

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

**“GENOTIPAGEM DO *Mycobacterium tuberculosis* UTILIZANDO RFLP E SPOLIGOTYPING EM ASSOCIAÇÃO COM MIRU PARA AVALIAR A EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE NO MUNICÍPIO DE ARARAQUARA-SP.”**

Ana Carolina Malaspina

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Queico Fujimura Leite

**ARARAQUARA - SP**

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

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

**“GENOTIPAGEM DO *Mycobacterium tuberculosis*  
UTILIZANDO RFLP E SPOLIGOTYPING EM ASSOCIAÇÃO COM  
MIRU PARA AVALIAR A EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA  
TUBERCULOSE NO MUNICÍPIO DE ARARAQUARA-SP.”**

Ana Carolina Malaspina

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Queico Fujimura Leite

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de doutor em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia, área de Microbiologia Básica.

**ARARAQUARA - SP**

2009

Trabalho realizado no Laboratório de Micobactérias “Prof. Dr. Hugo David”,  
Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara.

## **Dedicatória**

---

Aos meus pais, Osvaldo e Lídia, pelo apoio, dedicação e amor, por me proporcionarem caminhos e oportunidades, por seus ensinamentos, olhares atentos e exemplos de força, competência e disposição.

À Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite por sua generosidade na troca de experiências e ensinamentos, pelo empenho e dedicação a todos os seus alunos, pela compreensão, e acima de tudo, por seu exemplo de ética e profissionalismo.

## **Agradecimentos**

---

Agradeço a Deus, pela condução através dos caminhos e jornadas, pelo amparo nos momentos de fraqueza e pela satisfação ao alcançar na fé, um sempre surpreendente, porém acertado resultado.

À Dr<sup>a</sup> Maria Helena Feres Saad, pela enorme contribuição para o desenvolvimento deste trabalho através de sugestões, esclarecimentos e auxílio técnico, juntamente com sua equipe.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosilene Fressatti Cardoso e à Dr<sup>a</sup> Daisy Nakamura Sato, pelo apoio, incentivo, amizade e constante contribuição nas diversas etapas deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Aparecida Varanda e ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, pela colaboração e disponibilidade para contribuir com relevantes observações e sugestões.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Taís Maria Bauab, pela disponibilização de estrutura e equipamentos para a conclusão deste trabalho.

A toda equipe de profissionais do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, Dr. Eduardo Ferraz Hage, Dr. Walter Manso Figueiredo, Maria Heloísa Ribeiro, pelo auxílio e atenção. Em especial à Rosângela Maria Gasparetto da Silva e Brunilde Helena Jung Viana, pelo carinho, disponibilidade, paciência e indispensável auxílio.

Às funcionárias da seção de pós-graduação Cláudia Lúcia Molina, Sônia Ornellas Silva e Laura Rosim, pela atenção constante e gentil atendimento.

Às técnicas Edinéia Fátima Corrêa, Marisa Fernandes e Sílvia Helena de Oliveira David, pela amizade e adorável companhia ao longo destes anos.

Aos companheiros do Laboratório de Micobactérias, Fernando Pavan, Marcelo Miyata, José Rodrigo Pandolfi, Karina Prince, Natália Mendes, Paulinho, Faber, Carol, Letícia e Leonardo, pelo auxílio e toda colaboração.

Aos amigos Ivone Anno, Soraya Varela, Walclécio Lira e Luis Gustavo Monazzi, pelo apoio desde o início desta jornada.

Aos amigos Fabiana Julião, Vagner Oliveira, Karla Paranhos e Mariana Zancul, pela presença constante e a amizade incondicional.

Ao amigo Adolfo Barreto, pelo apoio e auxílio em todas as etapas deste trabalho, é sempre muito bom poder contar com pessoas especiais como você.

Ao meu namorado Cristiano Aguiar, pelo estímulo, parceria, compreensão e paciência durante toda a construção deste trabalho.

Ao meu irmão Igor, pelo incentivo e confiança, e a toda minha família pela participação e celebração em mais uma etapa a ser cumprida.

Seja como os pássaros que,  
ao pousarem um instante sobre ramos muito leves,  
sentem-nos ceder, mas cantam!  
Eles sabem que possuem asas.

VICTOR HUGO

## CAPÍTULO I

Lista de Tabelas	12
Lista de Quadros	13
Lista de Figuras	14
Lista de Siglas e Abreviaturas	15
Resumo	17
Abstract	18
<b>1. Introdução</b>	<b>19</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>30</b>
<b>3. Material e métodos</b>	<b>31</b>
3.1. Seleção das amostras	31
3.2. Aspectos éticos	34
3.3. Caracterização da população estudada	34
3.4. Confirmação da pureza e da identificação do <i>M. tuberculosis</i>	34
3.4.1. Microscopia	34
3.4.2. Identificação molecular através de PCR	35
3.5. Genotipagem	36
3.5.1. RFLP	36
3.5.1.1. Extração do DNA	36
3.5.1.2. Verificação da integridade do DNA	37
3.5.1.3. Quantificação do DNA extraído	38

3.5.1.4. Digestão do DNA extraído	38
3.5.1.5. Transferência para membrana de náilon	38
3.5.1.6. Preparo da sonda genética	39
3.5.1.7. Purificação da sonda	40
3.5.1.8. Quantificação da sonda de DNA	40
3.5.1.9. Marcação da sonda	40
3.5.1.10. Hibridização e detecção	41
3.5.2. Spoligotyping	42
3.5.2.1. Extração de DNA	42
3.5.2.2. PCR	43
3.5.2.2. Hibridização e detecção	44
3.5.3. MIRU	45
3.6. Análise dos resultados	45
4. RESULTADOS	46
4.1. Seleção das amostras	46
4.2. Caracterização da população estudada	46
4.3. Confirmação da identificação dos isolados	52
4.4. RFLP	52
4.5. Spoligotyping	59
4.6. MIRU	70
4.7. Spoligotyping associado ao MIRU	72
4.8. Spoligotyping e MIRU associados ao RFLP	74
<b>5. Discussão</b>	<b>76</b>
<b>6. Conclusões</b>	<b>80</b>

<b>7. Referências bibliográficas</b>	<b>82</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>92</b>
8.1. Anexo I	92
8.2. Anexo II	96
8.3. Anexo III	97

## **CAPÍTULO II**

<b>1. Usefulness of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> molecular typing in a tuberculosis low-endemic agro-industrial setting in Brazil.</b>	<b>99</b>
<b>2. Tuberculose e o estudo molecular de sua epidemiologia.</b>	<b>102</b>
<b>3. Classic and molecular study of <i>Giardia duodenalis</i> in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.</b>	<b>109</b>

# CAPÍTULO I

---

## Lista de Tabelas

---

Tabela 1	Incidência da tuberculose em Araraquara de 2000 a 2006 e representatividade da amostragem selecionada com relação ao número total de casos da doença.	32
Tabela 2	Representatividade da amostragem selecionada com relação ao número de casos de tuberculose pulmonar.	33
Tabela 3	Representatividade da amostragem selecionada com relação ao número de amostras de pacientes com tuberculose pulmonar e cultura positiva.	33
Tabela 4	Distribuição dos 122 pacientes portadores de tuberculose, segundo características demográficas.	49
Tabela 5	Distribuição dos 122 pacientes portadores de tuberculose, segundo características clínicas e laboratoriais.	50
Tabela 6	Distribuição dos 122 pacientes portadores de tuberculose, segundo características epidemiológicas adicionais.	51
Tabela 7	Relações epidemiológicas identificadas entre 10 pacientes infectados por cepas de <i>M. tuberculosis</i> pertencentes a grupos genéticos definidos por RFLP- <i>IS6110</i> .	58
Tabela 8	Spoligotipos da família LAM descritos no banco internacional SpolDB4 identificados em Araraquara.	64
Tabela 9	Spoligotipos da família T descritos no banco internacional SpolDB4 identificados em Araraquara.	65
Tabela 10	Spoligotipos da família H descritos no banco internacional SpolDB4 identificados em Araraquara.	66
Tabela 11	Spoligotipos da família U descritas no banco internacional SpolDB4 identificados em Araraquara.	67
Tabela 12	Spoligotipos não descritos no banco internacional SpolDB4 identificados entre os isolados de Araraquara.	68

## Lista de Quadros

---

Quadro 1	Protocolo de ciclagem da PCR para diagnóstico de <i>M. tuberculosis</i> .	36
Quadro 2	Protocolo de ciclagem da PCR para Spoligotyping.	44
Quadro 3	Amostras estudadas e seu respectivo ano de isolamento.	46
Quadro 4	Grupos genéticos com similaridade superior a 90% obtidos por RFLP.	53
Quadro 5	Grupos genéticos com similaridade superior a 70% obtidos por RFLP.	54
Quadro 6	Relação dos spoligotipos obtidos e a respectiva identificação de famílias e spoligotipos contidos no banco internacional SpolDB4. Amostras 003 a 129.	61
Quadro 7	Relação dos spoligotipos obtidos e a respectiva identificação de famílias e spoligotipos contidos no banco internacional SpolDB4. Amostras 133 a 237.	62
Quadro 8	Relação dos spoligotipos obtidos e a respectiva identificação de famílias e spoligotipos contidos no banco internacional SpolDB4. Amostras 238 a 288.	63

## Lista de Figuras

---

Figura 1	PCR representativo das amostras estudadas para confirmação da identificação do <i>M. tuberculosis</i> . 01 a 11: amostras; CN: controle negativo; CP: controle positivo; PM: peso molecular.	51
Figura 2	Dendrograma dos 68 perfis genéticos obtidos com a técnica do RFLP- <i>IS6110</i> .	54
Figura 3	Dendrograma ampliado dos 72 perfis genéticos obtidos com a técnica do RFLP- <i>IS6110</i> .	60
Figura 4	Revelação da membrana de Spoligotyping. As linhas representam as amostras e as colunas, os oligonucleotídeos espaçadores.	58
Figura 5	Dendrograma dos 116 perfis de spoligotyping obtidos.	69
Figura 6	Dendrograma de 102 isolados avaliados por MIRU.	71
Figura 7	Dendrograma de 96 isolados avaliados por Spoligotyping e MIRU.	73
Figura 8	Dendrograma de 59 isolados avaliados por Spoligotyping, MIRU e RFLP.	75

## Lista de Siglas e Abreviaturas

---

µm	Micrômetro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacilo Calmetti-Guerin
C	Citosina
CTAB	Hexadecil trimetil brometo de amônio
DIG	Digoxigenina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSS	Dodecil sulfato de sódio
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
G	Guanina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INH	Isoniazida
IS	Sequência de inserção
mbar	Milibar
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
PPD	Derivado de Proteína Purificada (Teste Intradérmico)
PZA	Pirazinamida
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF	Rifampicina
SSC	Solução salina com citrato
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
UV	Ultravioleta
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
WHO	World Health Organization
x	Vezes

## Resumo

---

O estudo da epidemiologia molecular através de diferentes técnicas vigentes como *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Spacer Oligonucleotide Typing* (Spoligotyping) e *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU) revolucionou a compreensão da epidemiologia da tuberculose. Foram analisados isolados clínicos de pacientes portadores de tuberculose pulmonar no município de Araraquara, entre os anos 2000 e 2006, através de genotipagem por RFLP e Spoligotyping (n=122). A técnica de RFLP permitiu a identificação de um índice de 26,4% de casos de tuberculose proveniente de infecção recente na cidade de Araraquara, no período de 2000 a 2006. Verificou-se relação epidemiológica em cerca de 68% dos casos envolvendo grupos genéticos identificados pelo RFLP. Destaca-se as transmissões intradomiciliares e a moradia em condomínios residenciais do CDHU. A técnica de RFLP permitiu a distinção de dois grandes grupos genéticos, A e B, dentre os isolados de Araraquara. Cerca de 73% dos spoligotipos obtidos foram identificados no Banco Internacional de Spoligotyping SpolDB4, sendo as famílias LAM, T e H as mais predominantes e cerca de 27% dos spoligotipos encontrados apresentaram perfis não descritos no SpolDB4. A associação do RFLP, Spoligotyping e MIRU não foi uma boa ferramenta para a análise genética dos isolados clínicos visando esclarecimentos epidemiológicos. Embora a genotipagem através do RFLP permita uma melhor discriminação entre os isolados bem como uma excelente associação entre amostras relacionadas epidemiologicamente, a técnica de Spoligotyping associada ao MIRU permite uma boa discriminação entre os isolados clínicos, da mesma forma que propicia uma satisfatória correlação entre casos ligados epidemiologicamente.

## Abstract

---

Molecular epidemiology study using different current methods such as Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Spacer Oligonucleotide Typing (Spoligotyping) and Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU) modified tuberculosis epidemiology comprehension. Clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients from Araraquara, between 2000 and 2006, were genotyped through RFLP and Spoligotyping (n=122). RFLP provided the identification of a 26.4% level of tuberculosis cases caused by recent infection in the period. Epidemiologic association were verified in 68% of the cases in clusters identified by RFLP. Intradomiciliary transmissions and living in residential condominiums from CDHU were important factors. RFLP fingerprint provides the distinction of two big genetic groups, A and B, among Araraquara isolates. About 73% of spoligotypes were described in the International Spoligotyping Database SpolDB4 and LAM, T and H families were the most frequent, in the other hand, 27% of spoligotypes had unique profiles not described in SpolDB4. RFLP, Spoligotyping and MIRU association was not a good tool to genotype clinical isolates in order to provide epidemiological understandings. Although RFLP fingerprinting allows a better discrimination as well as an excellent association among epidemiological related isolates, Spoligotyping associated with MIRU provides a good discrimination among clinical isolates as well as provides a satisfactory correlation among cases epidemiological connected.

# 1. Introdução

---

A tuberculose é uma doença que acompanha o homem há muito tempo. Existem evidências da doença em ossos pré-históricos datados de 8.000 antes de Cristo. À medida que as populações perderam seu caráter nômade e constituíram aglomerados, aldeias e cidades a transmissão da doença foi favorecida pela constituição de ambientes fechados. A partir dos séculos XIV e XV, com a presunção do contágio da tuberculose entre as pessoas, os doentes passaram a ser isolados juntamente com seus pertences com o objetivo de evitar a disseminação da doença e as conseqüentes epidemias. O século XVIII é caracterizado por uma elevada mortalidade causada pela tuberculose, ocasionando duras medidas para combater a denominada Peste Branca, os doentes eram afastados da coletividade e em caso de falecimento tinham todos os seus pertences incinerados (KRITSKI, 2000).

O agente causador da tuberculose, também conhecido como bacilo de Koch, foi descoberto em 1882 por Robert Koch e a partir de 1940 começaram a surgir os antimicrobianos que trariam finalmente a cura da tuberculose anos seguintes. Na década de 60, é instituído o esquema definitivo de três antibióticos administrados simultaneamente, promovendo a cura de 95% dos pacientes. O tratamento adotado no Brasil atualmente é composto pelos antibióticos rifampicina (RIF), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA) com seis meses de duração, sendo os dois primeiros meses com RIF, INH e PZA e os quatro subsequentes com RIF e INH. Este esquema de tratamento mais curto é eficaz e menos tóxico, apesar de 20 vezes mais caro do que o previamente adotado com duração de 12 meses. Entretanto, seu uso, associado a uma política racional de

redução de hospitalizações, trouxe economia significativa de recursos, possibilitando sua implementação em todo o país, de forma pioneira em todo o mundo (BRASIL, 2002; KRITSKI, 2000).

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por espécies de micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (ARANAZ et al., 2003; COUSINS et al., 2003). As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*. O gênero *Mycobacterium* compreende cerca de 100 espécies, a maioria saprófitas de vida livre (ARANAZ et al., 1999). São organismos aeróbios, não esporulados e classificam-se em micobactérias de crescimento rápido ou lento, de acordo com o tempo de crescimento requerido para produzir colônias visíveis em meios de cultura sólidos, menos ou mais de sete dias, respectivamente, pois a natureza hidrofóbica de sua superfície celular leva à formação de aglomerados e a alterações na permeabilidade dos nutrientes através da célula (LEITE e SATO, 2006; STROHL et al., 2004).

