *gyrA* de *M leprae*.

Em um total de 124 amostras analisadas pelo seqüenciamento do gene *gyrA*, 84 (67,7%) ficaram alocadas na família *gyrAC* e 40 (32,3%) na população *gyrAT*, separando as amostras recebidas em duas populações, onde podemos observar que a população *C* é significativamente mais encontrada que a população *T*.

Tabela 21 – Resultado de seqüenciamento do gene *gyrA* de DNA extraído de biopsias com IB conhecido.

<i>gyrA</i>	0	1	2	p valor
Positivo	18(29,5%)	27(65,9%)	32(72,7%)	<0,001
Negativo	43(70,5%)	14(34,1%)	12(27,3%)	
Total: 146	61	41	44	

Ibcat- IB categorizado; 0 – IB 0; 1 – IB >0< 3+ e 2 – IB 3+ >; pvalor < 0,005 qui-quadrade (Fischer corrigido)

Nós observamos que alguns DNAs dos pacientes analisados pelo gene *gyrA* apresentam: substituição de um nucleotídeo do **C** pelo **T** – mutação silenciosa, indicando a caracterização de duas populações do *M. leprae*. Avaliamos a seqüência do gene *gyrA* com DNA controle contendo o **C** e DNA controle com a substituição do **C** pelo **T** utilizando as enzimas: Tli com Taq comum, Taq polimerase comum, PFU e PFU com Taq comum, para garantirmos que a substituição não se tratava de um erro (dados não mostrados).

6.2.3.4 Gene *gyrB*

Com intuito de verificar a presença de SNPs no gene *gyrB* também associado com resistência a ofloxacina.

Nenhuma mutação foi encontrada após amplificação e seqüenciamento do gene *gyrB* das 46 biopsias analisadas e com seqüenciamento finalizado.

Tabela 22 – Resultado de seqüenciamento do gene *gyrB* de DNA extraído de biopsias com IB conhecido.

<i>gyrB</i>	0	1	2	p valor
Positivo	9(14,8%)	16(39,0%)	<u>20(45,5%)</u>	<u><0,001</u>
Negativo	52(85,2%)	25(61,0%)	24(54,5%)	
Total: 146	61	41	44	

Ibcat- IB categorizado; 0 – IB 0; 1 – IB >0< 3+ e 2 – IB 3+ >; pvalor < 0,005 qui-quadrado (Fischer corrigido)

6.2.4 Pacientes com primeira biopsia (diagnóstico de hanseníase) e segunda biopsia após alta por cura (recidiva).

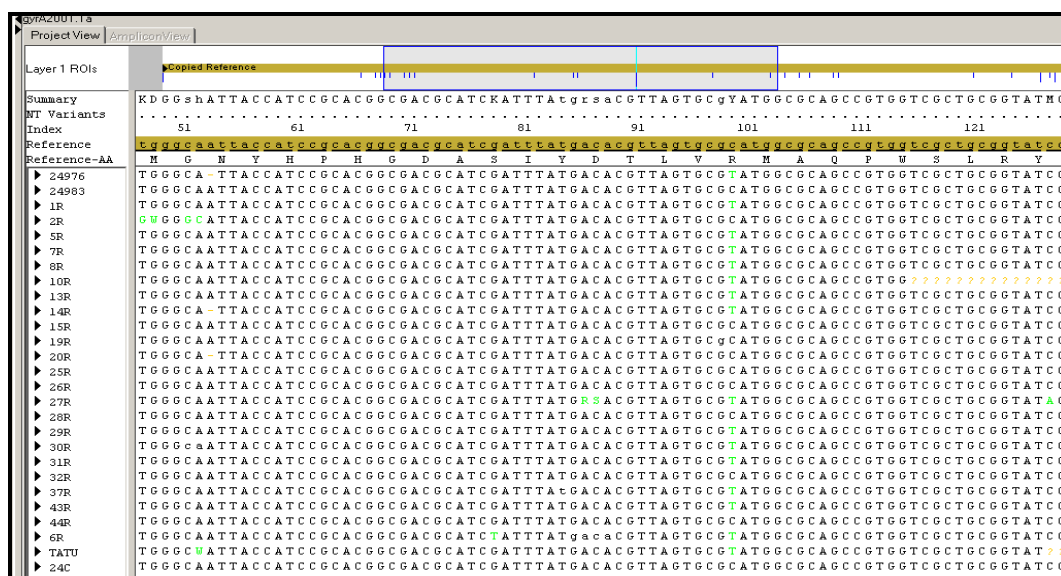
Após analisarmos as biopsias dos sete pacientes com primeira biopsia e a biopsia da recidiva, o resultado foi: quatro pacientes com primeira biópsia **T** e a biópsia da recidiva **C** e, um paciente a primeira biopsia **C** e o retorno dele **T**– sugerindo re-infecção Tabela 22 e as Figura 28 A, B e C – foram realizados PCRs do gene *gyrA* com enzimas de correção da seqüência: Tli e PFU com concentração de MgCl₂ variando de 2,5 mM e 2 mM. Dados não mostrados

Tabela 23 – Pacientes com duas biópsias (1ª. Diagnóstico e 2ª. Recidiva) – mutação no *gyrA*.

Pacientes	Biopsia / baciloscopia	Data	Tratamento	<i>gyrA</i>	Residência/Município
A - LL	20216 – 24305 – 5+	23/07/1992 06/11/2003	PQT/MB	C T	Rio/Conj Esperança
B - BL	18904 – 4+ 23229 – 6+	19/09/1988 23/04/2001	PQT/MB	T C	Rio/Acari
C - LLS	18433 – 6+ DNDS/MB 21743 – 4+	16/09/1987 17/09/1997	PQT/MB	T C	Rio/Vila da Penha
D - BL	18418 – 5+ DNDS/MB 22798 – 3,5+	27/08/1987 05/06/2000	PQT/MB	T C	Baixada Fluminense/Nova Iguaçu
E - BL	18740 – 4+ 24106 – 6+	25/05/1988 19/05/2003	PQT/MB	T T	Baixada Fluminense/São João de Meriti
F - LLS	19502 – 5+ 23597 – 6+	17/01/1990 28/01/2002	PQT/MB	T T	Rio/Madureira
G - LLS	19500 – 4+ 22477 – 4+	17/01/1990 04/08/1999	PQT/MB	T C	Baixada Fluminense/Nova Iguaçu
H LL	24327 – 6+ 24493 – 4+	Não é recidiva	PQT/MB	C C	Magé

BL- borderline lepromatous; **LL-** lepromatous leprosy; **DNDS/MB:** Rifampicina (RMP) 600mg/dia, 90 dias + Dapsona (DDS) 100mg/dia; **PQT/MB:** RMP 600mg + CLZ 300mg/mês (supervisionado) + DDS 100mg + CLZ 50mg/dia, 12 ou 24 doses mensais; **PQT/PB:** RMP 600mg/mês (supervisionado)+ DDS100mg/dia, 6 doses/mensais;

A



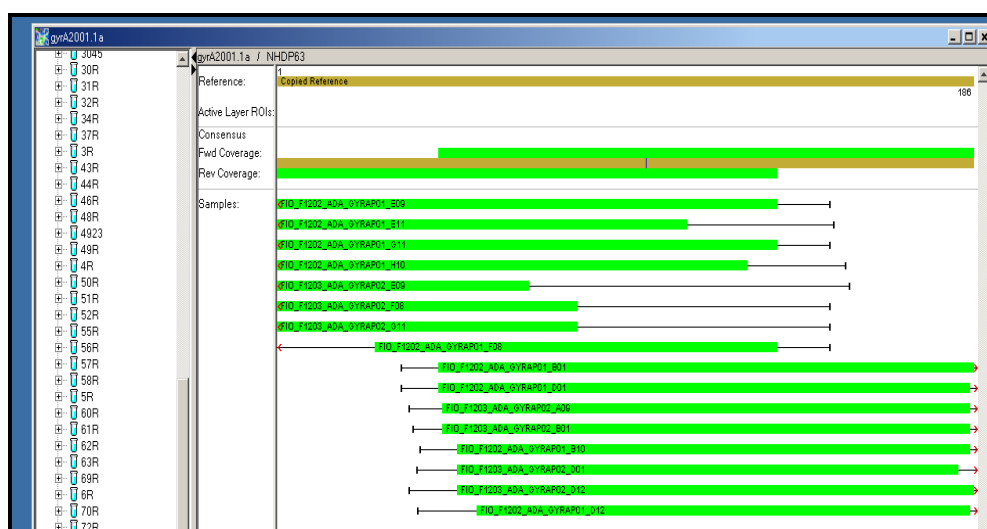


Figura 28 A, B e C – SNPs no gene *gyrA* de *M. leprae*: de C para T.

6.2.5 Amostra de pacientes com recidiva de hanseníase inoculada no coxim plantar de Balb/c.

Embora tenhamos recebido além das biopsias de pacientes com recidiva, DNA de amostras de pacientes com recidiva que haviam sido inoculadas em camundongo Balb/c no Instituto Lauro de Souza Lima em Bauru – São Paulo, devido a suspeita de resistência medicamentosa a rifampicina, nenhuma SNP foi encontrada nas amostras analisadas provenientes de coxim plantar de Balb/c (Figura 29)

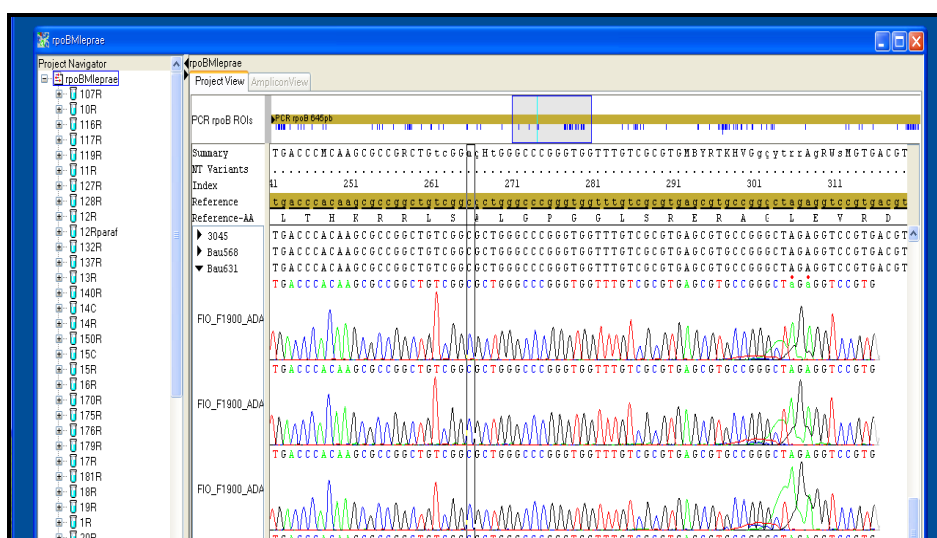


Figura 29 – sequência gene *rpoB* de DNA extraído de amostra inoculada em coxim plantar de camundongo Balb/c – sensível.

6.2.6 Infecção de *M leprae* em tatu.

Analizamos também amostras de *M leprae* de tatu infectado naturalmente no Ceará e conseguimos uma boa sequência de DNA extraído de uma lesão do focinho do animal, e segundo o sequenciamento pertence à população **T**. Precisamos de um número mais significativo de animais naturalmente infectados, mas não é fácil (Figura 30).

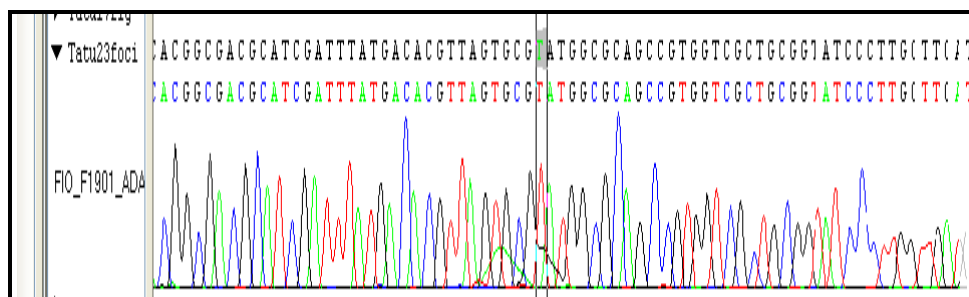


Figura 30 – SNP no gene *gyrA* em DNA extraído de tatu infectado naturalmente no ambiente – Ceará.

Identificamos amostras previamente identificadas pelo VNTR em SNPs 1, 3 e 4, utilizando o gene *gyrA* em colaboração com o Dr. Patrick Brennan e Dra. Varalakshmi Vissa (Colorado State University, Fort Collins, USA) e, todas as amostras alocadas no SNP 3 foram agrupadas no SNP *gyrA* **T** e todas as demais, ou seja, 1 e 4 no SNP *gyrA* **C** – dados não mostrados.

Tabela 24 — Amostras dos pacientes com recidiva de hanseníase e resultado de sequenciamento dos genes de interesse.

<i>Amostras</i>	<i>folP</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	Origem
24976	+	+	+ T	+	RJ
24977	+	+	+ T	+	RJ
24981	+	+	+ T	+	RJ
24982	+	+	+ T	+	RJ
24983	+	+	+ T	+	RJ
NHDP-63	+	+	+ T	+	Estados Unidos
3039 V	+	+	+ C	-	Estados Unidos
3045 V	+	+	+ C	+	Estados Unidos
4923 V	+	+	+ C	+	Estados Unidos
A606	+	-	+ C	+	Estados Unidos
I480	+	-	+ C	+	Estados Unidos
I487	+	-	+ C	+	Estados Unidos
Thai53	+	-	+ C	+	Estados Unidos
MI Cris	+	+	+ C	+	Estados Unidos
NHDP-55	+	-	-	-	Estados Unidos
<i>folP</i> 101	+	-	-	-	Estados Unidos
<i>folP</i> 102	+	-	-	-	Estados Unidos
<i>folP</i> 103	+	-	-	-	Estados Unidos
<i>rpoB</i> 531		+			Japão

<i>Amostras</i>	<i>IB</i>	<i>folp</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	Origem
R1 -	4	+	+	+ T	+	RJ
R2 -	0	+	+	+ C	+	RJ
R3 -	4	+	+	+ T	+	RJ
R4 -	0,41	+	+	+ C	+	RJ
R5 -	0,41	+	+	+ T	+	RJ
R6 -	6,85	+	+	+ T	+	RJ
R7 -	0	+	+	+ T	+	RJ
R8 -	2,42	+	+	+ T	+	RJ
R9 -	4,7	-	+	+ C	-	RJ
R10 -	2,42	+	+	+ T	+	RJ
R11 -	1,49	+	+	+ T	+	RJ
R12 -	1,49	+	+	+ C	+	RJ
R13 -	2,33	+	+	+ T	+	RJ
R14 -	4,7	+	+	+ T	+	RJ
R15 -	3,8	+	+	+ C	-	RJ
R16 -	0	+	+	+ T	+	RJ
R17 -		-	-	-	+	RJ
R18 -		-	-	+ C	-	RJ
R19 -	3,8	+	+	+ C	+	RJ
R20 -	5,7	+	+	+ C	+	RJ
R21 -		+	+	+ T	+	RJ
R22 -	1,33	-	-	-	-	RJ
R23 -	1,33	-	-	+ C	+	RJ
R25 -	4	+	+	+ C	+	RJ
R26 -	4	+	+	+ C	+	RJ
R27 -	0,25	-	-	+ T	+	Nova Iguaçu - RJ
R28 -		+	+	+ C	+	RJ
R29 -		-	-	+ T	+	RJ
R30 -	4,4	+	+	+ T	+	RJ
R31 -	2	+	+	+ T	+	RJ

R32 -		-	-	+ C	+	RJ
R33 -	0	-	-	+ C	+	RJ
R34 -	0	-	+	-	-	RJ
R35 -	3,75	-	+	-	-	ES
R36 -	0	-	-	-	-	ES
R37 -	4,5	+	-	+ T	+	ES
R38 -	0	-	-	+ C	+	ES
R39 -	0	-	-	-	-	ES
R40 -	0	-	-	-	-	ES
R41 -	0	-	-	-	-	ES
R42 -	0	-	-	-	-	ES
R43 -		+	+	+ T	+	RJ
R44 -		+	+	+ C	+	RJ
R45 -	2?	+	-	+ T	+	RJ
R46 -	0?	-	-	+ C	-	RJ
R47 -	3,25	+	+	+ T	+	RJ
R48 -		+	-	+ T	-	RJ
R49 -		-	-	+ C	+	RJ
R50	4,5	+	+	+ T	+	RJ
R51		-	-	+ C	+	RJ
R52	0	-	-	-	+	Duque de Caxias - RJ
R53		-	-	-	-	RJ
R54	0	-	-	+ C	-	RJ
R55	1,5	+	+	+ C	+	RJ
R56	4	+	-	-	-	RJ
R57	4,25	+	-	+ C	+	AM
R58		+	+	+ T	-	RJ
R60	0	-	-	+ C	-	Nova Iguaçu RJ
R61	4,5	+	+	+ C	+	RJ
R62	3,33	-	+	+ T	+	RJ
R63		-	-	-	+	RJ
R64	0	-	-	+ C	-	São João de Meriti RJ
R65	3	-	-	-	-	RJ
R66	0,75	-	-	+ C	-	RJ
R67	0	-	-	-	-	CE
R68	0	-	-	-	-	CE
R69	3+	+	+	+ C	-	CE
R70	0	+	+	+ C	-	CE
R71		+	-	-	-	AM
R72		+	+	+ C	+	AM
R73		+	+	+ C	+	AM
R74		+	-	+ C	-	AM
R75	4	+	-	-	-	AM
R76		-	-	-	-	AM
R77		-	-	-	-	RJ
R78		-	-	+ T	-	AM
R79		+	+	-	-	RJ
R80	1	+	+	+ T	+	RJ
R81	0	-	-	-	-	RJ
R82	0	-	-	+ C	+	RJ
R83	3,5	+	+	+ T	+	ES
R84	0	-	-	-	-	ES
R85	3,5	-	+	+ T	-	ES
R86	4,25	-	+	-	-	ES

R87	0	-	-	-	-	ES
R88	0	-	-	-	-	ES
R89	0	-	-	-	-	ES
R90	1,5	-	+	+ T	-	ES
R91	2	+	+	+ T	-	ES
R92	0	-	-	-	-	ES
R93	4,25	+	+	+ T	-	ES
R94	0	-	-	-	-	ES
R95	0	-	-	-	-	Belém PA
R96	3,75	+	-	+ C	-	Ananindeua PA
R97	0	-	-	+ C	-	Benevides PA
R98	2,5	-	-	+ C	-	Concordia PA
R99	0	-	-	+ C	+	Marituba PA
R100	5	-	-	-	-	Ananindeua PA
R101	0,5	-	-	-	-	Tomé-Açu PA
R102	0	-	-	+ C	-	Ourém PA
R103	0	-	-	-	-	Paragominas PA
R104	0	-	-	-	-	Ananindeua PA
R105	0	-	-	-	-	Marituba PA
R106	2	-	-	+ C	-	Belém PA
R107	2,5	-	+	+ C	-	Belém PA
R108	0	-	-	-	-	Benevides PA
R109	0	-	-	-	-	Benevides PA
R110	0	-	-	-	-	Belém PA
R111	0	-	-	-	-	Marituba PA
R112	0	-	-	-	-	Ananindeua PA
R113	2,5	-	-	-	-	Belford – Roxo RJ
R114	0	-	-	-	-	Nilópolis RJ
R115		-	-	-	-	RJ
R116		+	+	+ C	-	AM
R117	1,25	-	+	+ C	+	Nova Iguaçu - RJ
R118	3,75	+	-	+ C	-	ES
R119	1,25	+	+	+ T	-	ES
R120	0	-	-	-	-	ES
R121	0	-	-	-	-	ES
R122	0	-	-	-	-	ES
R123	0	-	-	-	-	ES
R124	1,25	+	-	-	-	ES
R125	0	-	-	-	-	ES
R126	0	-	-	-	-	ES
R127	0	-	-	-	-	ES
R128	1,75	+	+	-	-	ES
R129	4,75	+	-	+ T	-	ES
R130	2,5	+	-	-	-	ES
R131		-	-	-	-	ES
R132		-	-	-	-	ES
R133	5	+	-	-	-	AM
R134		-	-	+ C	-	AM
R135		+	+	+ C	+	AM
R136	5,25	+	-	+ C	+	AM
R137	3,75	+	+	-	+	Fazendinha - RJ
R138	4	+	+	+ T	-	Magé RJ
R139	0	-	-	+ C	+	Magé RJ
R140	3,25	+	+	-	-	São João de Meriti - RJ

R141	1,25	-	-	+ C	+	Barcarena PA
R142	4,25	+	-	+ C	-	Belém PA
R143	0	-	-	-	-	Bragança PA
R144	0	-	-	+ C	-	Marituba PA
R145	0	-	-	+ T	-	Ananindeua PA
R146	0	-	-	+ C	-	Pacajá PA
R147	4	folP 55	rpoB531	+ C	+	Igarapé-Açú PA
R148	0	-	-	-	-	Ananindeua PA
R149		-	-	-	-	Ananindeua PA
R150	2,25	+	+	+ C	+	Belém PA
R151		-	-	-	-	RJ
R152		-	-	-	-	Campo Grande RJ
R153		-	+	+ C	-	AM
R154		+	+	+ C	-	AM
R155		-	+	+ C	-	AM
R156		-	-	-	-	AM
R157	6	+	+	+ C	+	AM
R158	4,75	-	+	+ C	+	AM
R159		-	-	-	-	ES
R160		-	-	-	-	ES
R161		-	-	-	-	ES
R162		-	-	-	-	ES
R163		-	+	+ C	-	ES
R164		-	rpoB531	+ C	-	ES
R165		-	-	-	-	ES
R166	4,75	-	+	+ C	-	AM
R167	0	-	-	-	-	AM
R168		+	-	+ C	-	AM
R169	0,5	-	-	-	-	CE
R170	4+	-	+	-	-	CE
R171	2,5	-	-	-	-	CE
R172	3+	+	-	+ C	-	CE
R173	1+	-	-	+ C	-	CE
R174	0	-	-	-	-	CE
R175	4+	-	+	-	-	CE
R176	3+	+	-	-	-	CE
R177	1,25	-	-	-	-	CE
R178	1+	-	-	-	-	CE
R179	4	-	+	-	-	CE
R180	1,75	-	-	-	-	CE
R181	4+	+	+	-	-	CE
R182	2+	-	+	-	-	CE
R183		-	-	+ C	-	AM
R184	5,25	-	+	+ C	-	AM
R185		+	rpoB531	+ C	-	AM
R186		-	-	+ C	-	AM
R187		-	+	+ C	-	AM
R188	0	-	-	-	-	Belém PA
R189	0,5	+	-	-	-	Marituba PA
R190		-	-	-	-	RJ
R191		-	-	-	-	RJ
R192		-	-	-	-	RJ
R193		-	-	-	-	AM
R194		-	+	+ T	-	AM

R195		folP 55	rpoB531	+ C	-	AM
R196		-	-	-	-	AM
R197		-	-	+ C	+	AM
R198		-	+	+ C	-	AM
R199		-	-	+ C	-	AM
R200		-	-	+ C	-	AM
R201		+	+	+ C	+	AM
R202		-	-	-	-	AM
R203		-	+	+ T	-	Colégio RJ
R204		-	-	-	-	Nova Iguaçu RJ
R205		-	+	+ C	-	AM
R206		-	-	+ C	-	AM
R207		+	-	+ C	-	AM
R208		-	-	-	-	RJ
R209		-	-	-	-	Riachuelo RJ
R210		-	-	-	-	Piedade RJ
R211	1,5	+	-	+ C	-	AM
R212		+	+	+ C	-	AM
R214		-	-	-	-	AM
R215		-	-	-	-	RJ
R216		+	-	+ T	-	AM
R217		+	-	+ C	-	AM
R218		-	+	+ T	-	São João de Meriti RJ
R219		-	-	+ C	-	RJ
R220		-	-	-	-	AM
R221		-	-	+ C	-	AM
R222		-	+	+ C	-	RJ
R224	0	-	-	-	-	ES
R225	0	-	-	-	-	ES
R226	0	-	-	-	-	ES
R227	4,75	-	+	+ T	-	ES
R228	0	-	-	-	-	ES
R229	0	-	-	-	-	ES
R230		-	-	-	-	RJ
R231		-	+	+ C	-	RJ
R233		-	-	-	-	RJ
R234		-	-	-	-	PA
R235	5,0	+	+	+ C	-	PA

Discussão

7 Discussão.

7.1 Discussão parte 1.

O complexo *M. tuberculosis* é composto por espécies altamente adaptáveis ao ser humano e outros animais, há aproximadamente 40.000 mil anos vem aperfeiçoando e aplicando seu potencial de infectar, “fitness” e virulência. Com o desenvolvimento da biologia molecular, e a criação de técnicas, tais como, a reação em cadeia da polimerase (PCR) por Mullis & Faloona em 1987, e o melhoramento das metodologias nos foi possível analisar e investigar Tb e outras *micobactérias* em vários tipos de amostras. Recentes estudos do genoma de complexo *M. tuberculosis* moderno indicam que *M. bovis* e *M. tuberculosis* tem um precursor ancestral o *M. prototuberculosis*, e se os dados de Rochschild e colaboradores em 2001 forem válidos, o DNA encontrado em búfalo extinto há 17.000 anos é provavelmente o ancestral do complexo *M. tuberculosis* (GUTIERREZ e cols., 2005; WILBUR & BUIKSTRA, 2006).

A Organização Mundial de Saúde elegeu a tuberculose bovina como importante zoonose profissional nos grupos de magarefes, tratadores de animais e veterinários. A tuberculose causada por *M bovis* é indistinguível sob aspectos clínicos, radiológicos e anatomopatológicos da causada pelo *M tuberculosis*. Assim, é possível que a infecção pulmonar em humanos causada por *M bovis* esteja subestimada apesar da pasteurização do leite ter tornado a tuberculose humana causada pelo *M bovis* muito rara em países desenvolvidos (WEDLOCK e cols., 2002).

Em 2007, Kantor e colaboradores, traçaram um perfil da zoonose em 10 países da América Latina, entre os quais, Argentina, Brasil, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, Peru, Uruguai e Venezuela a partir de informações de seus laboratórios oficiais com dados variando de 3 a 20 anos. O estudo descreve o Brasil como um dos maiores criadores de gado da América Latina, com aproximadamente 190 milhões de cabeças de gado, com o teste tuberculínico variando nos estados de 0,4% (Sul e Sudeste) a 3,6% (Nordeste). De modo geral, estima-se que 10% do rebanho bovino brasileiro sejam infectados pelo *M. bovis*, entretanto este número pode ser ainda mais importante se consideramos o rebanho não oficial (LILENBAUM, 2005).

No Brasil no período de 20 anos (1987-2006) apenas um caso de infecção por *Mycobacterium bovis* em humanos foi relatado (comunicação pessoal Paulo Cesar Caldas). Em 2009 mais dois casos foram identificados em pacientes do estado do Rio Grande do Sul pelo Centro de Referência Prof. Hélio Fraga – Curicica, Rio de Janeiro em colaboração com nosso laboratório através do método *pncA* e MIRU. A situação real de nosso país em relação à infecção pelo *M bovis* em humanos, ainda não é clara.

A vacina BCG tem papel limitado na prevenção das diferentes formas de tuberculose por *M. tuberculosis*, exceto nas formas graves disseminadas ou com comprometimento meningeo na infância. Entretanto, a vacinação BCG pode estar contribuindo para a erradicação da tuberculose humana por *M bovis* no Brasil, devido a elevada cobertura vacinal (MONTEIRO-MAIA e cols., 2006).

Após analisarmos os seqüenciamentos das 480 lâminas de baciloscopia Campos dos Goytacazes e Minas Gerais e, em 16 biópsias de gânglio detectamos o *M bovis* apenas nas amostras de duas biópsias de gânglio de pacientes que são oriundos de região de gado de leite de Minas Gerais.

Após analisarmos os 1435 isolados cultivados em meio Löwenstein-Jensen contendo piruvato provenientes do Rio de Janeiro, os 285 isolados cultivados em meio Löwenstein-Jensen com glicerol, oriundos do estado do Ceará, pelo método de PCR seguido de restrição: gene *pncA*, métodos moleculares para a identificação e diferenciação de *M. bovis* e *M. tuberculosis* já descritos na literatura como métodos bastante relevantes para o diagnóstico de *M. bovis* não encontramos nenhum caso de TB causada por *M. bovis*. Acreditamos que o hábito de bebermos apenas leite pasteurizado, não comermos carne crua, associado à vacinação em massa do BCG e a alta incidência de tuberculose causada por *M tuberculosis*, sejam as razões da baixa prevalência de *M. bovis* em nosso estudo, apesar da existência de gado infectado pelo *M bovis*, com uma notificação oficial – baseada em abatedouros cadastrados – em 2005 de que 1,3% do rebanho de gado brasileiro estavam infectados (NASSAR e cols., 2007).

