

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

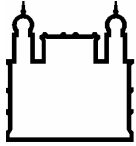
**ESTUDO DE FATORES RELACIONADOS AO CONTROLE DA
TUBERCULOSE: RESISTÊNCIA ÀS DROGAS, TRANSMISSÃO E
SUSCETIBILIDADE DO HOSPEDEIRO.**

MARCILIO DELAN BALIZA FERNANDES

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARCILIO DELAN BALIZA FERNANDES

ESTUDO DE FATORES RELACIONADOS AO CONTROLE DA
TUBERCULOSE: RESISTÊNCIA ÀS DROGAS, TRANSMISSÃO E
SUSCETIBILIDADE DO HOSPEDEIRO.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Profa. Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
Profa. Dra. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

RIO DE JANEIRO
2007

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Marcilio Delan Baliza Fernandes

ESTUDO DE FATORES RELACIONADOS AO CONTROLE DA TUBERCULOSE: RESISTÊNCIA ÀS DROGAS, TRANSMISSÃO E SUSCETIBILIDADE DO HOSPEDEIRO.

ORIENTADOR (ES): **Profa. Dra.** Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
Profa. Dra. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Aprovada em: 23 / 11 / 2007

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Nome - Milton Ozório Moraes (Presidente)
Prof. Dr. Nome – Adalberto Rezende Santos (avaliador Interno)
Prof. Dr. Nome – Afrânio Lineu Kritski (avaliador externo)

Rio de Janeiro, 23 de novembro de 2007

À minha esposa Claudia Lima, meus filhos Ícaro e Victor, meus pais Orlando e Adelina e meus irmãos Mauricio, Adelane e Marcelo que sempre me apoiaram em todos os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às instituições que deram suporte para que este trabalho pudesse ser concluído. Aos ex-diretores do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FICRUZ, Alexandre Bezerra de Carvalho e Rômulo Maciel, pela infra-estrutura, financiamento e confiança depositada em mim. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Ciência e tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento concedido sem o qual partes deste trabalho não teriam sido realizadas. A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da FIOCRUZ. Ao Laboratório Central de Pernambuco (LACEN) e Secretaria de Saúde do Município do Cabo de Santo Agostinho pelo suporte técnico. À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) pelo apoio dado para conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Orlando Fernandes Teixeira e Adelina Vieira Baliza Fernandes, que desde o início da minha formação estiveram sempre presentes, e aos meus irmãos, Mauricio Baliza, Adelane Baliza, Marcelo Baliza que sempre me deram força para prosseguir.

À minha esposa, amiga e companheira, Cláudia Lima, pela sua compreensão e paciência nas horas difíceis e de ausência e pela força que sempre me deu em todos os momentos que passamos juntos.

Aos meus dois filhos, Ícaro Baliza e Victor Baliza que iluminam a minha vida e a torna mais fácil.

Às minhas amigas e orientadoras Norma Lucena e Fátima Militão por disponibilizar parte de seu tempo, paciência e sabedoria nesta jornada.

A Ricardo Ximenes pelas consultas técnicas e amizade.

À minha grande amiga de todas as horas Kirte Teixeira pela amizade, conselhos e apoio nas horas mais difíceis.

À Leonardo Dutra, um grande amigo e companheiro e a Deinha por todas as madrugadas de sono perdidas nas visitas domiciliares aos pacientes.

À Inês e todos que fazem parte do Posto de Saúde Herbert de Souza No Cabo de Santo Agostinho pelo apoio em todos os momentos.

A Secretaria Municipal de Saúde do Cabo de Santo Agostinho.

À Maria Madileuza Neves, responsável pelo setor de tuberculose do LACEN e também à todos que com ela trabalham, Clenildo e Fábio, pela imensa colaboração e amizade.

À Albert Martins pelo apoio na fase final dos trabalhos.

Ao IMIPE e todos que fazem o Laboratório de Biologia Molecular pelos momentos de alegria.

À todos que fazem parte da biblioteca, setor de Informática e Reprografia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

À todos os meus amigos que fazem parte do meu dia-a-dia que me ajudaram e me proporcionaram momentos de lazer e que para não cometer nenhuma injustiça em esquecer alguém, não os citarei.

“Febre, hemoptíase, dispnéia e suores noturnos. A vida que podia ter sido e não foi..... Tosse, tosse, tosse. Já fui sacudido, forte. De bom aspecto, sadio. Como os rapazes do esporte. Hoje sou lívido e esguio. Quem me vê pensa na morte.....”