Apesar das bactérias do gênero *Mycobacterium* possuírem características muito diversas com relação à morfologia das colônias e às características bioquímicas, elas possuem algumas características taxonômicas comuns, como a álcool-ácido resistência quando expostas a coloração tintorial de Ziehl-Neelsen, a presença de ácidos graxos de cadeia longa (chamados ácidos micólicos) e um ácido desoxirribonucléico (DNA) com alto teor em guanina e citosina (G + C). Os ácidos micólicos são provavelmente o suporte molecular da álcool-ácido resistência. Ligados ao peptidoglicano, eles formam

uma barreira periférica hidrofóbica capaz de se ligar e reter a fucsina durante a coloração de Ziehl-Neelsen (KRITSKI, 2000).

A tuberculose é transmitida de pessoa a pessoa por via aérea, através de gotículas de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro produzidas pelo indivíduo portador da forma clínica pulmonar ou laríngea da doença, ao tossir, espirrar ou falar (EDWARDS e KIRKPATRICK, 1986). Quando grandes partículas são inaladas, elas atingem as paredes das vias aéreas superiores, ficam presas no muco, são levadas para a orofaringe e são engolidas ou expectoradas (MURRAY, 1986).

Após a inalação, as gotículas, que geralmente contêm de um a dois organismos, são levadas até a árvore brônquica e atingem os alvéolos, local onde os bacilos iniciarão o processo patológico da doença, se conseguirem sobreviver às defesas primárias e se multiplicarem dentro do macrófago alveolar (RILEY, 1993; EDWARDS e KIRKPATRICK, 1986; HORSBURGH, 1996).

A patogenicidade do *M. tuberculosis* depende de sua capacidade de sobreviver e crescer dentro das células do hospedeiro. O bacilo não produz toxinas demonstráveis, porém, quando envolvido pelos macrófagos, inibe a fusão das vesículas fagocíticas com os lisossomos através dos sulfolípídeos (STROHL et al., 2004).

O crescimento da bactéria é lento, ocorrendo aproximadamente uma divisão a cada intervalo de 25 a 32 horas dentro do macrófago. Os organismos se multiplicam por um período de duas a doze semanas até atingirem o número de  $10^3$  a  $10^4$  células, quantidade suficiente para induzir uma resposta imune-celular que poderá ser detectada pela reação do teste tuberculínico (PPD) (DANNENBERG, 1992; SMITH e WIENGESHAUS, 1989). Muitas vezes um

resultado de PPD positivo é a única indicação de que a infecção com o *M. tuberculosis* tenha ocorrido.

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

Indivíduos com infecção latente, ou seja, que não apresentam a doença em sua forma ativa, não podem transmitir os bacilos. Estima-se que cerca de 10% das pessoas que adquirem a infecção e não recebem a terapia preventiva irão desenvolver a doença; nos 90% restantes, a infecção permanecerá latente ou será resolvida pelas defesas do organismo. O risco é maior nos primeiros dois anos após a infecção, período em que a manifestação da doença é observada em 50% dos casos (STYBLO, 1991). Por outro lado, os bacilos podem permanecer vivos no interior dos nódulos de Ghon durante toda a vida do indivíduo, reativando-se diante de condições favoráveis ao seu desenvolvimento (LEITE e TELAROLLI JUNIOR, 1997).

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

A imunização com o bacilo Calmetti-Guerin (BCG) é atualmente usada em muitos lugares do mundo para prevenir a tuberculose. A vacina recebeu este nome em homenagem aos dois pesquisadores franceses que desenvolveram

uma linhagem atenuada do *M. bovis* para fins de imunização e está disponível desde o início do século XX. (FINE, 1989).

A BCG é cerca de 80% protetora contra formas sérias da tuberculose, como a meningite em crianças, e tem sido usada em campanhas de imunização em massa pela Organização Mundial da Saúde, principalmente em países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, é recomendada somente para indivíduos tuberculina-negativos sob risco intenso e sustentado de infecção (STROHL et al., 2004).

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

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

A tuberculose é um grave problema de saúde pública, principalmente na idade mais produtiva das pessoas, destruindo a vida dos cidadãos mais frágeis

socialmente. Nos países desenvolvidos a doença ressurgiu entre as décadas de 80 e 90 do último século, associada ao HIV, à imigração e ao colapso dos programas de saúde pública. A situação atual é de decréscimo neste quadro com a restauração dos programas para controle da tuberculose e a adoção do tratamento sob observação direta. Nas Américas, vários fatores, além da pandemia do HIV, criam condições propícias para seu agravamento. A situação socioeconômica atual proporcionou um aumento das condições de pobreza, dificultando o acesso aos serviços de saúde, assim como um crescimento das populações marginais e das taxas de migração em busca de melhor qualidade de vida (BRASIL, 2002; KRITSKI, 2000).

No Brasil, a exemplo de países em desenvolvimento, a tuberculose é endêmica com cerca de 95 mil casos novos em 2006, fato que resulta numa razão de incidência de 50/100.000 habitantes (WHO, 2008). A incidência nas grandes cidades do sudeste brasileiro alcança altas cifras de 160/100.000 habitantes devido à enorme densidade populacional e desestrutura social. (BRASIL, 2002). A situação epidemiológica da tuberculose é bem conhecida nas grandes capitais brasileiras, e contrasta com a relativa ausência de dados das pequenas cidades do interior.

A cidade de Araraquara está situada no centro geográfico do estado de São Paulo, a uma distância de 269 quilômetros da capital, tendo como coordenadas geográficas 21°47'37" (latitude sul) e 48°10'52" (longitude oeste). A altitude média é de 646 metros em relação ao nível do mar, sendo a área total do município de 1.006 km<sup>2</sup> com 77,37 km<sup>2</sup> ocupados pela área urbana. A estimativa da população no ano de 2007 é de 195.815 habitantes, apresentando renda per capita de 441,875 reais (CENSO, 2000).

Por ser um centro agro-industrial, Araraquara apresenta um intenso fluxo migratório de jovens e adultos que vêm a Araraquara em busca de oportunidades de emprego. Apesar disso, a incidência de tuberculose é de 26 casos/100.000 habitantes. Esta baixa incidência de casos provavelmente pode ser atribuída ao excelente serviço ambulatorial realizado pelo Serviço Especial de Saúde (SESA) da Faculdade de Saúde Pública - USP, que dispõe também de registro detalhado dos pacientes, uma fonte segura e confiável que propiciam estudos epidemiológicos da tuberculose.

Anteriormente à introdução de técnicas de biologia molecular no diagnóstico de infecções por *Mycobacterium*, a microscopia direta do escarro utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen era o único método de diagnóstico rápido. Entretanto, uma baciloscopia positiva requer a presença de cerca de  $10^4$  bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) por mililitro de escarro, fato que limita o diagnóstico em alguns casos, tornando-o duvidoso (MOREIRA-OLIVEIRA et al., 2008).

Ferramentas utilizando princípios de biologia molecular tornaram-se aplicáveis tanto para o diagnóstico do *M. tuberculosis* quanto para o estudo de sua epidemiologia após o advento da genotipagem micobacteriana e o estabelecimento das relações entre seu genótipo e os fenótipos clínicos (THWAITES et al., 2007).

O estudo da epidemiologia molecular através de diferentes técnicas vigentes como *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Spacer Oligonucleotide Typing* (Spoligotyping) e *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU) revolucionou a compreensão da epidemiologia da tuberculose.

Análises epidemiológicas baseadas nestas técnicas permitem a comparação de linhagens de *M. tuberculosis* de diferentes áreas geográficas, o rastreamento da movimentação de linhagens individuais e a identificação de fatores de risco em infecções por *M. tuberculosis* em uma comunidade (FOXMAN e RILEY, 2001).

Levin et al. (1999) definem que os objetivos práticos da epidemiologia molecular são identificar os microrganismos responsáveis por doenças infecciosas, determinar sua rota de transmissão e identificar os genes responsáveis por sua virulência, resistência a drogas e produção de antígenos relacionados a vacinas.

A epidemiologia molecular envolve além do uso de técnicas moleculares para o estudo da taxonomia, filogenia ou genética de populações, a aplicação destas técnicas em problemas epidemiológicos (FOXMAN e RILEY, 2001).

O método mais freqüentemente utilizado para diferenciar cepas de *M. tuberculosis* é o de IS6110-RFLP que, aliado aos dados do paciente, permite que se estabeleça uma correlação epidemiológica. Entretanto, outros métodos como o Spoligotyping e o MIRU têm sido extensamente aplicados.

As espécies do complexo *M. tuberculosis* são geneticamente muito similares, com 85 a 100% de relação DNA-DNA, diferindo entre si quanto à sua epidemiologia (FROTHINGHAM et al., 1994). Estas espécies possuem uma seqüência de inserção exclusiva em seu cromossomo identificada como IS6110, de 1355 pares de base, relacionada à família IS3 das enterobactérias.

A inserção irregular de IS6110 no genoma das micobactérias permite a discriminação de cepas através da técnica de RFLP. Com base em observações laboratoriais e em pacientes durante surtos, o IS6110-RFLP, altamente diverso,

geralmente permanece estável o suficiente para ser usado como um marcador para comprovar ligações epidemiológicas em casos de tuberculose (VAN SOOLINGEN et al., 1991). As cepas são tipadas de acordo com o padrão eletroforético de bandas, gerado por diferenças na localização da seqüência /IS6110 no cromossomo e no número de cópias deste elemento, sendo esta técnica amplamente utilizada e recomendada, pois pode ser realizada de forma reprodutiva e padronizada (KREMER et al., 1999). Para Tenover et al. (1997), amostras com pequenas alterações no número ou na altura de bandas, devido a uma simples mutação, inserção, deleção ou inversão, podem ser identificadas como cepas relacionadas e pertencentes a um mesmo agrupamento ou família.

A análise de grande número de isolados pode gerar respostas para questões de longa data como a freqüência de reativação e de reinfecção, propriedades relacionadas à virulência, questões de importância crescente com o estabelecimento da AIDS pandêmica (VAN EMBDEN et al., 1993). Além disso, este tipo de abordagem torna possível a identificação dos maiores focos de contágio da população, possibilitando o desenvolvimento de métodos mais eficientes para interromper a transmissão da doença.

Apesar de seu excelente poder discriminatório, a técnica de /IS6110-RFLP, quando aplicada em cepas com baixo número de cópias da /IS6110, tem sua capacidade de discriminação diminuída, havendo a necessidade da utilização de métodos de genotipagem complementares (PARK et al., 2000; SAHADEVAN et al., 1995).

Outras desvantagens da técnica de RFLP é o trabalho excessivo, necessitando de pessoal altamente qualificado para a realização do ensaio, bem como a necessidade de DNA purificado, sendo tendência mundial a substituição

desta técnica por outras de execução mais rápida e facilitada. Dentre elas, vêm sendo sugeridas técnicas de epidemiologia molecular muito bem aceitas como o MIRU e o Spoligotyping (COWAN et al., 2005).

A técnica de Spoligotyping descrita por Kamerbeek et al. (1997) é baseada na amplificação *in vitro* de um único *locus* altamente polimórfico no genoma da bactéria contendo múltiplas *direct repeats* (DR), método que pode ser realizado em laboratórios sem equipamentos sofisticados. A subsequente hibridização diferencial dos produtos amplificados será realizada com oligonucleotídeos complementares às regiões espaçadoras variáveis, localizadas entre as DRs que estão ligados a membrana (MOLHUIZEN et al., 1998). A presença das seqüências espaçadoras varia entre diferentes cepas e é visualizada por uma mancha em um ponto fixo da membrana de hibridização.

O método é simples, rápido, robusto e muito utilizado em inquérito epidemiológico em larga escala, sendo considerada uma ferramenta de primeira linha para o estudo da diversidade genética de isolados de *M. tuberculosis* (KANDUMA et al., 2003). A técnica de Spoligotyping é prática e menos dispendiosa do que a de RFLP, somada a vantagem de se encontrar bases de dados no mundo todo, o que permite a comparação de perfis e a compreensão da transmissibilidade da tuberculose ao redor do mundo (SOLA et al., 2001).

O Banco Internacional de Spoligotyping SpolDB4 (BRUDEY et al., 2006) contém 1.939 perfis compartilhados (*shared-types* - STs) representando um total de 39.295 isolados clínicos originários de 122 países. Este banco fornece um retrato mundial da diversidade genética do Complexo *M. tuberculosis* através do Spoligotyping, seu livre acesso e a facilidade da apresentação dos dados

permitem a ampla utilização das informações para o estabelecimento de análises e comparações genéticas e epidemiológicas.

Desta forma, a técnica de Spoligotyping consiste em uma ferramenta poderosa para estudar epidemiologia, filogenia e adaptabilidade dos bacilos da tuberculose de acordo com o seu genótipo (KANDUMA et al., 2003).

A técnica de MIRU utiliza os princípios da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para estudar VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), ou seja, mini-satélites que contém números variáveis de cópias em seqüência no genoma da micobactéria, podendo repetir-se até centenas de vezes (SUPPLY et al. 2000 e 2001; MAZARS et al. 2001). Trata-se de um sistema altamente reprodutível e rápido, havendo geração de genótipos confiáveis e detalhados obtidos a partir de 12 *loci* contendo VNTRs do genoma do complexo *M. tuberculosis* (Supply et al., 2001).

O MIRU possibilita uma comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas e o rastreamento da movimentação de linhagens individuais, de forma semelhante à técnica de RFLP, entretanto, por ser de fácil execução, possibilita a análise de um número maior de amostras em curto período de tempo (PANDOLFI et al, 2007).

Pandolfi (2006) e Santos (2009), em trabalhos realizados no Laboratório de Micobactérias “Prof. Dr. Hugo David”, analisaram os perfis genéticos de isolados provenientes de pacientes de tuberculose pulmonar do município de Araraquara através da técnica de MIRU. A associação dos três métodos de genotipagem, IS6110-RFLP, Spoligotyping e MIRU, acompanhados de informações epidemiológicas da população estudada servem de instrumentos para a compreensão de diversos aspectos da transmissão da tuberculose.

## 2. Objetivos

---

O presente trabalho teve como objetivo geral:

1. Realizar a identificação e genotipagem de cepas de *M. tuberculosis* isoladas no Município de Araraquara–SP no período de 2000 a 2006, através do uso das técnicas de RFLP e de Spoligotyping como instrumento para o estudo da epidemiologia molecular da tuberculose.

Pretendeu-se alcançar os seguintes objetivos específicos:

2. Agrupar por similaridade genética as amostras estudadas, buscando identificar focos de transmissão da doença no Município de Araraquara;

3. Comparar os resultados obtidos neste estudo pela técnica de RFLP e Spoligotyping com os resultados de MIRU obtidos por Pandolfi (2006) e Santos (2009) para avaliar a presença de grupos genéticos predominantes em Araraquara;

4. Correlacionar os dados epidemiológicos e de genotipagem para avaliar a transmissibilidade da tuberculose no período de estudo;

5. Identificar através dos níveis de similaridade genética, os índices de tuberculose provenientes de reativação endógena e de infecção recente.

## 3. Material e métodos

---

### 3.1. Seleção das amostras

Para a execução deste trabalho foram selecionadas amostras provenientes de pacientes residentes no município de Araraquara com diagnóstico de tuberculose pulmonar confirmado através do isolamento do *M. tuberculosis*, realizado pelo Serviço Especial de Saúde (SESA) da Faculdade de Saúde Pública – USP, entre os anos de 2000 a 2006.

Os pacientes selecionados apresentavam informações demográficas, clínico-epidemiológicas e laboratoriais acompanhando as culturas positivas.

As culturas foram identificadas através de técnicas bioquímicas e convencionais (BRASIL, 1994), tendo sua identificação sido confirmada através de PCR.

Os isolados recebidos do SESA congelados foram cultivados nos meios Middlebrook 7H-9 para reativação e transferidos para Lowenstein-Jensen.

A Tabela 1 expressa os valores de incidência da tuberculose no município durante o período estudado e a representatividade da amostragem selecionada.

**Tabela 1** Incidência da tuberculose em Araraquara de 2000 a 2006 e representatividade da amostragem selecionada com relação ao número total de casos da doença.

<b>PERÍODO</b>	<b>TOTAL DE CASOS</b>	<b>CASOS ESTUDADOS</b>	<b>REPRESENTATIVIDADE (%)</b>
2000	49	21	42,8
2001	62	21	33,9
2002	56	05	8,9
2003	54	18	33,3
2004	55	14	25,5
2005	40	28	70,0
2006	52	15	28,8
<b>TOTAL</b>	<b>368</b>	<b>122</b>	<b>33,2</b>

Os valores totais de casos da doença em cada ano mostrados na Tabela 1 referem-se aos dados de pacientes do município de Araraquara, incluindo transferências, indivíduos portadores de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, bem como os casos novos e os reincidentes.