Em contra partida identificamos *M. tuberculosis* em amostra de um bovino e um búfalo, o que nos deixa claro que o ciclo de transmissão existe, do homem para o animal e que o oposto pode certamente ocorrer. Apesar de não termos detectado nenhum *M. bovis* nos

materiais provenientes de culturas ou lâminas, encontramos *M. bovis* em 2 amostras de fragmentos de linfonodos de pacientes provenientes da região da bacia leiteira.

Em um estudo realizado paralelamente a este, Sobral, L. F. (2009) demonstrou que não foi identificada nenhuma cepa de *Mycobacterium bovis* utilizando a caracterização fenotípica e bioquímica nos isolados que cresceram em meio contendo piruvato.

Nossas culturas de controle se mostraram bastante interessante, pois verificamos que o *M. bovis* tem preferência pelo meio suplementado com piruvato e, que o MTB é uma espécie extremamente adaptável as condições do meio, crescendo tanto em meio L-J padrão com glicerol quanto em L-J com piruvato.

Estudo realizado no município de Campos dos Goytacazes em 2004 por Santos identificou através de imuno – histoquímica 14 cepas de *M. bovis* em um total de 25 isolamentos de biópsias provenientes de bovinos. Mas apesar disso nenhum caso de *M. bovis* foi identificado nas amostras de lâminas de baciloscopia de pacientes de um período de 12 meses: 2006 – 2007, daquele município. Ao utilizarmos lâminas esperávamos detectar o *M. bovis* mais facilmente, já que em cultura o MTB provavelmente cresceria de forma mais robusta que o *M. bovis* o que dificultaria a sua identificação. Além disto, as lâminas de baciloscopia são o primeiro exame de diagnóstico bacteriológico e são de fácil execução. Assim, a aplicação de métodos moleculares a partir da extração de DNA de lâminas de baciloscopia poderia aumentar a velocidade do diagnóstico e da identificação da espécie.

Em nosso estudo, como já dito anteriormente encontramos apenas dois casos de *M. bovis* detectados em DNA extraído de biópsias de pacientes de Minas Gerais, identificados pelo PCR e seqüenciamento do gene *oxyR*; todas as demais amostras do estudo foram identificadas como *M. tuberculosis*.

Nosso laboratório tem extensa experiência com a metodologia de spoligotyping, desde 2000, e vem gerando muita informação a respeito da variabilidade, transmissão e relações filogenéticas dos isolados de MTB que circulam no Brasil (GOMES, 2008).

Após analisarmos 989 isolados do estado do Rio de Janeiro, obtivemos 33 grupos de spoligotyping, onde a família LAM foi mais prevalente dos casos identificados, corroborando com os dados de dominância desta família em toda América Latina (WILBUR & BUIKSTRA, 2006; DALLA COSTA e cols., 2009).

Já com os resultados obtidos de 285 isolados do estado do Ceará, evidenciamos 21 grupos de spoligotyping, e como já esperávamos a família LAM também foi à predominante.

As famílias LAM, Haarlem e T estão distribuídas em todos os continentes, no entanto, a família LAM é a mais freqüente na América do Sul e no continente africano. As cepas das famílias Beijing e EAI são principalmente encontradas no Sudeste asiático, confirmando que cepas do complexo *M. tuberculosis* apresentam uma tendência a uma distribuição geográfica específica (SOLA e cols., 2001). Encontramos bem poucos isolados da família EAI (4 isolados do Rio de Janeiro e 3 isolados do Ceará) – de todo o material analisado pelo método spoligotyping e, nenhum isolado de Beijing foi encontrado.

Observamos nas amostras analisadas do HUCFF-UFRJ – Rio de Janeiro, que pacientes de ambos os sexos tiveram tanto infecção por apenas uma família quanto por várias famílias de spoligotyping. Na literatura Warren, R M e colaboradores (2003) descreveram que 57% dos pacientes que eram infectados pela cepa Beijing tinham múltiplas infecções de MTB, ou seja, embora pertencesse à mesma família eram de tipos diferentes. Em nosso estudo assim como Warren e colaboradores, os casos de múltiplas infecções por MTB não puderam ser relacionados com a positividade do teste HIV (Vírus da imunodeficiência humana), pois não tínhamos informação sobre a realização e/ou resultado do teste. No entanto, acreditamos que estes casos de múltiplas infecções podem ocorrer devido à alta prevalência de TB na região, que propiciaria a infecção e re-infecção por diferentes cepas de *M tuberculosis*. Além disto, fatores associados à imunidade do paciente, como, desnutrição, diabetes mellitus, presença de infecção pelo HIV entre outros, poderiam favorecer estas múltiplas infecções. No entanto, em nosso estudo tais fatores não puderam ser avaliados.

Dos 448 isolados pacientes do sexo masculino do estudo, 259 tiveram infecção por apenas uma cepa de *M tuberculosis*, 67 pacientes tiveram múltiplas infecções, com diferentes cepas de *M tuberculosis*, o que sugere que estes pacientes possam ter sido re-infectados durante o curso da evolução da TB. Quatro pacientes poderiam ser alocados no grupo de única infecção se considerássemos apenas a família identificada pelo spoligotyping. No entanto, ao analisarmos diferentes isolados destes pacientes observamos que os mesmos variavam os tipos dentro destas famílias de spoligotyping: LAM9 (tipos 42 e 1706), LAM2 (tipos 17 e 179), T1 (tipos 1475, 1166 e 393) e H1 (tipos 47 e 1230). Esses casos nos fazem questionar se essas cepas estão em expansão? Mudando dentro do paciente ou eles também foram re-infectados no ambiente? O meio L-J piruvato teria favorecido o crescimento de

outras colônias de MTB, não visualizadas em meio L-J glicerol? Estamos tentados a acreditar que sim, mas experimentos futuros deverão ser feitos para verificarmos essa hipótese, tais como, velocidade e temperatura de crescimento e, característica das culturas.

Dos 253 isolados provenientes de pacientes do sexo feminino, 163 tiveram infecção por apenas uma cepa de MTB, 22 tiveram múltiplas infecções, com diferentes cepas de MTB, de forma semelhante ao ocorrido com os isolados dos homens, o que nos faz acreditar que estas pacientes também possam ter sido re-infectadas durante o curso da evolução da TB.

No presente estudo observamos que os homens são mais expostos a várias infecções do que as mulheres, provavelmente correspondendo a maior prevalência da doença no sexo masculino (SILVEIRA e cols. 2007; LOPES e cols. 2007). Submetemos isolados de 36 pacientes ao método do MIRU após termos observado múltiplas infecções utilizando o método spoligotyping (LAM, H e T), mas as múltiplas infecções só foram confirmadas em isolados de 22 pacientes. Uma das hipóteses para os resultados divergentes entre os métodos do estudo são os diferentes alvos genéticos, pois, o spoligotyping é baseado na região de repetição direta (DR), presente apenas em bactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*; podendo detectar a presença ou ausência de espaçadores de sequência conhecida. Já o MIRU é baseado em várias sequências repetitivas em série, espalhadas pelo genoma do MTB. Provavelmente estamos visualizando momento de diferenciação da bactéria e re-infecções em áreas endêmicas, onde o paciente estaria constantemente exposto a novas / outras cepas de MTB. Os significados clínicos/epidemiológico destas infecções múltiplas não foram analisados, pois não dispúnhamos de informações suficientes.

A cepa LAM é a mais prevalente no Rio de Janeiro, aparentemente devido a estarem mais bem adaptável as nossas condições climáticas e ambientais do que as demais cepas virulentas descritas na literatura, tais como, a cepa Beijing, não encontrada em nosso estudo, porém descrita em várias regiões do mundo. A família LAM também foi a mais encontrada nos isolados recebidos do estado de Ceará. A presença marcante destas famílias (LAM, T e H) em nosso estudo é mais uma prova de adaptação ao nosso ambiente com grande capacidade de infectar e causar doença, ou seja, capacidade de sobreviver e, conseqüentemente, ser transmitida para um segundo hospedeiro.

Confirmando os achados dos métodos iniciais do estudo, gene *pncA* e gene *gyrB* - MTUB, nenhum perfil referente ao *M bovis*, *M africanum* ou *M microti* foram encontrados com o método do spoligotyping, onde todos os perfis foram referentes ao *M. tuberculosis*.

Métodos moleculares de identificação de resistência têm sido utilizados em vários países para identificar resistência no gene do MTB, tais como, “kits” capazes de detectar mutações que causam resistência a rifampicina (INNO-Lipa Rif TB, Innogenetics N.VG., ent, Bélgica) e SSCP. O seqüenciamento de DNA também tem sido utilizado com sucesso na identificação molecular de espécies, na identificação de marcadores moleculares, como o SNPs (DE BEENHOUWER e cols., 1995; TELENTI e cols., 1993). Os métodos moleculares de detecção de resistência representam um avanço no combate à tuberculose resistente, auxiliando seu diagnóstico mais rapidamente e, conseqüentemente, facilitando a mudança para o tratamento mais adequado e assim interrompendo a sua cadeia de transmissão.

Estávamos analisando o gene *rpoB* em biópsias de pacientes com hanseníase (Parte 2) e como ainda não havíamos identificado nenhuma cepa mutante, precisávamos demonstrar/verificar a capacidade do método em identificar cepas resistentes a rifampicina, começamos então a amplificar e seqüenciar o gene *rpoB* de isolados de MTB previamente identificados como resistentes pelo método das proporções, onde geralmente surge modificações no genoma conferindo resistência ao antibiótico de grande importância na PQT da TB e da hanseníase, verificamos mutações nos códons: 522, 523, 531 e 564 (Tabela 15). Com exceção da mutação no códon 564, todas as demais mutações encontradas aqui já foram descritas em trabalhos anteriores (SENNA e cols., 2006; MOKROUSOV e cols., 2004; DE OLIVEIRA e cols., 2003).

Muitos estudos demonstram que a resistência a rifampicina tem se mostrado associada com redução do “fitness” em muitas espécies de bactérias, mas a mutação que envolve Ser531Leu tem sido verificada em isolados de diferentes áreas geográficas, e tem uma alta frequência (86 - 100% de todas as resistências a rifampicina). Billington e colaboradores verificaram que é relativamente baixo o custo do “fitness” quando a mutação é Ser531Leu, quando a mutação Ser531Trp confere alto custo no “fitness” da micobactéria (BILLINGTON e cols., 1999).

Nossos achados corroboram os dados demonstrados por Billington e colaboradores (1999), pois embora tenhamos analisado um número pequeno de isolados, a mutação prevalente foi Ser531Leu encontrada em aproximadamente 60,6% dos isolados. Em nosso

estudo as famílias mais frequentes foram: LAM, Haarlem e T, o que nos faz acreditar que a resistência a drogas e a virulência provavelmente favoreceram o estabelecimento dessas famílias nas Américas (WILBUR & BUIKSTRA, 2006; DALLA COSTA e cols. 2009). Os resultados aqui encontrados foram comparados com o encontrado no método das proporções, após a finalização das identificações e verificamos que em um grupo de isolados não foram encontradas mutações pelo método de PCR e seqüenciamento. Observamos que 40% das amostras submetidas ao seqüenciamento do gene *rpoB* não demonstraram resistência a rifampicina. No entanto, 23% das amostras não amplificaram e serão re-testadas, pois esse é resultado de um PCR seguido de seqüenciamento, sem repetição do método.

Em relação ao *M. tuberculosis*, a resistência as diferentes drogas utilizadas no tratamento da tuberculose, pode não estar relacionada somente ao acúmulo de determinadas mutações em um pequeno número de genes. Mas outros mecanismos, tais como, a permeabilidade da membrana e a ação de mecanismos de transporte ativo que impedem o acesso das drogas ao alvo intracelular podem estar favorecendo resistência em cepas que não conseguimos detectar através da ferramenta de biologia molecular utilizada no estudo. No futuro pretendemos re-analisar essas amostras utilizando o sistema do rifoligotyping, sistema baseado em PCR e hibridação (SILVA e cols., 2001; NIKAIDO e cols. 1998). As divergências entre as duas metodologias, ou seja, método das proporções versus seqüenciamento prova mais uma vez, que precisamos de mais de uma metodologia para se definir um diagnóstico de resistência e, que embora específicos o PCR e seqüenciamento, não detectam pequenas populações mutantes ao contrário do método das proporções que nos permite visualizar o isolamento de apenas uma só colônia.

Campos dos Goytacazes por tratar-se de um município com estrutura sócio-econômica e geográfica que comporta tanto características urbanas quanto rurais e, apresentar indicadores econômicos e de pobreza da população similares aos das demais regiões do Brasil, nos pareceu ser a região do estado do Rio de Janeiro com maior probabilidade de identificação de casos de tuberculose humana causada pelo *M. bovis*. Nesta série de casos, vale ressaltar, a extração e análises genotípicas foram realizadas diretamente a partir de lamina BAAR positivas, mas, verificamos que não se tratavam de *M. bovis*. E embora não fosse um dos objetivos do presente a análise da associação dos fatores de risco aos casos clínicos de tuberculose, dispúnhamos de informação sobre co-morbidade nos pacientes do município de Campos de Goytacazes. Onde observamos, 9/140 (6,4%) pacientes com diabetes

e 6/140 (7,6%) pacientes com HIV positivos em um total de 79 pacientes testados para o HIV (Classen, C N e cols. 2007; Nava-Aguilera E. e cols.2009). Também apontamos como fatores de risco, alcoolismo, tabagismo e ser do sexo masculino e, não foi relacionado à infecção por *M. tuberculosis* com a atividade profissão e/ou escolaridade, mas sim a taxa de alta por cura (57 pacientes), onde apenas 5 pacientes (8,77%) eram analfabetos. O que demonstra que quanto maior o grau de conhecimento e escolaridade menor as taxas de abandono.

7.2 Discussão parte 2.

A hanseníase é uma doença de longo período de incubação e evolução clínica insidiosa. O *Mycobacterium leprae* não leva seu hospedeiro a morte e parece ser uma bactéria atenuada, por exibir perda de sua carga genética, menor que a do *M. tuberculosis*. Entretanto, preserva sua virulência ao penetrar a célula nervosa e tem alto potencial incapacitante, que são responsáveis pelo medo, pelo preconceito e pelos tabus que envolvem a doença (COLE, 2001; DE OLIVEIRA, 2008; BRITO, 2003).

Os critérios para o diagnóstico de recidiva em hanseníase ainda não estão bem definidos, variando de acordo com o lugar ou autor. Operacionalmente, a Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária (CNDS/MS) considera a definição de recidiva em hanseníase, baseada na Organização Mundial de Saúde (OMS) e em sua conceituação, a ocorrência de sinais de atividade clínica da doença, após alta por cura (GALLO & OLIVEIRA, 1997).

Como em outras doenças infecciosas, casos de recidivas é um crucial parâmetro para verificar-se a eficácia do quimioterápico, sendo assim também em *Mycobacterium leprae*. Existem limitadas informações a respeito de risco para recidiva após o tratamento, poucos trabalhos têm retratado sobre esse ponto.

A OMS refere que 50% das recidivas aparecem dentro dos primeiros três anos e 75% dentro dos primeiros seis anos após o tratamento.

Aparecimento de novas lesões na pele e/ou lesões de nervos durante ou após o tratamento quimioterápico (MDT), em pacientes multibacilares e paucibacilares, podem ser reação, recidiva ou multiplicação de bacilos persistentes ou resistentes a drogas ou re-infecção – geralmente em pacientes LL suscetíveis ao desenvolvimento de nova infecção. A diferenciação pode ser difícil em algumas situações, especialmente quando o caso de recidiva vem acompanhado de reação tipo 1 – reação reversa ou reação tipo 2 – ENL (KAR & SHARMA, 2008)

Alguns trabalhos já foram publicados em torno da resistência medicamentosa em hanseníase, os pioneiros utilizando a técnica de Shepard (JI, 1987). Em 1988 Jin e Gross

publicaram um dos primeiros trabalhos demonstrando a possibilidade da investigação de resistência por meios moleculares investigando resistência em *E. coli*. Com o avanço de metodologias moleculares os primeiros trabalhos com investigação de resistência em micobactérias foram realizados em *M. tuberculosis* (TELENTI e cols., 1993) e utilizando os alvos usados em outros trabalhos como modelos experimentais, tornando possível a realização com o *M. leprae* (MUSSEY, 1995)

Com a inexistência de um método padrão-ouro para a confirmação de re-infecção e resistência, sendo estes baseados geralmente em sinais e sintomas clínicos, sendo utilizado ainda hoje apenas o teste padrão para confirmação do agente que é a baciloscopia. O critério baseado nos achados bacteriológicos foi abandonado em muitos locais porque a manutenção e a confiabilidade dos serviços de baciloscopia são difíceis, o teste de sensibilidade baseado na técnica de Shepard é demorado e sem garantia de sucesso. Os métodos moleculares vêm sendo implantados, sendo a técnica de PCR, o método complementar mais utilizado tanto no diagnóstico da hanseníase quanto na verificação de resistência (JI & PERANI, 1996; CAMBAU & PERANI, 1997).

Ensaios moleculares são potencialmente mais rápidos e sensíveis para a detecção de resistência a drogas e são teoricamente capazes de darem diagnóstico de uma amostra clínica em alguns dias. Produtos de PCR e seqüenciamento direto, análise SSCP, PCR-heteroduplex, ensaios baseados em hibridização reversa entre outras estratégias têm sido utilizadas (WILLIAMS & GILLIS, 2004).

Embora métodos moleculares tenham vantagem e desvantagens, técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para serem capazes de detectarem rapidamente uma resistência a drogas (SAPKOTA e cols. 2006). A rápida detecção de resistência em *M. leprae* é importante para a prevenção de ocorrência e transmissão de cepas MDR.

A confirmação etiológica depende principalmente do exame baciloscópico, que auxilia no diagnóstico de casos difíceis e de recidivas, no diagnóstico das formas bacilíferas e na classificação da doença. Algumas formas clínicas de hanseníase exibem baciloscopia negativa, mas um resultado negativo não exclui a doença (MARTINS e cols., 1991; WATERS e cols., 2002; BRASIL, 2001), como podemos observar em nosso estudo, onde muitos casos negativos foram positivos nos sistemas de PCR utilizados no estudo.

O Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de Controle de Hanseníase passou a orientar a utilização de dois indicadores principais para monitorar a magnitude da endemia: Coeficiente de Detecção dos Casos Novos e Coeficiente de Detecção dos Casos.

Os indicadores de coeficiente de prevalência e coeficiente de detecção de casos novos são construídos em sua grande maioria a partir do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN). O Programa Nacional de Controle da Hanseníase (PNCH) tem focado na detecção precoce da doença contribui para a melhora dos indicadores. Devido à doença ter um longo período de incubação, a ocorrência de casos em crianças e adolescentes está relacionada à transmissão recente. Isso significa que esses jovens estão vivendo em focos ainda ativos, com adultos infectados, e com circulação do bacilo causador da doença. É fundamental identificar não apenas os doentes, mas também as pessoas que convivem com eles. A taxa de detecção de casos no Brasil permanece igual ao longo dos anos, em torno de 40 a 45 mil novos casos em média. Entretanto, aproximadamente 51% dos casos acontecem em 1024 municípios brasileiros, localizados em dez diferentes regiões geográficas, segundo dados do PNCH de 2003 a 2005; desse total, mais de 60% dos casos são detectados em menores de 15 anos. No Rio de Janeiro os maiores focos estão concentrados em Campo Grande, Bangu e Santa Cruz. Já em todo o estado do Rio, a Baixada Fluminense (Nova Iguaçu, São João de Meriti e Belford Roxo) é a região mais problemática (www.cebes.gov.br).

A vigilância epidemiológica dos casos de recidiva é o principal meio de avaliação da eficácia do esquema terapêutico da hanseníase. Entretanto, os estudos de recidiva na literatura utilizam, muitas vezes, diferentes indicadores epidemiológicos, o que dificulta uma comparação dos resultados. Maroja e cols. (2001) encontraram uma taxa bruta de 0,95% em dados secundários de 29.000 casos com alta entre 1982-2001, submetidos aos recentes esquemas terapêuticos, em Manaus. Nery e cols. (2003) encontraram taxa bruta de 0,18% em coortes de 1584 pacientes, curados entre 1986 – 2000 (RJ). Oliveira (1996) encontrou percentual de 0,33/pac/ano de observação avaliando coortes de 155 pacientes com média de 50 meses pós-alta de PQT fixa em 1995 (AM e RJ).

Apesar dos estudos acima não terem demonstrado taxas acima de 1% é importante o diagnóstico de situação em estudos de coortes, critérios diagnósticos e análise estatística homogêneos; de forma a que se tenha uma informação mais precisa referente aos esquemas de PQT vigentes, possibilitando a sistematização de critérios diagnósticos do evento entre

importantes unidades de referência do país. Da mesma forma, inclui a padronização de técnicas de biologia molecular para a análise da resistência medicamentosa, permitindo avaliar a existência de cepas resistentes aos quimioterápicos em uso no país (TRIULLER, 2001).

Antes de começarmos o nosso projeto de investigação de resistência as drogas utilizadas no tratamento de pacientes com de hanseníase, verificamos e testamos diferentes amostras para a amplificação dos genes de interesse e que fosse de fácil armazenamento e transporte, testamos desde biopsias parafinadas a lâminas de baciloscopia, o material que se mostrou em melhor condição para o trabalho foi biopsia (congelada ou em álcool 70%), mas não podemos descartar a biopsia parafinada, que também amplificou os genes de interesse – em teste no laboratório, criando possibilidade de estudos retrospectivos, não apenas em hanseníase como também em outras doenças infecto-contagiosas.

Estudos relatam que as SNPs são utilizadas pelas bactérias e micobactérias para aumentar o “fitness” e virulência e, pode ser uma possível ferramenta de apoio epidemiológico no estudo da TB e da hanseníase, bem como, transmissão, recidiva, re-infecção, adoecimento recente e reservatórios: ambientais ou animais (HAZBÓN, 2008). As SNPs são mudanças de apenas um nucleotídeo que ocorrem durante a replicação do DNA e são usadas como marcadores de evolução da bactéria (MONOT e cols., 2008; COLE e cols., 2001).

É importante considerar a correlação do exame baciloscópico, se é negativo ou positivo (1 a 6+) com o resultado da amplificação, mas obtivemos resultados positivos em algumas biopsias que tiveram com resultado negativo para BAAR (tabela 26). Observamos, como esperado, as amostras paucibacilares amplificaram bem menos em comparação com as amostras multibacilares para os sistemas utilizados no estudo. Os dados encontrados demonstram modificação genética que indica a presença de resistência a dapsona e a rifampicina em apenas quatro pacientes e, não encontramos mutação que confira resistência ao ofloxacina; trabalhos descritos na literatura apontam para uma resistência de até 50 % para dapsona em regiões onde a droga foi administrada na década de 1980 (OPROMOLLA, 1991). Hoje os casos encontrados são em sua maioria de pacientes de leprosários ou foram tratados e interromperam o mesmo antes do tempo pré – determinado. Assim como para rifampicina e dapsona, resistência ao ofloxacina também tem sido descrita, embora seja mais rara, devido a ser uma droga de segunda linha no tratamento da hanseníase.

Ao analisarmos 61 biopsias de pacientes com baciloscopia negativa confirmada e submetidas ao sistema de PCR e seqüenciamento para o gene *folP1* e do gene *rpoB*, apenas conseguimos resultado de 4 (6,6%) biopsias; quando analisadas pelo sistema para o gene *rpoB* conseguimos resultado em biopsias de quatro pacientes, onde dois destes também apresentaram mutações no gene *folP1* sendo portanto pacientes MDR. Se o critério de diagnóstico se baseasse somente na baciloscopia acima de 3+ deixaríamos de realizar a investigação nesses pacientes.

E, existem relatos de portadores sadios da hanseníase, detectados através da técnica de PCR que podem ser fontes disseminadoras da doença (Lockwood e cols., 2004), quem sabe até os próximos a ficarem doentes, uma vez, que estão sendo expostos ao *M. leprae*.

Dos pacientes analisados aqui, o sexo masculino representou a maioria, onde podemos verificar 61,9% no Rio de Janeiro; 87,5 % no Pará; 65,8% no Espírito Santo; 38,8% no Ceará e, 90,9% no Amazonas.

Devido ao *M leprae* ainda não ser cultivável, a aplicação da metodologia da PCR é importante na amplificação seletiva de uma determinada região no gene escolhido para investigação.

Dapsona é uma das drogas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde para o regime de multidrogas, e é utilizada no tratamento da hanseníase desde 1940. Em meados de 1970, casos de resistência a sulfona e em 1978 o Ministério da Saúde adota o esquema: Rifampicina (600 mg/dia) 90 dias e Dapsona (100mg/dia) 5 anos. Os relatos de resistência a dapsona no Brasil foram mais freqüentes durante o período da monoterápia, nas décadas de 60-80.

Os primeiros casos de dapsona resistência foram detectados em 1964 e envolve duas mutações no gene *folP1* (KAI e cols. 1999; WILLIAMS e cols. 2000). E se registraram 80% das pessoas com recidiva (resistência secundária) e 40 % em novos casos - resistência primária (JI, 1985; PERSON & REES, 1976; VINNICOMBE & DERRICK, 1999). O teste in vivo é realizado no camundongo em um período de 6 meses a 1 ano e a resistência é caracterizada da seguinte maneira: baixa, intermediária ou alta; o que respectivamente significa que o bacilo foi capaz de multiplicar-se em coxim plantar do camundongo com a dieta contendo: 0,0001% , 0,001% e 0,01% de dapsona.

A mutação no códon 55, já descrita anteriormente mudando de uma PROLINA (CCC) para uma ARGENINA (CGC) mutação codificando resistência a dapsona, encontramos essa substituição em resultado de seqüenciamento de dois pacientes da região norte do país, um que reside na cidade de Igarapé-Açu pertencente ao município escolhido em 1921 para ser a primeira colônia agrícola de pacientes com hanseníase no Brasil, sendo a mesma inaugurada em 1924 e mantendo-se até 1976; e o outro paciente do estado do Amazonas.

Adicionalmente (além de SNP no códon 55), verificamos uma aparente mistura de sensível e mutante em outras regiões do fragmento da seqüência do gene *folP1* analisado. A presença de picos duplos na seqüência de cinco pacientes, resultado obtido várias vezes (seqüenciamento), que nos leva a acreditar em infecção mista. Segundo comunicação pessoal da Dra Maria Leide W. de Oliveira, na região norte foi utilizado durante um tempo o DADS, que era a sulfona injetável, que não apresentava bons níveis séricos. A maioria fez monoterapia e a rifampicina demorou a chegar. Os pacientes de colônia não faziam a medicação corretamente.

A presença de picos duplos nós faz pensar ser a re-infecção por *M leprae* é responsável por re-adoecimento de pacientes considerados curados após tratamento, uma vez, que pacientes com hanseníase têm deficiência na resposta específica contra o *M leprae*, além de bacilos latentes ou bacilos em lugares de difícil acesso para as drogas, tais como, bacilos em células de Schwann, (KUMAR, 2008; BAKER, 2006).

A rifampicina age como agente antimicrobiano em diferentes bactérias, por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, que uma vez resistentes usam de mesma estratégia: mutação em região definida do gene *rpoB*. E as micobactérias não são diferentes e mais que 97% das resistências a rifampicina em isolados clínicos tanto de *M. leprae* como de *M. tuberculosis* são encontradas no gene *rpoB* nos códons 526, 531 e 533. Mas em micobactérias de crescimento rápido e o *M. avium*, resistência natural para rifampicina já foi identificada como resultado de uma eficiente permeabilidade de membrana e mecanismo de degradação de rifampicina (TELENTI, 1993; TELENTI, 1998; GUERRERO, e cols. 1994).

A rápida detecção de resistência a drogas em *M leprae* tem como objetivo prevenir a ocorrência de transmissão de cepas multi drogas resistente (MDR). Alguns estudos demonstram várias mutações no gene *rpoB* no códon 531: Ser531Leu, Ser531Phe e

Ser531Met (WILLIAMS e cols., 1990; WILLIAMS e cols., 1994; ROCHE e cols., 2000). Em nosso estudo encontramos mutação nessa mesma região 531, de (serina) TCG para ATG (metionina), de (serina) TCG para TTG (leucina) e de TCG para TTC (fenilalanina).

Durante o estudo encontramos quatro pacientes contendo mutação no códon 531 do gene *rpoB*, conferindo resistência a rifampicina e dois desses também com resistência no gene *folP1* localizada no códon 55. Um paciente residindo próximo a antiga colônia (leprosário) de Belém, um provável ex-interno ou contato. Os pacientes de colônia são pacientes que foram isolados, separados da sociedade, casos antigos, de uma época em que não existia nem dapsona. E os nossos resultados demonstram que esses pacientes de ex – colônias necessitam de uma vigilância.