Manoel Bandeira

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO DA LITERATURA	07
2.1- Tuberculose e Resistência	08
2.1-1. Mecanismos de Resistência às Drogas	16
2.1-2. Fatores de Risco	18
2.1-3. Tratamento	23
2.2- Genotipagem	27
2.2-1. Marcadores Genéticos	28
2.2-2. Métodos de Genotipagem	33
3- OBJETIVOS	41
4- ARTIGOS	43
Artigo 1 - High frequency of drug resistance to isoniazid and rifampicin in tuberculosis in the city of Cabo de Santo Agostinho, an urban area of Northeast of Brazil	44
Artigo 2 – Analysis of the genetic diversity and distribution of Mycobacterium tuberculosis isolates from a cohort population established in Cabo de Santo Agostinho (Brazil)	63
5- Antígeno Leucocitário Humano (HLA) – Relacionado ao desenvolvimento da tuberculose doença no hospedeiro	83
5.1- Introdução	84
5.2- Objetivos	90
5.3- Material e Métodos	90
5.4- Resultados	93
5.5- Discussão	96
6- CONCLUSÕES	99
7- ANEXOS	103
8- REFERÊNCIAS	110
8.1- Introdução	111
8.2- Tuberculose e resistência	117
8.3- Genotipagem	123
8.4- Antígeno Leucocitário Humano (HLA)	129

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CDC- Centro de Controle de Doenças
CRISPR- Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Agrupadas
DNA- Ácido Desoxiribonucléico
DOTS- Tratamento Diretamente Observado
DR- Repetições Diretas
DRE-PCR- Elementos Repetitivos Duplos – Reação em Cadeia da Polimerase
E- Etambutol
Et- Etionamida
ETR- Repetições Consecutivas Exatas
H- Isoniazida
HIV- Vírus da imunodeficiência Humana
HLA- Antígeno Leucocitário Humano
IFN-gama- Interferon Gama
IS- Seqüência de Inserção
IUATLD- União Internacional Contra a Tuberculose e Doenças do Pulmão
LACEN- Laboratório Central
MDR- Multidroga Resistência
MHC- Complexo de Histocompatibilidade Maior
MIRU- Unidades Repetitivas Interespaçadas Micobacterial
MPTR- Repetições em Tandem Polimórficas Maior
MTB – *Mycobacterium tuberculosis*
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
PGRS- Seqüências Repetitivas Polimórficas Ricas em Guanina e Citosina
R- Rifampicina
RFLP- Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição
RNA- Ácido Ribonucléico
S- Estreptomicina
SNPs – Polimorfismo em um Único Nucleotídeo
TB-MDR – Tuberculose Multidroga resistente
VNTR- Número Variável de Repetições em Tandem
XDR- Extremamente Resistente
Z- Pirazinamida

LISTA DE FIGURAS

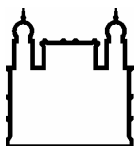
Figura 2.1: Mapa mostrando as regiões no mundo com maior prevalência de resistência a qualquer droga entre indivíduos sem tratamento anterior para tuberculose, entre 1994 e 2002.	10
Figura 2.2: Mapa mostrando as regiões no mundo com maior prevalência de resistência a qualquer droga entre casos de tuberculose previamente tratados, no período de 1994 a 2002.	11
Figura 2.3: Mapa mostrando as regiões no mundo com maior prevalência de tuberculose multidrogas resistente (MDR-TB) entre indivíduos sem tratamento anterior para tuberculose, entre 1994 e 2002.	13
Figura 2.4: Mapa mostrando as regiões no mundo com maior prevalência de tuberculose multidrogas resistente (MDR-TB) entre casos previamente tratados, no período de 1994 a 2002.	14
Figura 2.5: Representação esquemática das famílias de proteínas PE e PPE.	28
Figura 2.6: Distribuição dos loci de inserção do IS6110 relacionado ao quadro de leitura do genoma do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.	31
Figura 2.7: Mapa físico do elemento de inserção IS6110 mostrando sítios de clivagem para diversas enzimas de restrição.	32
Figura 2.8: Representação esquemática do spoligotyping.	35
Figura 2.9: Descrição do spoligotyping de linhagens das maiores famílias do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	36
Figura 2.10: Representação esquemática da seqüência replicada utilizando DRE-PCR. Localização dos Primers Ris1, Ris2, pntb1 e pntb2 utilizados em relação aos elementos de inserção IS6110 e PGRS.	37
Figura 2.11: Exemplo de locus VNTR. A figura mostra o locus ETR-B em <i>M. Tuberculosis</i> H37Rv e <i>M. bovis</i> .	38
Figura 5.1: Mapa Genético da região do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) presente no braço curto do cromossomo 6 humano.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Resume a prevalência de resistência a drogas em diversas regiões do mundo, mostrando a prevalência de resistência a qualquer droga em indivíduos sem tratamento anterior e em indivíduos com tratamento prévio para tuberculose e a prevalência de cepas multidroga resistente em indivíduos sem tratamento anterior e com tratamento prévio para tuberculose.	08
Tabela 2.2- Mostra os alvos celulares para as drogas anti tuberculose e os respectivos genes que podem sofrer mutações promovendo resistência em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	18
Tabela 2.3: Identifica os fatores mais comuns para um tratamento anti tuberculose inadequado aumentando o risco de desenvolvimento de cepas MDR.	22
Tabela 2.4: Mostra o Esquema I de tratamento para tuberculose indicado nos casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar	24
Tabela 2.5: Mostra o Esquema I Reforçado de tratamento para tuberculose indicado nos casos de recidiva após cura ou retorno após abandono do esquema I	25
Tabela 2.6: Mostra o Esquema III de tratamento para tuberculose indicado nos casos de falência de tratamento dos Esquemas I e IR.	26
Tabela 2.7: Mostrando elementos repetitivos presentes no genoma de espécies pertencentes ao complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizadas como marcaores na diferenciação entre linhagens.	28
Tabela 5.1: Mostra o número de alelos variantes nos loci do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) de classe I	85
Tabela 5.2: Mostra o número de alelos variantes nos loci do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) de classe II	85
Tabela 5.3: Mostra os alelos relacionados com suscetibilidade em desenvolver tuberculose doença e os alelos relacionados com proteção para tuberculose, em diversas populações no mundo.	89
Tabela 5.4- Mostra a taxa de ataque secundário para tuberculose em comunicantes intradomiciliares de acordo com o grau de parentesco.	93