**Tabela 2** Representatividade da amostragem selecionada com relação ao número de casos de tuberculose pulmonar.

<b>PERÍODO</b>	<b>CASOS DE TUBERCULOSE PULMONAR</b>	<b>CASOS ESTUDADOS</b>	<b>REPRESENTATIVIDADE (%)</b>
2000	41	21	51,2
2001	52	21	40,4
2002	47	05	10,6
2003	41	18	43,9
2004	43	14	32,6
2005	32	28	87,5
2006	40	15	37,5
<b>TOTAL</b>	<b>296</b>	<b>122</b>	<b>41,2</b>

Os valores totais de casos de tuberculose pulmonar em cada ano mostrados na Tabela 2 incluem transferências, casos novos e casos reincidentes.

**Tabela 3** Representatividade da amostragem selecionada com relação ao número de amostras de pacientes com tuberculose pulmonar e cultura positiva.

<b>PERÍODO</b>	<b>CULTURAS POSITIVAS</b>	<b>CASOS ESTUDADOS</b>	<b>REPRESENTATIVIDADE (%)</b>
2000	22	21	95,4
2001	41	21	51,2
2002	33	05	15,1
2003	33	18	54,5
2004	25	14	56,0
2005	31	28	90,3
2006	38	15	39,5
<b>TOTAL</b>	<b>223</b>	<b>122</b>	<b>54,7</b>

Os valores totais de amostras com cultura positiva em cada ano expressos na Tabela 3 referem-se aos dados de pacientes do município de Araraquara, portadores de tuberculose pulmonar, sejam eles novos ou reincidentes.

### **3.2. Aspectos éticos**

O estudo possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, parecer número 01/2003.

### **3.3. Caracterização da população estudada**

As informações demográficas, clínico-epidemiológicas e laboratoriais dos 122 pacientes selecionados para o estudo foram obtidas através de um questionário (Anexo I), aplicado por profissionais treinados do Serviço Especial de Saúde de Araraquara da Faculdade de Saúde Pública - USP, Instituição responsável pelo atendimento, tratamento e acompanhamento dos doentes na cidade de Araraquara. As informações foram arquivadas com o auxílio do software EPI-INFO versão 3.5.1.

### **3.4. Confirmação da pureza e identificação do *M. tuberculosis***

#### **3.4.1. Microscopia**

As culturas de *M. tuberculosis* provenientes do SESA foram submetidas a exames microscópicos após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen para confirmação da presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

### **3.4.2. Identificação molecular através de PCR**

As culturas puras foram submetidas à técnica de PCR empregando pares de *primers* que amplificam especificamente fragmentos de 245 pb contidos na seqüência de inserção *IS6110*, INS1 (5´ CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC) e INS2 (5´ GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA) (VAN EMBDEN et al., 1993). Para tal, 2,5 µL de lisado de células obtido através da termólise foram submetidos à amplificação sob as seguintes condições: em tubos de 0,2 mL foram acrescentados 21,5 µL de *Master Mix* (Promega, diluição de acordo com a recomendação do fabricante), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 25 pmol (INS1 e INS2) e a mistura reativa amplificada no Termociclador (PTC-100, MJ Research), seguindo o protocolo demonstrado no Quadro 1.

O produto de amplificação de 245 pb foi visualizado no gel de agarose corado com brometo de etídio e a leitura realizada com o auxílio de um transiluminador ultravioleta.

**Quadro 1.** Protocolo de ciclagem da PCR para diagnóstico de *M. tuberculosis*.

<b>Passo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Quantidade de ciclos</b>
1º	10 minutos	95°C	1
2º	1 minuto	94°C	30
	2 minutos	56°C	
	1 minuto	72°C	
3º	7 minutos	72°C	1
4º	∞	4°C	1

### **3.5. Genotipagem**

#### **3.5.1. RFLP**

A técnica de RFLP preconizada por van Soolingen et al. (1993) foi empregada para diferenciar as cepas de *M. tuberculosis* isoladas de espécimes clínicos provenientes de pacientes de Araraquara. Seguem-se as etapas empregadas para a sua realização.

A cepa padrão Mt 14323 utilizada nos experimentos foi gentilmente cedida pela Dr<sup>a</sup> Lucilaine Ferrazoli do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

##### **3.5.1.1. Extração do DNA**

Uma porção de aproximadamente 40 mg de cultura foi transferida para um microtubo contendo 500 µL de água ultrapura estéril e incubada a 80° C por 20 minutos. Foi realizada centrifugação a 12000xg por 1 minuto e o material ressuspendido em 500 µL de tampão TE. Solução lisozima em um volume de 50 µL foi adicionado e o tubo foi incubado a 37° C por 18 horas. Em seguida, 6 µL de solução proteinase K e 70 µL da solução de DSS 10% foram

adicionados e levados ao banho maria a 65° C por 10 minutos. Em seguida, 100 µL de solução NaCl 5 M e 80 µL de solução CTAB-NaCl previamente aquecida foram adicionados ao tubo e deixados durante 10 minutos em banho maria a 65° C, após homogeneização. Juntamente com 700 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), o material foi centrifugado a 13.000xg por 1 minuto. A fase superior de cada preparação foi transferida para tubos contendo 450 µL de isopropanol e após 18 horas a -20° C foram centrifugados a 13.000xg por 20 minutos a 4° C. Os sedimentos foram lavados com 500 µL de etanol 70% (mantido a -20° C por 18 horas) e centrifugados por 15 minutos a 4° C em 13.000xg. O sobrenadante foi desprezado, os sedimentos foram secos e ressuspensos em 30 µL de tampão TE, e após refrigeração por 2 horas, o material foi armazenado a -20° C.

### **3.5.1.2. Verificação da integridade do DNA**

Um microlitro de cada preparação de DNA foi diluído em 10 µL de solução tampão TE e acrescido de 4 µL de solução de arraste. O material proveniente foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 % em solução tampão TAE. Uma eletroforese em cuba horizontal a 50 volts foi iniciada até a introdução do material, depois aplicados uma carga 100 volts por 40 minutos. Após este período, o gel foi corado com brometo de etídio por 10 minutos e o produto, examinado em luz UV 254 nm.

### **3.5.1.3. Quantificação do DNA extraído**

A quantificação do DNA extraído foi realizada através de espectrofotometria específica (Ultrospec III, Pharmacia), para tal 2  $\mu\text{L}$  das preparações purificadas de DNA foram diluídos em 200  $\mu\text{L}$  de tampão TE.

### **3.5.1.4. Digestão do DNA extraído**

Aproximadamente 3  $\mu\text{g}$  de DNA de cada preparação foram transferidos para microtubos estéreis contendo 5 U da enzima *Pvu* II (Invitrogen), 2  $\mu\text{L}$  da solução tampão específica e um volume de água ultrapura estéril suficiente para completar 20  $\mu\text{L}$ . Os tubos foram submetidos à incubação em banho maria a 37<sup>o</sup> C por 4 horas. Em seguida, 6  $\mu\text{L}$  de solução de arraste foram acrescentados e o volume total aplicado em orifícios do gel de agarose 1%, usando-se sempre uma cepa de referência. Foi realizada a eletroforese em cuba horizontal com gel de 20x20cm por 17 horas a 30 volts, a temperatura ambiente.

### **3.5.1.5. Transferência para membrana de náilon**

A membrana de náilon foi previamente tratada com solução SSC (Solução salina com citrato) 20 vezes concentrada por 20 minutos. Todo o procedimento foi realizado sob pressão 50 mbar, com equipamento VacuGene XL Vacuum Blotting System (Pharmacia Biotech). Cada gel foi colocado sobre uma membrana de náilon (GE Healthcare). A membrana foi coberta sucessivamente com 20 mL da solução de despurinação (HCl 0,25 M) por 20

minutos, 20 mL de solução desnaturante (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) por 20 minutos, 20 mL de solução neutralizante (NaCl 1,5 M e tris-base 1,0 M) por 20 minutos e 20 mL de solução SSC 20x por 40 minutos. A membrana foi rapidamente lavada em solução SSC 10x e mantida a 37° C por 30 minutos para secagem. Para fixação dos fragmentos de DNA, a membrana foi exposta a 120.000 µjoules de radiação ultravioleta (UV Crosslinker, Hoefer) por aproximadamente 20 segundos.

#### **3.5.1.6. Preparo da sonda genética**

Uma porção de cultura de *M. tuberculosis* Mt14323 mantida em Lowenstein-Jensen foi transferida para um microtubo contendo 500 µL de água ultrapura estéril. O material foi submetido à fervura por 10 minutos e em seguida congelado a -20° C. No momento da reação, 5 µL da preparação foram adicionados em 11 tubos de 200 µL contendo a mistura de reagentes para PCR (usando os *primers* INS1 e INS2). Um dos tubos foi utilizado como controle negativo da reação, colocando-se 5 µL de água ultrapura no lugar da preparação. Os tubos foram levados ao termociclador para que se realizasse a PCR. Eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada com 10 µL da preparação, sendo utilizado como padrão de peso molecular o DNA *ladder* de 100 pb. A amplificação considerada correta apresentou uma banda de 245 pb.

### **3.5.1.7. Purificação da sonda**

A um volume de 500 µL do material amplificado foi acrescido 50 µL de solução estéril de acetato de sódio (3 M, pH 5,2) e 1,1 mL de etanol (-20° C). A mistura foi mantida a -20° C por 18 horas. Executou-se uma centrifugação a 13.000xg por 20 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% refrigerado e mantido à temperatura ambiente até a secagem. O material foi suspenso em 500 µL de tampão TE.

### **3.5.1.8. Quantificação da sonda de DNA**

A quantificação da sonda obtida no item 3.5.1.6 foi realizada através de espectrofotometria específica (Ultrospec III, Pharmacia), para tal 2µL das preparações purificadas foram diluídos em 200µL de tampão TE.

### **3.5.1.9. Marcação da sonda**

A marcação foi realizada com degoxigenina (DIG) 11-dUTP (Kit Roche), desnaturando-se por fervura durante 10 minutos aproximadamente 1 µg da sonda de DNA, seguido de um rápido resfriamento em banho de gelo. Foram acrescidos 2 µL da mistura de hexanucleotídeo, 2 µL da mistura de desoxiribonucleotídeo, 1 µL do reagente contendo o fragmento Klenow da DNA polimerase e água ultrapura estéril para completar o volume de 20 µL. O material foi incubado em banho maria a 37° C por 18 horas. Foram adicionados ao material 2,5 µL de solução LiCl<sub>2</sub> 4 M e 75 µL de etanol 95% refrigerado, que

foi levado a  $-20^{\circ}$  C por 18 horas. Uma centrifugação a 13.000gx por 20 minutos foi realizada. Em seguida, o sedimento foi lavado com etanol 70 % refrigerado e mantido à temperatura ambiente até a secagem. O material foi ressuspensão em 50  $\mu$ L de tampão TE e armazenado a  $-20^{\circ}$  C.

#### **3.5.1.10. Hibridização e detecção**

A membrana foi envolta em uma tela de náilon com a face contendo DNA voltada para cima e inserida em tubo de vidro específico. Umedeceu-se a membrana por dois minutos com 20 mL de solução SSC 2x e retirou-se todas as bolhas. Após este período, a membrana foi incubada a  $42^{\circ}$  C por uma hora em forno de hibridação (Amersham Pharmacia Biotech) com 10 mL de solução de hibridação (formamida, SSC 20x, solução bloqueadora 10%, N-lauroilsarcosina 10% e DSS 10%). Um volume de 50  $\mu$ L da sonda marcada foi desnaturado por fervura durante 10 minutos seguido de banho de gelo por cinco minutos. Adicionou-se a sonda desnaturada a 10 mL da solução de hibridação. Este material, depois de retirada a solução anterior, foi colocado no frasco contendo a membrana. Ocorreu incubação em forno de hibridação a  $42^{\circ}$  C por 18 a 20 horas. A membrana foi lavada quatro vezes. As duas primeiras lavagens com 50 mL de solução tampão A (SSC 2x e DSS 10%) a temperatura ambiente por cinco minutos, e as demais lavagens com 50 mL de tampão B (SSC 5x e DSS 10%) a  $68^{\circ}$  C por 15 minutos. Realizou-se tratamento com 50 mL de solução tampão 1 (ácido maléico 100 mM e NaCl 150 mM) e em seguida a membrana foi mantida em 80 mL de solução tampão 2 (solução tampão 1 e solução bloqueadora) a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução anterior foi

substituída por 20 mL de solução tampão 2 contendo quatro microlitros do anticorpo contra DIG conjugado a fosfatase alcalina e a membrana foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. A membrana foi submetida a duas lavagens em 50 mL de solução tampão 1 a temperatura ambiente por 15 minutos e retirada do tubo. Em um recipiente de vidro contendo 20 mL de solução tampão 3 (tris-base 100 mM e NaCl 100 mM), a membrana foi tratada por três minutos. Para revelar a reação foram adicionados 10 mL da solução de revelação (solução de nitro blue tetrazolium, solução de 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato e solução tampão 3, Genius DNA Labeling and Detection Kit, Boehringer-Mannheim) e o material foi mantido a 37° C para secagem, ao abrigo de luz.

### **3.5.2. Spoligotyping**

A técnica de Spoligotyping preconizada por Kamerbeek et al. (1997) foi empregada para diferenciar as cepas de *M. tuberculosis* isoladas de espécimes clínicos provenientes de pacientes de Araraquara. Seguem-se as etapas empregadas para a sua realização.

As cepas padrões *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv *M. bovis* BCG utilizadas nos experimentos foram obtidas diretamente do produto de extração de DNA comercializadas com os *primers*.

#### **3.5.2.1. Extração de DNA**

Um raspado da amostra bacteriana foi adicionado a 300 µL de tampão de lise, agitado em vórtex e congelado a -20° C por 30 minutos. O material foi

aquecido por 10 minutos em água fervente e repetiu-se o congelamento seguido de fervura. Ao tubo foi adicionado 600 µL da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), após agitação foi realizada centrifugação e a fase aquosa foi separada em um novo tubo com 600 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Duas centrifugações seguidas da adição de clorofórmio/álcool isoamílico separaram novamente a fase aquosa. O DNA presente na amostra foi precipitado com 300 µL de etanol absoluto e lavado duas vezes com etanol 70% previamente refrigerado. O sobrenadante foi desprezado, os sedimentos foram secos e ressuspensos em 30 µL de tampão TE, e após refrigeração por 2 horas, o material foi armazenado a  $-20^{\circ}$  C.

#### **3.5.2.2. PCR**

No momento da reação, 2µL do DNA extraído foi transferido para tubos de 200µL contendo a mistura de reagentes para PCR, utilizando os *primers DRa* (5' GGT – TTT – GGG – TCT – GAC – GAC – 3') e *DRb* (5' CCG – AGA – GGG – GAC – GGA – AAC – 3'), com o objetivo de realizar amplificação das regiões espaçadoras entre as DRs. Foram utilizados 2µL de cada *primer* na concentração 5µM. Um dos tubos foi utilizado como controle negativo da reação, colocando-se 2µL de água ultrapura no lugar do DNA. Os tubos foram levados ao termociclador para a realização da PCR e os ciclos realizados estão descritos no Quadro 2.

**Quadro 2.** Protocolo de ciclagem da PCR para Spoligotyping.

Passo	Tempo	Temperatura	Quantidade de ciclos
1	15 minutos	95° C	1
2	1 minuto	95° C	20
	1 minuto	55° C	
	30 segundos	72° C	
3	5 minutos	72° C	1
4	∞	4° C	-

### 3.5.2.2. Hibridização e detecção

A membrana foi previamente lavada por 5 minutos a 65° C com 250 mL de SSPE 2x SDS 0,1%. Posicionou-se a membrana e o suporte *cushion* no *miniblotter* (Immunetics) de forma que os canais ficassem perpendiculares a sua aplicação e em seguida parafusou-se o *miniblotter*. Os produtos da PCR foram desnaturados por 10 minutos a 100° C no termociclador e colocados imediatamente em gelo. Os resíduos de líquidos presentes em cada canal na membrana foram aspirados. Cada um dos canais foi preenchido com o produto da PCR diluído e desnaturado, evitando-se formação de bolhas, e os canais negativos foram preenchidos com 150 µL de SSPE 2x SDS 0,1%. O *miniblotter* foi incubado por 60 minutos a 60° C na posição horizontal e sem agitação.