A rápida informação sobre a susceptibilidade a droga tem sido buscada utilizando-se várias metodologias que sejam capazes de substituírem tanto o teste de sensibilidade 2 a 4 meses – em *M. tuberculosis* é utilizado o método das proporções, quanto a inoculação no coxim plantar de camundongos que leva de 6 meses a 1 ano no caso do *M. leprae* (WILLIAMS e cols., 1994).

Como já visto em *M. tuberculosis*, o gene *gyrA* se mostrou como um marcador genético molecular de populações de *Mycobacterium leprae*, caracterizando duas populações circulantes no Brasil.

Embora tenhamos encontrado uma porcentagem maior no tipo *gyrA***C** o nosso N amostral das demais regiões do Brasil ainda é pequeno. A diferença encontrada foi significativa entre as duas famílias, em um total de 124 amostras analisadas pelo sequenciamento do gene *gyrA*, 84 (67,7%) ficaram alocadas na família *gyrA***C** e 40 (32,3%) na população *gyrA***T** com um pvalor < 0,001.

Como já se sabe existem segundo o VNTR quatro populações de *M. leprae* circulando pelos continentes, os SNPs tipos: 1, 2, 3 e 4 (MONOT e cols. 2005); sendo que quando analisamos amostras previamente identificadas segundo os SNPs 1, 3 e 4 no sistema de PCR do gene *gyrA*, as mesmas foram agrupadas em nucleotídeo **C** e SNPs **T**, onde o SNP **T** agrupou somente o SNP tipo 3 e o nucleotídeo **C** agrupou os demais tipos.

Os dados encontrados não demonstram modificações genéticas que indique a presença de resistência ao ofloxacina; hoje os casos encontrados são em sua maioria de pacientes de

leprosários ou que foram tratados e interromperam o mesmo antes do tempo pré – determinado. Assim como para rifampicina, resistência ao ofloxacina também tem sido descrita, embora seja mais rara, devido a ser uma droga de segunda linha no tratamento da hanseníase, mas que tem tido sua importância aumentada como quimioterápico.

Os dados encontrados nesse estudo apontam para a continuação da investigação de resistência a drogas na região norte do país, onde encontramos três dos quatro casos de resistência medicamentosa e desses, dois são MDR.

8. Conclusão.

8.1 Conclusões Parte 1.

Apesar de não termos isolado/observado o *Mycobacterium bovis* nas amostras investigadas, não podemos descartar a hipótese de existência desta infecção já que, na prática clínica, não se é utilizado meio preferencial para o crescimento do *M. Bovis*.

As infecções por diferentes cepas de *M tuberculosis* em um mesmo paciente é mais freqüente do que se imaginava. A família LAM9 é a família mais bem estabelecida e adaptada ao nosso ambiente, bem como, as famílias H e T.

O sexo masculino foi o mais suscetível a infecção pelo *M. tuberculosis*, provavelmente devido a sua maior exposição no ambiente.

A resistência a rifampicina do *M. tuberculosis* descrita pelo método das proporções associou-se as mutações no códon 531.

8.2 Conclusões parte 2.

Resistência é um fenômeno aparentemente raro na maioria dos estados estudados, uma vez, que encontramos resistência em apenas quatro pacientes do estudo para os genes ligados a resistência (*folP* e *rpoB*) provenientes dos estados: Espírito Santo, Pará e Amazônia.

É importante investigarmos a resistência medicamentosa em pacientes de regiões próximas a antigos leprosários – devido a um dos casos de resistência medicamentosa as drogas de primeira linha (rifampicina e dapsona) nós chama a atenção - residi em uma região de antigo leprosário.

O gene *gyrA* se apresenta como um candidato a marcador epidemiológico de infecção e provável re-infecção pelo *M. leprae*.

Os resultados encontrados durante o estudo sugerem que recidiva possa estar associada à re-infecção.

9. Limitações.

9.1 Limitações parte 1

Demora no recebimento dos isolados em meio L-J piruvato;

Ter recebido apenas os isolados que cresceram em L-J piruvato e não ter recebido os mesmos isolados em meio L-J glicérol.

9.2 Limitações parte 2

Não ter conhecimento dos índices de baciloscopia no momento do recebimento das biópsias, o que nos fez repetir varias vezes os experimentos com resultado negativo e, muitas dessas amostras eram baciloscopia igual ou menor que 1+.

Em alguns momentos a plataforma de seqüenciamento ter ficado parada e em consequência, o estudo.

10 Perspectivas

10.1 Perspectiva Parte 1

Existe a necessidade de se implantar métodos moleculares simples e rápidos para a detecção de *M. bovis* em materiais tanto provenientes de animais quanto de seres humanos. Para isto, torna-se necessário a criação de um grupo multicêntrico de pesquisa da infecção causada pelo *M. bovis* no Brasil, buscando responder a questões como transmissão:

M. bovis → Homem ← *M. tuberculosis*

M. bovis → Animal ← *M. tuberculosis*

M. bovis → Animal → Homem ← *M. tuberculosis*
←

10.2 Perspectiva Parte 2

Aumentar o número de pacientes para a investigação de resistência medicamentosa e investigar pacientes que residiram ou viveram próximos a leprosários, para os genes de interesse na detecção de resistência.

Traçar o perfil epidemiológico das cepas de *M. leprae* na população brasileira baseando-se no gene *gyrA*.

Caracterizar as mutações encontradas em associação com carga bacilar e tentar fazer uma correlação com capacidade de infectar e causar doença – contatos doentes.

Investir na criação de um kit de detecção de resistência semelhante ao rifoligotyping para a detecção de *M. leprae* resistente, buscando detectar a população resistente que por ventura esteja misturada com a população sensível – visando sua implantação na área da Saúde.

Referências

11. Referências.

- ARANAZ, A. e cols. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** 34: 2734 – 2740, 1996.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 36(3): 373-382, 2003.
- ARBISER, J. L. & MOSCHELLA, S.L. Clofazimine: A review of its medical use and mechanisms of action. **J Am Acad Dermatol.** 32 (2): 241-247, 1995.
- BAROUNI A. S. e cols. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular and Cellular Probes.** 18: 167 – 170, 2004.
- BHATIA, A. S. e cols. Clinical and histopatological correlation in the classification of leprosy. **International Journal of Leprosy.** 3 (16): 433-438, 1993.
- BEHR, M. A. e cols. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genoma DNA microarray. **Science.** 284: 1520 – 1523, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias– 1º. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

BRISCOE, C. E. "Fate of tubercle bacilli outside the animal body." Rep. N° 161. Illinois Agricultural Experimental Station Bulletin. 1912.

BRITO, M. F. M. O retratamento em hanseníase: identificação de fatores de risco – um estudo caso controle. Recife, 2003. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco.

BROSCH, R., PYM A. S., GORDON S. V. AND COLE S. T. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol* 9: 452-458, 2001.

CAMICHAEL, R. Essay on the nature of scrofula with evidence of its origin from disorders of the digestive organs. London: Callow, 1810.

CHAUSSE, P. Des methods a employer pour realiser la tuberculose experimentale par inhalation. **Bull. Soc. Med. Vet.** 31: 267-274, 1913.

CHOPRA, I & BRENNAN, P. Molecular action of antimycobacterial agents. **Tuberc. Lung Dis.** 78:89-98, 1998.

CLASSEN, C. N. e cols. Impact f social interactions in the community on the transmission of tuberculosis in high incidence area. **Thorax.** 54: 136-140, 1999.

COBO J, e cols. Risk factors for nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. **Int J Tuberc Lung Dis.** 5: 413-8, 2001.

COLE, S. T. e cols. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature.** 393: 537–544, 1998.

COLE, S. T., e cols. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature.** 409: 1007 – 1011, 2001.

COUSINS, D. V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. **Rev Sci Tech.** Apr;20(1):71-85, 2001.

COUTINHO, E. S. F., HUF G. E BLOCH K. V. Ensaios clínicos pragmáticos: uma opção na construção de evidência em saúde. **Cad. Saúde Pública**. 19(4): 1189 – 1193, 2003.

DA SILVA ROCHA, A e cols. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. **J. of Microbiological Methods**. 37: 223 – 229, 1999.

DA SILVA ROCHA, A e cols. Novel allelic variants of mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of hsp65. **J. Clin. Microbiol.** 40: 4191 – 4196, 2002.

DAILLOUX, M e cols. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiological study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. **Medicine**; 72: 11-37, 1993.

DANKNER, W. M. E cols. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiological study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. **Medicine**; 72: 11-37, 1993.

DAILLOUX, M. e cols. Water and nontuberculous mycobacteria. **Water Research** 33: 2219-2228, 1999.

DALLA COSTA, E. R. e cols. 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 Microbiology**. 9: 39-49, 2009.

DALLAS, W. A. e cols. The dihydropteroate synthase gene, folP, is near the leucine tRNA gene, LeuU, on Escherichia coli chromosome. **J. Bacteriology**. 175: 7743-7745, 1993.

DALLAS, W. A. e cols. Cloning, sequencing and enhanced expression of the dihydropteroate synthase gene of *Escherichia coli* MC4100. **J. Bacteriology**. 174: 5961-5970, 1992.

DAVID, H. LÉVY-FREBAULT, V. E THOREL, M.-F. Méthodes de Laboratoire pour Mycobactériologie Clinique. Unite de la Tuberculose et des Mycobacteries. Institut Pasteur, 1989.

DEL PORTILLO, P. e cols. Amplification of a species-specific DNA fragment *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. **J. Clin. Microbiol.** 29: 2163 – 2168, 1991.

DE LISLE, G. W., MACKINTOSH, C. G. E BENGIS, R. G. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. **Rev. Sci. Tech.** 20: 86-111, 2001.

DE OLIVEIRA M M, DA SILVA ROCHA A e cols. Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phase hybridization assay. **J. Microbiol. Methods**. 53(3): 335 – 45, 2003.

DUTHIE, M. S. e cols. Antigen-specific T-Cell responses of leprosy patients. **Clinical And Vaccine Immunology**. 15 (11): 1659-1665, 2008.

FELDMAN, W. H. Observations of the longevity of *Mycobacterium tuberculosis* of bovine origin. **J. of the American Veterinary Medical Association**. 81: 223-229, 1932.

FERNANDES, J. O. M. e cols. Prevalência da tuberculose bovina determinada através de exames realizados em carcaças de bovinos abatidos no município de ANDRADINA-SP. **Ciê. Agr. Saúde. FEA, Andradina**, 3, (.2): julh-dez, 07 – 12, 2003.

FERREIRA NETO, J. S. & BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Revista Higiene Alimentar**. 2005.

FILLIOL I. e cols. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. **J. Clin. Microbiol.** 41: 1963 – 1970, 2003.

FILLIOL, I. e cols. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. **Emerging Infectious Diseases.** 8: 1347 – 1349.

FRANCIS J. The work of the British Royal Commission on Tuberculosis 1901-1911. **Tubercle.** 40: 124-132, 1959.

FROTHINGHAM R. e cols. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Mycobacterium africanum* Isolates from West Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1921–1926, 1999.

GARNIER T e cols. The genoma sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 100: 7877 – 7882, 2003.

GARNIER, T. e cols . Genetic and management factors that influence the susceptibility of cattle to *Mycobacterium bovis* infection. **Anim Health Res Rev.** 3(1):3-13, 2002.

GLOYNE, S. R. A note on the viability of acid-fast bacilli. Ii. Tubercle. **American Review of Tuberculosis.** 4: 215-216, 1920.

GOH, K. S e cols. Rapid differentiation of "*Mycobacterium canettii*" from other *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms by PCR-restriction analysis of the hsp65 gene. **J. Clin. Microbiol.** 39: 3705 – 3708, 2001.

GOMES, H. M. Identificação Molecular de Cepas do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e Detecção de Resistência a Antibióticos. Rio de Janeiro, 2006. Doutorado, Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FOCRUZ – Rio de Janeiro.

GOODFELLOW, M. & MAGEE J. (1998) Taxonomy of Mycobacteria. In Mycobacteria. Basic Aspects. Jenkins, P. A. and Gangadharam, P. R. J. (eds). London: Chapman and Hall, pp. 1-71.

GOULART, I. M. B. e cols. Grau de incapacidade: indicador de prevalência oculta e qualidade do programa de controle da hanseníase em um Centro de Saúde Escola do Município de Uberlândia- MG. **Hansen Int** 27(1):5-13, 2002.

GRANGE J M & YATES M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Vet. Microbiol.** 40: 137-151, 1994.

GRANGE, J M. e cols. HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. **Eur Respir J.** 7: 1564-1566, 1994.

GRANGE JM. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**; 81: 71-7, 2001.

GRIFFITH, A. S. Bovine tuberculosis in man. **Tubercle.** 18: 528-543, 1937.

GUERRERO, A. e cols. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. **Lancet.** 350:1738-42, 1997

GRIFFIN, J. e cols. The role of farm management practices and environmental factors in chronic tuberculosis. **Irish Veterinary Journal.** 45: 120-122, 1992.

GRIFFIN, J. M. The role of bought-in cattle in herd breakdowns due to tuberculosis in part of County Cavan during 1989. **Irish Veterinary Journal.** 46 : 143-148, 1993.

GRONDIN, S. e cols. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*.

GRONDIN, S. e cols. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 100(13): 7877-82, 2003.

GUERRERO, A. e cols. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. **Lancet.** 350:1738-42, 1997.

GUERRERO, C. e cols. Evaluation of the *rpoB* in rifampicin-susceptible and resistant *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. **J. Antimicrobiol Chemother.** 33: 661-663, 1994.

GUILLIS, T. P. E WILLIAMS, D. L. Dapsone resistance does not appear to be associated with a mutation in the dihydropteroate synthase-2 gene of *Mycobacterium leprae*. **Indian J. lepr.** 71 (1): 1-18, 1999.

GUTIERREZ, C. M. e cols. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **Plos Pathogens.** 1: 55-61, 2005.

HADDAD N, MASSELOT M, DURAND B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. **Research in Veterinary Science.** 76: 1 – 18, 2004.

HAZBÓN, M. H. e cols. Convergent Evolutionary Analysis Identifies Significant Mutations in Drug Resistance Targets of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 52: 3369 – 3376, 2008.

HOPEWELL, P.C. & BLOOM, B.R. (2000) Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases. In Textbook of Respiratory Medicine. Murray, P.J. (ed). Philadelphia: Saunders, pp. 1043-1105.

<http://www.emmanuelfranca.com.br/imgatlas/hanseníase.html>

HUARD, C. R. e cols. Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Journal of Bacteriology.** 188: 4272 – 4287, 2006.

HUARD, C. R. e cols. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **J. Clin. Microbiol.** 41: 1637 – 1650, 2003.

JANIN, Y. L. Review. Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorganic & medicinal Chemistry*. 15: 2479-2513, 2007.

Jl, B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr. Other Mycobact Dis.** 55: S830-835, 1987.

Jl, B. Drug resistance in leprosy – a review. *Lepr. Rev.* 56(4): 265-278, 1985.

JENSEN K A. Bovine tuberculosis in man and cattle. In *Advances in the control of zoonoses*. WHO/FAO Seminar on Zoonoses, Vienna, November 1952. Geneva: World Health Organization. 1953: 11.

KABEYA H, OHASHI K, ONUMA M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. **J Vet Med Sci.** **2001** ;63(7):703-8.

KAMERBEEK e cols. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **J. Clin. Microbiol.** 35: 907 – 914, 1997.

KANTOR, I. N. e cols. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. **Tuberculosis.** 88 (4): 358-365, 2008.

KAR, H. K. & SHARMA, P. New lesions after MDT in PB and MB leprosy: A report of 28 cases. **Indian J. Lepr.** 80: 247-255, 2008.

KASAI H, EZAKI T & HARAYAMA S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing Mycobacteria by Their *gyrB* sequences. **J. Clin. Microbiol.** 38: 301 – 308, 2000.

KOCH R. Die Aetiologie der Tuberkulose. **Berliner Klinische Wochenschrift** 19: 221-230, 1882.

KREMER, K. e cols. PCR + Reverse line hybridization (PHL) to detection rifampin 1997

KUBIN, M. E cols. Two cases of probable man-to-man transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. **Z Erkrank Atmungsorg.** 163: 285-291, 1984.

LESSLIE I W. Tuberculosis in attested herds caused by the human type tubercle bacillus. **Vet Rec.** 72: 218-224, 1960.

LEHMANN, K. B. & NEUMANN, R. genus *Mycobacterium*. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bacteriologischen Diagnostik, 1st ed. J. F. Lehmann, München, 1896.

LEPPER, A. W. & PEARSON, C. W. The route of infection in tuberculosis in beef cattle. **Australian Vet. J.** 49: 266-267, 1973.

LEVIN M, NEWPORT M. Inherited predisposition to mycobacterial infection: historical considerations. **Microbes infect.** 2: 1549-52, 2000.

LIEBANA, E. e cols. Assessment of genetic markers for species differentiation with the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J. Clin. Microbiol.** 34: 933-938, 1996.

LILENBAUM, W. e cols. Tuberculose bovina: prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção na região dos lagos do Estado do Rio de Janeiro. [Bovine tuberculosis: prevalence and epidemiology on 13 farms in the lakes region of Rio de Janeiro State, Brazil.] *Revista Brasileira de Medicina Veterinária.* 20 (3): 120-123, 1998.

LILENBAUM W., PESSOLANI M. C., FONSECA L. S. The use of Ag85 complex as antigen in ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.** 48: 161-6, 2001.

LOUIS, P. RECHERCHES ANATOMICO-PATHOLOGIQUES SUR LA PHTHISIE.
PARIS, 1825.

MATSUDA MENDES, J. e cols. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in a slum area of Rio de Janeiro, Brazil. **J Bras Pneumol.** 34(12):1063-1068, 2008.

MEIRON, R. e cols. Humoral and cellular responses in calves experimentally infected with bovine leukemia virus (BLV). **Vet Immunol Immunopathol.** 1985 Jun; 9(2):105-14.

MFINANGA, S. G. e cols. The magnitude and factors associated with delays in management of smear positive tuberculosis in Dar es Salaam, Tanzania. **BMC Health Services Research.** 8: 158-165, 2008.

MONOT, M., HONORÉ, N., e cols. Are variably-number tandem repeats appropriate for genotyping *Mycobacterium leprae*? **J. Clin. Microbiol.** 46: 2291-2297, 2008.

MORCILO, N. e cols. A low cost, home-made, reverse-line blot hybridisation assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.** 6: 959-965, 2002.

MULLENAX, C. H., ALLISON, M. J. E SONGER, J. R. Transport of aerosolized microorganisms from the rumen to the respiratory system during eructation.. **Am. J. Vet. Res.** 25: 1583-1593, 1964.

MUSSER, J. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. **Clin. Microbiol. Rev.** 8: 496-514, 1995.

NASCIMENTO FIGUEIREDO, Telma. Avaliação de marcadores genéticos para tipagem de *Mycobacterium bovis*. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação de Mestrado. Microbiologia Veterinária da Universidade Rural do Estado do Rio de Janeiro.

NASSAR, A F C e cols. Isolation and identification of bovine tuberculosis in a Brazilian herd (São Paulo). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 102(5): 639-642, 2007.

NAVA-AGUILERA E. e colaboradores. Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis. **Int. J. Tuberc. Lung Dis**. 13(1): 17-26, 2009.

NERY, J. A. C. Reação na Hanseníase: Uma descrição epidemiológica. Niterói – Rio de Janeiro, 1995. Dissertação de Mestrado. Dermatologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

NETO, J. S. F. & Bernardi, F. O controle da tuberculose bovina. **Revista Higiene Alimentar**. 2005.

NJANPOP-LAFOURCADE B. M. e cols. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. **J. Clin. Microbiol**. 39: 222 – 227, 2001.

NIEMANN, S. e cols. Differentiation of clinical *Mycobacterial tuberculosis* complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis. **J. Clin. Microbiol**. 38: 3231 – 3234, 2000.

NIEMANN S, RICHTER, E AND RÜSCH-GERDES S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. **J. Clin. Microbiol**. 38: 151 – 157, 2000.

O'DONAHUE, W. J. E cols. Short-course chemotherapy for pulmonary infection due to *Mycobacterium bovis*. **Arch Intern Med**. 145: 703-705, 1985.

OLIVEIRA, M. L. W. e cols. Relapse of lepromatous leprosy after WHO/MDT with rapid bacterial growth. **Lepr. Rev**. 73: 386-388, 2002.

ORSINE, M. e cols. Estudos clínicos, imunopatológicos e eletrofisiológicos dos nervos periféricos na hanseníase. **Rev. Neurocienc.** 16 (3): 220-230, 2008.

OPROMOLLA, D. V. A. Terapêutica multidroga. **An. Bras Dermatol**, 65(1): 37-40, 1991.

OPROMOLLA, P. A. & Martelli, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **An. Brasileiro de Dermatologia**, 2005.

PARRA, C. A. e cols. Isolation, characterisation, and molecular cloning of a specific mycobacterium tuberculosis antigen gene: identification of species-specific sequence. **Infect. Immun.** 59: 3411 – 3417, 1991.

PARREIRAS, P M e cols. Genotyping of Brazilian strains of *Mycobacterium bovis* using spoligotyping and MIRU-VNTR. **Submetido a JCM**, 2004.

PARREIRAS, P M e cols. Drug Susceptibility of Brazilian Strains of *Mycobacterium bovis* Using Traditional and Molecular Techniques. Submetido a **Mem IOC**, 2004.

PARREIRAS, P. M. Tipificação de *Mycobacterium bovis* utilizando spoligotyping e MIRU – VNTR e avaliação da sensibilidade à quimioterápicos de estirpes isoladas em Minas Gerais e outras regiões brasileiras. Minas Gerais – Belo Horizonte, 2003. Tese de Doutorado – Escola de Veterinária – UFMG.

PEREIRA, S. M. e cols. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. **Rev. Saúde Pública.** 41 (supl 1): 59-66, 2007.

PETTIT, J. H. & REES, R. J. Sulphone resistance in leprosy. an experimental and clinical study. [Lancet](#), 2:673-4, 1964.

PIGNATARO, P., DA SILVA ROCHA, A. e cols. Leprosy and AIDS: two cases of increasing inflammatory reactions at the start of highly antiretroviral therapy. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.** 23: 408 – 411, 2004.

PHILIPS C J C, MORRIS P A, Teversond R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. **Research in Veterinary Science.** 74: 1 –15, 2003.

PRABHAKAR, S. e cols. Use of hupB gene encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. **J. Clin. Microbiol.** 42: 2724 – 2732, 2004.

RAO, K. N., LAKSHMI, V. E SAHA K. Undernutrition in lepromatous leprosy. Part I. Is associated with poverty or with disease? **Lepr Rev.** 57(4): 299-309, 1986.

RAMASOOTA, P. e cols. Multiple mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium leprae* strains from leprosy patients in Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Health.** 31 (3): 493-497, 2000.

RASTOGI, N. LEGRAND, E. & Sola, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclatura and pathogenesis. **Ver. Sci. Tech.** 20: 21-54, 2001.

REDDY, P. K. & CHERIAN, A. Relapse in leprosy after multidrug therapy and its differential diagnosis with reversal reaction. **Indian J. Lepr.** 63 (1): 61-69, 1991.

REPORT. ROYAL COMMISSION ON TUBERCULOSIS. Final Report. London: HMSO. 1911.

REPORT. TRANSACTIONS OF THE BRITISH CONGRESS ON TUBERCULOSIS, 1901. Vols 1:3. London: Cowes, 1902.

RICHTER E. e cols., Evaluation of genotype MTC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. **J. Clin. Microbiol.** 41: 2672 – 2675, 2003.

RINALDI, A. Neglected Diseases. The global campaign to eliminate leprosy.

PlosMedicine. Dezembro. 2: 1222-1225, 2005.

RITACCO, V. e cols. Assessment of the sensitive and specificity of enzyme-linked immunosolvent assay (ELISA) for detection micobacterial antibodies in bovine tuberculosis.

Zentralbl Veterinarmed B. 34: 119-125, 1987.

ROBBINS, G. e cols. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B. C.). PLoS ONE | www.plosone.org. 4: 5669, 2009.

ROTHSCHILD, M. B. e colaboradores. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct Bison dated 17,000 years before the present. **Clinical Infectious Diseases.** 33: 305-11, 2001.

RUNYON, E. H., SELIN, M. J. AND HARRIS, H. W. Distinguishing mycobacteria by niacin test. **Am. Ver. Tuberc.** 79: 663, 1959.

SANTOS, A S O. Lesões, isolamento e expressão imuno-histoquímica do M bovis no granuloma da tuberculose em bovinos do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes – Rio de Janeiro. 2004. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

SAMPER, S. e cols. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. **AIDS.** Aug;11(10):1237-42, 1997.

SAPKOTA, B. R., RANJIT, C. AND MACDONALD, M. Reverse line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium leprae*. **Nepal Medical College Journal.** 8(2): 122-127, 2006.

SCHELLNER, H. Risk of infection in cattle grazing pastures contaminated with tubercle bacilli. **Die Rindertuberkulose.** 5: 179-188, 1956.

SCHNEIDER, J. e cols. Degradation of pyrene, benz(a) anthracene, and benzo(a)pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 13-19, 1996.

SCORPIO, A. & ZHANG, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. **Nat. Med.** 2: 662-667, 1996.

SHINNICK, T. M. & GOOD, R. C. Mycobacterial taxonomy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 13: 884-901, 1994.

SMITH T. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. **J Exp Med.** 3: 451-511, 1898.

SOBRAL, L. F. Pesquisa de Mycobacterium bovis entre as cepas de micobactérias isoladas no complexo hospitalar HUCFF/IDT-UFRJ no período de 2005-2006. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Medicina – UFRJ.

SOINI, H. & MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clinical Chemistry.** 47: 809-814, 2001;

SOLA, C. e cols. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infecton, Genetics and Evolution.** 3: 125 – 133, 2003.

SOMOSKOVI, A. e cols. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. **J. Clin. Microbiol.** 44: 4459-4463, 2006.

SREEVATSAN S., PAN X., STOCKBAUER K. E., e cols. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 97:9869–74, 1997.

SREEVATSAN S. e cols. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. **J. Clin. Microbiol** 34: 2007 – 2010, 1996;

SUFFYS P. N., DA SILVA ROCHA, A. e cols. Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. **J. Clin. Microbiol.** 39(12): 4477 – 4482, 2001.

SUPPLY, P. E cols. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology** 36 (3): 762-771, 2000.

TB ALLIANCE. Clofazimine. **Tuberculosis.** 88 (2): 96-99, 2008.

TELENTI, A. Direct, automated detection of rifampin-resistant mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 37(10): 2054-2058, 1993.

TELENTI, A. Genetics and pulmonary medicine. Genetics of drugs resistant tuberculosis - 5. **Thorax.** 53: 793-797, 1998.

THOEN C, LOBUE P E DE KANTOR I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Vet Microbiol.** 112(2-4):339-45, 2006.

TORTOLI, E. & MARCELLI, F. use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 26: 51-55, 2007.

TRAININ, Z. & KLOPPER, U. Immunofluorescent studies of lymph nodes and spleens of leukotic cattle for cells producing IgM and IgG. **Cancer Res.** 31: 1968-1970, 1971.

UNGAR-WARON, H. e cols. Experimental infection of calves with bovine leukemia virus (BLV): an applicable model of a retroviral infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 67: 195-201, 1999.

VAN DER ZANDEN, A. G. M., e cols. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in strain microscopic preparations. **J. Clin. Mol. Pathol.** 51: 209 - 214, 1998.

VAN DER ZANDEN, A. G. M., e cols. Use of DNA extracts Ziehl-Neelsen stained slides for molecular detection of resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** 41: 1101 - 1108, 2003.

WARREN, R. M. e cols. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.** 169: 610-614, 2004.

WEDLOCK, N. D. e cols. Control of *Mycobacterium bovis* infections and risk to human populations. **Microbes and Infection.** 4: 471-480, 2002.

WELL, A. e cols. The mtp40 gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. of Clinical Microbiol.** 34: 2309 – 2311, 1996.

WILBUR, A. K. & BUIKSTRA, J. E. Patterns of tuberculosis in the Americas – How can modern biomedicine inform the ancient past? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 101 (suppl. II): 59 – 66, 2006.

WILESMITH, J. W. & WILLIAMS, D. R. Tuberculosis lesions in reactor cows (letter). **Vet. Rec.** 119: 51, 1986.

WILLIAMS, D. L. e cols. Characterization of Rifampin Resistance in Pathogenic Mycobacteria. **Antimicrobl Agents And Chemotherapy.** 38: 2380-2386, 1994.

WHO. World Health Organization. WHAT FORMAT? Global leprosy situation, beginning of 2008. **83**: 293-300, 2008.

WHO. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. **WHO** report, 2008.

WHO. World Health Organization. 2004. Leprosy elimination project. Status report 2002–2003. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WHO. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No 3 (**WHO/CDC/TB/2004**). Geneva. Switzerland, 2004.

YAWALKER, S.J. & VISCHER W. Lamprene (clofazimine) in leprosy: basic information. **Basel: Ciba-Geigy Ltda**: 1-32, 1993.