Tabela 5.5- Mostra a taxa de ataque secundário para tuberculose em comunicantes intradomiciliares na faixa etária entre 16 e 59 anos de acordo com o grau de parentesco. 94

Tabela 5.6- Mostra a frequência dos alelos HLA de classe II em contatos intradomiciliares com e sem história prévia de tuberculose, Recife-PE. 95



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

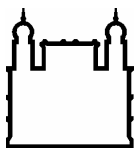
ESTUDO DE FATORES RELACIONADOS AO CONTROLE DA TUBERCULOSE: RESISTÊNCIA ÀS DROGAS, TRANSMISSÃO E SUSCETIBILIDADE DO HOSPEDEIRO.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Marcilio Delan Baliza Fernandes

Após ter sido considerada sob controle, a tuberculose ressurgiu na década de 90, sendo atualmente um sério problema de saúde pública envolvendo aspectos sociais e econômicos. Para entender os fatores envolvidos na transmissão e adoecimento pela tuberculose faz-se necessário compreender o tripé de sustentação da doença: ambiente, bacilo e hospedeiro. Em nosso trabalho avaliamos estes três aspectos importantes para a compreensão da epidemiologia da tuberculose em dois municípios da Região Metropolitana do Recife-PE. No Município do Cabo de Santo Agostinho, caracterizamos o padrão de desenvolvimento de cepas resistentes e fatores associados. A frequência de resistência primária e adquirida a qualquer droga foi 14% e 50% respectivamente enquanto que a frequência primária e adquirida para multidroga resistência foi 8,3% e 40%. Tratamento prévio para tuberculose e abandono de tratamento consistiu em fatores de risco para resistência primária a drogas. A taxa de resistência primária e adquirida principalmente por infecção com linhagens resistentes a Isoniazida e Rifampicina é bastante alta dificultando o controle da transmissão da tuberculose no Cabo. Mapeamos a transmissão da tuberculose utilizando como ferramenta a genotipagem das cepas pelo spoligotyping. Um total de 40 padrões distintos foi observado. Destes, um padrão com nove isolados, três padrões com cinco isolados cada, outros três padrões com quatro isolados, dois padrões com três isolados, cinco padrões com dois isolados cada e vinte e seis padrões com um isolado. A análise da distribuição geográfica dos casos agrupados atendidos no Cabo comparados aos resultados de estudo prévios feito no Posto de Saúde Lessa de Andrade em Recife, que atende pacientes de todo o estado de Pernambuco, mostrou que cepas agrupadas são encontradas em municípios vizinhos. No Município do Recife avaliamos o papel de marcadores genéticos (HLA) do hospedeiro na predisposição para tuberculose em comunicantes de casos índices diagnosticados no Recife. Dos 257 indivíduos analisados, 54 eram agregados (sem parentesco com o caso Índice) e 203 tinham algum grau de parentesco com o caso índice. O risco relativo para desenvolver tuberculose foi de 1.22 (95%CI:0.75-1.99) para parentesco de primeiro grau, 1.13(95%CI:0.63-2.03) para parentesco de segundo grau e 1.11(95%CI:0.44-2.78) para parentesco de terceiro grau quando comparados com os contatos sem relação de parentesco. A análise da frequência de alelos do HLA de classe II foi realizada em separado entre 77 indivíduos que haviam tido tuberculose e 119 indivíduos sem passado de tuberculose. Não encontramos qualquer alelo associado com suscetibilidade para adoecimento por tuberculose. Entretanto, o alelo DRB5*01 (OR= 0.45; IC95%= 0.20-0.98; $p= 0.0441$) aparece ligado à resistência para tuberculose e o alelo DRB3*02 (OR= 0.59; IC95%= 0.32-1.08; $p= 0.0905$) mostra uma tendência de associação com resistência em desenvolver tuberculose. O conhecimento do perfil de resistência de cepas do *M. tuberculosis* e do seu polimorfismo genético, bem como do hospedeiro em determinados grupos populacionais nos permite avaliar melhor os mecanismos de transmissão da doença contribuindo para o controle da tuberculose.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF FACTORS RELATED TO THE CONTROL OF TUBERCULOSIS: RESISTANCE TO DRUGS, TRANSMISSION AND HOST SUSCEPTIBILITY.