Anteriormente à remoção da membrana do *blotter*, todos os canais foram aspirados a vácuo. A membrana foi submetida a duas lavagens de 10 minutos a 60° C com 250 mL de SSPE 2x SDS 0,5% pré-aquecido e transferida para o *rolling bottle* até o resfriamento. Adicionou-se à membrana, 10 mL de SSPE 2x SDS 0,5% com 3 µL de streptavidina e procedeu-se com a incubação no forno de hibridação a 42° C por 45 a 60 minutos. A membrana foi submetida a duas lavagens com 250 mL de SSPE 2x SDS 0,5% por 10 minutos

a 42° C e duas lavagens com 250 mL de SSPE 2x por 5 minutos a temperatura ambiente. Procedeu-se com a incubação da membrana por 1 minuto com 20 mL da mistura ECL, retirando-se o excesso de líquido em papel. A membrana, coberta com plástico PVC, foi colocada em cassete e, em sala escura, adicionou-se o filme e a membrana foi exposta por 20 a 30 minutos antes de sua revelação, seguindo instruções do fabricante.

### **3.5.3. MIRU**

A técnica de MIRU estabelecida por SUPPLY et al. (2000) foi realizada por Pandolfi (2006) e Santos (2009) nas amostras selecionadas para este estudo. Os resultados determinados foram analisados comparativamente às técnicas de RFLP e Spoligotyping.

### **3.6. Análise dos resultados**

O perfil genético de cada cepa foi analisado com o auxílio do programa Bionumerics versão 4.61 (Applied Maths). Cada técnica foi avaliada individualmente e associada às demais.

O perfil genético dos isolados obtido através da técnica de Spoligotyping foi comparado com o Quarto Banco Internacional de Spoligotyping (SpolDB4) (BRUDEY et al., 2006).

A análise estatística dos dados epidemiológicos foi realizada através do programa EPI-INFO, versão 3.3.2.

## 4. Resultados

---

### 4.1. Seleção das amostras

Foram selecionadas e analisadas 124 isolados clínicos provenientes de 122 pacientes. A distribuição das amostras de acordo com seu ano de isolamento são descritos no Quadro 3. Foram mantidas apenas uma amostra por paciente no estudo, desde que as culturas coincidentes apresentassem perfis genéticos idênticos.

**Quadro 3.** Amostras estudadas e seu respectivo ano de isolamento.

Ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Número de amostras	21	21	05	18	14	28	15	122

### 4.2. Caracterização da população estudada

A partir das informações contidas nos questionários, alguns dos dados demográficos, laboratoriais e clínico-epidemiológicos mais relevantes foram extraídos e são apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Todos os 122 indivíduos envolvidos nesta pesquisa residiam no município de Araraquara durante o diagnóstico e o tratamento da tuberculose pulmonar. Todavia, apenas 51 deles (41,8%) eram naturais da cidade. Setenta e um pacientes (58,2%) tinham seus municípios de origem distribuídos entre os

estados de São Paulo, Paraná, Pernambuco, Bahia, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Alagoas e Minas Gerais.

Setenta e três por cento (90 indivíduos) da população estudada era do sexo masculino.

Das 32 mulheres portadoras de tuberculose, 53% ocupavam-se exclusivamente das atividades domésticas. Dentre os homens, apenas dois indivíduos eram profissionais da saúde e as profissões ou atividades mais freqüentes foram lavrador, pedreiro, autônomo, pintor, auxiliar de serviços gerais, mecânico e vendedor, incluindo-se padeiro, garçom, professor, motorista e porteiro.

A média de idade encontrada foi de  $43,5 \pm 15,5$  anos e a mediana, 43,0 (mínima de 14 e máxima de 87). Quarenta indivíduos (32,8%) tinham 50 anos ou mais, enquanto que 75 (61,5%) dos 122 pacientes estudados pertenciam à faixa etária de 21 a 49 anos. Apenas sete pacientes eram menores de 21 anos (5,7%).

Quanto ao grau de escolaridade, os indivíduos analfabetos ou com o primeiro grau incompleto representaram 65,6% da população.

Aproximadamente sessenta e seis por cento dos indivíduos viviam em moradias unifamiliares e 59% dividiam a casa com duas a quatro pessoas. Cinquenta e quatro pessoas (46,2%) possuíam algum tipo de renda e o valor médio declarado foi de  $441,40 \pm 532,10$  reais.

Vinte e seis indivíduos foram a óbito, durante ou após o tratamento, mas apenas nove deles (34,6%) tiveram como causa do óbito a tuberculose.

Dentre a população estudada, 11,5% (14) dos pacientes apresentavam um histórico de tuberculose anterior, sendo apresentado por um deles forma clínica extra-pulmonar. Ainda com relação à tuberculose anterior, a alta por abandono do tratamento foi observada em dois dos quatorze casos.

Trinta e três por cento dos indivíduos eram etílicos e 46,7% eram tabagistas.

Trinta e seis por cento das pessoas declararam a ocorrência de um contato prévio com indivíduos portadores de tuberculose pulmonar.

**Tabela 4.** Distribuição dos 122 pacientes portadores de tuberculose, segundo características demográficas.

CARACTERÍSTICAS	Nº (%) DE PACIENTES (n=122) <sup>a</sup>
<b>Idade (anos)</b>	
Média	43,5 ± 15,5
Mediana	43,0 (14 - 87)
<b>Faixa etária</b>	
14 a 20	7 (5,7%)
21 a 49	75 (61,5%)
50 a 87	40 (32,8%)
<b>Sexo</b>	
Feminino	32 (26,2%)
Masculino	90 (73,8%)
<b>Natural de Araraquara</b>	
Sim	51 (41,8%)
Não	71 (58,2%)
<b>Escolaridade</b>	
Analfabeto e 1º grau incompleto	80 (65,6%)
1º grau completo ou mais	38 (31,1%)
Ignorado	4 (3,3%)
<b>Número de pessoas em casa</b>	
1 a 2	16 (13,1%)
3 a 5	72 (59,0%)
Ignorado	34 (27,9)
<b>Renda</b>	
Com renda	54 (46,2%)
Sem renda	29 (24,8%)
Ignorado	39 (29,0%)
Valor da Renda	441,40 ± 532,10
Média (reais)	(500,00 – 2000,00)
<b>Óbito</b>	
Sim	26 (21,3%)
Não	96 (78,7%)
<b>Óbito por TB (n=26)</b>	
Sim	9 (34,6%)
Não	17 (65,4%)

<sup>a</sup> - valores diferentes são descritos acompanhando a análise correspondente

**Tabela 5.** Distribuição dos 122 pacientes portadores de tuberculose, segundo características clínicas e laboratoriais.

CARACTERÍSTICAS	Nº (%) DE PACIENTES (n=122) <sup>a</sup>
<b>Tempo de sintomas (dias) (n=71)</b>	
Média	72,4 ± 71,9 (3-365)
<b>Tuberculose anterior</b>	
Sim	14 (11,5%)
Não	93 (76,2%)
Ignorado	15 (12,3%)
<b>Esquema de tratamento</b>	
Esquema 1 (INH, RIF, PZA)	111 (91,0%)
Esquema 1R (INH, RIF, PZA, EMB)	11 (9,0%)
<b>Tipo de alta (n=116)</b>	
Cura	93 (80,2%)
Abandono	9 (7,7%)
Óbito	14 (12,1%)
<b>BCG</b>	
Sim	31 (25,4%)
Não	22 (18,0%)
Ignorado	69 (56,6%)
<b>Baciloscopia (n=121)</b>	
Positiva	102 (84,3%)
Negativa	19 (15,7%)
Positiva + (n=102)	60 (58,8%)
Positiva ++ e +++	42 (41,2%)
<b>HIV</b>	
Sim	15 (12,3%)
Não	87 (71,3%)
Ignorado	20 (16,4%)

<sup>a</sup> - valores diferentes são descritos acompanhando a análise correspondente

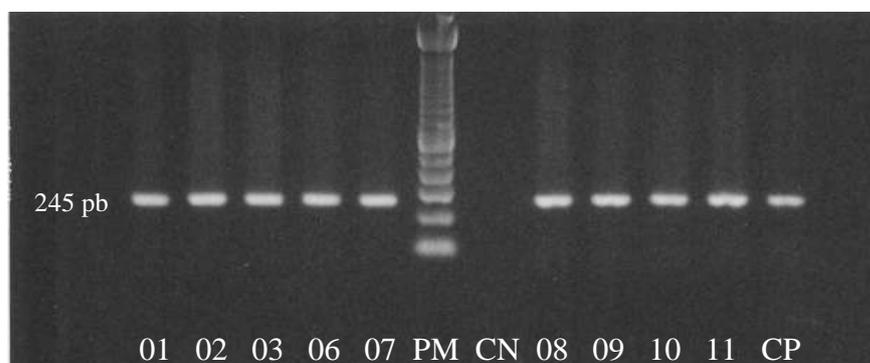
**Tabela 6.** Distribuição dos 122 pacientes portadores de tuberculose, segundo características epidemiológicas adicionais.

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>Nº (%) DE PACIENTES (n=122)</b>
<b>Contato prévio com tuberculose</b>	
Sim	44 (36,1%)
Não	54 (44,3%)
Ignorado	24 (19,7%)
<b>Local de procedência</b>	
São Paulo	91 (74,6%)
Outros Estados	17 (13,9%)
Ignorado	14 (11,5%)
<b>Etilismo</b>	
Sim	41 (33,6%)
Não	60 (49,2%)
Ignorado	21 (17,2%)
<b>Tabagismo</b>	
Sim	57 (46,7%)
Não	44 (36,1%)
Ignorado	21 (17,2%)

### 4.3. Confirmação da identificação dos isolados

Todas as 124 culturas estudadas foram identificadas como BAAR através do exame microscópico, utilizando a técnica de coloração Ziehl-Neelsen.

Todas as cepas estudadas foram confirmadas como *M. tuberculosis* pela técnica de PCR, empregando o par de primers INS1 e INS2 que amplificou especificamente fragmentos de 245 pb contidos na seqüência de inserção *IS6110* (Figura 1).



**Figura 1.** PCR representativo das amostras estudadas para confirmação da identificação do *M. tuberculosis*. 01 a 11: amostras; CN: controle negativo; CP: controle positivo; PM: peso molecular.

### 4.4. RFLP

Foram analisados 72 isolados provenientes de 72 pacientes selecionados para o estudo. A comparação dos perfis genéticos obtidos com a técnica de RFLP foi realizada com o auxílio do software Bionumerics versão 4.61 (Applied Maths). A normalização da imagem e o alinhamento das bandas foram

possíveis devido à presença do perfil de referência da cepa Mt 14323 posicionado nas extremidades e no meio de cada gel.

A construção do dendrograma foi realizado pelo método de UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic average*) e o índice de similaridade aplicado foi o índice de Dice. O dendrograma gerado pelo programa (Figura 2) indica a distribuição dos perfis genéticos analisados. O número da seqüência /S6110 no genoma do microrganismo variou de duas a 19 cópias.

A técnica de RFLP permitiu a identificação de sete grupos genéticos com 100% de similaridade, denominados R1, R2, R3, R4, R5, R6 e R7 (Figura 2). Também foi possível identificar 3 grupos com mais de 90% de similaridade, R8, R9 e R10.

**Quadro 4.** Grupos genéticos com similaridade superior a 90% obtidos por RFLP.

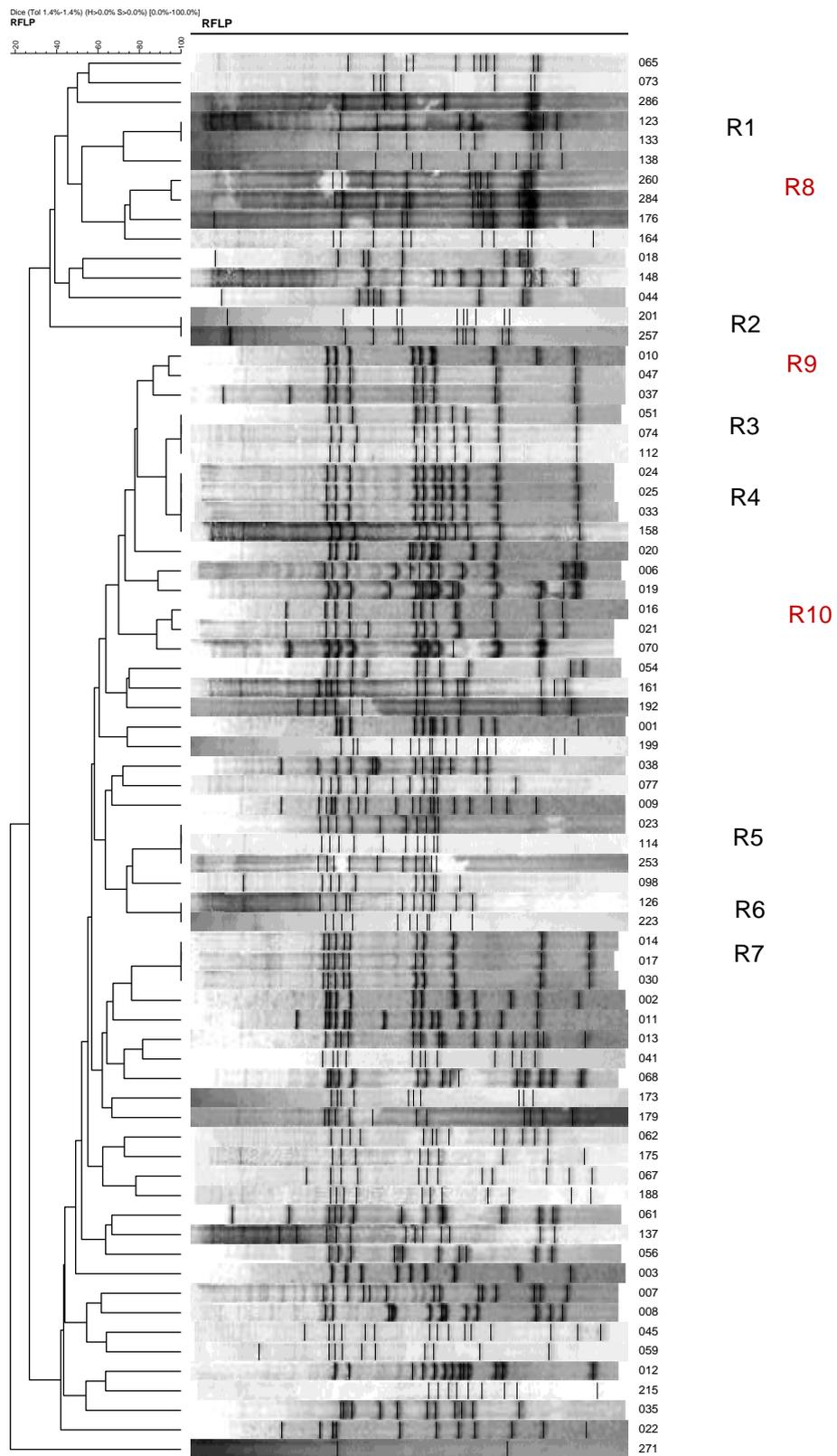
<b>Grupo genético</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Amostras</b>	<b>Similaridade</b>
R1	2	123, 133	100%
R2	2	201, 257	100%
R3	3	051, 074, 112	100%
R4	4	024, 025, 033, 158	100%
R5	3	023, 114, 253	100%
R6	2	126, 223	100%
R7	3	014, 017, 030	100%
R8	2	260, 284	95,24%
R9	2	010, 047	94,12%
R10	2	016, 021	95,65%

O dendrograma ampliado na Figura 3 mostra a identificação de 13 grupos com mais de 70% de similaridade genética, incluindo os grupos genéticos citados anteriormente (R1 a R10). Também foi possível a distinção de dois grandes grupos com perfis genéticos semelhantes, grupo A e grupo B.