YOO-CHUL, SHIN e cols. Variable members of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. **Journal of Clinical Microbiol.** 38 (12): 4535-4538, 2000.

YOU, E.-Y. e cols. Mutations in genes related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in korea. **Journal of infection.** 50: 6 – 11, 2005

ZANINI, M. S. E cols. Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polynerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health.** 45 : 473-479, 1998.

ZINK A. R. & NERLICH A. G. Molecular strain identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in archival tissue samples. **J. Clin. Pathol.** 57:1185-1192, 2004.

12. Artigos Submetidos

12.1 Submetido a revista Tuberculosis.

Genotyping analysis did not evidence any contribution of infection with *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Rio de Janeiro.

Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil.

Adalgiza da Silva Rocha¹, Atina R Elias¹, Luciana F. Sobral², Diego F Soares¹, Alexandre A Santos¹, Ana-Grazia Marsico², Gisele B Vieira², Mariana A. Hacker⁷, Paulo Cesar Caldas⁴, Marcio R. Silva³, Luiz C. Parente⁵, Philip Suffys¹ and Neio Boéchat⁶.

1. Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
2. Laboratory of Mycobacteriology, Institute of Thoracic Diseases and Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.
3. Embrapa Gado de Leite of Juiz de Fora, MG, Brazil.
4. Prof. Helio Fraga Tuberculosis National Reference Center, FIOCRUZ, Ministry of Health, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
5. TB Clinic, Augusto Guimarães Tuberculosis Regional Reference Center, TB Control Program, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.
6. Multidisciplinary Research Laboratory, Clementino Fraga Filho University Hospital and Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
7. Laboratory of Hanseníase, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence to: Neio Boéchat, Multidisciplinary Research Laboratory, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Avenida Brigadeiro Trompovski, s/n, Ilha do Fundão, 20541-590, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail- n_boechat@yahoo.com

Keywords: human tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, Spoligotyping, *pncA*, *oxyR*.

ABSTRACT

Human tuberculosis (TB) is primarily a pulmonary disease, caused by very closely related mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). By far, the most important agent is *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* being reported as the second most frequent etiology. In developing countries, *M. bovis* infection may constitute an important threat to public health. Accurate MTC species determination is useful for the identification of outbreaks, epidemiological links and planning the most appropriate anti-TB therapeutic regimen. In Brazil, as in most developing countries, *Mycobacterium* culture, identification and susceptibility tests are performed only in TB reference centers, usually for selected cases, routinely using solid, glycerol-containing, egg-based, without pyruvate supplementation Lowenstein-Jensen or Ogawa media, both restrictive for the majority of *M. bovis* strains. The exact role of *M. bovis* in the burden of human TB in Brazil is not clear. To answer this question the current study design was optimized for culturing and identification of MTC species, using conventional and molecular tools. However, we did not detect one single case of *M. bovis* in a large collection of MTC strains recovered from *M. bovis* conductive medium. Our results indicate that *M. bovis* importance on the burden of human TB in Brazil is marginal.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is primarily a disease of the lung, caused by very closely related mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). The complex includes the following species: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, and *M. bovis-BCG*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, and *M. canettii* (1, 2, 3). By far, the most important agent of human tuberculosis is *M. tuberculosis*, accountable for more than 90% of cases (4). Whereas *M. tuberculosis* is mainly a human pathogen, *M. bovis* has a broader host range, being mostly observed in cattle but sometimes reported as responsible for disease in other species. In the case of human TB, *M. bovis* is reported worldwide as being the second most frequent causative agent, estimated as being responsible for approximately 5% of the global tuberculosis cases (5). Infection with *M. bovis* has accounted for a proportion ranging from 0.5 to 7.2% of all patients with a bacteriological proven tuberculosis in industrialized countries (6). However, it is generally thought that in developing countries, *M. bovis* infection constitutes a more severe threat to public health and might account for up to 10 to 15% of the yearly registered new cases of human tuberculosis (7, 8).

Human infection with *M. bovis* is mostly due to ingestion of unpasteurized milk or, alternatively, inhalation of droplet nuclei (6, 7, 8). Although the anatomic site of human *M. bovis* disease is more often extra pulmonary, human disease caused by *M. bovis* and *M. tuberculosis* are clinically, radiologically, and histopathologically indistinguishable (9). Therefore, pathogen differentiation at species level requires the observation of phenotypic characteristics that include colony morphology, growth rate, and biochemical properties after culturing on appropriate medium. In most developing countries, diagnosis of human tuberculosis is based on direct microscopic examination of specimens after acid-fast staining and chest radiography. Some reference laboratories that are particularly concerned about more indept analysis of the etiologic agent of TB, perform culturing on the *Mycobacterium*

selective Löwenstein-Jensen (L-J) medium and perform tests to differentiate isolates of MTC from MOTT, eventually including some that distinguish *M. tuberculosis* from *M. bovis*. However, even in these laboratories the use of the egg-medium containing pyruvate, and of semi-synthetic media in which the bovine bacillus would preferably grow is greatly limited (10). The pyruvate requirement of most *M. bovis* strains is the basis of one of the major phenotypic differences between *M. bovis* and *M. tuberculosis* and seems to be due to a point mutation in the pyruvate kinase gene, resulting in a defective glycerol metabolism (11). Therefore, the difficulty in obtaining primary isolates of *M. bovis* using conventional L-J medium is a major obstacle to ascribe the contribution of *M. bovis* to the burden of human TB in developing countries. To better understand the role of *M. bovis* in the pathogenesis of human tuberculosis in Brazil, particularly in Rio de Janeiro, we conducted a study that added to conventional culturing and Mycobacterium identification procedures, the inclusion of culturing on pyruvate containing L-J medium and genetic analysis. We also performed genotyping of material present on slides that had been prepared as part of AFB microscopic-based sputum analysis for diagnosis of TB.

MATERIALS AND METHODS

Study setting and design. Virtually all commercially available milk supply is pasteurized in Brazil. Estimated Brazilian bovine population is 195 millions and the prevalence of tuberculin reactors animals range between 0.37 % (in the Southern-Eastern) to 3.62 % (in the Northern States) (12). Around 20 % of Brazilian dairy cattle farms are thought to be affected by bovine tuberculosis. In a survey conducted in Rio de Janeiro state 12.7 % of tested animals were tuberculin reactors (13). However, the magnitude of bovine tuberculosis may be yet more serious in Brazil. Isolated animals and small herds, in areas comprising subsistence farming, agropastoral, and pastoral communities, are usually not tested for *M. bovis* infection. Such areas are present even in the peripheral regions of Brazilian metropolitan areas. It is noteworthy that people living in these areas may be exposed to unpasteurized milk and dairy products and also to meat of infected animals.

World Health Organization estimated as 92,000 the number of new human TB cases in Brazil for 2007 (an incidence rate of 48 per 100,000 individuals). The overall estimated prevalence of *M. tuberculosis* infection among adults was 60 per 100,000 inhabitants. The mortality rate from tuberculosis in Brazil was estimated to be 4.4 per 100,000 persons (8,400 deaths/year in 2007) (14). Approximately 14 % of adults with TB are thought to be HIV positive (14), and an estimated 20 % of people living with HIV/AIDS have pulmonary tuberculosis (15). Rio de Janeiro is the second largest city in Brazil, with 5.8 million inhabitants. In 2005, Rio de Janeiro City had 8,414 TB cases per year and an incidence rate of 105.5 per 105 persons, almost twice as high as the rest of the country overall (16). In total, 377 deaths related to TB were registered in 2003, with an incidence of 6.3 per 105 persons. Official figures estimate that 8 % of adult TB patients in Rio de Janeiro have HIV infection (16). The Clementino *Fraga* Filho University Hospital (UH) / Institute of Thoracic Diseases (IDT) of the Federal University of Rio de Janeiro (FURJ), Rio de Janeiro, Brazil, serves a

population of 1 million persons. The Mycobacteriology Laboratory (ML) of the UH/IDT-FURJ provides mycobacteriology culture support to the UH as well as to the City Health Care centers and performs 5,000 cultures annually, 20 % of which are positive for growth of mycobacteria. During a 20 months period (from April 2005 to November 2006), clinical specimens routinely handled in the ML were enrolled in the study.

To investigate regions where the risk for *M. bovis* infection is thought to be greater than in Rio Metropolitan area, samples from other two Brazilian regions and their related rural area (where pyruvate supplemented media and even L-J routine culture were not available) were also analyzed: 1) - Campos, 300 km away from Rio de Janeiro, a mixed urban-rural municipality (0.5 million inhabitants) displaying unfavorable economic and human development indices that has its economy historically linked to the cattle farming, subsistence farming and sugar cane industry; 2) - Four municipalities in the State of Minas Gerais having important cattle and dairy farming activities. Each geographical area represents a different eco-epidemiological setting. During a 12 months period (from December 2007 to November 2008), a total of 306 strains characterized from AFB-positive slides corresponding to 132 pulmonary TB patients (some patients have more than one slide available to be examined) were analyzed.

Handling of clinical specimens and culture conditions. As it is generally believed that *M. bovis* growth or, at least, optimal growth is constrained by using media without pyruvate supplementation and/or containing glycerol, we performed, in parallel to culturing on conventional L-J medium supplemented with glycerol, inoculation of processed clinical samples on tubes with L-J that was free of glycerol and supplemented with 5 mg/ml sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). We collected a total of 8,833 specimens from 3,046 patients and replicate patient samples were due either because of collection from

different body sites and/or on different days. The median number of samples collected per patient was three. For culturing, clinical specimens were homogenized, submitted to N-acetylcysteine digestion and sodium hydroxide decontamination and centrifuged 2 times at 3,000g for 15 min. Aseptically collected fluids and tissues were centrifuged without previous digestion or decontamination. The sediment was resuspended and divided into three equal volumes. Two 200 µl aliquots were plated onto L-J (17). The third aliquot were plated onto L-J, without glycerol, pyruvate enriched agar slants (L-J pyruvate). All inoculated slants were incubated at 37° C for eight weeks and submitted to standardized observation protocol, after 48 to 72 h, and later on twice weekly. After 60 days, bacterial counts were defined by colony numbering from 1 to 19, or scored +1 (20 to 100 colonies), +2 (>100 individual colonies) or +3 (confluent colonies) (17). Growth on the L-J slants resembling mycobacterial colonies (i.e., rough, tough and buff-colored), was subjected to Ziehl-Nielsen (Z-N) staining and Gram staining to confirm the presence of acid-fast bacilli and rule out contamination. As a control procedure, we also inoculated four *M. bovis* (*Mycobacterium bovis* ATCC 19210, *Mycobacterium bovis* AN5, *Mycobacterium bovis* [bovine clinical strain], *Mycobacterium bovis* BCG 35736) and two *M. tuberculosis* strains (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *Mycobacterium tuberculosis* [human clinical strain]) onto triplicate agar slants of both L-J media types (with glycerol or pyruvate) that were also incubated at 37° C for 60 days. The mean of the triplicate was recorded as the colony count for the entire culture.

Phenotypic and biochemical characterization of bacterial isolates. For differentiation of *Mycobacterium* isolates of the MTC from MOTT, we observed characteristics based on pigmentation, colony morphology, speed of growth and biochemical tests (17, 18). Differentiation between some of the MTC members was achieved by analyzing phenotypical and biochemical features, including production of niacin, nitrate reduction, semi-quantitative

catalase activity and catalase thermostability at 68°C, as previously described by Kent & Kubica (18).

Genotyping. For genotyping of MTC DNA present in bacterial cultures a loop of mycobacterial mass was taken from cultures in L-J pyruvate medium, suspended in 0.5 ml of 10 mM Tris-HCl–1 mM EDTA–1% Triton X-100 incubated at 100°C for 10 min after vigorous mixing. Nucleic acids and processed cultures were stored at -20°C until further use. Spoligotyping was performed using PCR and hybridization conditions on a commercially available membrane (Isogen Bioscience BV, Marssen, The Netherlands) as previously described (19) and including negative and positive (*M. tuberculosis* and *M. bovis* DNA) controls in every batch of tests. As a supplementary test for differentiation of *M. tuberculosis* from *M. bovis*, we performed PCR-REA of a 726 bp fragment including the full *pncA* gene as described by Barouni *et al.*, (20). In brief, the 726 bp fragment was generated using the primers 5' GTC GGT CAT GTT CGC GAT CG 3' and 5' GCT TTG CGG CGA GCG CTC CA 3' and the following amplification conditions: 4 min enzyme activation at 95°C, followed by 35 cycles consisting of 95°C for 60 s, 68°C for 2 min, 72°C for 1 min, followed by a 10 min elongation step at 72°C. The *pncA* gene contains a polymorphic site that is preserved in *M. bovis*. The presence of this polymorphism, that permits the distinction between *M. bovis* and *M. tuberculosis*, was verified by electrophoresis on 5% agarose gel after digestion of PCR amplification with Eco065 I.

In addition to the genotyping of the clinical samples described above, we also performed genetic characterization of 454 AFB positive Z-N slides obtained from sputum samples corresponding to 223 pulmonary TB patients. Patients were from two different Brazilian regions, including 140 (303 positive Z-N slides) from Campos, Rio de Janeiro State and 83 (151 positive Z-N slides) from four municipalities of the Minas Gerais State. The

presence of AFB was quantified by microscopy and recorded as + (less than 1 bacillus per 100 examined fields), ++ (1-10 bacilli per 50 examined fields) and +++ (more than 10 bacilli per 20 examined fields). The slides had been stored at room temperature for no longer than eight weeks before DNA extraction, the latter achieved by a procedure adapted from van der Zend *et al.* (21). Briefly, residual oil present on the glass slides was removed with xylol (Merck, Darmstadt, Germany), rinsed with distilled water and the biological material removed from the surface by scraping with a # 14 lancet after spotting 25 µl of sterile distilled water. This suspension was transferred to a microcentrifuge tube containing 200 µl of a 15% Chelex 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) suspension and after vigorous shaking, incubated at 95°C for 30 min. The samples were then centrifuged for 10 min at 13,000 g and the supernatant removed and stored at -20°C until further analysis. As single point mutations of the *pncA* gene and the *oxyR* locus have been used to differentiate between *M. bovis* and *M. tuberculosis* isolates (22, 23) PCRs were performed to amplify a 726 bp fragment including the full *pncA* gene and a *oxyR* gene 150 bp fragment. Almost all *pncA* PCRs failed to amplify. However, the *oxyR* gene 150 bp fragments were regularly amplified and subsequently sequenced to detect the nucleotide A at gene position 285, typical of *M. bovis*.

Analysis. The two-proportion Z-test were used to compare mycobacterial growth on the different media used in the study. Fisher's exact test was used to compare the number of pulmonary and extra-pulmonary isolates that grew on L-J medium with those that grew exclusively L-J pyruvate medium. Spoligotyping patterns were recorded both in a 43-digit binary format representing the 43 spacers and as an octal code (24) and initially verified for the presence of spacers that differentiate *M. tuberculosis* from *M. bovis*. In addition, *M. tuberculosis* patterns were introduced into an excel datasheet for cluster recognition and classification and then compared with the SpolDB4 database of the Pasteur Institute of

Guadeloupe (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo>) for type classification.

All isolates that yielded spoligotyping that were recognized as undescribed patterns were submitted to at least one additional spoligotyping assay and only considered when confirming the first pattern.

RESULTS

Mycobacterial growth on routine L-J and L-J pyruvate medium. Results with control strains. As someone could argue that inherent problems within the pyruvate supplemented medium might account for the failure of *M. bovis* “truly” positive specimens to yield identifiable mycobacterial growth we carried out a growth control assay. Standard collection and clinical MTC strains were inoculated on L-J and L-J pyruvate. Their growth rates on each and both media are shown in Table 1. Results with clinical specimens strains. From the 26,499 agar slants that were inoculated with 8,833 clinical specimens suspicious for tuberculosis 17,666 cultures on routine L-J and 8,833 cultures on L-J supplemented with pyruvate, were observed during a 60 day period.

As it is commonly accepted that *M. bovis* growth or, at least, optimal growth is constrained by using media without pyruvate supplementation and/or containing glycerol we performed the rest of the analytical procedures aimed at the search of *M. bovis* as an agent of human TB only on isolates present on the L-J pyruvate, glycerol free medium. Among the 8,833 L-J pyruvate inoculates 1,796 mycobacterial positives were obtained, corresponding to 20.3 % of the total of incubated clinical specimens in the study period. The majority of isolates (n= 1,578, 88 %) were obtained from pulmonary clinical samples. Among the pulmonary isolates, 66 % originated from sputum, 27,1 % from induced sputum, 6,9 % from bronchoalveolar lavage fluid and 1% from other related specimens. An extra pulmonary site was the origin of 215 (12 %) of isolates. Taking into account the sum of extra pulmonary isolates, 28 % originated from lymphonodes, 27 % from blood or bone marrow, 12 % from pleura and the remaining 33 % from various other tissues.

Table 2 shows the distribution of the 1,796 mycobacterial isolates according to their medium/media of growth. Most of the pulmonary and extra-pulmonary strains grew on both L-J or L-J pyruvate medium: 1,408 out of 1,593 (88.4 %) and 161 out of 203 (79.3 %). A

similar proportion of pulmonary and extra-pulmonary strains were recovered from L-J pyruvate medium: 1,478 out of 1593 (92.7 %) and 196 out of 203 (96.5 %) (Z value: 1.862, CI 95%). For pulmonary specimens a comparable proportion of strains was recovered from L-J (1523/ 1593, 95.6 %) and L-J pyruvate medium (1,478/ 1593, 92.7 %). However, for extra-pulmonary specimens the proportion of strains recovered from L-J pyruvate (196/ 203, 96.5 %), was greater than that recovered from L-J medium (168/ 203, 82.8 %) (Z value: 4.399, CI 99 %). Some strains grew only on L-J or only on L-J pyruvate medium. Interestingly, when comparing the number of extra-pulmonary strains that grew exclusively on L-J (7/ 203, 3.4 %) or exclusively on L-J pyruvate medium (35/ 203, 17.3 %), extra-pulmonary strains appeared to express preferential growth on L-J pyruvate. Five-fold more extra-pulmonary mycobacterial isolation was observed exclusively on L-J pyruvate than exclusively on L-J medium (Z value: 4.399, CI 99 %). Also, when comparing the number of pulmonary and extra-pulmonary strains that grew on L-J with those that grew exclusively L-J pyruvate (data shown in Table 1, columns 1 and 5) [we observed a statistically significant higher number of](#) extra-pulmonary strains recovery exclusively from L-J pyruvate medium (70/ 1523 *versus* 35/ 203, respectively for pulmonary and extra-pulmonary strains [$p > 0.001$]). No such difference was observed in the case of inoculates derived from pulmonary specimens. It is noteworthy that inoculation on L-J pyruvate medium did not particularly favored growth or recovery of MOTT strains neither from pulmonary nor extra-pulmonary sites (data not shown).

Phenotypic and biochemical characterization of isolates. The great majority of the isolates ($n = 1,678$, 93.5 %) were identified as belonging to the MTC, while 115 (7.5 %) were recognized as MOTT. None of the 1,678 MTC isolates obtained on L-J pyruvate was identified as being *M. bovis*. All presented values of phenotypic features and biochemical

tests were indicative of *M. tuberculosis*. Data concerning details about possible intermediate strains or grouping of isolates characteristics will be discussed elsewhere (manuscript *in prep.*).

Genotyping of bacterial isolates recovered from L-J pyruvate medium of patients from Rio de Janeiro. Among the 1,674 isolates that were observed on L-J pyruvate 239 (14.2 %) could not be submitted to genetic analysis, due medium degradation, contamination or loss during transfer and storage. The rest (n = 1,435) could be submitted to genotyping using the assays for *pncA* and spoligotyping. Genotyping of *pncA*. Workable PCR amplification and *RFLP* analysis of the *pncA* gene polymorphic site at position 169 was obtained for 1,161 (81 %) of the 1,435 isolates and all showed the *M. tuberculosis* pattern. Spoligotyping. Good quality patterns were generated for 989 (69 %) of the isolates and all presented genotypes characteristic for *M. tuberculosis* (using as reference data available on SpolDB4 (24) and SITVIT databases (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>)). The spoligotyping results are provided as *M. tuberculosis* families and their frequencies among the analyzed isolates in Table 3. Considering SpolDB4 as a sources for recognition of spoligotyping reported else whereas, we observed that 858 of these isolates (86.8 %) presented spoligotyping that were also present in the database while the remaining 131 (13.2 %) segregated into 22 newly identified spoligotyping patterns, not reported by SpolDB4.

Among the formerly described genotypes, those belonging to the LAM family were most frequently observed (423/989, 42.7 %), being mostly LAM9 (166/423, 39.2 %) and about 70 % (114/166) of these identified as LAM9-type 42. Other frequently observed families were H3 (117/989, 11.8 %) with type 50 present in 78.6 % of such isolates, T1 (117/989, 11.8 %) with the type 53 being most frequent (45.3 %), H1 (62/989, 6.2 %)

presenting type 47 in 84% of this grouping, LAM2 (58/989, 5.8 %), LAM6 (56/989, 5.6 %) mainly represented by type 64 (87 %) and LAM3 (44/989, 4.4 %).

Genotyping of MTC present on Z-N slides. Mycobacterial DNA was obtained directly from AFB positive sputum smears produced during routine TB diagnosis work-up in two different Brazilian regions (Campos, Rio de Janeiro State and four municipalities in the State of Minas Gerais) where cultures were not available. At first, we attempted to differentiate between *M. bovis* and *M. tuberculosis* as the mycobacterial species present on the sputum smears pointing out the distinctive *pncA* gene single nucleotide point mutation at position 169. However, in our hands almost all *pncA* PCRs failed to amplify directly from smears. The few *pncA* gene fragments (756bp) that were successful amplified presented the *M. tuberculosis* pattern. Thereafter, assuming that the mycobacterial DNA present on the Z-N slides could have been significantly degraded, we realized that PCR amplification of targets of more than 150-200 bp could be difficult and therefore designed a primer set for amplifying the smaller *oxyR* gene fragment (150 bp) and verified the single nucleotide A/G polymorphism at position 285, distinctive of *M. bovis*, by direct sequencing (23).

The *oxyR* gene fragments were successfully amplified and sequenced in 122 of the 303 (40 %) AFB-positive smears from patients from Campos corresponding to 49 of the 140 (35 %) enrolled patients and in 91 of the 151 (60 %) AFB-positive smears, representing 58 of the 83 (69.8 %) TB patients from Minas Gerais. In all cases, sequence analysis demonstrated the presence of a G nucleotide at position 285 characteristic for *M. tuberculosis*.

DISCUSSION

Human disease caused by *M. bovis* and other species of the MTC are similar, although the anatomic site of *M. bovis* disease is more often extrapulmonary. Cases of human TB with *M. bovis* are mainly associated with the consumption of unpasteurized dairy products or close contact with infected animals (7). Nevertheless, epidemiologic evidence supports the likelihood of human-to-human, airborne *M. bovis* contagion (25, 26) and this issue has been considered as possibly relevant to the epidemiology and dynamics of human tuberculosis, at least in developing countries. A recent report describes an outbreak of sputum-positive *M. bovis* disease transmitted by person-to-person contact in United Kingdom (27). In San Diego, California, during 1980–1997, 34 % of culture confirmed TB cases in children aged <15 years were caused by *M. bovis*; approximately 90 % of these children were U.S. born and of Hispanic ethnicity (28). Co-infection with HIV favors *M. bovis* transmission leading rapidly to disease development (29) *Mycobacterium bovis* human disease outbreaks were previously described in HIV infected persons and many cases of severe disease due to *M. bovis* reported in immunocompromised patients (29, 30). Interestingly, alongside the well known cow-to-man transmission, human-to-cow transmission of infection has been well-documented as well (7). Some countries, such as Great Britain and Ireland, are currently experiencing an exponential increase in the incidence of bovine TB (31). In developing countries *M. bovis* infection is highly prevalent in farmed animals and the contribution of *M. bovis* to the burden of human TB in these regions could be more important than it is generally thought. Approximately 20 % of Brazilian dairy cattle farms are thought to be affected by bovine TB and in a survey conducted in Rio de Janeiro State, 12.7 % of tested animals were tuberculin reactors (13).

The WHO 2009 Global TB report indicates that Brazil had 92,000 new human TB cases in 2007 (an incidence rate of 48 per 100,000 individuals) and that 14 % of adults with TB are

thought to be HIV positive (14). Thus, Brazil, and particularly Rio de Janeiro metropolitan region and state, seems to present favorable conditions to the development of human TB infection and disease related to *M. bovis*. However, the burden of human TB caused by the bovine bacillus, worldwide or in Brazil, is not clearly established. The clinical, radiological, and anatomic-pathological findings in TB patients are identical whatever the organism involved, and consequently differentiation requires bacteriological methods. In Brazil, as in most, if not all developing countries, the tools currently used for TB diagnosis in the operational field are limited to the clinical history, physical examination, direct microscopic examination of specimens by acid-fast stain and chest radiography. *Mycobacterium* culture, identification and susceptibility tests are performed only in TB reference centers, usually for selected cases. However, even in these centers, solid, glycerol-containing, egg-based Lowenstein-Jensen or Ogawa media, both restrictive for the majority of *M. bovis* strains, are employed. Lowenstein-Jensen with pyruvate (but without glycerol), StoneBrink, modified Middlebrook 7H11 and tuberculosis bovine blood agar are considered the media of choice for the primary isolation of *M. bovis* (32). We hypothesized that the extensive use of nonconductive media for *M. bovis* coupled with limited use of discriminatory biochemical and genotypic tests should be considered as a potential cause of under-reporting of *M. bovis*-related human disease. In addition, the use of genotyping techniques to identify the bovine bacillus among MTC strains that had grown on inappropriate, non-selective media may be contributing to the under-reporting of *M. bovis* human disease as well. To verify this hypothesis we plated 8,833 clinical specimens suspicious for tuberculosis onto the routine L-J agar slants and onto one supplementary L-J pyruvate enriched, glycerol free, agar tube, during a 20 months study period. A total of 1,796 mycobacterial strains were isolated, corresponding to 20.3 % of the total of incubated clinical specimens in the study period. Mirroring the distribution of TB cases by site of disease in Brazil, 88 % of the isolates originated from the

respiratory tract. Most of pulmonary and extra-pulmonary isolates had grown well on L-J, L-J pyruvate or both media. However, some strains expressed preferential growth on L-J pyruvate medium, as reflected by five times more frequent mycobacterial isolation when comparing the number of extra-pulmonary strains that grew exclusively on L-J (7/ 203, 3.4 %) or exclusively on L-J pyruvate medium (35/ 203, 17.3 %) (Z value: 4.399, CI 99 %). This trend of some extra-pulmonary strains to preferentially grow on L-J pyruvate medium could be due to: i) the higher proportion of extra-pulmonary isolates that, as most *M. bovis* strains, could also intrinsically present lesions in carbohydrate catabolism, namely glycerol kinase and/or pyruvate kinase null or defective activity; ii) pyruvate supplementation might favor bacterial recovery from the usually paucibacillary extra-pulmonary specimens enhancing growth performance of small inoculi even of *Mycobacterium* spp. not possessing intrinsic defects in carbohydrate metabolism.

Isolates of the MTC may be classified according to their phenotypic characteristics or biochemical properties as strains that completely fulfill the criteria for *M. tuberculosis* or *M. bovis*. For such strains, no further characterization is usually performed. Nevertheless, some strains do not match all the required diagnostic criteria and produce atypical phenotypic and biochemical identification test results. Sometimes the differentiation between these two close-related MTC species (> 99.95 % of genome sequence identity) by using classical methods may pose a challenge to the microbiologist and could generate misleading results (33, 34). Spoligotyping is considered as a reliable confirmatory genetic means for the differentiation between *M. bovis* and *M. tuberculosis* and it is particularly useful for strains with atypical biochemical identification test results (34). For this reason, after the initial phenotypic and biochemical characterization, all 1,435 isolates recovered from the L-J glycerol free, pyruvate supplemented medium were submitted to spoligotyping. Adequate for analysis patterns were generated for 989 (69 of these isolates). All of them were confirmed as MTC but none was

marked by the distinct loss of spacers 3, 9, 16 and 39 – 43, individually or grouped, characteristic of *M. bovis* (24). Actually, all isolates were identified as *M. tuberculosis*.

Using the spoligotyping technique, differentiation of MTC strains up to a subspecies level is also possible (24). Therefore, to investigate the genetic diversity of *M. tuberculosis* strains circulating in Rio de Janeiro, we compared the obtained spoligotyping patterns with an updated international SpolDB4 database. Accordingly, the isolates were segregated in 33 strain families, the LAM (Latin-American and Mediterranean) spoligotyping signature, characterized by the simultaneous absence of at least spacers 21 to 24 and 33 to 36, being the most frequently observed (423/989, 42.7 %). Within this family, LAM9 was the most frequently identified family pattern (166/423, 39.2 %) and almost 70 % (114/166) of these were sub-grouped as type LAM9-type 42. Other frequently observed families were H3 (117/989, 11.8 %), T1 (117/989, 11.8 %), H1 (62/989, 6.2 %), LAM2 (58/989, 5.8 %), LAM6 (56/989, 5.6 %) and LAM3 (44/989, 4.4 %). In the family H3, the type 50 was identified in 78.6 % of the isolates. The Beijing pattern was not identified among the strain families that could be grouped by SpolDB4. Overall, the proportion of strains distribution *M. tuberculosis* major clades and sub-clades observed here are in agreement with previous studies conducted in Rio de Janeiro and Brazil (24, 35, 36). It is also noteworthy that 13.2 % (131/989) of the isolates segregated into 22 newly identified spoligotyping patterns, not reported by SpolDB4.