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Marcilio Delan Baliza Fernandes

Tuberculosis resurged in the 90s after having been considered to be under control and is now a serious public health problem with social and economic ramifications. To understand the factors involved in the transmission and the disease, it is necessary to understand the three fundamentals of the disease: the environment, *bacillus* and host. This work evaluates these three important aspects of the epidemiology of tuberculosis in two municipalities in the metropolitan region of Recife-PE. In the town of Cabo de Santo Agostinho, we characterized the pattern of the development of resistant strains and their associated factors. The frequency of primary and acquired resistance to any drug was 14% and 50%, respectively, while the frequency of primary and acquired multidrug resistance was 8.3% and 40%, respectively. Previous treatment for tuberculosis and abandonment of treatment were risk factors for primary resistance to drugs. Among persons with Isoniazid- and Rifampicin-resistant strains, the levels of primary and acquired resistance were quite, making tuberculosis control in Cabo quite difficult. The transmission pattern of tuberculosis was defined by using spoligotyping to genotype strains. A total of 40 distinct patterns were observed: one pattern with 9 isolates, three patterns with 5 isolates each, three other patterns with 4 isolates, two patterns with 3 isolates, five patterns with 2 isolates each, and 26 patterns with 1 isolate alone. Geographical analysis of cases residing in Cabo compared with those evaluated at the post of Health in Lessa de Andrade in Recife (a reference health service for greater Pernambuco) revealed that both municipalities shared common isolates. In Recife, the role of genetic markers (HLA) of host predisposition to tuberculosis was evaluated among persons who live in the same house as index cases. Of the 257 subjects studied, 54 persons (reference cases) were not related to the index case but shared their household. Among the 203 subjects related to the index case, the relative risk for developing tuberculosis, depending on degree of relationship, was 1.22 (95%CI :0.75-1 .99) for first-degree, 1.13 (95%CI :0.63-2 .03) for second degree, and 1.11 (95%CI :0.44-2 .78) for third degree when compared with the 54 afore-mentioned reference cases. Frequency analysis of HLA class II alleles was conducted separately between the 77 individuals who had tuberculosis and the 119 individuals with no history of tuberculosis. We did not find any allele associated with susceptibility to illness for tuberculosis. However, the allele DRB5*01 (OR= 0.45; 95%CI= 0.20-0.98; $p= 0.0441$) appears linked to resistance to tuberculosis and the allele DRB3*02 (OR= 0.59; 95%CI= 0.32-1.08; $p= 0.0905$) shows a trend of association with resistance to develop tuberculosis. A more complete understanding of *M. Tuberculosis* resistant strains and their genetic polymorphisms, as well as the host susceptibility in certain population groups, allow us to better assess the mechanisms of disease transmission and ultimately contribute to the control of tuberculosis.

1- INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno este bem adaptado ao homem (FLYNN e CHAN 2005), acompanhando-o desde civilizações antigas que deixaram registros, sejam em documentos encontrados ou estudos de múmias (KATO-MAEDA *et al.*, 2001; SMITH 2003). Estudos da distribuição de regiões variáveis resultantes de eventos como inserções e deleções sugerem que o mesmo tenha se derivado do *Mycobacterium canettii* ou de um ancestral comum ao bacilo da tuberculose (BROSCH *et al.*, 2002).

Além do *Mycobacterium tuberculosis*, outras espécies de bacilos pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* causam doenças exclusivamente ao homem (*Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canetti*) ou roedores (*Mycobacterium microti*). Outros apresentam um grande número de hospedeiros (*Mycobacterium bovis* subespécie *bovis*, *Mycobacterium bovis* subespécie *caprae*), (CHIMARA *et al.*, 2004; BROSCH *et al.*, 2002). Uma nova espécie foi proposta como pertencente ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* tendo sido isolada inicialmente em focas, mas que também pode ser patogênica para o homem e outros animais silvestres, denominada *Mycobacterium pinnipedii* (COUSINS *et al.*, 2003).

Existem várias formas de tuberculose (pulmonar, meníngea, miliar, óssea, renal, cutânea, genital). A forma mais freqüente e mais contagiosa é a pulmonar. Um paciente pulmonar bacilífero, se não tratado, em um ano pode infectar de 10 a 15 pessoas. Uma vez iniciado o tratamento, o paciente normalmente deixa de transmitir a doença em aproximadamente 15 dias (BRASIL^b 2007). As principais manifestações clínicas são tosse produtiva, febre, perda de peso, ocorrendo hemoptise nos casos mais avançados (DUNLAP *et al.*, 2000).