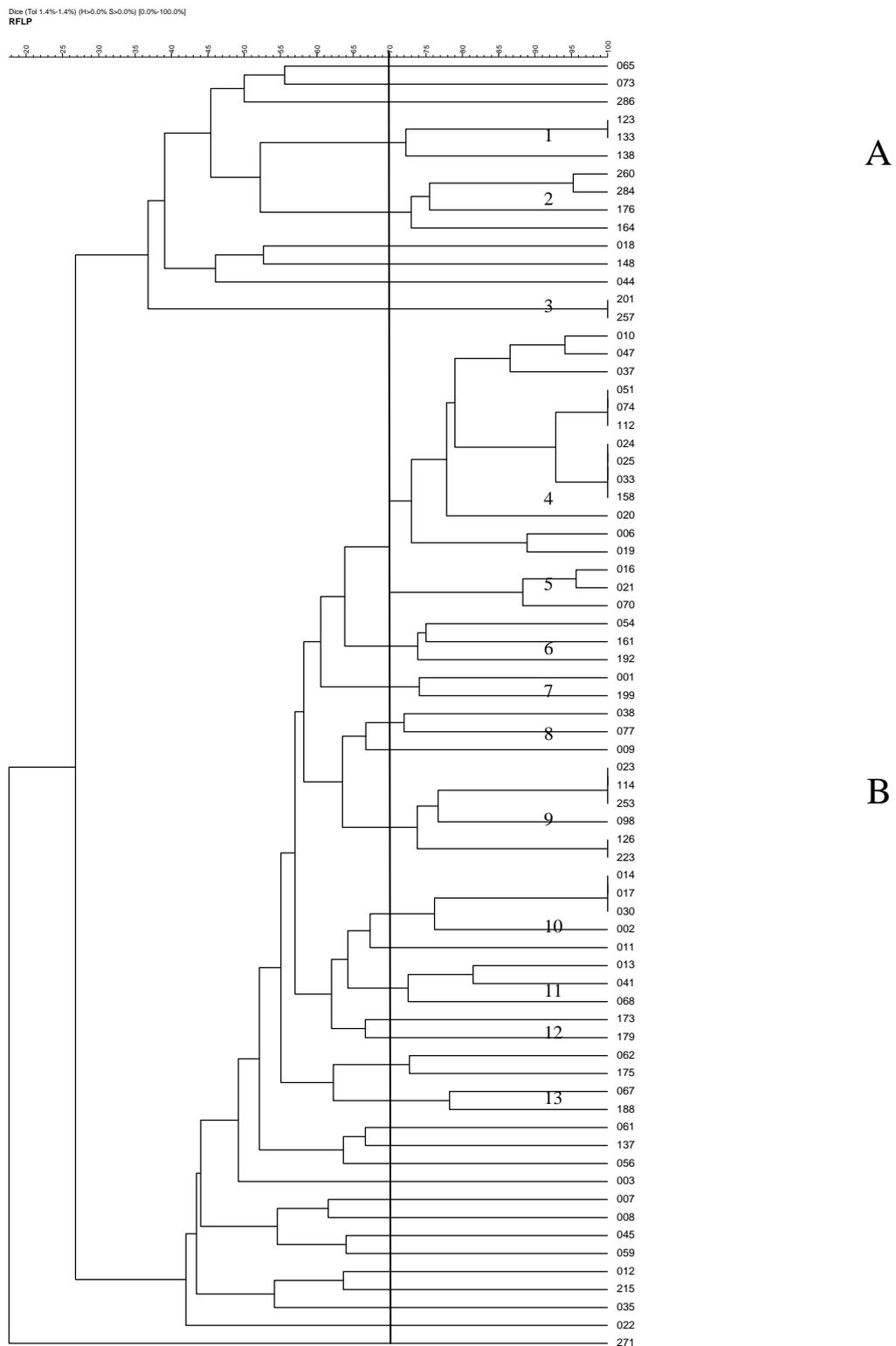
**Quadro 5.** Grupos genéticos com similaridade superior a 70% obtidos por RFLP.

<b>Grupo</b>	<b>Grupo genético</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Amostras</b>	<b>Similaridade</b>
A	1	3	123, 133, 138	72,2%
	2	4	260, 284, 176, 164	73,0%
	3	2	201, 257	100,0%
B	4	13	010, 047, 037, 051, 074, 112, 024, 025, 033, 158, 020, 006, 019	73,0%
	5	3	016, 021, 070	88,3%
	6	3	054, 161, 192	73,9%
	7	2	001, 199	74,1%
	8	2	038, 077	72,0%
	9	6	023, 114, 253, 098, 126, 223	73,8%
	10	4	014, 017, 030, 002	76,2%
	11	3	013, 041, 068	72,5%
	12	2	062, 175	72,7%
	13	2	067, 188	78,3%

Desta forma, das 72 amostras avaliadas, 19 delas foram agrupadas com 100% de similaridade, perfazendo um total de 26,4% dos isolados. Vinte e cinco isolados (34,7%) apresentaram mais de 90% de similaridade e ao analisarmos uma similaridade superior a 70% podemos identificar 49 isolados compartilhando perfis genéticos, distribuídos em 13 grupos, representando 68,1% da população avaliada.



**Figura 2.** Dendrograma dos 72 perfis genéticos obtidos com a técnica do RFLP-IS6110.



**Figura 3.** Dendrograma ampliado dos 72 perfis genéticos obtidos com a técnica do RFLP-*IS6110*.

Dentre os 19 isolados classificados em grupos genéticos, em 13 (68,4%) foi possível estabelecer algum tipo de ligação epidemiológica. A tabela 7 indica estas ligações bem como o período de manifestação da doença, a co-infecção com HIV e a profissão.

As ligações epidemiológicas estabelecidas entre os pacientes do grupo R1 (amostras 123 e 133) indicam um contato em ambiente hospitalar, uma vez que envolve um profissional da saúde com um indivíduo, já portador da tuberculose, que esteve internado em seu local de trabalho.

Os três pacientes do grupo R3 (amostras 051, 074 e 112) apresentavam características em comum como o uso endovenoso de drogas ilícitas e histórico prisional. Há indícios de que estes indivíduos tenham freqüentado os mesmos pontos de venda e de consumo de drogas, uma vez que residem em bairros comuns ou próximos.

Dos quatro pacientes do grupo R4 foram estabelecidas ligações apenas entre dois pacientes, que também pertenciam à mesma família e residência.

Dois dos pacientes do grupo R5 (amostras 023 e 114) residem em um conjunto habitacional da Companhia de Desenvolvimento Habitacional e Urbano do Estado de São Paulo (CDHU) e o terceiro indivíduo deste grupo é filho de uma das moradoras (paciente 023 e 253). Destaca-se aqui o fato de que os pacientes que compõem o grupo genético R4 habitam o mesmo conjunto residencial.

As ligações epidemiológicas estabelecidas entre os pacientes do grupo R7 (amostras 014, 017 e 030) foram integralmente solucionadas, uma vez que os três indivíduos pertenciam à mesma família e residência.

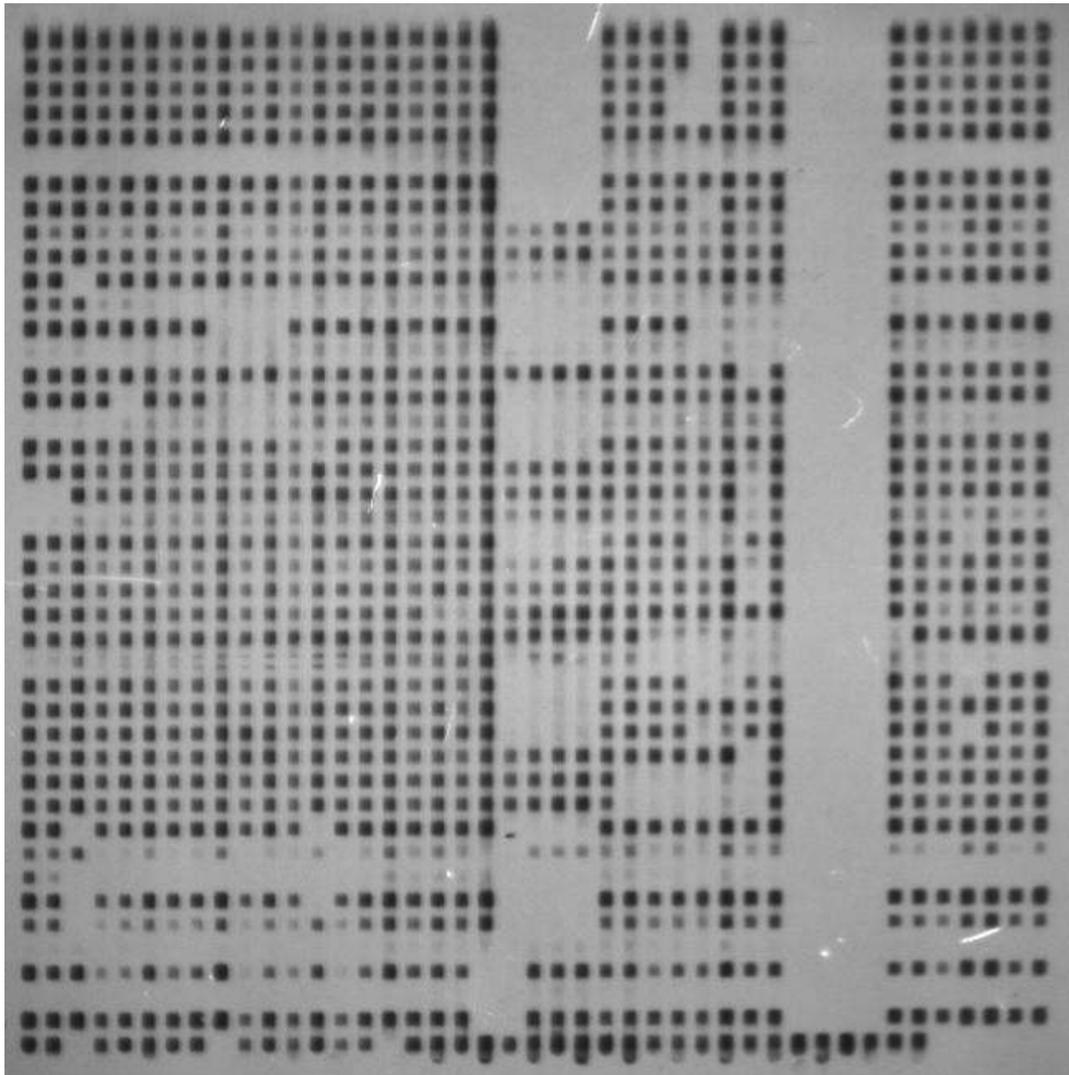
**Tabela 7.** Relações epidemiológicas identificadas entre 10 pacientes infectados por cepas de *M. tuberculosis* pertencentes a grupos genéticos definidos por RFLP-IS6110.

<b>Grupo Genético</b>	<b>Nº da Amostra</b>	<b>Data da Baciloscopia</b>	<b>HIV</b>	<b>Profissão</b>	<b>Relação Epidemiológica</b>
R1	123	20/02/2003	Negativo	Serviços gerais	Paciente e profissional da saúde
	133	09/04/2003	Negativo	Técnico de enfermagem	
R2	201	10/11/2004	Negativo	Auxiliar de escritório	
	257	15/09/2006	Negativo	Lavrador	
R3	051	30/04/2001	Positivo	Pedreiro	Usuários de drogas de mesmo bairro e bairros próximos
	074	24/10/2001	Positivo	Padeiro	
	112	25/10/2002	Negativo	Lavrador	
R4	024	04/06/2001	Negativo	Vendedor	Pai e filha
	025	28/02/2002	Negativo	Estudante	
	033	07/10/2000	Negativo	Lavrador	
	158	11/03/2005	Negativo	Acompanhante	
R5	023	19/12/2000	Positivo	Empregada doméstica	Moradores do mesmo condomínio, mãe e filho
	114	29/11/2002	Negativo	Porteiro	
	253	14/12/2005	Negativo	Cobrador	
R6	126	04/02/2003	Negativo	Do lar	
	223	24/04/2005	Ignorado	Ignorado	
R7	014	22/05/2000	Negativo	Do lar	Esposa, marido e filho
	017	28/07/2000	Negativo	Estudante	
	030	03/09/2001	Negativo	Pedreiro	

#### **4.5. Spoligotyping**

Através da técnica de Spoligotyping foram analisados 170 isolados de *M. tuberculosis*. Das amostras avaliadas, foram mantidas apenas os perfis não coincidentes de cada paciente, totalizando 116 amostras provenientes de 115 pacientes selecionados para este estudo.

A Figura 4 mostra os perfis genéticos dos isolados revelados a partir da membrana. Estes perfis genéticos visualizados através da hibridização com os oligonucleotídeos espaçadores foram transformados em valores numéricos, de maneira a obtermos um número de 15 dígitos (DALE et al., 2001). Esta identificação facilita a comparação de amostras com bancos de dados interlaboratoriais.



**Figura 3.** Revelação da membrana de Spoligotyping. As linhas representam as amostras e as colunas, os oligonucleotídeos espaçadores.

A comparação dos perfis genéticos obtidos com os dados inseridos no Banco Internacional de Spoligotyping SpolDB4 permitiu a identificação de 27 spoligotipos (*shared-types* - STs) previamente descritos. Estes, totalizando oitenta e cinco amostras com perfis genéticos conhecidos dentre os 116 obtidos, representando agrupamento de 73,3% da população. Todos os perfis obtidos são descritos nos quadros 6, 7 e 8.

**Quadro 6.** Relação dos spoligotipos obtidos e a respectiva identificação de famílias e spoligotipos contidos no banco internacional SpolDB4. Amostras 003 a 129.

Amostras	Descrição do Spoligotipo														Família	Spoligotipo	
003	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	0	0	T1	51
007	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
008	7	5	7	7	0	3	7	7	7	7	6	0	7	7	1	-	-
009	7	7	7	7	7	7	7	7	7	4	6	0	7	7	1	T1	1905
010	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
012	5	7	7	7	3	7	6	7	7	7	6	0	6	0	0	-	-
013	7	7	7	7	7	7	6	0	7	4	6	0	7	3	1	LAM4	1895
014	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
016	7	7	7	7	7	7	6	6	0	0	0	0	1	7	1	U	1892
017	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
018	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	0	7	7	1	H2	2
019	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
020	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	3	1	LAM4	60
021	7	7	7	3	5	7	6	6	6	3	0	0	1	7	1	-	-
022	7	7	7	7	7	7	7	7	7	4	6	0	7	7	1	T1	1905
023	6	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM1	20
024	6	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM1	20
025	6	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM1	20
030	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
035	7	7	7	7	7	7	7	7	6	1	4	0	0	7	1	-	-
038	7	6	0	0	0	2	6	0	4	0	0	0	1	7	1	-	-
041	7	7	7	7	7	7	6	0	7	4	6	0	7	3	1	LAM4	1895
044	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0	0	0	0	0	U (likely H3)	237
045	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
047	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
051	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
054	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7	6	0	7	7	1	T1	1626
059	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
061	7	7	7	7	7	7	6	7	7	5	6	0	7	3	1	-	-
062	7	7	7	7	7	7	6	0	7	4	6	0	7	3	1	LAM4	1895
065	7	7	7	7	2	7	7	7	7	7	2	0	7	7	1	-	-
067	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
068	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
070	7	7	7	7	7	7	6	6	0	0	0	0	1	7	1	U	1892
073	7	3	7	7	5	7	7	7	7	7	6	0	0	0	0	-	-
074	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
077	7	7	7	7	5	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	1176
098	7	7	7	3	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	81
112	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
114	6	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM1	20
120	7	7	7	7	5	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	393
121	7	7	7	7	5	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	393
123	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	0	7	7	1	H2	2
124	7	7	7	7	5	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	393
126	6	7	7	7	4	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	-	-
129	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64

**Quadro 7.** Relação dos spoligotipos obtidos e a respectiva identificação de famílias e spoligotipos contidos no banco internacional SpolDB4. Amostras 133 a 237.