Extending the search for human *M. bovis* TB cases to eco-epidemiological settings where the risk of *M. bovis* infection is thought to be greater than in Rio Metropolitan area, we also investigated samples from other two Brazilian regions and their rural areas that harbor important cattle dairy activities. As the L-J pyruvate supplemented media and even L-J solid media cultures are not routinely available in these municipalities of Rio de Janeiro and Minas Gerais States, we performed direct mycobacterial DNA extraction from 454 AFB-positive slides (303 from Campos and 151 from Minas Gerais, corresponding to 223 pulmonary TB

patients) to identify any possibly present *M. bovis* strain. The *oxyR* 150 bp gene fragment was successfully amplified and sequenced from AFB-positive smears of 47.9 % of the 223 studied pulmonary TB patients and in none, we observed the presence of the **A** nucleotide at position 285, typical for *M. bovis*.

It is somewhat surprising that not a single case of *M. bovis*-related TB was evidenced after analysis of 1,678 MTC isolates from 702 patients, particularly considering that: i) the strains were isolated from a large spectrum of specimens that include lymph nodes, bone marrow, blood, bone and bowel biopsies; ii) the University Hospital being a regional and national reference for TB, AIDS, immuno-inflammatory diseases and hematological malignancies an important proportion of examined specimens were originated from immunosuppressed patients and iii) the University Hospital Gastroenterology Clinic being a regional reference for cases of infectious, granulomatous and inflammatory bowel diseases several of such cases are routinely under diagnostic investigation that not rarely includes mycobacterial cultures. Also, as the majority of developing or transition countries and regions, Brazil, and particularly Rio de Janeiro Metropolitan area and State, seems to present predisposing conditions for the development of human *M. bovis* infection and disease. In a recent retrospective survey, Kantor *et al.* reported that the proportion of *M. bovis*-related human TB cases in 10 South America countries ranged from 0 % to 2.5 % (10). Except for two cases from Ecuador, three from Brazil and one from Venezuela, all reported *M. bovis* TB cases were diagnosed in Argentina. Apparently in the other six investigated countries (Chile, Colombia, Costa Rica, Dominican Republic, Peru and Uruguay) *M. bovis* has never been isolated from humans (10). Possible limitations of our results are the enrollment of TB cases without systematic sampling from all Brazilian regions, including truly rural areas and those with small agro-pastoral communities, and the failure to obtain a clear genotype from all mycobacterial isolates enrolled in the study. Nevertheless, we present here unexpected results,

considering that Rio de Janeiro and Brazil, as other regions and countries in Latin America, Africa and Asia, have high prevalence of both bovine and human TB. Although almost all commercially available milk is pasteurized in Brazil it was recently reported that 11 of 128 (8.5 %) bovine milk samples from retail markets in the State of São Paulo were contaminated by *M. bovis* (37). In addition, small cow herds may be found scattered all over the country, even in peripheral regions of great cities like Rio. Small herd surveillance for infectious diseases presents problems in developed (38) and developing countries and is certainly much more difficult to be accomplished in countries like Brazil. Actually, in Brazil, for such dispersed cow or cows this surveillance may be completely inexistent. Moreover, a clearly defined slaughtering policy is not adopted in most Brazilian regions so people living in these areas are probably exposed to unpasteurized milk, unpasteurized dairy products and meat from infected animals. Even so, only few *M. bovis*-related TB cases have been reported in Brazil (10) and this picture remains unchanged even when lymphnodal and intestinal TB, TB associated with HIV and other immunosuppressive conditions and TB cases from Brazilian rural areas displaying poor economic indexes are taken in account.

As vaccination with *M. bovis* BCG was introduced in Brazil in 1940 and has been systematically administered to all infants since 1976, some particular degree of protection provided by this vaccine might be one possible explanation for the paucity of *M. bovis* TB cases reported in our country. Most expert comments on the burden of *M. bovis* in human TB emphasize that the problem is most probably underestimated due to the limited use of non conductive media for detecting *M. bovis* (10). Hence, our study design was optimized for culturing and identification of MTC species, using conventional and molecular tools, and the fact that we did not detect one single case of *M. bovis* in such a large sample collection indicates that *M. bovis* importance on the burden of human TB in Brazil is marginal.

CONFLICT OF INTEREST

None.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are in debt with Mariana Hacker and Alexandre Santos for technical support. Adalgisa S Rocha has been granted by CAPES/CNPq, Ministry of Science and Technology, Brazil, PhD Scholarship.

REFERENCES

1. **Grange JM, Yates MD, De Kantor IN.** 1996. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *WHO/EMC/ZOO/96/4*.
2. **van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD.** A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1236-45.
3. **Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodriguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A.** Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1305-14.
4. **World Health Organization.** 1996. Report of the tuberculosis epidemic. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
5. **Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX.** Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998;4:59-70.

6. **de la Rua-Domenech R.** Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2006;**86**:77-109.
7. **Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O.** Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev Sci Tech* 2001;**20**:325-37.
8. **O'Reilly LM, Daborn CJ.** The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 1995;**76**(Suppl 1):1-46.
9. **Grange JM.** *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* 2001;**81**:71-77.
10. **De Kantor, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Telles MASD, Ribeiro MO, Torres MCGT, Polo CL, Welman R W, Vicente V, Kuffo D, Ascencios L, Campos LMV, Rivas C, Ward JH.** Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis*. 2008;**88**:358–365.
11. **Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG.** The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;**100**:7877-82.
12. **Roxo E.** Situação atual da tuberculose bovina no Brasil. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal, PNCEBT. Secretaria de Defesa Agropecuaria. Docum. PNCEBT DDD2005, São Paulo: SDA. 2005; p. 1–5.
13. **Lilenbaum W, Shettinnni J, Souza GN, Ribeiro ER, Moreira EC, Fonseca LS.** Tuberculose bovina: prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção na região dos lagos do Estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Medicina Veterinária* 1998;**20**:120-123

14. **World Health Organization.** WHO 2009 report. Global tuberculosis control. Country profile: Brazil. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/bra.pdf. Last time assessed in October 2009
15. **World Health Organization.** Global health atlas. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2007 <http://www.who.int/globalatlas/>. Last time assessed in October 2009
16. **Tuberculosis Control Program of the City of Rio de Janeiro.** 2005 report. Boletim informativo do programa de controle de TB do municipio do Rio de Janeiro. http://www.saude.rio.rj.gov.br/media/boletim_epidemiologicoTB_2004.pdf. Last time assessed in September 2009
17. **Brazil, Ministry of Health.** Secretaria de Vigilancia em Saude. Departamento de Vigilancia Epidemiologica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília : 2008; p 186-285
18. **Kent PT and Kubika GP.** Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control. Atlanta. U.S.A. 1985.
19. **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**:907-14.
20. **Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MT, Zanini MS, Salas CE.** A pncA polymorphism to differentiate between Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis. *Mol Cell Probes*. 2004;**18**:167-70.
21. **van der Zanden AGM, Hoentjen AH, Heilmann FGC, Weltevreden EF, Schouls LM, van Embden JD.** Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium

tuberculosis complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998;**51**:209–14.

22. **Scorpio A, Zhang Y.** Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/ nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 1996;**2**:662-7.

23. **Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, Gillies DA 2nd, Siddiqui S, Khalaf CN, Kreiswirth BN, Bifani P, Adams LG, Ficht T, Perumaalla VS, Cave MD, van Embden JD, Musser JM.** Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 1996 ;**34**:2007-10.

24. **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, Gutierrez 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, Rasolonaivalona T, Rossetti ML, Rüschi-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.

25. **LoBue PA, LeClair JJ, Moser KS.** Contact investigation for cases of pulmonary *Mycobacterium bovis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;**8**:868-72.

26. **Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, Morlock GP, Crawford JT, Lobue PA.** Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis* 2008;**47**:168-75.
27. **Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RM, Dale J, Innes JA, Hunt D, Tweddell A, Wood A, Anderson C, Hewinson RG, Smith NH, Hawkey PM, Sonnenberg P.** Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 2007;**369**:1270-6.
28. **Dankner WM, Waecker NJ, Essey MA, Moser K, Thompson M, Davis CE.** *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)* 1993;**72**:11-37.
29. **Grange JM, Daborn C, Cosivi O.** HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. *Eur Respir J* 1994;**7**:1564–1566.
30. **Gori A, Marchetti G, Catozzi L, Nigro C, Ferrario G, Rossi MC, Degli Esposti A, Orani A, Franzetti F.** Molecular epidemiology characterization of a multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* outbreak amongst HIV-positive patients. *AIDS* 1998;**12**:445–446.
31. **Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M.** Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:1951-62.
32. **Corner LA, Nicolacopoulos C.** Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. *Aust Vet J* 1988;**65**:202-5
33. **Centers for Disease Control and Prevention.** Human Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis* - New York. Editorial. *MMWR Morb Mortal Wkl. Rep* 2005;**54**:605-608.

34. **Gutiérrez MC, Galán JC, Blázquez J, Bouvet E, Vincent V.** Molecular markers demonstrate that the first described multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* outbreak was due to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999;**37**:971-5.
35. Lazzarini LC, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, Shashkina E, Mello FC, Gibson AL, Virginio MJ, Marsico AG, Butler WR, Kreiswirth BN, Suffys PN, Lapa E Silva JR, Ho JL. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2007;**45**:3891-902.
36. Scholante Silva AB, Von Groll A, Félix C, Conceição FR, Spies FS, Scaini CJ, Rossetti ML, Borsuk S, Dellagostin OA, Almeida da Silva PE. Clonal diversity of *M. tuberculosis* isolated in a sea port city in Brazil. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Aug 7. [Epub ahead of print].
37. **Greiner M, Dekker A.** On the surveillance for animal diseases in small herds. *Prev Vet Med*. 2005;**70**: 223-34.
38. **Leite CQ, Anno IS, Leite SR, Roxo E, Morlock GP, Cooksey RC.** Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; **98**:319-23.

12.2 Submetido ao Journal Microbiology Methods.

Genotyping of *Mycobacterium leprae* from Brazilian leprosy patients suggest the occurrence of re-infection or of bacterial population shift during disease relapse

Adalgiza da Silva Rocha,¹ Alexandre Araujo Cunha Santos,¹ Patricia Pignataro,² José Augusto Nery,² Antônio Basílio de Miranda,⁴ Diego Fonseca Soares,¹ Amanda Nogueira Brum Fontes,¹ Alice Miranda,² Helen Ferreira,² Neio Lucio Boéchat,³ Maria Eugênia Novisck Gallo,² Euzenir Nunes Sarno,² Maria Leide W. De Oliveira⁵ and Philip Noel Suffys¹

¹Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Multidisciplinary Laboratory, University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Laboratory of Functional Genomic and Bioinformatics, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁵Training Center on Dermatology, University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence: Philip Noel Suffys; psuffys@ioc.fiocruz.br

Running title: genotyping of *M. leprae* from relapse cases

SUMMARY

No reliable data are available on the dimension of leprosy relapse in Brazil and on it what way this influences disease control. Recently, we participated in a project that used standardized procedures for definition and reporting of relapse cases and of the contribution of drug resistance to relapse, including sequencing of part of the *Mycobacterium leprae* genes *rpoB*, *folP1*, *gyrB* and *gyrA*. As part of this study, we performed genotyping of *M. leprae* present in skin biopsy samples taken during the initial and relapse stage from eight cases that were part of this project. In none of these samples, a genetic change that supports the presence of drug resistant bacilli was observed. However, we observed the presence of a synonymous mutation at position 297 of *gyrA* (**CgyrAT**), earlier observed in about 30% of leprosy cases in Brazil. Surprisingly, among five of these patients, we observed a nucleotide change, being either **CgyrAT** (n = 1) or **TgyrAC** (n = 4) and therefore performed genotyping by analysis of the four Short Tandem Repeats GAA, GTA9, AT17 and TA18. In general, this *gyrA* SNP change was accompanied by a change in STR genotype, the latter not occurring in the two patients that presented unchanged *gyrA*. These data suggest that in a considerable part of leprosy relapse cases from Rio de Janeiro, the second disease episode seems is caused by a strain of *M. leprae* that is different from the one that caused initial disease.

INTRODUCTION

Since the introduction of standardized multi-drug therapy (MDT) schemes as established by the World Health Organization in 1981 (Grosset *et al.*, 1989), a considerable decrease of the prevalence of leprosy in many endemic countries has been observed. Nonetheless, some regions did not present a decline of disease incidence rates as expected. It is the major indicator of recent disease transmission (Rinaldi *et al.*, 2005) and alerting for the need of better control measures for control of leprosy (WHO, 2008). The difficulty of differentiating diagnosis of disease relapse and reactional states is one of the contributing factors to continuing transfer of live bacilli and disease transmission (Shetty *et al.*, 2001; Linder *et al.*, 2008).

Leprosy relapse is either due to incorrect patient handling, or to inadequate drug intake, leading to the reappearance of drug susceptible and/or resistant bacilli, of persistent bacteria or due to re-infection with *M. leprae* after cure (Oliveira *et al.*, 2002; Reddy & Cherian, 1991). Few data are available on the relative contribution of these factors to disease relapse and we here present data obtained by genotyping of *M. leprae* isolates obtained from a selection of patients that are part of a larger study for determination of the importance of relapse among leprosy patients in Brazil.

Our data suggest that not the selection of drug resistant but of a minor fraction of drug sensitive bacilli, or re-infection after cure is prevalent among cases that present leprosy relapse in Rio de Janeiro, Brazil.

METHODS

Patients and clinical samples

Our study was performed on clinical samples from eight leprosy patients, residents of the City of Rio de Janeiro and diagnosed at the Ambulatório Souza de Araújo (IOC, Fiocruz, RJ). They were suspected of suffering from leprosy relapse and were therefore included in a project that was designed for more accurate determination of the frequency of relapse among Brazilian leprosy patients (*“Magnitude e caracterização das recidivas de hanseníase em pacientes submetidos aos esquemas poliquimioterápicos/OMS e apoio à identificação de cepas resistentes do M. leprae em cinco estados brasileiros”*; MCT-CNPq / MS-SCTIE-DECIT – N° 35/2005). This procedure was based on the inclusion of optimized and standardized procedures for diagnosis and epidemiological criteria for definition of relapse and The cases investigated presently were the only that had skin biopsy samples available, taken during diagnosis of the first and second disease episode.

As part of the diagnostic procedure, a skin biopsy was collected using a 6 mm punch and cut in half, submitting one part to fixation in 10% neutral buffered-formalin and paraffin embedding for histopathology exam and the other part to snap freezing or immersion in 70% ethanol for PCR analysis.

Histopathology of the skin biopsies

The formalin-fixed specimens were serially cut in 5 μ m-thick sections and stained with hematoxylin-eosin and Wade's stain for visualization and counting of acid-fast bacilli using the logarithmic index (Ridley and Hilson 1967) and disease classification according to Ridley and Jopling (1966). Sections were viewed and captured on a Nikon Eclipse E400 microscope (Nikon, Japan) equipped with a Cool Snap Pro camera (Media Cybernetics, USA) and Image Pro plus 4.0 software.

Extraction of nucleic acids

The frozen or ethanol fixed samples (the latter after being rehydrated by immersing during 10 min in milli-Q) were cut into small pieces and macerated by performing strokes using disposable sterile sticks (Scienceware, Bel-Art Products, Pequannock, USA) in 1.5 ml micro centrifuge tubes and after addition of 500 μ l of milli-Q water and 100 μ l of zirconium beads (0.1 mm; BioSpec Products, Bartlesville, USA). After this, 150 to 200 μ l of Sephaglas was added (Flexiprep, GE Healthcare) and the suspension vortexed vigorously during 10 sec, centrifuged at 13,000 rpm for 3 min and the supernatant removed. The tissue/beads/Sephaglas/DNA-containing pellet was suspended in 200 μ l of washing buffer (20 mM Tris-HCl - pH 7.5, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl) and absolute ethanol added to a final concentration of 60%. The mixture was vortexed vigorously during 3 min and after sedimentation and removal of the supernatant, the pellet washed with 70% ethanol and air-dried at RT. For DNA elution, 50 to 150 μ l of water milli-Q (depending on the pellet size) was added and after mixing and incubation during 5 min at RT, centrifuged at 13,000 rpm for 1 min. The supernatant was transferred to another tube and stored frozen.

Amplification and sequencing analysis of part of rpoB, folP1, gyrB and gyrA

Part of the genes *rpoB*, *folP1*, *gyrB* and *gyrA* were analyzed by direct sequencing of PCR products generated using conditions described previously (Ramasoota *et al.*, 2000; Cambau *et al.*, 2002; You *et al.*, 2005) and included the generation of PCR products with the primers MrpoBF (5' GGT GGT CGC CGC TAT CAA G 3') and MrpoBR (5' TTT GCG GTA CGG TGT TTC G 3'), *folPF* (5' TAC TTA CTG TAA TCC CCT GTG CTG 3') and *folPR* (5' TTG ATC CTG ACG ATG CTG TC 3'), *gyrBF* (5' ACT GAT CCT CGA AGT TCT GAA CTG 3') and *gyrBR* (5'CAA TGC CGT AAT AAT TGC TTG AA 3') and *gyrAR* (5' CAT CGC TGC CGG TGG GTC ATT A 3') and *gyrBF* (5' ACT GAT CCT CGA AGT TCT GAA CTG 3'), generating PCR products of respectively 289, 173, 187 and 178 bp.

Because of the lack *M. leprae* species specific generation of PCR products using the PCR conditions for *gyrA*, we designed a new set of primers, *gyrANF* (5' TAA GTC AGC ACG GTC AGT CG 3') and *gyrANR* (5' GAC ACA CAA TAA CGC ATC GC 3'), that generated a 189 bp fragment only when *M. leprae* DNA was present (data not shown).

Amplification was performed in a PCR mixture of 50 µl containing 0.25 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8.3); 30 pmoles/µl of each primer pair and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen do Brasil) and by submitting for 5 min to 94°C, followed by a touch-down procedure consisting of denaturation at 94°C for 45 sec and annealing at 68°C to 63°C at 45 sec, introducing a 1°C decrease per cycle during the first six cycles. The subsequent 35 cycles were of 94°C for 45 sec, 62°C s for 45 sec and 72 °C for 90 s, followed by a final extension at 72°C for 10 min.

After verification of PCR product quantity and quality on 3% agarose gel, amplicons were purified using the ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit (Invitrogen do Brasil) and

sequenced using the same primers as those for generating the PCR fragment of each gene, using the ABI Big Dye 3.1 Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystems do Brasil).

Sequence data presented here are those obtained after using the forward and reverse primers and, in most cases, having repeated the experiment. In the case of the characterization of the *gyrA* SNP, sequence analysis was performed also after generation of the 189 bp fragment using *Pfu* DNA polymerase (Promega).

Sequences were generated on an ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and introduced into SeqScape (Applied Biosystems) and compared with the *M. leprae* sequences NC002677 and z14314 (*rpoB*), AL023093 (*folP1*), NC002677 (*gyrB*) and NC002677 (*gyrA*), available at Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>). As a control during PCR amplification and sequencing reactions, we included an aliquot of *M. leprae* DNA prepared from Armadillo.

Genotyping by VNTR analysis

For analysis of the copy number of the four STRs GAA, GTA9, AT17 and TA18, we performed direct sequencing of PCR products, using experimental conditions adapted from Monot *et al.* (2008) and Shin *et al.* (2000). In brief, amplification was performed in a 50 µl reaction sample containing 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 U of *Taq* polymerase (Invitrogen) and 200 nM of the primers 5'CTACAGGGGGCACTTAGCTC and 5'GGACCTAAACCATCCCGTTT (GAA), 5'ACCCGGAATTCCTCCAAG and 5'GCCAGAAGCGTCATCTGTTC (AT17), 5'CCGCGTTAGCATAGGCAAT and 5'AACGGTTAGGTCGAGACCAC (TA18) and 5'CGCAGATGCAACGATCAC and 5'AATATGCATGCCGGTGGT (GTA). Amplification was as described by Monot *et al.* (2008) and consisted of denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 45 PCR cycles (1 min at 94 °C, 1 min at 55°C, extension at 72 °C for 2 min), with

a final extension at 72 °C for 10 min. Amplified DNA fragments were verified on agarose gel, purified and sequenced as described above.

RESULTS

Patient's characteristics and diagnosis

Initially, the eight cases included in this study were considered as leprosy relapse cases and due to the availability of clinical sample during the first and second disease stage, submitted to genotyping. However, upon more careful verification of the clinical data, patient G was recognized as suffering from the Type I reactional state and not from disease relapse; this case was maintained in our study as a control case.

Clinical and demographic data available from the eight patients are summarized in Table 1. All were residents of neighborhoods of Rio de Janeiro that are known to be highly endemic for leprosy. In addition, high bacterial loads were observed in the biopsy samples taken during both disease stages, as part of diagnosed as suffering from MB leprosy.

Histological examination confirmed that these patients had MB disease and allowed further differentiation into BL or LL form of leprosy. Patients presented erythematous infiltrated papules or plaques in which the histopathology features observed in the skin biopsies ranged from moderate to heavy inflammatory infiltration, mainly of macrophages infected with *M. leprae* and lymphocytes, grouped around blood vessels and nerve bundles. All biopsies also showed evidence of a high number of acid-fast bacilli, ranging from +3 to +6 (Table 1).

Sequencing of rpoB, folP1, gyrB and gyrA

From the eight patients, a skin biopsy sample was available for DNA analysis from first and second disease period and from all good quality sequences could be generated for the fragments of *rpoB*, *folP1*, *gyrB* and *gyrA*. The sequence of the fragments of the first three genes was found to be identical to that of the reference DNA or sequences described for drug susceptible strains (data not shown), indicating that none of the formerly described drug resistant associated SNPs were present (Table 2).

In the case of the *gyrA* fragment sequence however, we observed the transition from T to C or C to T at position 297 of *gyrA*. The presence of a T at this position was observed in at least one of the samples of the seven relapse cases while both of the samples from patient G presented *gyrA*-T (Table 2). When concentrating on allele frequency among the samples available, we observed a C in seven of the 16 alleles (44%) while T was present in the other nine (56%); among the patients, a T was present in seven of the eight patients (88%). Upon analysis and comparison of the SNP composition from each of both samples of each of the patients, a transition was observed among five of the seven relapse cases (71%), one (20%) carrying **CgyrAT** and the other four (80%) **TgyrAC**. The other two cases had a T in both samples (Table 2).

Genotyping of the four STRs GAA, GTA9, AT17 and TA18

Due to the limited amount of processed sample available for DNA analysis, we were not able to determine the copy number of the four *M. leprae* STRs in all samples and all patients. As presented in Table 2, five of the relapse cases yielded the genotype as defined by either four or three of the STRs.

Identical STR copy number in both samples, although defined by copy number of only three of the four STRs, was observed in the two cases that also presented identical *gyrA* allele (E and F). On the other hand, a change in at least two or three of the STRs was observed in the three patients that also presented a modification of the *gyrA* SNP (Table 2).

DISCUSSION

The implementation of standardized multi-drug therapy (MDT) is considered as one of the most important interventions that led to the dramatic decrease of disease prevalence on a global level (WHO, 2009). Nonetheless, several countries are still endemic for the disease and continue reporting high incidence rates, calling for the reconsideration of what is presently considered as adequate for disease control.

In Brazil, an incidence rate of 21/100.000 and about 40,000 new leprosy cases each year is reported (Ministry of Health 2009, www.saude.gov.br). Data on frequency of relapse cases might add to the understanding of disease transmission and adequacy of control programs. Data presented by the National Information System (SINAN) reported a relapse rate that ranged between 2.4% to 4.0% between 2001 and 2004 (SINAN, www.saude.gov.br/svs, 2007). This is much higher than the rate from 0.18% to 0.99%, reported by Oliveira et al. (2006-2007), upon evaluation of patients that have been treated during the last 25 years. The difference in relapse frequency as defined by these studies is probably due to differences in definition of what should be considered as a relapse case and of what is cure, and of modification of diagnostic procedures that led to the confuse between relapse and reactional states (Opromolla, 1994). The lack of standardized diagnostic and reporting criteria for definition of disease relapse, together with the recognition of morbidity caused by lack of differential diagnosis between relapse and reactional states, led to an initiative for more accurate definition of disease relapse. A protocol was therefore adopted that improved recognition of relapse due to correction of erroneous data related to diagnosis and information spreading and detection of drug resistance.

Resistance to antibiotics is an increasingly problem for the management of bacterial infections (Coates et al., 2002). Although recent data based on the mouse footpad assay and sequencing evidenced the existence of DR and MDR *M. leprae* strains, (Shetty et al., 2005; Kim et al., 2003), no comprehensive data exist on the contribution of such cases to disease transmission and relapse. We therefore performed sequence analysis of part of the genes *gyrA*, *gyrB*, *rpoB* and *folP1* to investigate the relation between genetic changes and drug resistance and the contribution to leprosy relapse (da Silva Rocha et al. unpublished results). We presently show genotyping data of *M. leprae* present in skin biopsy samples that were taken during the first and second disease episode from eight patients that presented clinical signs indicative for disease relapse. Six of these cases had been treated using the conventional MDR scheme that included dapsone, rifampicin and clofazimine administration during one year and the other two received rifampicin and dapsone only (Table 1). One of the patients (case H in Table 1) was later on defined as presenting reactional episode and not being a relapse case.

Our data showed the absence of mutations indicative for development of drug resistance in the samples from the presently investigated cases and is in agreement with the low level of genotypes indicative for DR or MDR leprosy (2%) that was detected upon analysis of over 200 relapse cases using the same diagnostic and analytical procedures (da Silva Rocha et al, unpublished results). As far as we know, only two cases of DR leprosy were documented in Brazil, one being a dapsone resistant case in the Brazilian Amazon region that had been treated with dapsone only (Talhari et al. 1986), and a second case, resident of an ex-leprosy colony in Bauru and reported as being MDR using the mouse footpad assay (Opromolla, et al. 1993). Our genotyping data support the hypothesis that low level of DR is not due to inadequate case finding or reporting. We believe that both the use of high doses of dapsone

during the monotherapy phase of disease treatment, and the availability of rifampicin in Brazil only at the end of the seventies, delayed the appearance of DR and MDR leprosy cases.

The absence of genotypes indicative for drug resistance observed presently also suggests that treatment failure is not a major cause of disease relapse and the contribution of alternative mechanisms such as reinfection or the appearance of latent or minor fractions of the bacterial population. This is supported by our observation of the high frequency of a genotype change, as defined by the SNP 297-*gyrA*. In the present patient population, we observed the presence of the T allele in 56% of the samples and 88% of the patients, a frequency that is considerably higher than that observed in the whole study population of relapse cases mentioned before (da Silva Rocha et al. unpublished results). As the occurrence of SNPs is considered a rare event in *M. leprae* (Monot, et al., 2005), our observation of the presence of the synonymous mutation in *gyrA* and the might be an additional phylogenetic marker. Also, the high frequency of allele change in the relapse cases observed presently could be representative for a genotype that has been selected from the bacterial population during development of disease relapse.

As the presence of the SNP 297-*gyrA* has not been evaluated for its significance as being a marker for pathogen genotype modification during disease, we performed genetic analysis by sequence analysis of four STRs that have been described as adequate for discrimination of *M. leprae* strains (Brum Fontes et al., in press). We observed that the genotype data as defined by the SNP 297-*gyrA* were supported by the VNTR data. Although we were unable to obtain complete genotypes for all samples, we are quite confident that the STR data support our hypothesis of the use of SNP 297-*gyrA* as a phylogenetic marker, as based on our data showing the low frequency of STR based genotype clustering observed in the general *M. leprae* population (Fontes et al, in press).

In summary, sequence analysis of the genes *rpoB*, *folP*, *gyrB* and *gyrA* and of four STRs of *M. leprae* present in samples from a set of leprosy patients strongly suggests that selection of a bacteria subpopulation or reinfection, and not development of drug resistance, is mainly responsible for disease relapse. This suggests that there is no need for use of alternative therapeutic schemes for treatment of relapse cases. However, as this study was performed on patients that were residents of Rio de Janeiro only, further studies are needed to evaluate whether this is a particular feature of relapse patients from this region of the country. The importance of the need for further investigation of leprosy relapse is evident by the observation that in the Northeast region of Brazil, 34% of relapse cases presented a co-prevalent leprosy cases in their family (Brito, et al. 2005).