Estima-se que pelo menos um terço da população mundial esteja infectado pelo bacilo da tuberculose (Organização Mundial de Saúde - OMS) e que aproximadamente dois milhões de pessoas morram por ano em consequência dessa doença (FLYNN e CHAN 2005). Calcula-se que em 2005 houve 8,8 milhões de novos casos de tuberculose no mundo, dos quais 7,4 milhões ocorreram na Ásia e região do Sub Saara africano, causando a morte de 1,6 milhões de pessoas, entre elas 195.000 infectados por HIV (OMS 2007). Nas Américas, as taxas de incidência da tuberculose entre 1990 e 1997 mantiveram-se praticamente sem alterações,

sendo bem distintas entre as regiões mais desenvolvidas e os países em desenvolvimento (BRASIL 2002). Dados de 2005 mostram incidência acima de 75 casos por 100.000 habitantes em países como Bolívia (210,5), Equador (131), Guatemala (77,8), Haiti (305,5), Honduras (78,3) e Peru (171,5), (OMS^a 2007). Nos países desenvolvidos a incidência situa-se abaixo de 15 casos por 100.000 habitantes como nos Estados Unidos da América (2.0), Japão (13), Suécia (2.6), Holanda (3.1), (OMS 2005).

O Brasil encontra-se entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo, ocupando o 15º lugar (BRASIL^a 2007). Dados do Ministério da Saúde revelam que entre 1980 e 2003, ocorreram 1.935.600 casos de tuberculose, dos quais cerca de 30% na região nordeste e 45% na região sudeste (BRASIL^b 2006). Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 111.000 casos novos e 6.000 óbitos ocorrendo anualmente (BRASIL^a 2007).

No Estado de Pernambuco, a incidência anual de tuberculose é de aproximadamente 60 casos por 100.000 habitantes. Entre janeiro de 2000 e outubro de 2006 foram notificados 33.628 casos, com 1.701 óbitos neste período (BRASIL^a, 2006), sendo o segundo estado do Nordeste em números de casos, com 99.238 notificações entre 1980 e 2003 (BRASIL^b, 2006). Em Recife, entre janeiro de 2000 e outubro de 2006, foram notificados 11.598 casos de tuberculose com 579 óbitos e no Cabo de Santo Agostinho foram notificados 820 casos com 35 óbitos neste período (BRASIL^a 2006), tendo incidência anual média de aproximadamente 60 casos por 100.000 habitantes. Em Recife, a incidência média anual de tuberculose fica muito acima da média nacional sendo de aproximadamente 100 casos por 100.000 habitantes (BRASIL^d 2007).

A resposta imune contra a tuberculose é mediada por células do hospedeiro contra o bacilo que envolve macrófagos como células efectoras e linfócitos como células imune reguladoras (JOSÉ *et al.*, 1999; BARNES *et al.*, 1993), mantendo o bacilo em estado de latência mas não erradicando a infecção (COLE *et al.*, 1998). Calcula-se que pessoas com infecção latente apresentem em toda sua vida 10% de chances em progredir para tuberculose ativa (DOLIN *et al.*, 1998). O maior risco de se desenvolver tuberculose ativa é para pessoas expostas a situações de subnutrição, portadores do vírus HIV, usuários de drogas injetáveis (SUFFYS *et al.*,

1997; BRASIL^c 2007), sob o uso de esteróides ou outros medicamentos imunossupressores, idade avançada (TUFARIELLO *et al.*, 2003) dentre outros. Alguns fatores contribuem para aumentar o risco de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* tais como exposição em espaços fechados relativamente pequenos (ambiente), diminuição da resposta imune no tecido pulmonar afetado por silicoses, inalação de fumo (hospedeiro) e concentração de bacilos inalados (patógeno) (OMS 2002).

O desenvolvimento de cepas resistentes às drogas bem como o surgimento da AIDS contribuiu para o aumento da doença (YOUNG 1998). É estimado que mais de três milhões de pessoas estejam co-infectados com o bacilo da tuberculose e o vírus da AIDS em todo o mundo. A taxa da co-infecção tuberculose/HIV no país está em torno de 3 a 4%, com amplas diferenças regionais (GARCIA *et al.*, 2000). No Estado de Pernambuco, a prevalência da co-infecção tuberculose/HIV, situou-se em torno de 7% em 2002 (BOLETIM INFORMATIVO DST/AIDS PERNAMBUCO 2005). A associação das duas enfermidades constitui um sério problema de saúde pública, principalmente por contribuir para o aumento dos índices de mortalidade (BRASIL^c 2007). Entre as doenças associadas com infecção pelo HIV, a tuberculose tem particular importância porque é contagiosa, além de ser, frequentemente, a primeira manifestação clínica da deficiência imunológica (SEVERO *et al.*, 1993). Além disso, os co-infectados pelo HIV apresentam maior frequência de tuberculose extrapulmonar e por micobactérias atípicas oportunistas, tornando o diagnóstico difícil (KOCHI 1991).