Amostras	Descrição do Spoligotipo														Família	Spoligotipo	
133	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	0	7	7	1	H2	2
137	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
138	7	7	7	7	7	7	7	7	4	0	2	0	7	7	1	H1	47
148	7	7	7	7	7	7	3	4	7	7	6	0	4	7	1	T4_CEU1	39
158	6	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM1	20
159	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
160	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
161	7	7	7	7	7	7	2	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	1768
162	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
164	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	2	0	7	7	1	H3	50
165	5	7	7	7	3	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	-	-
166	7	7	7	7	7	7	4	1	7	7	2	0	7	7	1	-	-
167	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
170	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
173	7	7	7	7	7	7	6	0	7	1	6	0	7	7	1	-	-
175	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
176	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	2	0	7	7	1	H3	50
179	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
181	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
184	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
188	7	7	7	7	1	7	6	0	7	7	6	0	7	3	1	-	-
192	7	7	7	7	7	7	6	7	7	7	6	0	6	7	1	-	-
193	6	7	7	7	3	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM2	17
199	7	7	6	1	7	7	6	0	7	4	0	0	7	7	1	-	-
200	7	7	7	3	5	7	6	0	7	7	6	0	6	7	1	-	-
201	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	2	0	7	7	1	H3	50
203	7	5	6	1	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	-	-
211	7	7	7	7	7	7	7	7	6	2	2	0	7	7	1	-	-
212	7	7	6	1	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	156
213	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
214	7	7	7	7	3	7	7	7	7	7	6	0	7	3	1	T2-T3	73
215	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
217	7	7	7	7	7	7	6	0	7	4	6	0	7	3	1	LAM4	1895
219	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	42
220	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7	2	0	7	7	1	H3	1238
222	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	0	0	T1	51
223	6	7	7	7	3	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM2	17
224	7	7	7	7	0	3	7	7	4	0	0	0	0	1	1	-	-
226	7	7	7	7	1	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM9	216
227	7	7	7	7	7	7	6	0	7	6	6	0	7	3	1	-	-
230	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	0	T1	522
232	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
233	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM 3 e S/convergente	4
234	7	7	7	7	7	7	6	4	7	6	6	0	7	6	1	-	-
236	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
237	7	7	5	3	5	7	6	0	7	7	6	6	7	7	1	-	-

**Quadro 8.** Relação dos spoligotipos obtidos e a respectiva identificação de famílias e spoligotipos contidos no banco internacional SpolDB4. Amostras 238 a 288.

Amostras	Descrição do Spoligotipo														Família	Spoligotipo	
238	7	7	7	7	7	7	7	7	4	0	2	0	7	7	1	H1	47
241	7	7	7	7	0	0	6	5	4	0	0	0	0	0	0	-	-
244	7	7	7	7	4	0	0	7	7	5	6	0	7	7	1	-	-
246	4	6	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	4	7	1	-	-
250	6	7	7	7	3	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM2	17
251	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
253	6	7	7	7	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	LAM1	20
254	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
255	7	7	7	3	7	7	6	3	7	7	6	0	7	7	1	-	-
256	7	7	7	7	7	7	6	3	7	7	6	0	7	7	1	-	-
257	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
260	1	7	7	7	7	7	7	7	7	7	2	0	7	7	1	-	-
263	7	7	7	7	5	7	6	7	7	7	6	0	6	7	1	-	-
266	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	7	1	LAM6	64
270	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
271	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
272	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	7	7	1	T1	53
273	7	7	7	7	7	7	6	7	7	7	6	0	6	7	1	-	-
278	7	7	7	7	7	7	6	0	7	5	6	0	7	3	1	LAM6	95
279	7	7	7	7	7	7	6	3	7	7	6	0	7	7	1	-	-
280	7	7	7	7	7	7	6	0	7	4	6	0	7	3	1	LAM4	1895
284	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	2	0	7	7	1	H3	50
286	7	7	7	7	7	7	7	7	4	0	2	0	7	7	1	H1	47-
288	7	7	7	7	7	7	7	7	4	0	2	0	7	7	1	H1	47-

A distribuição dos 27 spoligotipos em linhagens e sub-linhagens (famílias) permitiu que identificássemos quatorze delas entre os isolados de Araraquara, T1, T2-T3, T4\_CEU1, H1, H2, H3, LAM1, LAM2, LAM3 e S/convergente, LAM4, LAM6, LAM9, U e U (likely H3).

A linhagem Latin-American-Mediterranean (LAM) foi a mais freqüente entre as amostras analisadas representando cerca de 40 % dos isolados. A Tabela 8 mostra a distribuição geográfica dos 12 spoligotipos da família LAM. Pode-se observar que o spoligotipo 1895 (ST1895) é um tipo localizado, tendo sido descrito apenas no Brasil. Já os spoligotipos ST4, ST1768, ST216 e ST1176 ainda não apresentam relatos de ocorrência no Brasil.

**Tabela 8.** Spoligotipos da família LAM descritos no banco internacional SpolDB4 identificados em Araraquara.

Famílias	Spoligotipos	Nº de isolados em Araraquara	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
LAM1	20	06	ARG, AUS, AUT, BEL, <b>BRA</b> , CMR, CUB, DEU, ECU, ESP, EST, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, IDN, LBY, MEX, MOZ, MWI, NAM, NLD, PER, PHL, PRT, RUS, SWE, USA, VEN, VNM, ZAF, ZWE	426
LAM2	17	03	ARG, <b>BRA</b> , CMR, CUB, CZE, ESP, FXX, GLP, GUF, HTI, MEX, MTQ, MYS, NAM, NLD, PHL, PRT, USA, VEM	322
LAM3 e S / convergente	4	01	ARG, AUT, BEL, CAN, DEU, FIN, FXX, GBR, GLP, GNB, GUF, HTI, ITA, ITAS, KEN, LBY, MAR, MTQ, MWI, MYS, NLD, NOR, POL, PRT, RUS, SAL, SWE, TUR, USA, VEN, ZAF	118
LAM4	60	01	ARG, AUT, BEL, <b>BRA</b> , CUB, DEU, DZA, ESP, FXX, GBR, LAM4, GNB, GUF, ITA, ITAS, MAR, MDG, MEX, MOZ, NLD, PRT, RUS, SEM, USA, VEM, ZAF, ZWE	83
LAM6	1895	05	<b>BRA</b>	02
LAM6	64	12	ARG, AUS, AUT, BEL, <b>BRA</b> , COM, CZE, DZA, FXX, GBR, GUF, IND, IRN, ITA, MDG, MEX, MTQ, MWI, MYS, PRT, SEM, USA, VEM	157
LAM6	95	01	<b>BRA</b> , GBR, GUF, USA	11
LAM6	1768	01	CUB, MYS	02
LAM9	42	14	ARG, ARM, AUS, AUT, AZE, BEL, BGD, <b>BRA</b> , CAF, CMR, CUB, CZE, DEU, DZA, EGY, ESP, EST, ETH, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, IDN, IND, IRN, ITA, ITAS, KAZ, KEN, LBY, LVA, MAR, MDG, MEX, MOZ, MTQ, MWI, MYS, NLD, NZL, PER, PHL, POL, PRT, PYF, RUS, SAL, SEM, SWE, THA, TUN, TUR, USA, VEM, VNM, ZAF, ZWE	1227
LAM9	81	01	ARG, <b>BRA</b> , CUB, ITA, ZWE	20
LAM9	216	01	ARG, ITA, USA, VEM	09
LAM9	1176	01	ARG, EST, GEO, IDN, MDG, NLD	11

A linhagem T representou cerca de 20 % dos isolados. Trata-se de uma família pouco caracterizada e classificada como uma linhagem moderna do *M. tuberculosis*.

A Tabela 9 apresenta os nove spoligotipos da família T identificados no estudo. Quatro deles não foram descritos no Brasil (ST393, ST522, ST1626 e ST39).

**Tabela 9.** Spoligotipos da família T descritos no banco internacional SpolDB4 identificados em Araraquara.

Famílias	Spoligotipos	Nº de isolados em Araraquara	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
T1	51	02	ARG, AUS, AUT, BEL, <b>BRA</b> , CHN, FXX, GBR, GLP, GUF, HTI, ITA, ITAS, JPN, MDG, MEX, MYS, NLD, PRT, SWE, TUR, USA, VEM, VNM	158
	53	11	ANT, ARG, ARM, AUS, AUT, AZE, BEL, BGD, <b>BRA</b> , BRB, CAF, CAN, CHN, CIV, CMR, COM, CUB, CZE, DEU, DNK, DZA, EAFR, EGY, ESP, EST, ETH, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, HUN, IDN, IND, IRN, ITA, ITAS, JPN, KAZ, KEN, LBY, LVA, MAR, MDG, MEX, MNG, MOZ, MTQ, MWI, MYS, NAM, NLD, NOR, NZL, PAK, PER, POL, PRT, REU, ROM, RUS, SAL, SDN, SEM, SUR, SWE, THA, TUR, USA, VEM, VNM, ZAF, ZMB, ZWE	2497
	156	01	AUT, <b>BRA</b> , ESP, ITA, MDG, USA	33
	393	03	AUS, FXX, PRT, USA	06
	522	01	AUT, GNB, HTI, IDN, KEN, USA	08
	1626	01	USA	03
	1905	02	ARG, <b>BRA</b>	02
T2-T3	73	01	AUS, AUT, BEL, <b>BRA</b> , EGY, FIN, FXX, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, IDN, ITA, MDG, MEX, MOZ, MTQ, NLD, PRT, SWE, USA, VEM, VNM, ZWE	114
T4_CEU1	39	01	ARM, AUT, BEL, CZE, DEU, FXX, GBR, ITA, NLD, POL, USA, VNM, ZAF	67

A linhagem Haarlem (H) representou 10 % dos isolados. A Tabela 10 indica os quatro spoligotipos identificados em Araraquara. O ST1238, além de raro, não foi descrito no Brasil.

**Tabela 10.** Spoligotipos da família H descritos no banco internacional SpolDB4 identificados em Araraquara.

Famílias	Spoligotipos	Nº de isolados em Araraquara	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
H1	47	04	ARG, ARM, AUS, AUT, AZE, BEL, BGD, <b>BRA</b> , CAF, CAN, CMR, CUB, CZE, DEU, DNK, ESP, EST, FIN, FXX, GBR, GLP, GNB, GUF, HTI, HUN, IND, ITA, ITAS, MAR, MDG, MEX, NLD, POL, PRT, ROM, RUS, SAL, SEN, SWE, TUR, USA, VEN, ZWE	721
H2	2	03	ARG, AUT, BEL, <b>BRA</b> , CUB, CZE, DEU, DNK, DZA, ESP, FIN, FXX, GLP, GUF, HTI, IND, ITA, LBY, MEX, MTQ, NLD, POL, RUS, TUR, USA, ZAF	283
H3	50	04	ARG, ARM, AUS, AUT, BEL, BOL, <b>BRA</b> , CAF, CHN, CIV, CMR, COM, CUB, CZE, DEU, DNK, DZA, EAFR, ESP, EST, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, HUN, IDN, IND, ITA, ITAS, JPN, KEN, LBY, MAR, MDG, MEX, MTQ, MYS, NLD, NZL, PAK, PER, POL, PRT, REU, ROM, RUS, SDN, SEM, SWE, THA, TUR, USA, VEN, VNM, ZAF	1504
	1238	01	GLP, MEX, VEM	03

Juntas, as famílias H, LAM e T totalizaram cerca de 70 % das amostras analisadas, retratando que estas as quais são as três principais famílias descritas mundialmente, são as mais frequentes na África, América Central, Europa e América do Sul.

A linhagem U foi descrita para 2,6% dos isolados e os dois únicos spoligotipos encontrados apresentaram distribuição geográfica contrastante.

Enquanto o ST1892 é exclusivamente encontrado no Brasil, o ST237 nunca foi descrito na América do Sul (Tabela 11).

**Tabela 11.** Spoligotipos da família U descritas no banco internacional SpolDB4 identificadas em Araraquara.

Famílias	Spoligotipos	Nº de isolados em Araraquara	Distribuição Geográfica	Nº de isolados SpolDB4
U	1892	02	<b>BRA</b>	02
U (likely H3)	237	01	AUT, BEL, CMR, DEU, FIN, FXX, GBR, IDN, ITA, ITAS, MDG, POL, PRT, RUS, SWE, USA, ZAF	74

Trinta e um isolados (26,7 %) não puderam ser classificados em spoligotipos e famílias divulgadas no banco SpolDB4, apresentando um perfil não descrito anteriormente. Estes spoligotipos não descritos (SND) estão relacionados na Tabela 12.

Os perfis genéticos descritos nos quadros 6, 7 e 8 foram analisados com o auxílio do Bionumerics, gerando o dendrograma apresentado na Figura 4. Foi possível a identificação de 15 grupos genéticos apresentando 100% de similaridade. Estes 15 grupos incluíram 75 amostras do total de 116 isolados tipados, representando 65,2% da população.

**Tabela 12.** Spoligotipos não descritos no banco internacional SpolDB4 identificados entre os isolados de Araraquara.

Spoligotipo	Nº das amostras	Descrição do Spoligotipo														Nº de isolados	
SND 1	008	7	5	7	7	0	3	7	7	7	7	6	0	7	7	1	01
SND 2	012	5	7	7	7	3	7	6	7	7	7	6	0	6	0	0	01
SND 3	021	7	7	7	3	5	7	6	6	6	3	0	0	1	7	1	01
SND 4	035	7	7	7	7	7	7	7	6	1	4	0	0	7	1	01	
SND 5	038	7	6	0	0	0	2	6	0	4	0	0	0	1	7	1	01
SND 6	061	7	7	7	7	7	7	6	7	7	5	6	0	7	3	1	01
SND 7	065	7	7	7	7	2	7	7	7	7	7	2	0	7	7	1	01
SND 8	073	7	3	7	7	5	7	7	7	7	7	6	0	0	0	0	01
SND 9	126	6	7	7	7	4	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	01
SND 10	165	5	7	7	7	3	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	01
SND 11	166	7	7	7	7	7	7	4	1	7	7	2	0	7	7	1	01
SND 12	173	7	7	7	7	7	7	6	0	7	1	6	0	7	7	1	01
SND 13	188	7	7	7	7	1	7	6	0	7	7	6	0	7	3	1	01
SND 14	192 e 273	7	7	7	7	7	7	6	7	7	7	6	0	6	7	1	02
SND 15	199	7	7	6	1	7	7	6	0	7	4	0	0	7	7	1	01
SND 16	200	7	7	7	3	5	7	6	0	7	7	6	0	6	7	1	01
SND 17	203	7	5	6	1	7	7	6	0	7	7	6	0	7	7	1	01
SND 18	211	7	7	7	7	7	7	7	7	6	2	2	0	7	7	1	01
SND 19	224	7	7	7	7	0	3	7	7	4	0	0	0	0	1	1	01
SND 20	227	7	7	7	7	7	7	6	0	7	6	6	0	7	3	1	01
SND 21	234	7	7	7	7	7	7	6	4	7	6	6	0	7	6	1	01
SND 22	237	7	7	5	3	5	7	6	0	7	7	6	6	7	7	1	01
SND 23	241	7	7	7	7	0	0	6	5	4	0	0	0	0	0	0	01
SND 24	244	7	7	7	7	4	0	0	7	7	5	6	0	7	7	1	01
SND 25	246	4	6	7	7	7	7	7	7	7	7	6	0	4	7	1	01
SND 26	255	7	7	7	3	7	7	6	3	7	7	6	0	7	7	1	01
SND 27	256 e 279	7	7	7	7	7	7	6	3	7	7	6	0	7	7	1	02
SND 28	260	1	7	7	7	7	7	7	7	7	7	2	0	7	7	1	01
SND 29	263	7	7	7	7	5	7	6	7	7	7	6	0	6	7	1	01

SND: Spoligotipo não descrito.