REFERENCES

- Brito, M.F.M., Gallo, M. E. N. and Ximenes, R. A. A.** (2005) O retratamento por recidiva em hanseníase Retreatment of leprosy relapse. *An Bras Dermatol.* **80**(3):255-60.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., et al.,** (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* **409**: 1007–1111.
- da Cunha, M. D., Cavaliere, F. A. M., Hércules, F. M., Duraes, S. M. B., de Oliveira, M. L. W.-D. and de Matos, H. J.**(2007). Os indicadores da hanseníase e as estratégias de eliminação da doença, em município endêmico do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* **23**: 1187-1197.
- Fontes, A. N. B., Sakamuri, R. M., Baptista, I. M. F. D., Ura, S., Moraes, M. O., Martínez, A. N., Sarno, E. N., Brennan, P. J., Vissa, V. D. & Suffys, P. N.** Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian leprosy patients. *Lepr Rev*, In press.
- Goulart, I. M. B., Souza, O. B, Marques, C. R., Pimenta, V. L., M. A. G. and Goulart, L. R.** (2008). Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts. *Clinical and Vaccine Immunology.* **15**: 101–105.
- Guillemin, I., Jarlier, V. and Cambau, E.** (1998) Correlation between Quinolone Susceptibility Patterns and Sequences in the A and B Subunits of DNA Gyrase in Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **42**: 2084–2088.
- Grosset, J., Guelp, C., Bobin, P., et al.** (1989) Study of 39 documented relapses of multibacillary leprosy after treatment with rifampin. *Int J Lepr.* **57**: 607 – 614.

- Kaimal, S. and Thappa, D. M.** (2009). Relapse in leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* **75**: 126-135.
- Kim, S.-K., Lee, S.-B., Kang, T.-J. and Chae, G.-T.** (2003) Detection of gene mutations related with drug resistance in *Mycobacterium leprae* from leprosy patients using Touch-Down (TD) PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* **36**: 27-32.
- Linder, K.; Zia, M et al.**(2008) Relapses versus reactions in multibacillary leprosy: proposal of new relapse criteria. *Tropical Medicine and International Health.* **13**: 295-309.
- Matrat, S., Cambau, E., Jarlier, V. and Aubry, A.** (2008) Are All the DNA Gyrase Mutations Found in *Mycobacterium leprae* Clinical Strains Involved in Resistance to Fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **52**: 745-747.
- Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppé, J.-Y. et. al.** (2005) On the Origin of Leprosy. *Science.* **308**: 1040 – 1042.
- Monot, M., Honoré, N, Balie`re, C., Ji, B., Sow, S., Brennan, P. J. and. Cole, S. T.** (2008). Are Variable-Number Tandem Repeats Appropriate for Genotyping *Mycobacterium leprae*? *Journal of Clinical Microbiology.* **46**: 2291–2297.
- Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppée, J.Y., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J.S., Truman, R.W., Williams, D.L., Gelber, R., Virmond, M., Flageul, B., Cho, S.N., Ji, B., Paniz-Mondolfi, A., Convit, J., Young, S., Fine, P.E., Rasolofo, V., Brennan, P.J., Cole, S.T.** (2005). On the origin of leprosy. *Science.* **308**:1040-2.
- Ministério da Saúde.** (2009). Instruções Normativas – Portaria Nº. 125/SVS-SAS, de 26 de Março de 2009. *Diário Oficial da União.* Nº – **59**.
- Oliveira, M.L.W. et al.** (2006 – 2007) Projeto de pesquisa: Magnitude e caracterização das recidivas de hanseníase em pacientes submetidos aos esquemas poliquimioterápicos/OMS e

apoio à identificação de cepas resistentes do *M. leprae* em cinco estados brasileiros. ISTO FOI PUBLICADO

Oliveira, M. L. W, Pierro, A. P. S., Silveira, P. A. M., Campos, M. M. C., Vilela, M. F. (2002). Relapse of lepromatous leprosy after WHO/MDT with rapid bacterial growth. *Leprosy Review*. **73**: 386-8.

Opromolla, D. V. A. , Costa, H. C., Oliveira, P. R. D. Resistência medicamentosa múltipla secundária na hanseníase. *Hansen Int*. 1993; 18(1/2): 11-16)

Opromolla, D.V. A. (1994) recidiva ou reação reversa. *Hansen Int*. **19**: 10 – 16.

Oskam, L., Dockrell, H. M, Brennan, P. J., Gillis, T., Vissa, V., Richardus, J. H. and Members of the IDEAL Consortium (2008). Molecular methods for distinguishing between relapse and reinfection in leprosy. *Tropical Medicine and International Health* **13**: 1325–1326.

Ramasoota, P., Wongwit, W., et al. (2000). Multiple mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium leprae* strains from leprosy patients in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Health*. **31**: 493-497.

Reddy, P. K. & Cherian, A. Relapse in leprosy after multidrug therapy and its differential diagnosis with reversal reaction. (1991). *Indian J. Lepr*. **63**(1): 61-9.

Ridley DS & Jopling WH. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. **34**: 255–73.

Ridley DS & Hilson GR. (1967) A logarithmic index of bacilli in biopsy. I. Method. [Int J Lepr Other Mycobact Dis](#). **35**:184-6.

Rinaldi, A. (2005). The Global Campaign to Eliminate Leprosy. *PLoS Medicine* | www.plosmedicine.org. **2**: 1222 – 1225.

Schurr, E.; Alcaïs, A.; de Léséleuc, L. and Abel, L. (2006) Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae* *Seminars in Immunology*. **18**: 404–410.

Shetty, V. P. et al. (2005). Clinical, histopathological and bacteriological study of 52 referral MB cases relapsing after MDT. *Lepr Rev*. **76**: 241 – 252.

Shin, Y. C. et al. (2000) Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J. Clin. Microbil.* **38**: 4535 – 4538.

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2007.

Sousa, A. L. O. M. et al. (2007). *Mycobacterium leprae* DNA associated with type 1 reaction in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. *Am. J. Trop. Med Hyg.* **77**: 829 – 833.

Talhari, S., Damasco, M. H. S., Schettini, A. P. et al. (1986) Secondary dapsone resistant leprosy in Brazil: a preliminary report. *Lepr Rev* :57-8.

Vissa, V. D., Brennan, P. J. (2001) The genome of *Mycobacterium leprae*: A minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol* **2**. Available: <http://genomebiology.com/2001/2/8/reviews/1023>. Accessed 24 October 2005.

Walker, S. L. and Lockwood, D. N. J. (2006). The clinical and immunological features of leprosy. *Br. Med. Bull.* **77** and **78**: 103–121.

WHO. (2008). WHAT FORMAT? Global leprosy situation, beginning of 2008. **83**: 293-300.

WHO. (2009). Drug resistance in leprosy: reports from selected endemic countries. **84**: 103 – 121.

WHO.WER.nº 21,2009 (84):185-196.www.who.int/wer

WHO. (1994). The leprosy unit division of control of tropical diseases. Risk of relapse in leprosy. WHO/CTD/Lep/94.1.

www.saude.gov.br/svs

You, E.-Y.; Kang, T. J.; Kim, S.-K.; Lee, S.-B. and Chae, G.-T. (2005). Mutations in genes related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in korea. *Journal of Infection*. **50**: 6 – 11.

Young, D. B. and Cole, S.T. (1993). MINIREVIEW: Leprosy, Tuberculosis, and the New Genetics. *Journal of Bacteriology*. **175**: 1 – 6.

Young, S. K., Taylor, G. M, Jain, S. et al. (2004) Microsatellite Mapping of *Mycobacterium leprae* Populations in Infected Humans. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**: 4931 – 4936.

Young, S. K., Ponnighaus, J M., Jain, S., Lucas, S., Suneetha, S., Lockwood, D N. J.,

Young, D. B., Fine, P. E. M. (2008). Use of Short Tandem Repeat Sequences to Study *Mycobacterium leprae* in Leprosy Patients in Malawi and India. *PLoS Negl Trop Dis* **2**: 214 (1-7).

Comité de ética

13. Comitê de ética

13.1 Parte 1.

O referido trabalho foi aprovado pela comissão de ética, CEP – MEMO – N.º 311/09
Protocolo de Pesquisa: 039/09

13.2 Parte 2.

O referido trabalho foi aprovado pela comissão de ética, CEP – MEMO – N.º 183/06
Protocolo de Pesquisa: 019/06



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:

☐ Alice Helena Dutra Violante
Médico - Prof. Associado

Secretário:

☒ Zuzmara Rodrigues da Silva
Professor

Membros Titulares:

☒ Beatriz Maria Alasia de Herédia
Antropólogo - Prof. Associado
☐ Carlos Henrique Fernandes Castelpoggi
Médico - Especialista
☐ Eliza Regina Ambrosio
Assistente Social - Mestre
☒ Helena Warzynsky
Representante dos Usuários
☐ Luzia da Conceição de Araújo Marques
Enfermeiro - Mestre
☐ Marco Antonio Alves Brasil
Médico - Professor Adjunto
☒ Mano Teixeira Antonio
Farmacológico - Especialista
☒ Nunita Conceição Fernandes
Médico - Prof. Adjunto
☒ Paulo Feijó Barros
Médico - Prof. Assistente
☐ Roberto Coury Pedrosa
Médico - Doutor

Membros Suplentes:

☒ Anna Paula Trindade Rocha Pierucci
Nutricionista - Professor Auxiliar
☐ Beatriz Moritz Trope
Médico - Doutora
☐ Carlos Alberto Guimarães
Médico - Prof. Associado
☐ Cássia de Assis Martinusso
Jornalismo
☐ Lucia Helena Luiza Vieira Arim
Biólogo - Mestre
☐ Maria Bernadete Tavares Soares
Representante dos Usuários
☐ Maria da Conceição Lopes Buarque
Assistente Social
☒ Mariângela Oliveira da Silva
Enfermeiro
☐ Michel Jean-Marie Thiolliert
Sociólogo - Prof. Adjunto
☐ Natália Henrique Silva Canedo
Médico - Professor Adjunto
☐ Renan Moritz Vamier Rodrigues Almeida
Engenheiro - Professor Adjunto
☐ Rui Haddad
Médico - Prof. Adjunto

CEP - MEMO - n.º 311/09

Rio de Janeiro, 04 de maio de 2009.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Adalgiza da Silva Rocha

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 040 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 039/09 - CEP

Título: "Mycobacterium bovis e tuberculose humana"

Pesquisador (a) responsável: Dra. Adalgiza da Silva Rocha

Data de apreciação do parecer: 30/04/2009

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 30/10/2009, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 - CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof.ª. Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:
☒ Luiz Carlos Duarte de Miranda
Médico - Prof. Adjunto
Secretário:
☒ Mário Tassilo Antonio
Farmacêutico - Especialista
Membros Titulares:
☒ Alice Helena Dutra Violante
Médico - Prof. Adjunto
☐ Antonio de Magalhães
Munho
Enfermeiro - Mestre
☐ Beatriz Montz Tropé
Médico - Doutorado
☒ Eduardo Jorge Bastos
Cortes
Médico - Prof. Assistente
☐ Eliza Regina Ambrosio
Assistente Social - Mestre
☐ Luiz Bonfim Pereira da
Cunha
Médico - Especialista
☐ Maria de Fátima Gustavo
Lopes
Representante dos Usuários
☒ Paulo Feijó Barros
Médico - Prof. Adjunto
☒ Zomara Rodrigues da Silva
Professora
Membros Suplentes
☐ Albato Krzyem Arhex
Médico - Doutorado
☐ Daniel Savignon Marinho
Farmacêutico - Especialista
☒ Helena Warzynsky
Representante dos Usuários
☐ Luzia da Conceição de
Araújo Marques
Enfermeiro - Mestre
☐ Maria Adelaide Moreira
dos Santos
Nutricionista - Mestre
☒ Mário Fernando Petzhold
Engenheiro - Doutor
☒ Orlando Nunes Cosenza
Sociólogo - Doutor
☐ Roberto Coury Pedrosa
Médico - Doutor
☒ Vania Dias de Oliveira
Assistente Social

CEP - MEMO - nº 183/06

Rio de Janeiro, 17 de março de 2006

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Prof^a. Maria Leide Wand Del Rey de Oliveira

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. Sa. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 019/06 - CEP

Título: "Magnitude e caracterização das recidivas de hanseníase em pacientes submetidos aos esquemas poliquimioterápicos/OMS e apoio à identificação de cepas resistentes do *M. leprae* em 6 estados brasileiros".

Pesquisador (a) responsável: Prof^a. Maria Leide Wand Del Rey de Oliveira

Data de apreciação do parecer: 09/03/2006

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 09/09/2006, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d, da Resolução n.º 196/96 - CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof. Luiz Carlos Duarte de Miranda
Coordenador do CEP

14 APÊNDICE A

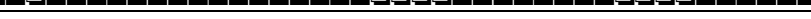
Tabela 7. Amostras HUCFF – Rio de Janeiro

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
11		822	119	X1		Complexo MTB
11		906	40	T4		Complexo MTB
28		1377				Complexo MTB
17		202	64	LAM6	MTB	Complexo MTB
17		228	64	LAM6		Complexo MTB
17		239	64	LAM6		Complexo MTB
17		329				Complexo MTB
17		250	317	T2	MTB	Complexo MTB
28		601	317	T2		
17		602	317	T2		Complexo MTB
17		605	1475	T1		
17		611	317	T2		Complexo MTB
17		613	317	T2		Complexo MTB
28		251	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
23		1009				Complexo MTB
23		1024				Complexo MTB
23		1040				Complexo MTB
23		394	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
23		407	42	LAM9		Complexo MTB
17		480	42	LAM9		Complexo MTB
17		794	92	X3		Complexo MTB
23		848	92	X3		Complexo MTB
17		902				
23		585		?		
17		9	47	H1	MTB	Complexo MTB
17		11	47	H1	MTB	Complexo MTB
17		107	47	H1	MTB	Complexo MTB
17		136		??		Complexo MTB
17		594	47	H1		Complexo MTB

Espécie	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		1202				Complexo MTB
17		112	50	H3	MTB	Complexo MTB
17		116		?		Complexo MTB
17		132				Complexo MTB
17		940		??		Complexo MTB
17		946		??		Complexo MTB
17		1062				
17		1150				
17		1053	17	LAM2		Complexo MTB
104		883		?		Complexo MTB
11		1344				Complexo MTB
23		552	753	LAM9		Complexo MTB
17		476	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
23		427			MTB	Complexo MTB
23		632	42	LAM9		Complexo MTB
104		426	1227	T5_MAD2	MTB	Complexo MTB
17		92	50	H3	MTB	Complexo MTB
23		113				Complexo MTB
17		158	50	H3		Complexo MTB
17		84	50	H3		Complexo MTB
17		1386				Complexo MTB
23		1414				Complexo MTB
23		850	157	T3		Complexo MTB
17		729	157	T3		Complexo MTB
17		804	157	T3		Complexo MTB
23		838		?		Complexo MTB
23		939				Complexo MTB
17		764	64	LAM6		Complexo MTB
23		909				Complexo MTB
17		1231				Complexo MTB
17		1375				Complexo MTB
23		421	105	U		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		423	105	U		Complexo MTB
23		467	105	U		Complexo MTB
23		874				Complexo MTB
17		377	51	T1		Complexo MTB
17		385		?		Complexo MTB
17		420	51	T1		Complexo MTB
17		439	51	T1		
17		462	53	T1		Complexo MTB
17		464	51	T1		Complexo MTB
17		493	51	T1		Complexo MTB
17		530	51	T1		Complexo MTB
17		554	53	T1		Complexo MTB
17		592	51	T1		Complexo MTB
17		557	47	H1		Complexo MTB
17		32	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		43	64	LAM6	MTB	Complexo MTB
17		59	64	LAM6	MTB	Complexo MTB
17		70				
17		1064				
23		698	179	LAM2		Complexo MTB
17		1117				Complexo MTB
17		532				
17		536				
17		678	33	LAM3		Complexo MTB
17		689				
17		754	393	T1		Complexo MTB
17		760	393	T1		
17		987		??		
23		1211				Complexo MTB
17		489	177	LAM9		Complexo MTB
17		505	177	LAM9		Complexo MTB
17		544	177	LAM9		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		564	177	LAM9		Complexo MTB
17		985				Complexo MTB
17		1052	47	H1		
17		1118				
17		1379				Complexo MTB
17		1402				Complexo MTB
17		154	390	H3		Complexo MTB
110		358		?		Complexo MTB
23		1303				Complexo MTB
28		1353				Complexo MTB
23		266	822	LAM9		Complexo MTB
17		50	53	T1		
17		53	53	T1		
23		620	157	T3		
17		622	157	T3		Complexo MTB
23		235	157	T3		Complexo MTB
6		359		?		Complexo MTB
17		199	20	LAM1		Complexo MTB
23		531	64	LAM6		
23		1127	875	T2		
17		1163	73	T2-T3		
17		1246				Complexo MTB
23		1381				Complexo MTB
23		1382				Complexo MTB
23		1307				Complexo MTB
23		446	50	H3		Complexo MTB
23		1288				Complexo MTB
17		180	1659	U		Complexo MTB
23		194				
11		610	388	LAM9		Complexo MTB
17		1215		?		Complexo MTB
17		1220		??		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		1340				
23		584	1243	H3	MTB	Complexo MTB
23		261	388	LAM9	MTB	Complexo MTB
11		796	17	LAM2		Complexo MTB
23		1170				Complexo MTB
17		606	4	LAM3 and S/convergent	MTB	
17		608				
17		1177				Complexo MTB
17		1178				
17		1198				Complexo MTB
23		687	33	LAM3		Complexo MTB
17		856	33	LAM3		Complexo MTB
17		1056	53	T1		Complexo MTB
17		48	268	H3	MTB	Complexo MTB
17		1400				
23		567		??	MTB	Complexo MTB
17		597		??		Complexo MTB
23		230	33	LAM3	MTB	Complexo MTB
17		616	33	LAM3		Complexo MTB
17		676	177	LAM9		Complexo MTB
17		506	177	LAM9		Complexo MTB
17		948	177	LAM9		Complexo MTB
17		1055	137	X2		Complexo MTB
17		1257				
17		1269				
17		1271				Complexo MTB
23		863		??		Complexo MTB
23		886		??		Complexo MTB
23		888		??		
17		1011				Complexo MTB
17		1027				Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		1042				Complexo MTB
17		951				
17		225	1536	S		Complexo MTB
17		125		?	MTB	Complexo MTB
17		167				
17		229	20	LAM1		Complexo MTB
17		289		??		Complexo MTB
17		318	20	LAM1		Complexo MTB
17		334	20	LAM1		Complexo MTB
17		357		?		Complexo MTB
17		82	20	LAM1		Complexo MTB
17		159	20	LAM1	MTB	Complexo MTB
17		161	20	LAM1		Complexo MTB
17		133			MTB	Complexo MTB
104		184				
17		191				
17		192				
17		201		?	MTB	Complexo MTB
11		300				Complexo MTB
23		217	50	H3	MTB	
17		569	60	LAM4	MTB	Complexo MTB
17		576	60	LAM4		Complexo MTB
17		1264				Complexo MTB
17		1293				Complexo MTB
28		1300				
17		789	1475	T1		Complexo MTB
17		839				Complexo MTB
17		932				Complexo MTB
17		934				Complexo MTB
17		209	64	LAM6	MTB	
28		1401				Complexo MTB
112		79	177	LAM9	MTB	

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		2			MTB	Complexo MTB
17		508	1475	T1		
17		757	1475	T1		
17		758	393	T1		
17		762	1166	T1		
17		949				
17		961				
17		967				
17		1422				Complexo MTB
17		431	64	LAM6	MTB	Complexo MTB
17		1123				Complexo MTB
23		346	20	LAM1	MTB	Complexo MTB
17		429	42	LAM9	MTB	
17		430		??		Complexo MTB
17		539	42	LAM9		Complexo MTB
17		1157				Complexo MTB
23		550	50	H3		
17		705		??		
23		155			MTB	Complexo MTB
23		1085				Complexo MTB
104		444	53	T1	MTB	Complexo MTB
11		460	53	T1		Complexo MTB
28		332			MTB	
17		111	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		131				Complexo MTB
17		137		?		Complexo MTB
23		149	42	LAM9		Complexo MTB
17		173	42	LAM9		
17		298		?		Complexo MTB
17		316	42	LAM9		Complexo MTB
17		335	93	LAM5		Complexo MTB
17		343	42	LAM9		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		382	33	LAM3		Complexo MTB
17		386	720	U		Complexo MTB
104		389	33	LAM3		Complexo MTB
28		706		??		
17		781	17	LAM2		Complexo MTB
23		857		LAM2		Complexo MTB
17		214		?	MTB	Complexo MTB
23		604	317	T2		Complexo MTB
23		631		??		Complexo MTB
17		665		??		Complexo MTB
17		246		?	MTB	
17		623		??		Complexo MTB
17		663		?		
17		1250	216	LAM9		Complexo MTB
17		1270	216	LAM9		Complexo MTB
17		236		?		Complexo MTB
17		324		?	MTB	Complexo MTB
28		699	33	LAM3		Complexo MTB
23		980	50	H3		Complexo MTB
23		1008				Complexo MTB
17		862				Complexo MTB
17		1143				Complexo MTB
17		1237	777	H4		Complexo MTB
17		881	1241	U		Complexo MTB
17		913	1241	U		Complexo MTB
17		927	1241	U		Complexo MTB
17		1076				
17		1298				Complexo MTB
17		1319				Complexo MTB
17		483	64	LAM6		
17		538				
15		563	64	LAM6		Complexo MTB

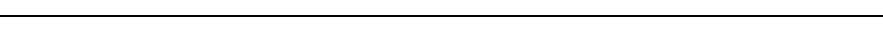
Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		685	42	LAM9		Complexo MTB
17		896				Complexo MTB
17		768		?		Complexo MTB
23		1380				Complexo MTB
17		78	73	T2-T3		Complexo MTB
17		713	58	T5_MAD2		Complexo MTB
17		895	457	H3		Complexo MTB
17		816		??		Complexo MTB
17		975	47	H1		Complexo MTB
11		1141				Complexo MTB
17		1112	33	LAM3		
17		1115		?		Complexo MTB
17		1219	33	LAM3		Complexo MTB
11		1086				
23		697		??		Complexo MTB
23		973		??		Complexo MTB
23		974		??		
17		1254	53	T1		Complexo MTB
23		157	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		28	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		1174				
17		750		??		Complexo MTB
17		797		??		Complexo MTB
17		808		??		Complexo MTB
17		908		??		Complexo MTB
17		988	50	H3		Complexo MTB
23		555		?		Complexo MTB
28		1369				Complexo MTB
104		297	655	H3		Complexo MTB
23		216	20	LAM1	MTB	Complexo MTB
112		1313				
17		1014				Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		1032				Complexo MTB
17		1208	105	U		Complexo MTB
17		1287	105	U		
17		925		?		Complexo MTB
17		1097		??		Complexo MTB
17		1255		??		Complexo MTB
104		170			MTB	
23		279				
23		619	1475	T1		
28		1249	20	LAM1		Complexo MTB
28		1424				Complexo MTB
17		274	60	LAM4	MTB	Complexo MTB
23		10	157	T3	MTB	Complexo MTB
17		15	65	T1	MTB	Complexo MTB
23		5	34	S	MTB	Complexo MTB
23		12	34	S	MTB	Complexo MTB
23		77	34	S		Complexo MTB
23		305				Complexo MTB
110		331	1176	LAM9		Complexo MTB
17		33			MTB	Complexo MTB
11		529	137	X2		Complexo MTB
17		1162		?		
17		1236		?		Complexo MTB
28		319	50	H3		Complexo MTB
17		458	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
28		1065				
17		37	50	H3	MTB	Complexo MTB
11		151			MTB	Complexo MTB
104		1063	47	H1		Complexo MTB
28		812	42	LAM9		Complexo MTB
28		669		?		Complexo MTB
17		1049				Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		1387				Complexo MTB
28		553	50	H3		Complexo MTB
23		659	375	LAM5		Complexo MTB
17		1068				Complexo MTB
17		821		??		Complexo MTB
17		825		??		Complexo MTB
17		826		??		Complexo MTB
17		832		??		Complexo MTB
104		1139				Complexo MTB
104		1222	50	H3		Complexo MTB
17		1144	764	H3		Complexo MTB
17		1406				
23		1054				Complexo MTB
23		1294				Complexo MTB
17		1093				
23		1167	1176	LAM9		
17		1268				Complexo MTB
23		572	17	LAM2	MTB	Complexo MTB
23		581	17	LAM2		Complexo MTB
17		875	245	T1		Complexo MTB
17		1280				Complexo MTB
17		455	1610	LAM6	MTB	Complexo MTB
17		495	1610	LAM6		Complexo MTB
23		518	1610	LAM6		
23		527	1610	LAM6		Complexo MTB
23		543		?		Complexo MTB
23		551	1610	LAM6		Complexo MTB
23		675	1610	LAM6		Complexo MTB
23		365		?	MTB	Complexo MTB
23		378		?		Complexo MTB
23		391	47	H1		
23		400	47	H1		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		402	47	H1		Complexo MTB
17		593	47	H1		Complexo MTB
17		595	47	H1		Complexo MTB
104		1190				
11		1227				Complexo MTB
17		1396				Complexo MTB
23		533		??	MTB	Complexo MTB
17		575		??		
17		618		??		Complexo MTB
17		661		??		Complexo MTB
112		1312		?		Complexo MTB
11		561	1321	LAM1-LAM4	MTB	Complexo MTB
17		512		??		Complexo MTB
23		1359				
17		1130				Complexo MTB
17		1175	60	LAM4		Complexo MTB
28		782	105	U		Complexo MTB
112		1151	39	T4-CEU1		Complexo MTB
17		1146		?		Complexo MTB
17		1376				Complexo MTB
23		147		?	MTB	Complexo MTB
23		1138				
17		1152		?		Complexo MTB
17		1180				Complexo MTB
17		1203				Complexo MTB
23		1248		??		Complexo MTB
17		456		?	MTB	Complexo MTB
28		220	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		393	47	H1	MTB	Complexo MTB
17		395	47	H1		Complexo MTB
23		434	47	H1		
17		814		?		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
28		548	167	T1		Complexo MTB
112		1343				Complexo MTB
17		792	50	H3		Complexo MTB
17		834	50	H3		Complexo MTB
23		855	50	H3		Complexo MTB
17		1253		?		Complexo MTB
23		196			MTB	Complexo MTB
23		174				
23		313				Complexo MTB
23		341	52	T2		Complexo MTB
17		1191				
17		223	1106	LAM9	MTB	Complexo MTB
23		486	20	LAM1	MTB	Complexo MTB
17		509	435	LAM9		Complexo MTB
17		673	435	LAM9		Complexo MTB
17		765	435	LAM9		Complexo MTB
17		954	435	LAM9		Complexo MTB
17		679	435	LAM9		Complexo MTB
17		684	435	LAM9		Complexo MTB
17		1124		?		Complexo MTB
17		1171				Complexo MTB
104		472	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		882	17	LAM2		Complexo MTB
17		887				Complexo MTB
17		918	17	LAM2		Complexo MTB
17		1023				Complexo MTB
17		1336				
110		323			MTB	Complexo MTB
17		1066				Complexo MTB
17		1368				Complexo MTB
23		16	54	MAMU2		Complexo MTB
23		1358				