O diagnóstico precoce é de extrema importância para o controle da doença. A baciloscopia é o método utilizado de rotina, sendo baseado em microscopia direta que apesar de ser rápida apresenta baixa sensibilidade e especificidade (CARPENTIER *et al.*, 1995). A cultura, considerada padrão ouro, leva até seis semanas para se ter o resultado, sendo o crescimento do bacilo necessário para identificação precisa da espécie e teste de sensibilidade às drogas (DUNLAP *et al.*, 2000). Vários sistemas comerciais relacionados ao diagnóstico do bacilo têm sido desenvolvidos, tais como, BACTEC (KAMINSKI *et al.*, 1995; BADAK *et al.*, 1996), Tubo Indicador de Crescimento da Micobacteria (MGIT), (HONGMANEE *et al.*, 2001), e outros baseados em amplificação do DNA (PCR), (DELACOURT *et al.*, 1995; VLASPOLDER *et al.*, 1995; BENNEDSEN *et al.*, 1996; HASHIMOTO *et al.*,

1996; DEL PORTILLO *et al.*, 1996; DIDOMENICO *et al.*, 1996; D'AMATO *et al.*, 1996). Estes sistemas permitiram avanços no diagnóstico da tuberculose o que é essencial para um controle apropriado da doença.

O estudo da variabilidade genética de linhagens circulantes em determinada população fornece conhecimento da dinâmica da transmissão da doença (TRINDADE *et al.*, 2004), possibilitando estratégias de intervenção de forma efetiva. Assim, vários métodos moleculares têm sido utilizados para distinguir entre falha no tratamento e reinfecção exógena (KRUUNER *et al.*, 2002), verificar transmissão da tuberculose em centros de saúde como hospitais (LEMAITRE *et al.*, 1998), em estudos epidemiológicos (TORREA *et al.*, 1995), diferenciar infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias (FROTHINGHAM e MEEKER-O'CONNELL, 1998; CILLIERS *et al.*, 1997) entre outras aplicações.

O risco de a infecção progredir para doença clínica de 10%, como descrito anteriormente, sugere um papel importante de fatores genéticos na suscetibilidade à doença (BELLAMY 1998). Assim, Vários estudos utilizando métodos moleculares têm descrito associação entre HLA (Antígeno Leucocitário Humano) e tuberculose doença (TERÁN-ESCANDON *et al.*, 1999; RAVIKUMAR *et al.*, 1999; DUBANIEWICZ *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2001; VEJBAESSYA *et al.*, 2002; HAMID *et al.*, 2003). O polimorfismo em um único nucleotídeo (SNPs) também é utilizado como marcadores genéticos na predisposição a doenças (SUN *et al.*, 2007).

Após ter sido considerada sob controle, a tuberculose ressurgiu na década de 90, sendo atualmente um sério problema de saúde pública envolvendo aspectos sociais e econômicos. Para entender os fatores envolvidos na transmissão e adoecimento pela tuberculose faz se necessário compreendermos o tripé de sustentação da doença: ambiente, bacilo e hospedeiro.

Em nosso trabalho avaliamos estes três aspectos importantes para a compreensão da epidemiologia da tuberculose em dois municípios da Região Metropolitana do Recife-PE. No Município do Cabo de Santo Agostinho, caracterizamos o perfil de cepas resistentes e fatores associados, além de mapear a transmissão da tuberculose utilizando como ferramenta a genotipagem das cepas pelo spoligotyping. No Município do Recife avaliamos o papel de marcadores

genéticos (HLA) do hospedeiro na predisposição para tuberculose em comunicantes de casos índices diagnosticados no Recife.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- TUBERCULOSE e RESISTÊNCIA

Resistência às drogas em tuberculose geralmente é classificada como primária e adquirida. Quando a resistência é demonstrada em pacientes que nunca haviam recebido tratamento antituberculose previamente, é denominada resistência primária e nos casos em que o paciente já tenha feito tratamento prévio para tuberculose é denominado de resistência adquirida. Entretanto a OMS (Organização Mundial de Saúde) e IUATLD (União Internacional Contra a Tuberculose e Doenças do Pulmão) tem substituído o termo resistência primária por “resistência a drogas entre casos novos” e resistência adquirida por “resistência a drogas entre casos previamente tratados” (PARAMASIVAN and VENKATARAMAN, 2004).

Estudos epidemiológicos para avaliação do padrão de resistência são importantes para otimizar o tratamento e prevenir a disseminação de linhagens resistentes (SURUCUOGLY, *et al.* 2005). Recente estudo divulgado pela OMS mostrou o perfil de resistência a drogas anti tuberculose em 77 regiões envolvendo 62 países, resumido na tabela 2.1.