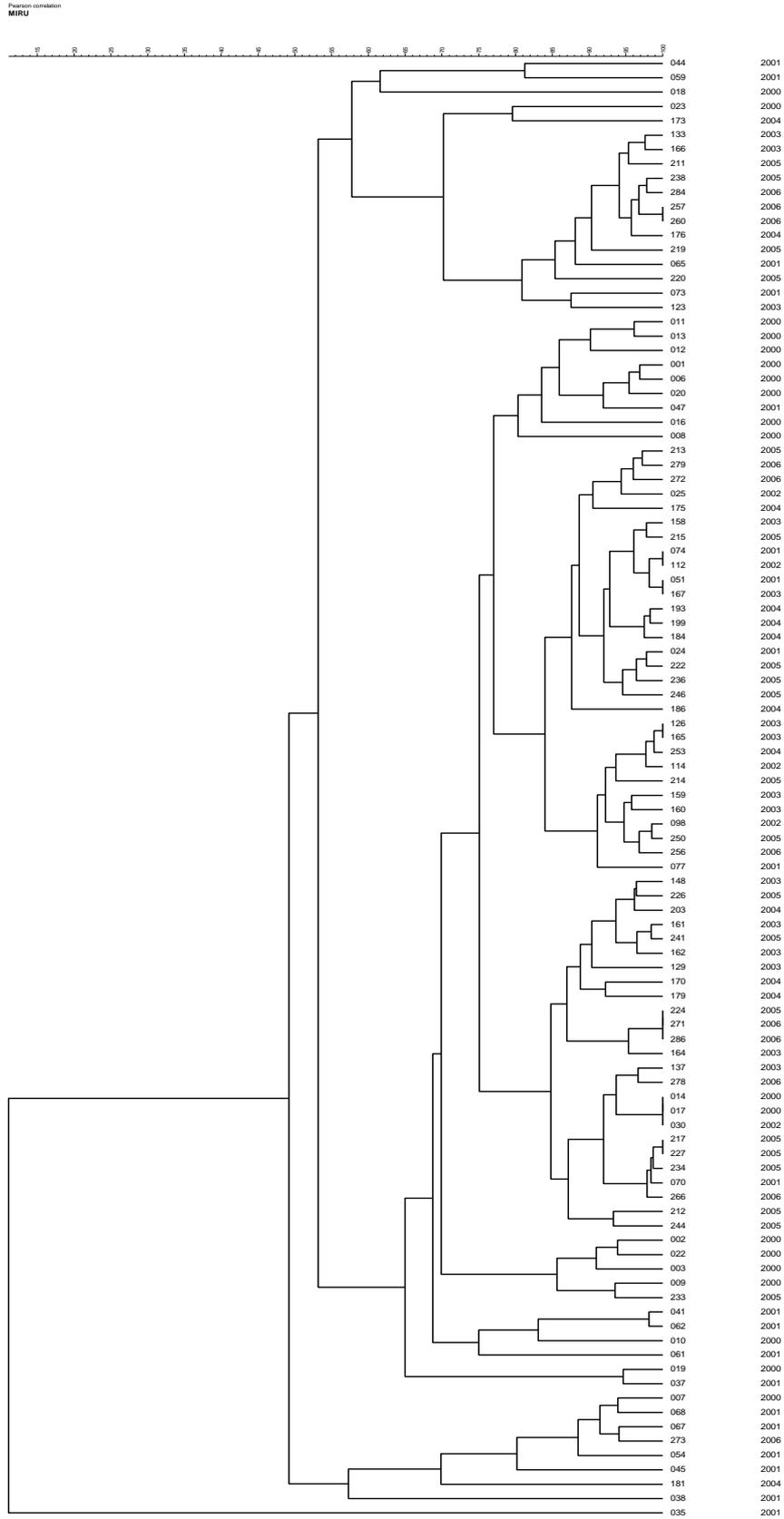


**Figura 5.** Dendrograma dos 116 perfis de spoligotyping obtidos.

#### **4.6. MIRU**

Os isolados de pacientes com tuberculose pulmonar do município de Araraquara foram avaliados geneticamente através da técnica de MIRU por Pandolfi (2006), que analisou 49 isolados de 2000 a 2002 e Santos (2006), que analisou 115 isolados de 2002 a 2006. Os resultados selecionados para as análises aqui avaliadas totalizam 102 isolados clínicos que também tenham sido avaliados por RFLP e/ou Spoligotyping.

A análise dos 102 isolados, mostrados na Figura 6, indicam a formação de sete grupos com 100% de similaridade genética, alcançando um índice de 15,7% das amostras.



**Figura 6.** Dendrograma de 102 isolados avaliados por MIRU.

#### **4.7. Spoligotyping associado ao MIRU**

Ao associarmos as técnicas de Spoligotyping e MIRU, dos isolados 128 isolados clínicos inicialmente selecionados para este estudo, eliminando os isolados de mesmo paciente que apresentavam perfis coincidentes, chegamos a uma amostragem de 96 isolados tipados tanto por Spoligotyping quanto por MIRU.

A Figura 7 retrata esta associação, que resultou na formação de apenas 3 grupos com 100% de similaridade genética envolvendo sete isolados (7,3%).

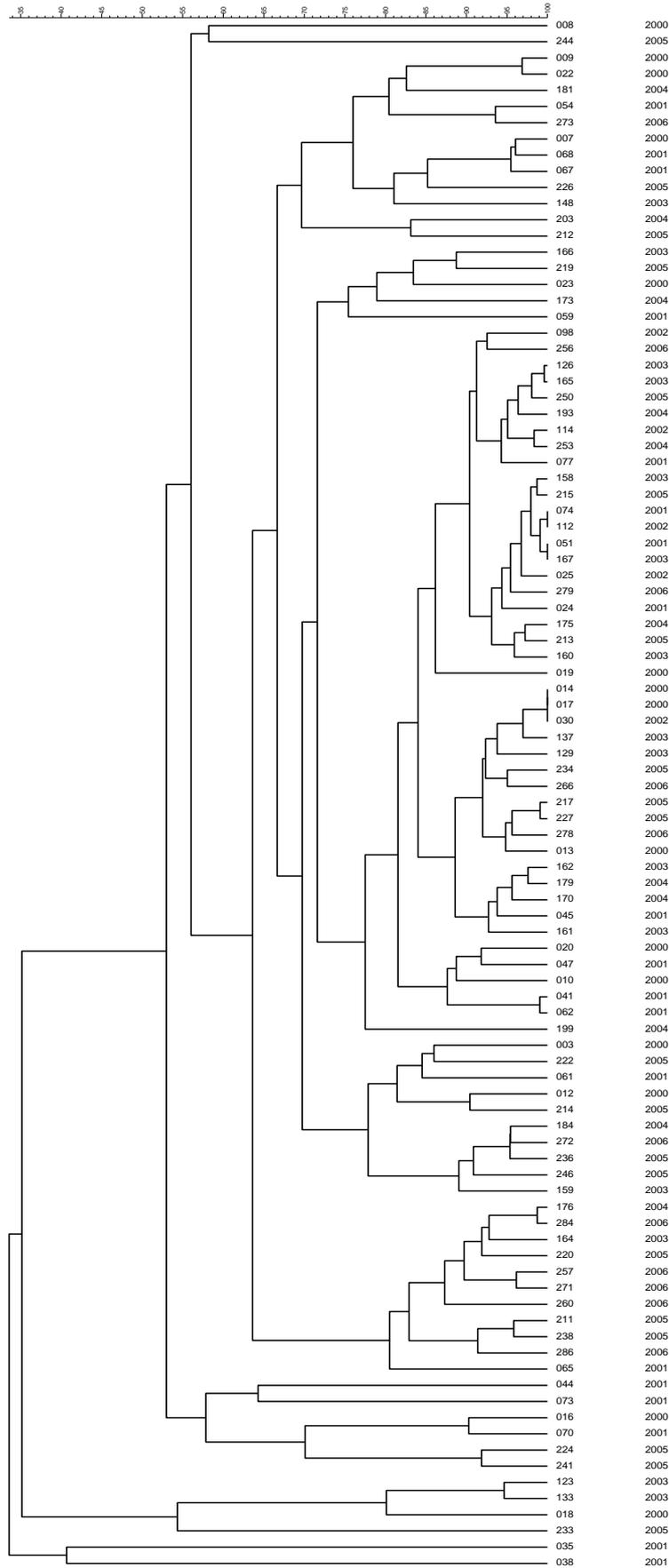
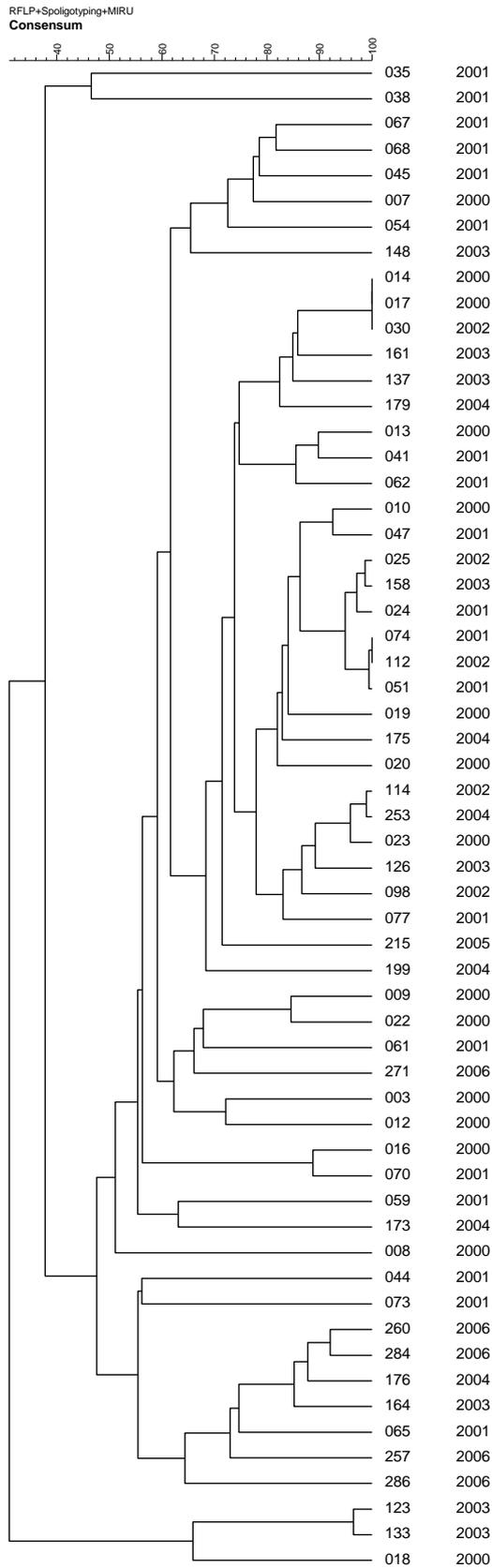


Figura 7. Dendrograma de 96 isolados avaliados por Spoligotyping e MIRU.

#### **4.8. Spoligotyping e MIRU associados ao RFLP**

Ao associarmos as técnicas de Spoligotyping, MIRU e RFLP, dos isolados 128 isolados clínicos inicialmente selecionados para este estudo, eliminando os isolados de mesmo paciente que apresentavam perfis coincidentes, chegamos a uma amostragem de 59 isolados tipados tanto por Spoligotyping quanto por MIRU e RFLP.

A Figura 8 retrata esta associação, que resultou na formação de apenas 2 grupos com 100% de similaridade genética envolvendo cinco isolados (8,5%).



**Figura 8.** Dendrograma de 59 isolados avaliados por Spoligotyping, MIRU e RFLP.

## 5. Discussão

---

A tuberculose é um exemplo de doença infecciosa em que as técnicas de biologia molecular permitiram a obtenção de informações que seriam difíceis ou até mesmo impossíveis de serem verificadas através de métodos laboratoriais convencionais (FOXMAN e RILEY, 2001).

Segundo Tenover et al. (1997), amostras com pequenas alterações no número ou na altura de bandas, devido a uma simples mutação, inserção, deleção ou inversão, podem ser identificadas através da tipagem da IS6110 como cepas relacionadas e pertencentes a um mesmo agrupamento ou família, retradados com um índice de similaridade superior a 70%. Portanto, os resultados obtidos com RFLP possibilitam inferir que cerca de 68% dos casos de tuberculose em Araraquara são causados por duas famílias de agentes etiológicos, as famílias A e B.

A tuberculose proveniente de transmissão recente é normalmente definida como a doença que ocorre dentro de dois anos após a infecção com o agente *M. tuberculosis*. Segundo Small et al. (1994), os casos de doença associados às cepas que formam grupo genético são decorrentes de transmissão recente. Presume-se, desta maneira, que grupos genéticos formados por isolados idênticos que compartilham um DNA *fingerprinting* são resultado da disseminação do organismo entre os hospedeiros humanos que o abrigam. Já os pacientes com tuberculose cujos isolados não podem ser agrupados em grupo genético, ou seja, amostras com perfil genético único, apresentam a doença proveniente da reativação de uma infecção latente

adquirida no passado. Esta inferência claramente depende da heterogeneidade dos marcadores moleculares usados para a tipagem (ALLAND, 1994).

Sendo o RFLP-IS6116 o método de tipagem molecular com o mais alto índice de discriminação, podemos afirmar que durante o período estudado, entre os anos de 2000 a 2006, o índice de tuberculose no município de Araraquara proveniente de uma infecção recente foi de 26,4%. A origem destas infecções recentes foi comprovada ao se estabelecer as associações epidemiológicas em 68,4% dos casos de tuberculose envolvidos em grupos genéticos com 100% de similaridade genética de seu agente.

O método de genotipagem baseado em PCR, Spoligotyping, proposto para avaliar a epidemiologia molecular e facilitar o estudo de amostras em larga escala, indicou um índice de similaridade genética de 65,2% entre os isolados (COWAN et al., 2005). Sendo este método menos discriminatório comparado ao RFLP, ao observarmos o posicionamento dos isolados que compõem os grupos genéticos (100% de similaridade) formados pelo spoligotyping e os grandes grupos A e B (acima de 70% de similaridade) gerados pelo RFLP, identificamos uma coincidência de amostras agrupadas e uma associação entre sua frequência (68,1% dos isolados por RFLP foram agrupados com até 70% de similaridade).

O Spoligotyping permitiu a identificação de cerca de 73% dos spoligotipos dos isolados de Araraquara entre os spoligotipos descritos no Banco Internacional de Spoligotyping SpolDB4. As famílias LAM, T e H representaram cerca de 70% de todos os isolados deste estudo, enquanto cerca de 26% dos spoligotipos apresentaram perfis não descritos anteriormente no mesmo banco.

Cowan e colaboradores (2005) analisaram 259 isolados, provenientes de um período de três anos de Wisconsin, através da genotipagem por RFLP, Spoligotyping e MIRU, e relataram que, independente do método de tipagem adotado, a adição de um segundo ou terceiro método diminuiu o índice de grupos genéticos encontrados compartilhando 100% de similaridade. Entretanto, os resultados de Cowan et al. (2005) demonstraram que a tipagem por Spoligotyping e MIRU associadas gerou uma discriminação adequada para a maioria dos casos analisados.

A associação entre os métodos de Spoligotyping e MIRU para os isolados avaliados neste estudo gerou um índice de similaridade completa próxima de 7,3%. Entretanto, ao analisarmos o agrupamento de isolados com similaridade superior a 90%, verificamos o envolvimento de 71,9% das amostras. Ainda para a associação de Spoligotyping e MIRU, este índice chega a 62,7% dos isolados com similaridade acima de 90% quando são selecionadas apenas as 59 amostras que foram analisadas pelos três métodos abordados. Em ambos os casos, os isolados envolvidos neste agrupamento também coincidem com aqueles envolvidos nos grupos A e B de até 70% de similaridade identificados pelo RFLP.

A associação entre RFLP, Spoligotyping e MIRU indicou a formação de apenas 2 grupos com 100% de similaridade genética envolvendo 8,5% dos isolados. No entanto, a associação das amostras em grupos de até 90% de similaridade foi mais satisfatória quanto a associação das amostras que comprovadamente apresentaram ligações epidemiológicas, representando cerca de 27% dos isolados. Este índice aproxima-se da porcentagem dos isolados em grupos genéticos com 100% de similaridade gerado pelo RFLP.

Com relação às relações epidemiológicas estabelecidas, podemos ressaltar a transmissão intradomiciliar com sendo um alto fator de risco para a infecção recente de tuberculose.

Destacamos também a ocorrência de cerca de 21% dos casos provenientes de infecção recente em um conjunto habitacional da Companhia de Desenvolvimento Habitacional e Urbano do Estado de São Paulo (CDHU).

## 6. Conclusões

---

1. A genotipagem através do RFLP permite uma melhor discriminação entre os isolados bem como uma excelente associação entre amostras relacionadas epidemiologicamente.
2. A técnica de Spoligotyping associada ao MIRU permite uma boa discriminação entre os isolados clínicos, da mesma forma que propicia uma satisfatória correlação entre casos ligados epidemiologicamente. Neste estudo, a tolerância para as associações foi de grupos genéticos formados com índices de similaridade superior a 90%.
3. A associação do RFLP, Spoligotyping e MIRU não foi uma boa ferramenta para a análise genética dos isolados clínicos visando esclarecimentos epidemiológicos.
4. Cerca de 73% dos spoligotipos obtidos foram identificados no Banco Internacional de Spoligotyping SpolDB4, sendo as famílias LAM, T e H as mais predominantes entre os isolados de Araraquara.
5. Cerca de 27% dos spoligotipos encontrados nos isolados de Araraquara compõem perfis não descritos no Banco Internacional de Spoligotyping SpolDB4.
6. A técnica de RFLP permitiu a identificação de um índice de 26,4% de casos de tuberculose proveniente de infecção recente na cidade de Araraquara, no período de 2000 a 2006.