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
70		487				Complexo MTB
23		1301	60	LAM4		Complexo MTB
17		734				Complexo MTB
17		983				
17		984				
23		1228				Complexo MTB
28		1261				Complexo MTB
17		521	33	LAM3		Complexo MTB
17		541	33	LAM3		Complexo MTB
11		1410				Complexo MTB
17		74	73	T2-T3		Complexo MTB
17		4			MTB	
17		34	37	T3	MTB	Complexo MTB
17		40	73	T2-T3	MTB	Complexo MTB
23		73	73	T2-T3		Complexo MTB
23		96	73	T2-T3		Complexo MTB
23		68	73	T2-T3	MTB	Complexo MTB
23		49	47	H1	MTB	
23		672	17	LAM2		Complexo MTB
23		710	17	LAM2		Complexo MTB
23		898		??		
17		102	1321	LAM1-LAM4	MTB	Complexo MTB
17		688	828	LAM4		Complexo MTB
17		741	828	LAM4		
17		859	828	LAM4		Complexo MTB
17		997				Complexo MTB
17		1044				
17		723	828	LAM4		Complexo MTB
17		566	20	LAM1	MTB	Complexo MTB
17		630	20	LAM1		Complexo MTB
23		146		?		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
112		876				Complexo MTB
103		205	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
28		1201				Complexo MTB
23		1277				
23		183		?	MTB	Complexo MTB
23		285		??		Complexo MTB
17		340				Complexo MTB
23		349	176	LAM5		Complexo MTB
23		351				Complexo MTB
17		921	50	H3		Complexo MTB
17		923	50	H3		Complexo MTB
17		1015				Complexo MTB
17		1330				Complexo MTB
17		1357				Complexo MTB
17		238		?	MTB	Complexo MTB
23		307				Complexo MTB
17		263				Complexo MTB
17		265				Complexo MTB
17		171				
28		328				Complexo MTB
17		190				
17		193				
27		1077				
28		1412				Complexo MTB
23		1140				
17		1408				
23		691	47	H1		Complexo MTB
23		730	47	H1		Complexo MTB
23		748	47	H1		Complexo MTB
17		892	47	H1		Complexo MTB
23		994	42	LAM9		Complexo MTB
23		996	828	LAM4		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		105		?		Complexo MTB
17		135				Complexo MTB
17		1135				
28		344	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
23		970				Complexo MTB
17		1204				Complexo MTB
17		1266				Complexo MTB
17		482	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
23		703	50	H3		Complexo MTB
17		363	358	T1	MTB	Complexo MTB
17		384		?		Complexo MTB
17		471		?		Complexo MTB
17		570	137	X2		Complexo MTB
17		578	137	X2		
17		588	137	X2		Complexo MTB
28		589	137	X2		Complexo MTB
27		347	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		405	176	LAM5	MTB	Complexo MTB
23		445		??		Complexo MTB
17		450		??		Complexo MTB
17		478	176	LAM5		Complexo MTB
23		443	93	LAM5		Complexo MTB
23		496	176	LAM5		Complexo MTB
23		517	176	LAM5		Complexo MTB
23		535	176	LAM5		Complexo MTB
10		278				não tem amostra
23		666	20	LAM1		Complexo MTB
104		410	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		419	42	LAM9		Complexo MTB
17		1234	50	H3		Complexo MTB
17		1235	50	H3		
17		693	1284	T1		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		709	1284	T1		Complexo MTB
17		1000				Complexo MTB
17		690	1284	T1		Complexo MTB
23		545		??		Complexo MTB
17		751	393	T1		
17		770	1475	T1		
17		777	53	T1		
17		780				Complexo MTB
112		945				
17		968	4	LAM3 and S/convergent		
17		998	42	LAM9		
17		415	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
23		380	211	LAM3	MTB	Complexo MTB
114		371		?		Complexo MTB
23		1232	42	LAM9		Complexo MTB
17		1314				Complexo MTB
23		774	53	T1		Complexo MTB
23		80			MTB	Complexo MTB
23		156			MTB	Complexo MTB
23		657	53	T1		
11		1356				Complexo MTB
17		1278				Complexo MTB
17		1282				Complexo MTB
23		1037				Complexo MTB
23		1403				
17		422	1475	T1	MTB	
17		424	1475	T1		
17		451				
17		499				
17		670		??		
17		738	1426	T3		Complexo MTB

Espécie	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		1113	52	T2		
17		1121	52	T2		Complexo MTB
17		1134				Complexo MTB
23		1239	53	T1		Complexo MTB
23		1388				Complexo MTB
23		830	42	LAM9		Complexo MTB
11		1297				
10		115		?	MTB	Complexo MTB
17		979				Complexo MTB
17		725	4	LAM3 and S/convergent		Complexo MTB
17		907				Complexo MTB
17		1213	64	LAM6		Complexo MTB
23		1109	64	LAM6		
23		87	179	LAM2	MTB	Complexo MTB
17		255	177	LAM9	MTB	Complexo MTB
23		221	34	S	MTB	Complexo MTB
23		124		?	MTB	Complexo MTB
23		141				Complexo MTB
17		1045				Complexo MTB
17		1046				Complexo MTB
17		1378				Complexo MTB
23		993	47	H1		Complexo MTB
17		3			MTB	Complexo MTB
17		17		??	MTB	Complexo MTB
17		18		??	MTB	Complexo MTB
23		651	47	H1		Complexo MTB
23		1233		?		Complexo MTB
17		1290				Complexo MTB
17		1292				Complexo MTB
17		1328				
17		1101	34	S		

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17	[Yellow bar]	1276				Complexo MTB
112	[Yellow bar]	1165				Complexo MTB
23	[Patterned bar]	224		?	MTB	Complexo MTB
23	[Patterned bar]	120		?	MTB	Complexo MTB
17	[Yellow bar]	879				
17	[Yellow bar]	910				Complexo MTB
17	[Yellow bar]	914				
17	[Yellow bar]	924				
17	[Yellow bar]	926				
17	[Yellow bar]	1095				
17	[Yellow bar]	1106				
11	[Patterned bar]	364		?	MTB	Complexo MTB
17	[Patterned bar]	956	53	T1		Complexo MTB
17	[Patterned bar]	963	53	T1		Complexo MTB
17	[Patterned bar]	418	1758	U	MTB	Complexo MTB
17	[Patterned bar]	448	1758	U		Complexo MTB
17	[Yellow bar]	1133				Complexo MTB
17	[Patterned bar]	1172		?		Complexo MTB
112	[Patterned bar]	707		??		
70	[Patterned bar]	733		??		
17	[Yellow bar]	267			MTB	
17	[Yellow bar]	273				
6	[Yellow bar]	312				
28	[Patterned bar]	1311	93	LAM5		Complexo MTB
17	[Patterned bar]	67	64	LAM6	MTB	Complexo MTB
23	[Green patterned bar]	559	50	H3		Complexo MTB
104	[Orange patterned bar]	577	50	H3	MTB	Complexo MTB
23	[Yellow bar]	1006				Complexo MTB
11	[Yellow bar]	1325				Complexo MTB
104	[Yellow bar]	1333				Complexo MTB
11	[Red patterned bar]	1108	293	H3		
17	[Patterned bar]	1229	1284	T1		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		590	17	LAM2		Complexo MTB
17		641	17	LAM2		Complexo MTB
23		1394				
17		374				Complexo MTB
23		823	18	X2		Complexo MTB
23		829	18	X2		Complexo MTB
104		586	1475	T1		Complexo MTB
17		375	17	LAM2	MTB	Complexo MTB
17		477	17	LAM2		Complexo MTB
17		540	17	LAM2		Complexo MTB
17		571	17	LAM2		Complexo MTB
17		573		LAM2		
17		599	1337	LAM9		Complexo MTB
17		681	17	LAM2		Complexo MTB
17		370				Complexo MTB
17		633	17	LAM2		
17		639	17	LAM2		Complexo MTB
27		348		?		Complexo MTB
23		396				
17		417	33	LAM3		Complexo MTB
17		433	33	LAM3	MTB	Complexo MTB
17		528	33	LAM3		Complexo MTB
17		546	33	LAM3		Complexo MTB
17		547	1475	T1		Complexo MTB
17		558	33	LAM3		Complexo MTB
17		562	33	LAM3		Complexo MTB
17		272	50	H3		Complexo MTB
17		1126	1706	LAM9		
17		1176				Complexo MTB
17		1247	42	LAM9		Complexo MTB
23		226	50	H3	MTB	Complexo MTB
23		232	50	H3	MTB	Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		301		?	MTB	Complexo MTB
23		345	50	H3	MTB	Complexo MTB
17		1005				
17		1007				
11		397	42	LAM9		Complexo MTB
23		20	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		1161	1284	T1		
112		727	64	LAM6		
112		747	64	LAM6		Complexo MTB
23		1088				
112		800	42	LAM9		
17		1129				Complexo MTB
17		206	50	H3	MTB	Complexo MTB
17		208	50	H3	MTB	Complexo MTB
17		401	50	H3		Complexo MTB
17		479	50	H3		Complexo MTB
17		568	50	H3		Complexo MTB
17		625	50	H3		Complexo MTB
17		628	50	H3		Complexo MTB
17		635	50	H3		Complexo MTB
17		662	50	H3		
23		253	53	T1	MTB	Complexo MTB
23		712	60	LAM4		Complexo MTB
17		717	1475	T1		
17		719	53	T1		Complexo MTB
17		787	53	T1		Complexo MTB
17		790	53	T1		Complexo MTB
17		799	53	T1		Complexo MTB
17		837	53	T1		Complexo MTB
17		938	53	T1		Complexo MTB
17		1012				Complexo MTB
17		1020				Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		388	20	LAM1	MTB	Complexo MTB
17		474	20	LAM1	MTB	Complexo MTB
11		861				Complexo MTB
23		1192				
112		1286	42	LAM9		Complexo MTB
17		1244	42	LAM9		Complexo MTB
17		1284	42	LAM9		Complexo MTB
17		1158	1367	LAM5		
17		1183				
23		1347				Complexo MTB
17		1168				Complexo MTB
17		1051	50	H3		Complexo MTB
17		1417				
23		1295				Complexo MTB
104		249	42	LAM9		Complexo MTB
112		1256				Complexo MTB
17		1308				
17		716	1475	T1		
23		35				
17		310				
17		612				
17		1299				
17		1350				
17		293		?		Complexo MTB
11		320	1710	LAM4		Complexo MTB
23		368		?		Complexo MTB
17		373	33	LAM3		Complexo MTB
17		891	58	T5_MAD2		Complexo MTB
23		972		??		Complexo MTB
17		1189				
28		1221	119	X1		Complexo MTB
17		702		?		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
28		169		?		Complexo MTB
28		172		?		Complexo MTB
17		708	20	LAM1		Complexo MTB
17		718	20	LAM1		Complexo MTB
17		731	20	LAM1		Complexo MTB
17		737	20	LAM1		Complexo MTB
17		785	20	LAM1		Complexo MTB
17		865	20	LAM1		Complexo MTB
17		992				Complexo MTB
17		915		?		Complexo MTB
28		1346				Complexo MTB
112		756	50	H3		Complexo MTB
112		759	50	H3		Complexo MTB
17		715	64	LAM6		Complexo MTB
17		227	47	H1		Complexo MTB
17		1392				Complexo MTB
17		369		?		Complexo MTB
23		454	42	LAM9		Complexo MTB
17		1230	68	T5		Complexo MTB
104		1016				Complexo MTB
11		1281				Complexo MTB
17		1263	431	H1		Complexo MTB
17		1265	431	H1		Complexo MTB
23		1329				Complexo MTB
17		408	62	H1		Complexo MTB
17		411	62	H1		Complexo MTB
17		1157	46	U(likely H)		Complexo MTB
17		1081				Complexo MTB
17		88	64	LAM6		
23		682	50	H3		Complexo MTB
17		1214				Complexo MTB
17		1425				Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		810	42	LAM9		Complexo MTB
17		240	33	LAM3		Complexo MTB
17		399	42	LAM9		Complexo MTB
17		828	47	H1		Complexo MTB
23		818	47	H1		Complexo MTB
112		560	47	H1		Complexo MTB
112		523	47	H1		Complexo MTB
28		788	93	LAM5		Complexo MTB
28		1309				Complexo MTB
28		1326				
23		526		??		
17		1091	17	LAM2		Complexo MTB
17		1210	1241	U		Complexo MTB
17		1324				Complexo MTB
17		303		??		
17		920	33	LAM3		Complexo MTB
17		1019				Complexo MTB
17		1035				Complexo MTB
17		1348				Complexo MTB
23		1411				Complexo MTB
23		1279				Complexo MTB
17		1087				Complexo MTB
17		1104	17	LAM2		
17		1273		??		Complexo MTB
23		1245				
17		1418				
23		259	106	U		Complexo MTB
17		1073				
17		1391				Complexo MTB
17		1154	42	LAM9		Complexo MTB
17		1155	42	LAM9		Complexo MTB
11		877				Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		362	531	H1		Complexo MTB
11		1			MTB	Complexo MTB
28		204		?	MTB	Complexo MTB
17		958				Complexo MTB
28		614	64	LAM6		Complexo MTB
11		650	64	LAM6		
17		803				
17		414	47	H1		Complexo MTB
17		416	42	LAM9		Complexo MTB
17		1094	50	H3		
17		1181				
17		1195				
10		286		?		Complexo MTB
17		648	47	H1		Complexo MTB
17		484	33	LAM3		Complexo MTB
17		524		?		Complexo MTB
104		256		?		
17		372	17	LAM2		Complexo MTB
11		315	866	LAM9		Complexo MTB
17		1159				Complexo MTB
28		1199				Complexo MTB
23		1349				Complexo MTB
23		1421				Complexo MTB
28		761	20	LAM1		Complexo MTB
17		234		??		Complexo MTB
17		234		??		Complexo MTB
28		671		??		Complexo MTB
17		211	42	LAM9		Complexo MTB
17		626	193	LAM2		Complexo MTB
17		629	17	LAM2		Complexo MTB
23		795	34	S		Complexo MTB
17		52	42	LAM9	MTB	Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		57	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		89	42	LAM9		Complexo MTB
17		928	42	LAM9		Complexo MTB
17		935	42	LAM9		Complexo MTB
17		947	42	LAM9		Complexo MTB
23		288	42	LAM9		Complexo MTB
23		342	42	LAM9		
17		350		?		Complexo MTB
17		1017				Complexo MTB
23		128				Complexo MTB
17		330	42	LAM9		Complexo MTB
23		317	42	LAM9		Complexo MTB
28		1370				Complexo MTB
17		894	50	H3		Complexo MTB
17		904	50	H3		Complexo MTB
17		977	1895	LAM4		Complexo MTB
17		990		?		Complexo MTB
17		1193				
11		481	42	LAM9		Complexo MTB
23		270	4	LAM3 and S/convergent		Complexo MTB
17		732	47	H1		
17		811	47	H1		Complexo MTB
23		842	47	H1		Complexo MTB
23		843	47	H1		Complexo MTB
23		860	47	H1		Complexo MTB
23		864	47	H1		Complexo MTB
17		931	1230	H1		
23		1038				Complexo MTB
17		177				
17		162	20	LAM1		Complexo MTB
17		178				

Espécie	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		181	1321	LAM1-LAM4		Complexo MTB
17		1405				
17		398	42	LAM9		
17		413				
17		582				Complexo MTB
17		583				
17		596				
17		598		??		
23		742		??		
28		1119		?		Complexo MTB
17		911	64	LAM6		Complexo MTB
23		1258	64	LAM6		Complexo MTB
112		827	244	T1		Complexo MTB
17		1147	1176	LAM9		Complexo MTB
17		1371				Complexo MTB
17		1083				Complexo MTB
17		1267				
17		1274				Complexo MTB
17		258				Complexo MTB
28		168				
23		880		??		Complexo MTB
17		889				Complexo MTB
23		917		??		Complexo MTB
23		943		??		Complexo MTB
17		1041				Complexo MTB
23		119		?		Complexo MTB
23		63	1528	LAM9	MTB	Complexo MTB
28		138		??		Complexo MTB
17		85	157	T3		Complexo MTB
17		94				Complexo MTB
104		784		?		Complexo MTB
17		846		?		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		722	157	T3		Complexo MTB
17		735	157	T3		Complexo MTB
17		752	157	T3		Complexo MTB
17		753	157	T3		Complexo MTB
17		776	157	T3		Complexo MTB
17		868	157	T3		Complexo MTB
17		299	50	H3		Complexo MTB
17		1420				Complexo MTB
17		1122		?		Complexo MTB
17		1128				Complexo MTB
17		1132				Complexo MTB
70		1116	73	T2-T3		Complexo MTB
17		452	64	LAM6		Complexo MTB
23		457	64	LAM6		Complexo MTB
17		459	64	LAM6		Complexo MTB
23		69	20	LAM1	MTB	Complexo MTB
17		903	378	T1		Complexo MTB
17		222	467	H3		
17		1363				Complexo MTB
17		1310				Complexo MTB
17		1296				Complexo MTB
17		66		?	MTB	Complexo MTB
17		175				
17		36	47	H1	MTB	Complexo MTB
17		38	47	H1	MTB	Complexo MTB
17		39	47	H1	MTB	Complexo MTB
23		95	47	H1		Complexo MTB
23		98	47	H1		Complexo MTB
23		122	431	H1		Complexo MTB
23		139		??		Complexo MTB
23		352				Complexo MTB
104		1241	1337	LAM9		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		198				
23		383	1337	LAM9		Complexo MTB
23		412	1337	LAM9		Complexo MTB
17		468	1337	LAM9		Complexo MTB
23		587	1337	LAM9		Complexo MTB
23		600	1337	LAM9		Complexo MTB
17		603	1337	LAM9		Complexo MTB
17		1004				Complexo MTB
17		871	33	LAM3		Complexo MTB
17		1217	33	LAM3		Complexo MTB
17		1365				Complexo MTB
17		56	177	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		8		?	MTB	Complexo MTB
17		19	177	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		44	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		114	42	LAM9		Complexo MTB
28		514	39	T4-CEU1		Complexo MTB
23		853	42	LAM9		Complexo MTB
6		144		?		Complexo MTB
17		1404				
23		213		?		Complexo MTB
17		187				
17		295				
17		271	42	LAM9		Complexo MTB
17		878				
17		152		?		Complexo MTB
17		465	50	H3		Complexo MTB
17		556	50	H3		Complexo MTB
11		404	42	LAM9		Complexo MTB
17		242	20	LAM1		Complexo MTB
23		1291				
23		912				

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		1059				Complexo MTB
23		1373				
17		490	50	H3		Complexo MTB
17		510	50	H3		Complexo MTB
17		565	50	H3		Complexo MTB
17		683	50	H3		Complexo MTB
17		953	42	LAM9		Complexo MTB
28		999	1284	T1		Complexo MTB
17		502	17	LAM2		Complexo MTB
17		511	17	LAM2		Complexo MTB
17		755	17	LAM2		Complexo MTB
17		767	17	LAM2		Complexo MTB
17		962				Complexo MTB
17		966				Complexo MTB
23		1341				
103		627				
17		1384				Complexo MTB
104		409				
17		469				
17		475				
17		957	64	LAM6		Complexo MTB
17		959	64	LAM6		Complexo MTB
17		763	64	LAM6		Complexo MTB
17		1345				
17		126	37	T3		Complexo MTB
17		134				Complexo MTB
17		143		?		Complexo MTB
17		153		?		Complexo MTB
17		186				
17		284		?		Complexo MTB
23		336				Complexo MTB
23		93		??		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		189				
17		287		?		Complexo MTB
17		302		?		Complexo MTB
23		24		??	MTB	Complexo MTB
23		104		?	MTB	Complexo MTB
23		108		??		Complexo MTB
17		360				Complexo MTB
11		849	106	U		Complexo MTB
28		233	42	LAM9		Complexo MTB
70		453		?		
11		1352				Complexo MTB
23		1355				Complexo MTB
17		1423				Complexo MTB
17		695	42	LAM9		Complexo MTB
17		736	42	LAM9		Complexo MTB
17		819	42	LAM9		Complexo MTB
17		971	58	T5_MAD2		Complexo MTB
23		721	242	T1		Complexo MTB
17		724	242	T1		Complexo MTB
17		739	242	T1		Complexo MTB
17		745	242	T1		Complexo MTB
17		836	242	T1		Complexo MTB
17		858	242	T1		Complexo MTB
17		1010				Complexo MTB
17		326		?		Complexo MTB
23		337		?		Complexo MTB
28		1058	64	LAM6		Complexo MTB
11		815	50	H3		Complexo MTB
23		441	33	LAM3		
17		1149	64	LAM6		Complexo MTB
17		1156		??		Complexo MTB
17		1084	50	H3		Complexo MTB

Espécie	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		1259	431	H1		Complexo MTB
17		937	194	LAM2-LAM4		Complexo MTB
112		1285	194	LAM2-LAM4		Complexo MTB
17		617	50	H3		Complexo MTB
17		1125				Complexo MTB
17		1169				Complexo MTB
17		817	64	LAM6		Complexo MTB
17		824	64	LAM6		Complexo MTB
17		831	64	LAM6		Complexo MTB
23		972		??		Complexo MTB
104		642	42	LAM9		Complexo MTB
17		241	119	X1		Complexo MTB
28		1397				Complexo MTB
17		845	746	H3		Complexo MTB
17		884	746	H3		Complexo MTB
17		1031				Complexo MTB
17		1034				Complexo MTB
17		1039				Complexo MTB
17		333	1241	U		Complexo MTB
11		1072				Complexo MTB
17		406	20	LAM1		Complexo MTB
17		772	53	T1		Complexo MTB
17		942				Complexo MTB
17		148	50	H3		Complexo MTB
17		1001				Complexo MTB
23		771	42	LAM9		
23		1416				Complexo MTB
23		1383				
23		473	157	T3		Complexo MTB
28		354				Complexo MTB
28		607	53	T1		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		1206				Complexo MTB
23		664	53	T1		
23		574	1580	T1		Complexo MTB
23		645	64	LAM6		Complexo MTB
112		1002				Complexo MTB
23		656	1176	LAM9		Complexo MTB
17		237				Complexo MTB
17		793	137	X2		Complexo MTB
23		833	137	X2		Complexo MTB
23		866		?		
23		885	137	X2		Complexo MTB
17		930		?		Complexo MTB
23		1022				Complexo MTB
23		1030				Complexo MTB
23		1033				Complexo MTB
17		769	137	X2		Complexo MTB
17		890	137	X2		Complexo MTB
23		700				
28		720	1475	T1		
17		1029				
17		1036				
17		1223	33	LAM3		Complexo MTB
17		1226		?		Complexo MTB
23		257	4	LAM3 and S/convergent		Complexo MTB
17		7	741	H3	MTB	Complexo MTB
17		21	741	H3	MTB	Complexo MTB
17		195				Complexo MTB
17		215	64	LAM6		Complexo MTB
112		686	33	LAM3		Complexo MTB
112		696	33	LAM3		Complexo MTB
112		893	33	LAM3		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
112		900				Complexo MTB
28		901		?		Complexo MTB
17		23	741	H3	MTB	Complexo MTB
17		46	741	H3	MTB	Complexo MTB
17		58	741	H3	MTB	Complexo MTB
17		179				
11		283	42	LAM9		Complexo MTB
104		296	42	LAM9		Complexo MTB
17		507	4	LAM3 and S/convergent		Complexo MTB
17		960	4	LAM3 and S/convergent		Complexo MTB
17		969	50	H3		Complexo MTB
17		1317				Complexo MTB
104		1320				Complexo MTB
17		1327				Complexo MTB
17		1332				Complexo MTB
17		1047				Complexo MTB
17		1048				Complexo MTB
17		1419				
23		260	92	X3		Complexo MTB
23		1166		?		Complexo MTB
28		164		?		Complexo MTB
28		1224		??		
17		182	42	LAM9		Complexo MTB
17		197	42	LAM9		Complexo MTB
17		212	42	LAM9		Complexo MTB
17		291	42	LAM9		Complexo MTB
17		308	42	LAM9		Complexo MTB
17		309	1706	LAM9		Complexo MTB
17		339				
17		655	42	LAM9		Complexo MTB
17		1185	42	LAM9		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		1367				Complexo MTB
17		1251	1337	LAM9		Complexo MTB
11		995	53	T1		Complexo MTB
17		45	268	H3	MTB	Complexo MTB
23		47	268	H3	MTB	Complexo MTB
17		55		?	MTB	Complexo MTB
17		694	47	H1		Complexo MTB
17		976	50	H3		Complexo MTB
11		1089	50	H3		
104		1321				Complexo MTB
104		428	34	S		Complexo MTB
11		1092	402	U		
17		30	33	LAM3	MTB	Complexo MTB
28		515	137	X2	MTB	Complexo MTB
28		525	60	LAM4		Complexo MTB
23		1082				Complexo MTB
17		1334				Complexo MTB
17		247	64	LAM6		Complexo MTB
17		248	64	LAM6		Complexo MTB
17		282	64	LAM6		Complexo MTB
17		290		?		Complexo MTB
17		294		?		Complexo MTB
17		322	64	LAM6		Complexo MTB
17		492		??		Complexo MTB
17		494				Complexo MTB
17		497		??		Complexo MTB
17		522		??		Complexo MTB
17		542		??		Complexo MTB
17		667		??		Complexo MTB
23		254	64	LAM6		Complexo MTB
28		516		?		Complexo MTB
3		325	47	H1		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		200				Complexo MTB
17		277		?		Complexo MTB
28		1304				
17		449	60	LAM4		Complexo MTB
17		519	42	LAM9		Complexo MTB
17		537		?		Complexo MTB
17		1079				Complexo MTB
17		1067				Complexo MTB
17		1120				Complexo MTB
17		1216		?		Complexo MTB
17		1218		?		Complexo MTB
104		338	39	T4-CEU1		Complexo MTB
17		1302				Complexo MTB
17		1366				Complexo MTB
23		91	47	H1		Complexo MTB
23		1080				Complexo MTB
17		1151	39	T4-CEU1		Complexo MTB
17		897		?		Complexo MTB
23		991	1176	LAM9		Complexo MTB
23		1398				Complexo MTB
23		766	50	H3		Complexo MTB
17		1137				
17		1243	33	LAM3		Complexo MTB
23		1395				Complexo MTB
17		1053	17	LAM2		
17		1074				
17		1110	17	LAM2		
112		1390				Complexo MTB
112		130				Complexo MTB
17		356				Complexo MTB
23		387		?		Complexo MTB
17		466	51	T1		Complexo MTB

Espécie	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
28		304				Complexo MTB
112		1342				Complexo MTB
17		498	17	LAM2		Complexo MTB
17		513	17	LAM2		Complexo MTB
17		1252				Complexo MTB
17		1160	1176	LAM9		Complexo MTB
17		1240	42	LAM9		Complexo MTB
17		1179				
17		1315				
17		740				Complexo MTB
17		746	702	EAI5		Complexo MTB
17		802	702	EAI5		Complexo MTB
17		806	702	EAI5		Complexo MTB
17		1096	111	LAM3		
17		1182				
17		1225	105	U		Complexo MTB
23		1260	33	LAM3		Complexo MTB
17		852	20	LAM1		Complexo MTB
17		854	20	LAM1		Complexo MTB
23		941	20	LAM1		Complexo MTB
23		1021				Complexo MTB
23		621	50	H3		Complexo MTB
11		1003				Complexo MTB
104		163	33	LAM3		Complexo MTB
23		176				
104		640	33	LAM3		Complexo MTB
114		269				Complexo MTB
17		728	50	H3		
17		744	50	H3		Complexo MTB
23		786	50	H3		Complexo MTB
17		813	50	H3		Complexo MTB
23		835	50	H3		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		982				Complexo MTB
17		986				Complexo MTB
17		773	53	T1		Complexo MTB
17		840	53	T1		Complexo MTB
17		844	53	T1		Complexo MTB
23		244		??		Complexo MTB
23		1415				Complexo MTB
17		381		?		Complexo MTB
17		110				Complexo MTB
17		783	50	H3		Complexo MTB
17		867	50	H3		Complexo MTB
17		916	50	H3		Complexo MTB
17		936	50	H3		Complexo MTB
23		944	50	H3		Complexo MTB
23		1018				Complexo MTB
23		1026				Complexo MTB
23		660	50	H3		Complexo MTB
23		90		?		
17		145	64	LAM6		Complexo MTB
23		150	64	LAM6		Complexo MTB
17		83	64	LAM6	MTB	Complexo MTB
28		185				
17		275	20	LAM1		Complexo MTB
112		1050				Complexo MTB
70		1111	92	X3		
70		1114				
23		807	42	LAM9		Complexo MTB
17		442	73	T2-T3		Complexo MTB
23		485	73	T2-T3		Complexo MTB
17		54	42	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		726	402	U		Complexo MTB
17		809	402	U		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		86	42	LAM9		Complexo MTB
17		101	42	LAM9		Complexo MTB
23		127	42	LAM9		Complexo MTB
17		615	42	LAM9		Complexo MTB
17		432	53	T1		Complexo MTB
23		13			MTB	Complexo MTB
17		1207				
23		390	168	H3		Complexo MTB
17		964				
23		674	102	T1		
11		1361				Complexo MTB
17		327	34	S		Complexo MTB
17		1399				
23		955	64	LAM6		
17		1142				Complexo MTB
23		361				Complexo MTB
17		379		?		Complexo MTB
17		22	1337	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		29	1337	LAM9	MTB	Complexo MTB
17		99	1337	LAM9		Complexo MTB
23		851	42	LAM9		Complexo MTB
17		488		??		Complexo MTB
17		491		??		Complexo MTB
17		520		?		Complexo MTB
17		668		??		Complexo MTB
17		950				Complexo MTB
17		965		?		Complexo MTB
23		435	50	H3		Complexo MTB
11		1061		?		Complexo MTB
104		1275				
114		366				Complexo MTB
17		933				