Região / País	Prevalência de resistência a drogas				Fonte
	Qualquer droga		MDR		
	Casos novos (%)	Tratamento anterior (%)	Casos novos (%)	Tratamento anterior (%)	
África					
Botsuana	13.6	30.3	1.3	13.6	OMS (2004)
Zambia	11.5	15.9	1.8	2.3	OMS (2004)
Limpopo – África do Sul	7.1	17.0	2.4	7.0	OMS (2004)
Américas					
Argentina	9.7	22.8	1.8	9.4	OMS (2004)
Colômbia	15.5		1.5		OMS (2004)
Equador	23.4	47.4	6.6	24.8	OMS (2004)
Estados Unidos	12.7	18.8	1.1	5.2	OMS (2004)
Brasil	9.2	21.8			BRASIL 2002

Ceará - Brasil			1.1	3.3	BARROSO (2001)	
Pernambuco - Brasil	16.2	39.7			ALBUQUERQUE (2001)	
São Paulo - Brasil	11.0	27.0	1.0	16.7	TELLES (2005)	
Mediterrâneo Oriental						
Egito	30.5	68.2	2.2	38.2	OMS (2004)	
Oman	5.3	58.3	0.0	58.3	OMS (2004)	
Europa						
Andorra	0.0		0.0		OMS (2004)	
Cazaquistão	57.1	82.1	14.2	56.4	OMS (2004)	
Karakalpakstan	-	48.1	79.4	13.2	40.2	OMS (2004)
Uzbequistão						
Tomsk Oblast - Rússia	37.3	60.7	13.7	43.6	OMS (2004)	
Luxemburgo	7.7	0.0	0	0.0	OMS (2004)	
Suíça	5.5	5.3	0	1.8	OMS (2004)	
Israel	31.2	41.7	14.2	20.8	OMS (2004)	
Sudoeste Asiático						
North Arcot - Índia	27.7		2.8		OMS (2004)	
Nepal	11.0	40.9	1.3	20.5	OMS (2004)	
Pacífico Ocidental						
Província Liaoning - China	42.1	55.8	10.4	24.4	OMS (2004)	
Camboja	10.3	17.7	0.0	3.1	OMS (2004)	
Nova Zelândia	11.4	9.1	0.0	0.0	OMS (2004)	

Tabela 2.1- Resume a prevalência de resistência a drogas em diversas regiões do mundo, mostrando a prevalência de resistência a qualquer droga em indivíduos sem tratamento anterior e em indivíduos com tratamento prévio para tuberculose e a prevalência de cepas multidroga resistente (MDR) em indivíduos sem tratamento anterior e com tratamento prévio para tuberculose.

A prevalência de resistência a qualquer droga em casos novos de tuberculose entre 1999 e 2002 variou de 0% em Andorra e Malta a 57,1% no Cazaquistão, com média de 10,2% (Figura 2.1). Treze regiões apresentaram prevalência acima de 25%, dentre estas, quatro apresentaram prevalência altíssima como no Cazaquistão descrito anteriormente, na região de Karakalpakstan no Uzbequistão (48,1%), Província Liaoning na China (42,1%) e na Federação Russa de Tomsk Oblast (37,3%) (OMS, 2004). Em Taiwan, Hsueh *et al.* analisando os dados publicados entre 1990 e 2002 das prevalências de tuberculose, mostraram resistência primária a Isoniazida variando de 4,7 a 12%, para Rifampicina de 0,7 a 5,9%, Etambutol de 1 a 6% e Estreptomicina de 4 a 11% (HSUEH *et al.*, 2005).