7. Algum tipo de relação epidemiológica foi verificada em cerca de 68% dos casos envolvendo grupos genéticos identificados pelo RFLP. Destaca-se as transmissões intradomiciliares e a moradia em condomínios residenciais do CDHU no município de Araraquara.

8. A técnica de RFLP permitiu a distinção de dois grandes grupos genéticos, A e B, dentre os isolados de Araraquara.

## 7. Referências Bibliográficas

---

ALLAND, D.; KALKUT, G. E.; MOSS, A. R.; MCADAM, R. A.; HAHN, J. A.; BOSWORTH, W.; DRUCKER, E.; BLOOM, B. R. Transmission of tuberculosis in New York City – an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 1710-1716, 1994.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **Am. J. Respir. Care Med.**, v. 161, p. 1376-1395, 2000.

ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 53, n. 1785–1789, 2003.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; GÓMEZ-MAMAPASO, E.; GALÁN, J.C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 49, p. 1263-1273, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5ª ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. Rio de Janeiro, 1994.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J.R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W.M.; GORI, A.; AL-HAJJOJ, S.A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international Spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol.**, v. 6, p. 6-23, 2006.

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; 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.** v. 53, p. 1305–1314, 2003.

COWAN, L.S.; DIEM, L.; MONSON, T.; WAND, P.; TEMPORADO, D.; OEMIG, T.V.; CRAWFORD, J.T. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 688-695, 2005.

DALE, J.W.; BRITAIN, D.; CATALDI, A.A.; COUSINS, D.; CRAWFORD, J.T.; DRISCOLL, J.; HEIRSMA, H.; LILLEBAEK, T.; QUITUGUA, T.; RASTOGI, N. et

al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*: recommendations for standardized nomenclature. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 5, p. 216-219, 2001.

DANNENBERG, A. M. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: host-parasite interactions, cell-mediated immunity, and delayed-type hypersensitivity. In: SCHLOSSBERG, D. (Ed.) **Basic principles in tuberculosis**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 1992.

EDWARDS, D.; KIRKPATRICK, C. H. The immunology of mycobacterial diseases. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 134, p. 1062-1071, 1986.

FARER, L. S.; LOWELL, L. M.; MEADOR, M. P. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. **Am. J. Epidemiol.**, v. 312, p. 205-217, 1979.

FINE, P. E. M. The BCG story: lessons from the past and is for the future. **Rev. Infect. Dis.**, v.11, Suppl., p. S353-S359, 1989.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **Am. J. Epidemiol.**, v. 153, p. 1135-1141, 2001.

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

HORSBURGH, J. Tuberculosis without tubercles. **Tuberc. Lung Dis.**, v. 77, p. 197-198, 1996.

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

KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. **J. App. Microbiol.**, 94: 781-91, 2003.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W.H.; HERMANS, P.W.M.; MARTIN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B.B.; RILEY, L.W.; YAKRUS, M.A.; MUSSER, J.M.; VAN EMBDEN, J.D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *M. tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2607-2618, 1999.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G.R.M. **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria.** 2ª ed., São Paulo: Ed. Atheneu, 2000.

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

LEITE, C. Q. F.; TELAROLLI JUNIOR, R. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. *Rev. Ciênc. Farm.*, v. 18, n. 1, p. 17-28, 1997.

LEVIN, B. R.; LIPSITCH, M.; BONHOEFFER, M. Population biology, evolution, and infectious disease; convergence and synthesis. **Science**, v. 283, n. 5403, p. 806-809, 1999.

MAZARS, E., LESJEAN, S., BANULS, A., GILBERT, M., VINCENT, V., GICQUEL, B., TIBAYRENC, M., LOCHT, C., SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proc. Of Nat. Am. Ac. of Scie.**, v. 98, n. 4, p. 1901-1906, 2001.

MOLHUIZEN, H.O.F; BUNSCHOTEN, A.E.; SCHOULS, L.M.; VAN EMBDEN, J.D.A. In: PARISH, T; STOKER, N.G. (Ed). **Mycobacteria protocols**. Humana Press, 1998.

MOREIRA-OLIVEIRA, M.S.; OLIVEIRA, H.B.; PACE, F.; STEHLING, E.G.; ROCHA, M.M.M.; AILY, D.C.G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W.D. Molecular genotyping and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained

from inmates of correctional institutions of Campinas, Southeast Brazil. **BJID**. v. 12, p. 487-493, 2008.

MURRAY, J. Defense mechanisms. In: MURRAY, J. F. (Ed.) **The normal lung: the basis for diagnosis and treatment of pulmonary disease**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986.

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

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

PARK, Y.K.; BAI, G.H.; KIM, S.J. Restriction length polymorphism analysis of *M. tuberculosis* isolated from countries in the Western Pacific Region. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 191-197, 2000.

RILEY, R. Transmission and environmental control of tuberculosis. In: REICHMAN, L.; HERSHFELD, E. (Ed.) **Tuberculosis**. New York: Marcel Dekker, 1993.

SAHADEVAN, R.; NARAYANAN, S.; PARAMASIVAN, C.N.; PRABHAKAR, R.; NARAYANAN, P.R. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *M. tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 3037-3039, 1995.

SANTOS, A.C.B. **Estudo da epidemiologia molecular da tuberculose em pacientes de Araraquara-SP, no período de 2002 à 2006.** 2009. 96 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

SHERRIS, J. C. Mycobacteria. In: SHERRIS, J. C. (Ed.) **Medical microbiology: an introduction to infectious diseases.** New York: Elsevier Science, 1984. p. 291-304.

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

SMALL, P.M.; SCHECTER, G.F.; GOODMAN, P.C.; SANDE, M.A.; CHAISSON, R.E.; HOPEWELL, P.C. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 289-294, 1991.

SMITH, D.; WIENGESHAUS, E. What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in humans. **Rev. Infect. Dis.**, v. 11, p. S385-S393, 1989.

SOLA, C.; FILLIOL, I.; GUTIERREZ, M.C.; MOKROUSOV, I.; VINCENT, V.; RASTROGI, N. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 390-396, 2001.

STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 259-272.

STYBLO, K. **Epidemiology of tuberculosis**. The Hague: Royal Netherlands Tuberculosis Association, 1991.

SUPPLY, P., LESJEAN, S., SAVINE, E., KREMER, K., SOOLINGEN, D., LOCHT, C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3563-3571, 2001.

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

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 18, n. 6, p. 426-439, 1997.

THWAITES, G.; CAWS, M.; CHAU, T.T.H.; D'SA, A.; LAN, N.T.N.; HUYEN, M.N.T.; GAGNEUX, S.; ANH, P.T.H.; THO, D.Q.; TOROK, E.; NHU, N.T.Q.; DUYEN, N.T.H.; DUY, P.M.; RICHENBERG, J.; SIMMONS, C.; HIEN, T.T.; FARRAR, J. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 46, n. 4, p. 1363-1368, 2008.

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

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

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; DE HAAS, P. E. W.; SOLL, D. R.;  
VAN EMBDEN, J. D. A. Occurrence and stability of insertion sequences in *M. tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2578-2586, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.** Geneva: World Health Organization, 2008.  
(WHO Report)

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo I

**SERVIÇO ESPECIAL DE SAÚDE DE ARARAQUARA - SESA  
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA – USP  
PROGRAMA DE TUBERCULOSE**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA E  
MICROBIOLÓGICA DOS PACIENTES**

Data da entrevista: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### 1. Identificação:

Nome: \_\_\_\_\_

Cadastro/Matrícula: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade Presumida(em anos):\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

Referência: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_

Endereço trabalho/escola: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cor ou Raça:  Branca  Preta  Parda  Amarela  Indígena  Sem declaração

Procedência: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Zona:  Urbana  Rural  Sem residência fixa  Penitenciária  Sem dados

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

#### 2. Caracterização sócio-econômica:

Profissão: \_\_\_\_\_

Atividade: \_\_\_\_\_

Situação Profissional atual:  Vínculo empregatício  Autônomo  Aposentado  Desempregado

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

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

Moradia:  Unifamiliar  Multifamiliar  Coletiva  Rua  Outra: \_\_\_\_\_

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

Nº refeições diárias:  1  2  3 ou mais  nenhuma

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

### 3. Situação Epidemiológica:

Notificado em : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Semana epidemiológica: \_\_\_/\_\_\_ Ficha epidemiológica nº: \_\_\_\_\_

Notificado por:

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

Vacina **BCG-ID** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Cicatriz :  +  -

Tem ou teve contato com paciente de Tuberculose?

Não  Sim, há \_\_\_ meses/anos Por \_\_\_\_\_ meses/anos Nome: \_\_\_\_\_

Teve Tuberculose anteriormente?

Sim Quantas vezes? \_\_\_\_\_  Não

Tipo de tuberculose: \_\_\_\_\_ início da doença: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Local do tratamento: \_\_\_\_\_ tratamento de \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ a \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Alta:  cura  mudança de diagnóstico  abandono  transferência

Tipo de tuberculose: \_\_\_\_\_ início da doença: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Local do tratamento: \_\_\_\_\_ tratamento de \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ a \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Alta:  cura  mudança de diagnóstico  abandono  transferência

Tipo de tuberculose: \_\_\_\_\_ início da doença: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Local do tratamento: \_\_\_\_\_ tratamento de \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ a \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Alta:  cura  mudança de diagnóstico  abandono  transferência

### 4. Antecedentes Pessoais:

Tabagismo:  Sim, há \_\_\_ anos Nº cigarros/dia: \_\_\_\_\_  Não

Etilismo:  Sim, há \_\_\_ anos  Não

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

**Sorologia HIV:**  Negativa  Positiva  Indeterminada  Não Realizada  Recusa

ELISA1 em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ELISA2 em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Diabetes  Candidíase oral  Blastomicose  Outra micose profunda (\_\_\_\_\_)

Hanseníase  Doença mental  Anemia  Câncer de pulmão  Outra neoplasia (\_\_\_\_\_)

Cirurgia:  Sim, de \_\_\_\_\_  Não

Uso de droga imunossupressora:  Sim, qual? \_\_\_\_\_  Não

### 5. História da doença atual:

**Sintomas:** Início em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  emagrecimento  febre  tosse  anorexia  dispnéia

escarros hemoptóicos  fraqueza  sudorese noturna  dor torácica  outro \_\_\_\_\_

**Local de diagnóstico:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Exames:** PPD \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado : \_\_\_\_\_mm  Não realizado

**Baciloscopia** nº \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  escarro  outro material: \_\_\_\_\_  
 Positivo IB= \_\_\_\_\_  Negativo  Não realizado

**Cultura :** nº \_\_\_\_\_  escarro  outro material: \_\_\_\_\_  
 Positiva  Negativa, realizado , \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Não realizada

**Identificação:** \_\_\_\_\_, realizado , \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Não realizada

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

Rifampicina  Isoniazida  Pirazinamida  Streptomicina  
 Etambutol  Etionamida  Cicloserina  Paranitrobenzoico  Outro \_\_\_\_\_

**PCR :** \_\_\_\_\_

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

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

Biópsia ganglionar  Biópsia pulmonar  Biópsia pleural  
 Outros: \_\_\_\_\_

**Avaliação antropométrica inicial:** Peso: \_\_\_\_\_Kg Altura: \_\_\_\_\_ m IMC= \_\_\_\_\_

**Forma clínica:**  Pulmonar  Pleural  Ganglionar  Meníngea  Outra: \_\_\_\_\_

**Início do tratamento:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ **Esquema:** \_\_\_\_\_ **Fim do tratamento:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Medicamentos utilizados:**  Rifampicina  Isoniazida  Pirazinamida  Etambutol  
 Etionamida  Streptomicina  Amicacina  Clofazimina  Norfloxacino  Outro \_\_\_\_\_

**Baciloscopia de Controle :** Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Negativa  Positiva, IB= \_\_\_\_\_  Não realizada  
**Cultura:** Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Negativa  Positiva  Não realizada **Identificação:** \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Negativa  Positiva, IB= \_\_\_\_\_  Não realizada  
**Cultura:** Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Negativa  Positiva  Não realizada  
**Identificação:** \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Negativa  Positiva, IB= \_\_\_\_\_  Não realizada  
**Cultura:** Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Negativa  Positiva  Não realizada **Identificação:** \_\_\_\_\_

**Tratamento 2:** Início \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ **Motivo:** \_\_\_\_\_ **Esquema:** \_\_\_\_\_ **Fim do tratamento 2:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Na Alta medicamentosa :**

**Baciloscopia :** Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Negativa  Positiva, IB= \_\_\_\_\_  Não realizada  
**Cultura:** Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  Negativa  Positiva  Não realizada  
**Identificação:** \_\_\_\_\_

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



## 8.2. Anexo II

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

Protocolo nº 17/2002-CEP

Interessado: Profª Drª CLARICE QUEICO FUJIMURA LEITE

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

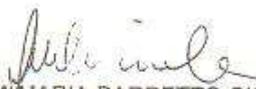
### **Parecer nº 01/2003 – Comitê de Ética em Pesquisa**

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

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

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

Araraquara, 31 de janeiro de 2003.

  
Profª. Drª. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI  
Coordenadora do CEP

### 8.3. Anexo III

#### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

##### Dados sobre a pesquisa

**Título do Projeto:** Epidemiologia Molecular da Tuberculose em pacientes da região de Araraquara  
**Coordenadora do projeto:** Clarice Queico Fujimura Leite telefone: (0XX16) 3301 6953  
**Médicos responsáveis:** Dr. Eduardo F. Hage e Dr. Walter Manso Figueiredo telefone: (0XX16) 222 2277  
**Telefone de contato do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP:** (0XX16) 3301 6897

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

##### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

1. Eu compreendo que minha participação é inteiramente voluntária e não é, de forma alguma, condição para que receba tratamento médico neste serviço de saúde. Se eu decidir não participar desta pesquisa ou interrompê-la a qualquer momento não serei prejudicado.
2. Eu responderei a um questionário padronizado que investigará aspectos sobre meu perfil sócio-econômico. O questionário identificará fatores de risco que possam estar associados à transmissão da tuberculose, além de analisar o uso de drogas e/ou tóxicos, hábitos sexuais e transmissão sanguínea prévia.
3. Após aconselhamento sobre o significado do teste sorológico para o vírus da Aids, eu permitirei que o resultado seja utilizado nesta pesquisa.
4. Posso me recusar a fazer o teste sorológico para o vírus da Aids, sem que isto implique na minha exclusão desta pesquisa.

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

Endereço:

Identidade (Nº do RG):

### Artigos científicos completos publicados em periódicos

- 1- PANDOLFI, José Rodrigo Claudio, MALASPINA, Ana Carolina, SANTOS, Adolfo Carlos Barreto, Suffys, P.N., OELLEMANN, M.A.C., VALENTINI, S.R., **LEITE, C. Q. F.** Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia.. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** , v.28, p.251 - 258, 2007.
- 2- Malaspina AC., Cavalcanti HR., **Leite CQF.**, Machado SMA., Viana BHJ., Silva RMG., Hage EF., Figueiredo WM, Marques E., Ferrazoli L., Arbex M., Lessi M., Fonseca LS., Rigouts L., Feres MH. Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* Molecular Typing in a Tuberculosis Low – Endemic Agro-Industrial Setting of Brazil. **Jpn. J. Infect. Dis.** v. 61, p. 231-233, 2008
- 3- Tashima, Nair Toshiko ; SIMÕES, Maria Jacira Silva ; **Leite, Clarice Queico Fujimura** ; Fluminhan, Antonio ; Nogueira, Marco Antonio ; MALASPINA, Ana Carolina . Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 1-11, 2009.
- 4- E. Noda Noguti, C. Q. Fujimura Leite, A. C. Malaspina, A. C. B. Santos, R. D. C. Hirata, M. H. Hirata, E.M. Mamizuka, R. Fressatti Cardoso : Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from low endemic setting in south of Brazil: Aceito para publicação na **Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz:**

# 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](#)