Espécie	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		1043				
112		188				
17		1200				
112		1272	2	H2		Complexo MTB
17		1389				Complexo MTB
23		1212	2	H2		Complexo MTB
11		367				Complexo MTB
17		440	52	T2		Complexo MTB
104		873	1241	U		Complexo MTB
11		1362				Complexo MTB
17		1145				Complexo MTB
17		1238				
28		534	53	T1		Complexo MTB
23		978	4	LAM3 and S/convergent		Complexo MTB
28		1070				Complexo MTB
27		1164				
17		219	64	LAM6		Complexo MTB
17		252		?		Complexo MTB
17		276		??		Complexo MTB
17		280	1227	T5_MAD2		
17		281	176	LAM5		Complexo MTB
17		636	176	LAM5		Complexo MTB
17		644	176	LAM5		Complexo MTB
17		652	176	LAM5		Complexo MTB
17		653	176	LAM5		Complexo MTB
17		425	53	T1		
17		42	17	LAM2	MTB	Complexo MTB
23		62		?	MTB	Complexo MTB
17		75	17	LAM2		Complexo MTB
17		81	17	LAM2		Complexo MTB
17		117				Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		140		?		Complexo MTB
11		1075				
23		704		??		
17		1131				Complexo MTB
17		1173				
17		624	42	LAM9		Complexo MTB
17		634	42	LAM9		Complexo MTB
17		638	42	LAM9		
17		654	42	LAM9		Complexo MTB
17		778	132	U		Complexo MTB
17		779	132	U		Complexo MTB
17		841	132	U		Complexo MTB
17		847	132	U		Complexo MTB
28		1338				Complexo MTB
17		1194				
17		6			MTB	Complexo MTB
17		14			MTB	Complexo MTB
23		701		??		Complexo MTB
23		905		?		Complexo MTB
23		1426				Complexo MTB
112		989	50	H3		Complexo MTB
112		1090				
11		798		??		Complexo MTB
23		1136				
23		1242		?		Complexo MTB
17		1305				Complexo MTB
23		1409				Complexo MTB
17		1372				Complexo MTB
17		870	378	T1		
17		243	179	LAM2		Complexo MTB
23		580	179	LAM2		Complexo MTB
23		591	179	LAM2		Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
23		647	179	LAM2		Complexo MTB
23		658	17	LAM2		Complexo MTB
23		376		?		Complexo MTB
23		791	42	LAM9		Complexo MTB
28		805	20	LAM1		Complexo MTB
17		579		??		Complexo MTB
104		210	50	H3		Complexo MTB
112		26	37	T3	MTB	Complexo MTB
104		61	17	LAM2	MTB	Complexo MTB
114		470	42	LAM9		Complexo MTB
17		919	4	LAM3 and S/convergent		
17		922				
17		952				
17		929		?		
17		1028				
17		1337				
17		109		?		Complexo MTB
17		142				Complexo MTB
17		436		?		Complexo MTB
23		403	17	LAM2		Complexo MTB
17		437	17	LAM2		Complexo MTB
17		447		?		Complexo MTB
17		463	42	LAM9		Complexo MTB
17		549	17	LAM2		Complexo MTB
17		392		?		
23		51			MTB	Complexo MTB
28		76			MTB	Complexo MTB
23		103	50	H3		Complexo MTB
17		1013				Complexo MTB
17		1393				
23		1306				Complexo MTB

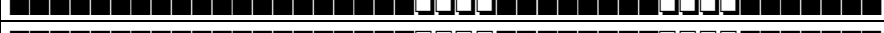
17		637	39	T4-CEU1		Complexo MTB
17		643	39	T4-CEU1		Complexo MTB
23		1360				Complexo MTB
17		1100				
17		1107	1793	U		
17		1187				
17		1209		?		Complexo MTB
17		1262				
23		71	73	T2-T3	MTB	Complexo MTB
23		609	33	LAM3		Complexo MTB
17		355				Complexo MTB
23		245		?		Complexo MTB
28		41	193	LAM2	MTB	Complexo MTB
28		1364				Complexo MTB
23		203		?	MTB	Complexo MTB
17		646		??		Complexo MTB
17		649		??		Complexo MTB
11		1374				Complexo MTB
23		1385				Complexo MTB
28		31		?	MTB	Complexo MTB
17		106		?		Complexo MTB
17		121		?		Complexo MTB
23		64	17	LAM2	MTB	Complexo MTB
11		231		?		Complexo MTB
17		820		?		
103		165				
103		166				
23		1025				Complexo MTB
23		1283	467	H3		Complexo MTB
23		65		??	MTB	Complexo MTB
17		97		??		Complexo MTB
17		100		?		Complexo MTB
23		123				Complexo MTB

Espécime	Spoligotyping	amostra	Type	Descrição	MTUB	PNC A
17		1060	137	X2		Complexo MTB
17		1098				Complexo MTB
17		1099				
17		1105				
17		1148	137	X2		Complexo MTB
17		1188				
17		1078				Complexo MTB
17		1103		?		
17		714	176	LAM5		Complexo MTB
17		25			MTB	Complexo MTB
17		262	93	LAM5		Complexo MTB
17		264	17	LAM2		Complexo MTB
17		306		??		Complexo MTB
17		311				Complexo MTB
17		1323				Complexo MTB
17		1407				
23		1102	64	LAM6		
34		1318				Complexo MTB
104		1322				Complexo MTB
17		1331				Complexo MTB
23		207		?		Complexo MTB
23		801	47	H1		Complexo MTB
17		1413				
23		711	50	H3		
23		981	50	H3		Complexo MTB
17		1339				
17		1069				Complexo MTB
17		1427				Complexo MTB
17		899	?	?		Complexo MTB
		72				
		268				

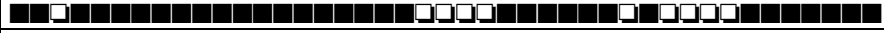
APÊNDICE B

APÊNDICE B. Famílias identificadas pelo spoligotyping nos isolados do Estado do Ceará.

Perfil spoligotyping	amostra	Type	Descrição	Bairro
	203	53	T1	Pq. Novo Mondubim - Fortaleza
	212	53	T1	Mondubim
	167	51	T1	
	18	50	H3	Cj João Paulo III
	20	50	H3	
	21	50	H3	Granja Portugal
	58	50	H3	Barra do Ceará
	68	50	H3	Aerolândia
	103	50	H3	Bom Jardim
	126	50	H3	
	132	50	H3	Chorozinho - Chorozinho
	160	50	H3	Parquelândia - Fortaleza
	164	50	H3	Aerolândia
	185	50	H3	Bom jardim
	187	50	H3	Mucuripe
	196	50	H3	Serrinha
	202	50	H3	Jaçanaú
	226	50	H3	Messejana
	233	50	H3	Aerolândia
	238	50	H3	Cj Palmeiras
	193	50	H3	João XXIII
	201	50	H3	Parquelândia - Fortaleza
	176	237	U(Likely H3)	Novo Oriente - Novo Oriente
	1	236	EAI5	Cajazeiras
	195	236	EAI5	Pe. Andrade
	22	1060	T1	Messejana
	8	47	H1	J. Oliveiras
	38	47	H1	Pq. Iracema
	154	47	H1	Pq. Iracema
	163	47	H1	Edson Queiroz

	166	47	H1	
	207	47	H1	Itaperi
	172	47	H1	Edson Queiroz
	39	291	T1	Ato Bezerra
	9	42	LAM9	Messejana
	23	42	LAM9	Passaré
	21	42	LAM9	Granja Portugal
	43	42	LAM9	Aracoiba
	56	42	LAM9	Serrinha
	57	42	LAM9	Praia Futuro
	66	42	LAM9	Cj Palmeiras
	67	42	LAM9	Messejana
	139	42	LAM9	Aerolândia
	140	42	LAM9	Jangurussú
	157	42	LAM9	
	159	42	LAM9	Maracanaú
	179	42	LAM9	Canindezinho
	188	42	LAM9	Cj Ceará
	194	42	LAM9	Quintino Cunha
	206	42	LAM9	Itaperi
	210	42	LAM9	
	211	42	LAM9	Mondubim
	232	42	LAM9	João XXIII
	192	42	LAM9	Serrinha
	165	60	LAM4	Maracanaú
	85	60	LAM4	Jangurussú
	152		2X	São Gerardo
	19	64	LAM6	Barra do Ceará
	33	64	LAM6	Tancredo Neves
	37	64	LAM6	Alto Alegre - Maracanaú
	41	64	LAM6	
	45	64	LAM6	Pq. Iracema
	49	64	LAM6	Monte Castelo

	96	1337	LAM9	Dias Macedo
	7		?	Eusébio - Eusébio
	189		??	
	190		??	Marco - Marco
	181		??	Pq. Iracema
	98	81	LAM9	Vila Pery
	110		?	Carlito Pamplona
	230		?	Henrique Jorge
	112		?	Água Fria
	113	34	S	Itaperi
	35	1536	S	Colônia
	168		?	Eusébio - Eusébio
	4	33	LAM3	Demócrito Rocha
	11	33	LAM3	Jereissati I - Maracanaú
	13	33	LAM3	Vila Pery
	90	33	LAM3	
	186	33	LAM3	Cid. Funcionários
	76	33	LAM3	Barroso
	73	33	LAM3	Pq. iracema
	74		??	Bela Vista
	36		??	Jurema - Caucaia
	3		?	
	231	105	U(LAM3?)	J. Bandeirantes
	76		?	Barroso
	77	211	LAM3	Pici
	124	211	LAM3	
	148	211	LAM3	
	234		?	Cj. Ceará
	2	822	LAM9	
	100		??	
	101		??	
	125		??	Cristo Redentor
	150		??	Cj. Ceará

	111		??	Messejana
	15	1284	T1	
	133	1284	T1	
	162	1284	T1	
	169	1284	T1	Edson Queiroz
	173	1284	T1	
	180	1284	T1	
	213	1284	T1	Planalto Pici
	217	1284	T1	Otávio Lobo - Itaitinga
	16	388	LAM9	Siqueira II
	17	388	LAM9	Dias Macedo
	54	388	LAM9	Bom Futuro
	64	388	LAM9	
	205	388	LAM9	CEMJA
	122	1621	T2-T3	Ato Bezerra
	114		?	Cj Ceará
	156		?	G. Sampaio
	61	702	EAI5	
	52	91	X3	Passaré
	62	91	X3	Bairro de Fátima
	55	20	LAM1	Siqueira
	65	20	LAM1	São Cristovão
	155	20	LAM1	Aerolândia
	199	20	LAM1	
	204	20	LAM1	
	225	20	LAM1	
	97	20	LAM1	J. Iracema
	171	20	LAM1	
	218		?	Presidente Kennedy
	197		??	Cid. Funcionários
	215		??	Maracacaú - Maracanaú
	127		??	Messejana
	143		??	Messejana

Anexos: 3; 4; 5; 6; e 7.

Anexo 3. Sequência do gene *rpoB* *M tuberculosis* com os oligos .

Atg aça gac acg acg ttg ccg cct gac gac tcg ctc gac cgg atc gaa ccg gtt gac atc gag cag gag atg cag cgc agc tac atc
 gac tat gcg atg agc gtg atc gtc ggc cgc gcg ctg ccg gag gtg cgc gac ggg ctc aag ccc gtg cat cgc cgg gtg ctc tat gca
 atg ttc gat tcc ggc ttc cgc ccg gac cgc agc cac gcc aag tcgg ccc ggt cgg ttg ccg aga cca tgg gca act acc acc cgc acg
 gcg acg cgt cga tct acg aca gcc tgg tgc gca tgg ccc agc cct ggt cgc tgc gct acc cgc tgg tgg acg gcc agg gca act tcg
 gct cgc cag gca atg acc cac cgg cgg cga tga

Sequência do gene *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis* com a localização das mutações.

ccg gtg gtc gcc gcg atc aag gag ttc ttc ggc acc agc cag ctg agc caa ttc atg gac
E. coli 503 511 513 516

cag aac aac ccg ctg tcg ggg ttg acc cac aag cgc cga ctg tcg gcg ctg ggg ccc ggc
 518 522 523 526 531 533
 GTG GAG TGC
 GAC
 CGC
 TTT (controle)
 TTG
 TGG
 CTC
 TAC
 CAA

ggg ccc ggc ggt ctg tca cgt gag cgt gcc ggg ctg gag gtc cgc gac gtg cac ccg tcg
 473.474.475.476.477.478.479.480.481.482.483.484.485.486.487.488.489.490.491.492

cac tac ggc cgg atg tgc ccg atc gaa acc cct gag ggg ccc aac atc ggt ctg atc ggc
 560 564
 GTC

Anexo 4. Sequência do gene *oxyR* de *M tuberculosis* com o nucleotídeo Guanina (G) no nucleotídeo 285, encontra-se uma Adenina (A) nessa posição em *M bovis*.

[illegible]

Anexo 5. Sequência do gene *rpoB* de *M. leprae* de 289 bp.

409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432
gtc	gag	gcg	atc	acg	ccg	cag	acg	ctg	atc	aat	atc	cgt	ccg	gtg	gtc	gcc	gct	atc	aag	gaa	ttc	ttc	ggc
433	434	435	436	437	438	439	440	441(516)	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451(526)	452	453	454	455	456(531)
acc	agc	cag	ctg	tcg	cag	ttc	atg	gat	cag	aac	aac	cct	ctg	tcg	ggc	ctg	acc	cac	aag	cgc	cgg	ctg	tcg
457	458(533)	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
gcg	ctg	ggc	ccg	ggt	ggt	ttg	tcg	cgt	gag	cgt	gcc	ggg	cta	gag	gtc	cgt	gac	gtg	cac	cct	tcg	cac	tac
481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504
ggc	cgg	atg	tgc	ccg	atc	gag	act	ccg	gag	ggc	ccg	aac	ata	ggt	ctg	atc	ggt	tca	ttg	tcg	gtg	tac	gcg
505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528
cgg	gtc	aac	ccc	ttc	ggg	ttc	atc	gaa	aca	ccg	tac	cgc	aaa	gtg	ggt	gac	ggt	gtg	gtc	agc	gac	gag	atc

Anexo 6. Sequência do gene *folP1* do *M. leprae* de 173 bp.

```

1
gtg agt ttg gcg ccagtg cagggtt att ggg gttttg aac gtc act gac aattcgt tctcagat ggc gga cgt tac ctt gat cct gac gat gct gtc cag cac
53 55
ggc ctg gca atg gtc gcg gaaggc gcggcg att gtc gac gtc ggt ggc gaatcg acc cgg ccc ggt gcc att agg acc gat cct cg agt tga act c tct cgt atc
gtt cct gtc gtaaa gaacttg cagcacagggg att acagta agt atc gat act acg cgc gct gat gtt gcacggg gcggc gct gca aag cgg gcacggat cgtc
Gtcgtgtcccc Taatgtcat <←

```

Anexo 7. Sequência do gene *gyrA* de *M. leprae* de 187 bp.

```

1   atg act gat atc acg ctg cca cca ggt gac ggt tct ata cag cgg gtt gag ccg gtc gac
61  att cag cag gaa atg cag cgc agc tat att gat tac gcg atg agt gtg att gtg ggc cgg
121 gcg ttg cct gaa gtc cgc gat ggt ctc aaa ccg gta cat cgt cgg gtc ttg tac gcg atg
181 tta gac tcc ggt ttc cgc ccc gac cgt agc cac gct aag tca gca cgg tca gtc gct gag
241 acg atg ggc aat tac cat ccg cac ggc gac gca tcg att tat gac acg tta gtg cgc atg
301 gcg cag ccg tgg tcg ctg cgg tat ccc ttg gtt gat ggg caa ggc aat ttc ggt tcg ccg
361 ggt aat gac cca ccg gca gcg atg cgttat tgtgtgtcaggaaattccttggtgaggttg

```

Anexo 8. Projeto RECHANS – FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE CASO DE RECIDIVA DE HANSENÍASE

1) N° _____ 2) UF _____ 3) U.S. atual _____ 4) U.S. trat. Inicial _____	
5) Nome: _____ 6) Pront: _____ 7) SINAN: _____	
8) D.nasc: __/__/____ 9) Sexo ☐ 10) Escolaridade: __ anos 11) Ocupação: _____	
12) Endereço: _____ 13) Tel: _____	
14) Tempo de residência: _____ 15) Residência anterior: _____	
16) N° cômodos na casa: ____ 17) Convive com hansen: N ☐ S ☐ 18) Tipo contato: _____	
19) Nome: _____ Dt diagnóstico: __/__/____	
20) Nome: _____ Dt diagnóstico: __/__/____	
21) Dt.Diag./Tto.Inicial: __/__/____ 22) FC: I ☐ T ☐ BT ☐ BB ☐ BV ☐ V ☐ FNP ☐ NC ☐	
23) G.I.Física ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ NA 24) Baciloscopia: Pos ☐ Neg ☐ NR ☐ Índice _____ NR	
25) Histopatologia: ☐ I ☐ T ☐ BT ☐ BB ☐ BV ☐ V ☐ NC ☐ NR ☐ CC 6) ILB _____	
27) Esquema de tratamento: PQT/PB 6 DS ☐ PQT/MB 12 DS ☐ DNDS+PQT ☐ DNDS ☐ Outros ☐ _____	
28) Reação hans. No tratamento: S ☐ N ☐ 29) Tipo I ☐ Tipo II ☐ Mista ☐	
30) Dt alta/cura: __/__/____ 31) GIF 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ NA ☐ 32) N° troncos nervosos afetados/alta: _____	

Pós Alta: 33) Reação S ☐ N ☐ 34) Tipo: ☐ I ☐ II ☐ mista ☐ neurite isolada

35) Dt 1ºsurto: __/__/____ 36) Dt. último surto: __/__/____

37) Tratmtto: ☐ Pred ☐ Talid ☐ P+T ☐ Outros

38) N° meses tratamento: Pred. ____ 39) Talid. ____ 40) Clofaz. ____ 41) Resposta: Boa ☐
Sem sucesso ☐ 42) Crit clínico Recidiva: S ☐ N ☐

43) Lesões: macula ☐ pápula ☐ infiltração difusa ☐ nódulos ☐ Placas infiltradas ☐
Úlceras ☐ area hipoestésica ☐ 44) Reação: S ☐ N ☐

45) Tipo: ☐ I ☐ II ☐ mista ☐ neurite isolada 46) Comp geral: S ☐ N ☐

47) GIF 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ NA ☐ 48) N° troncos nervosos afetados/alta: ____ 49) Dta últ aval: __/__/____

50) Re-Tto. PQT S ☐ N ☐ 51) Esquema terapêutico instituído: PQT/PB 6DS ☐
PQT/MB 12 DS ☐ PQT/MB 24 DS ☐ Outros _____

52) Dt diag. Recidiva __/__/____ Local diagnóstico: Própria US ☐ US de referência ☐

53) Lesões: macula ☐ pápula ☐ infiltração difusa ☐ nódulos ☐ Placas infiltradas ☐
Úlceras ☐ area hipoestésica ☐

54) FC: ☐ I ☐ T ☐ BT ☐ BB ☐ BV ☐ V ☐ NC

55) GIF 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ NA ☐

56) Reação: S ☐ N ☐

57) Tipo: ☐ I ☐ II ☐ mista ☐ neurite isolada

58) Comp geral: S ☐ N ☐

59) N troncos nervosos afetados: ____ 60) N ulnar ☐ mediano ☐ fibular ☐ T post ☐ Outros _____

61) Baciloscopia: Pos ☐ Neg ☐ NR ☐ 62) Desc. Morfol. Globias ☐ agrupados ☐
isolados ☐

63) Índice ____ NR

Íntegros ☐ fragmentados ☐

64) Histopatologia: I ☐ T ☐ BT ☐ BB ☐ BV ☐ V ☐ NC ☐ 65) Local Bióp Pele ☐
Nervo ☐

66) Descriç. Globias ☐ agrupados ☐ íntegros ☐ fragmentados ☐ isolados ☐ 67) ILB _____

68) Sorologia: 1-MLFLOW _____ 2-ELISA atual _____ 3-anterior _____ 4-posterior _____
5-NR

Data: __/__/____ Origem Teste: _____

69) Co-morbidades:

70) Sensibilidade medicamentosa-sequenciamento

rpoB	mutação	Não	Sim	Tipo
FolP1	mutation	Não	Sim	Tipo
GyrA	mutation	Não	Sim	Tipo

Obs:

Assinatura

Função

Data / /

71) Esq. De tratamento: PQT/PB 6DS ☐ PQT/MB 12 DS ☐ PQT/MB 24 DS ☐ Outros

72) Data de início de re-tratamento: ____/____/____

Avaliação clínica e neurológica 3º mês de tratamento 73) Quadro cutâneo

Melhorado ☐ inalterado ☐ piorado ☐ 74) Reação N ☐ S ☐

OBS:

Médico responsável _____ Função _____ Data
____/____/____

Avaliação clínica e neurológica 6º mês de tratamento

76) Quadro cutâneo: melhorado ☐ inalterado ☐ piorado ☐ 77) reação N ☐ S ☐ Tipo:
☐ I

II ☐ mista ☐ neurite isolada ☐

Médico responsável _____ Função _____ Data
____/____/____

Avaliação clínica e neurológica 12º mês de tratamento

78) Dt alta/cura: __/__/____ 79) GIF 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ NA ☐ 80) N° troncos nervosos
afetados: _____

81) Reação: N ☐ S ☐ Tipo: ☐ I ☐ II ☐ mista ☐ neurite isolada

Descrição de garras e seqüelas _____

82) Baciloscopia: Pos ☐ Neg ☐ NR ☐

83) Desc. Morfol. Globias ☐ agrupados

☐

isolados ☐ íntegros ☐ fragmentados ☐

84) Índice _____NR 85) Sorologia: MLFLOW

86) Quadro cutâneo: ☐ lesões residuais ☐ lesões infiltradas ☐ ulcerações ☐ garras

Médico responsável _____

Função _____

Data

____/____/____

Fig 1) Lesões início tratamento

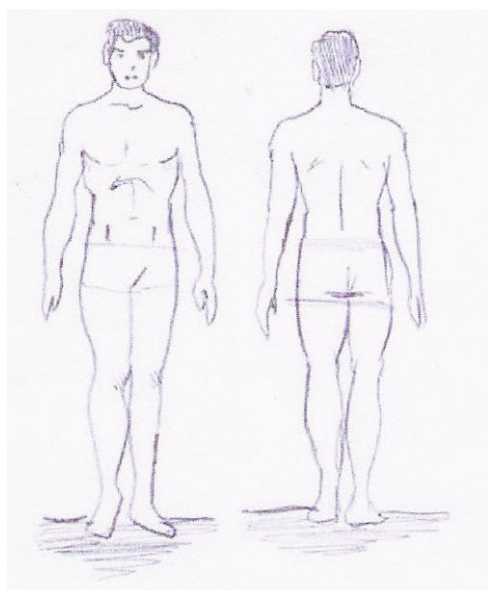


Fig 2) Final de tratamento

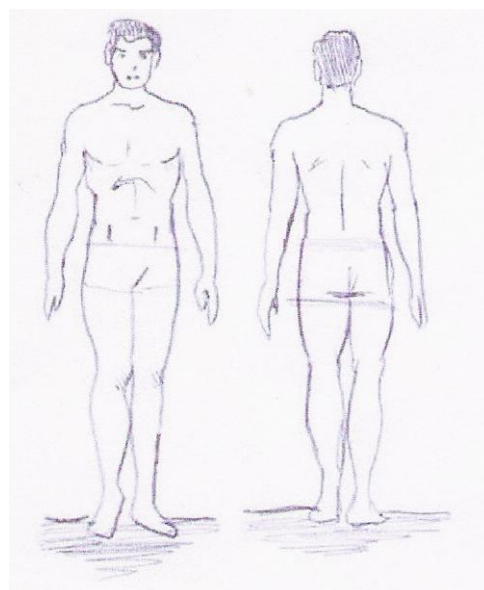


Fig 3)-Recidiva-OBS:

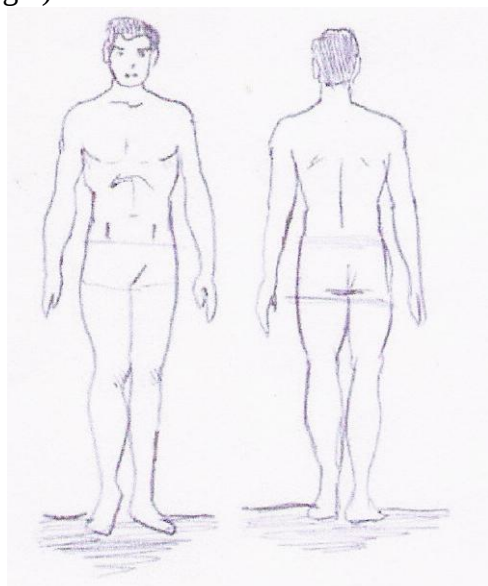
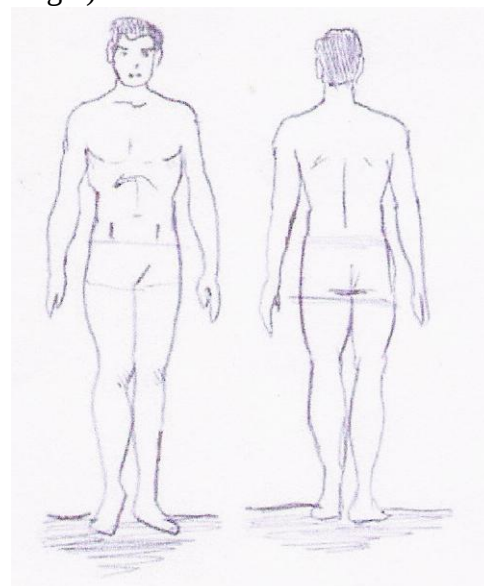


Fig 4)- Fim do re-tratamento tratamento



OBS:

Médico responsável _____ Função:

Data de preenchimento: __/__/____

FICHA DE AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA SIMPLIFICADA

Face	1ª / /		2ª / /		3ª / /	
Nariz	D	E	D	E	D	E
Queixa principal						
Ressecamento (S/N)						
Ferida (S/N)						
Perfuração de septo (S/N)						
Olhos	D	E	D	E	D	E
Queixa principal						
Fecha olhos s/força (mm)						
Fecha olhos c/força (mm)						
Triquíase (S/N) / Ectrópico (S/N)						
Dimin.sensib. córnea (S/N)						
Opacidade córnea (S/N)						
Catarata (S/N)						
Acuidade visual						

Membros Superiores	1ª / /		2ª / /		3ª / /	
Queixa principal						
Palpação dos nervos	D	E	D	E	D	E
Ulnar						
Mediano						
Radial						

Legenda: N = normal, E = espessado e D = dor

Avaliação da força	1ª / /		2ª / /		3ª / /	
	D	E	D	E	D	E
Abrir dedo mínimo Abdução do 5º dedo (nervo ulnar)						
Elevar o polegar Abdução do polegar (nervo mediano)						
Elevar o punho Extensão do punho (nervo radial)						

Legenda: F = forte, D = diminuída, P = paralisado ou 5 = forte, 4 = resistência parcial, 3 = movimento completo, 2 = movimento parcial, 1 = contração, 0 = paralisado

INSPEÇÃO E AVALIAÇÃO SENSITIVA

1ª / /		2ª / /		3ª / /	
D	E	D	E	D	E
					

Legenda: Caneta/Filamento lilás (2g) Sente ✓ Não sente ✗ ou Monofilamentos: seguir cores
Garra móvel = M, Garra rígida = R, Reabsorção = , Ferida = 

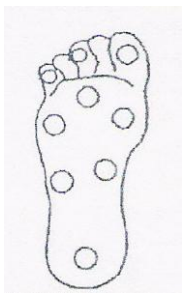
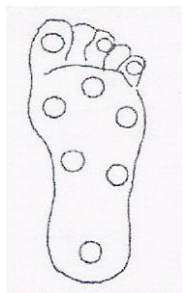
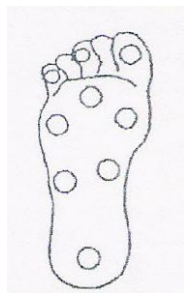
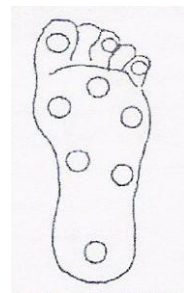
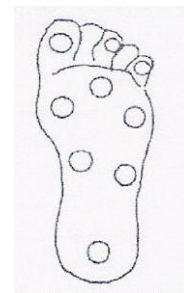
MEMBROS INFERIORES	1 ^a	/	/	2 ^a	/	/	3 ^a	/	/
Queixa principal									
Palpação de nervos	D		E	D		E	D		E
Fibular									
Tibial Posterior									

Legenda: N=normal E=espessado D=dor

Avaliação da força	1 ^a	/	/	2 ^a	/	/	3 ^a	/	/
	D		E	D		E	D		E
Elevar o hálux Extensão de hálux (nervo fibular) 									
Elevar o pé Dorsiflexão de pé (nervo fibular) 									

Legenda: F = forte, D = diminuída, P = paralisado ou 5 = forte, 4 = Resistência parcial, 3 = Movimento Completo, 2 = Movimento parcial, 1 = Contração, 0 = Paralisado

INSPEÇÃO E AVALIAÇÃO SENSITIVA

1 ^a	/	/	2 ^a	/	/	3 ^a	/	/
D		E	D		E	D		E
								

Legenda: Caneta/Filamento lilás (2g) Sente ✓ Não sente ✗ ou Monofilamentos: seguir cores
Garra móvel = M, Garra rígida = R, Reabsorção = ///, Ferida = ☹

CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE INCAPACIDADE (OMS)

DATA DA AVALIAÇÃO	OLHOS		MÃOS		PÉS		MAIOR GRAU	ASSINATURA
	D	E	D	E	D	E		
Aval. diagnóstico / /								
Aval. de alta / /								

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](#)