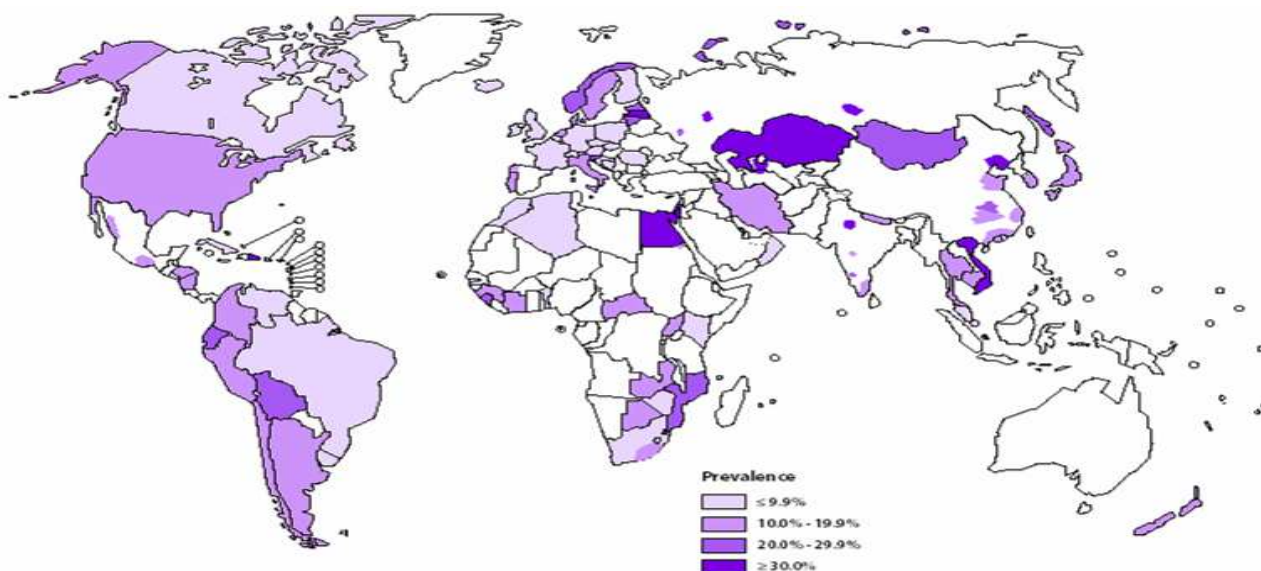


Figura 2.1: Mapa mostrando as regiões no mundo com maior prevalência de resistência a qualquer droga entre indivíduos sem tratamento anterior para tuberculose, entre 1994 e 2002.

Fonte: OMS 2004.

Considerado os casos com tratamento anterior para tuberculose a prevalência média foi de 18,4% para resistência a qualquer uma das drogas usadas no tratamento (Figura 2.2). Em onze regiões a prevalência ficou acima de 50%, sendo mais alta no Cazaquistão (82,1%) e Uzbequistão (79,4%) (OMS, 2004). Montoro *et*

al., em estudo realizado entre 1995 e 1998 em Cuba, relataram 91,3% de resistência a qualquer uma das drogas em pacientes previamente tratados, na primeira fase do estudo (1995-1996) e 32,4% na segunda fase do estudo (1997-1998) (MONTORO *et al.*, 2004).

Analisando a resistência total, Surucuoglu *et al.* relataram prevalência de resistência a qualquer droga de 21,1% no oeste da Turquia entre 1997 e 2003. O tipo mais comum de resistência a qualquer uma das drogas foi a Isoniazida (16,9%), Estreptomicina (14,9%), Etambutol (9,8%) e Rifampicina (9%) (SURUCUOGLU *et al.*, 2005). No norte do Paquistão, Butt *et al.* relatam resistência a Rifampicina de 32%, Isoniazida de 37%, Estreptomicina de 19% e Etambutol de 17% (BUTT *et al.*, 2004).

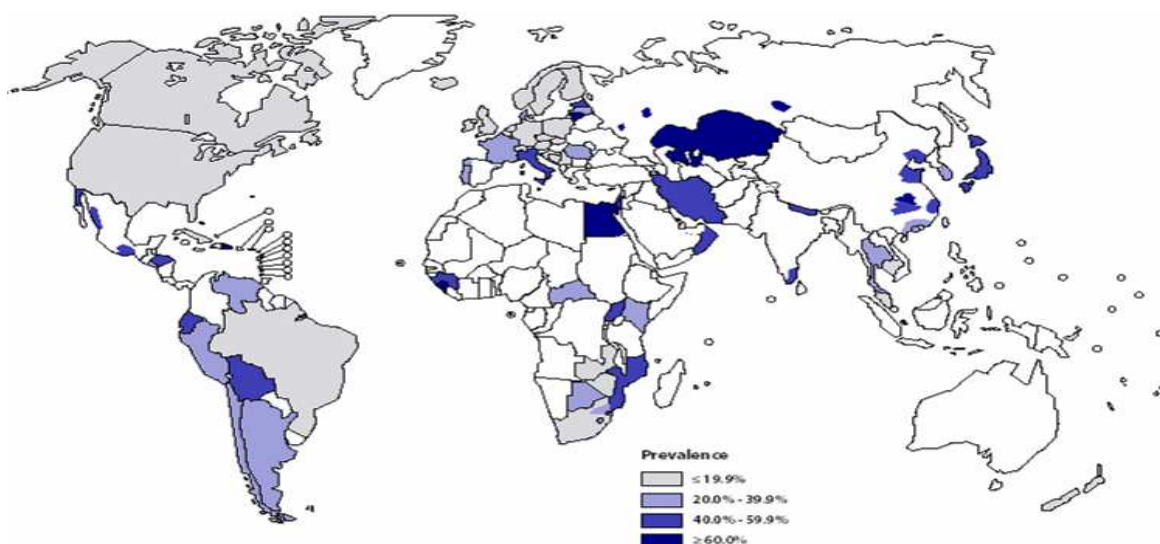


Figura 2.2: Mapa mostrando as regiões no mundo com maior prevalência de resistência a qualquer droga entre casos de tuberculose previamente tratados, no período de 1994 a 2002.

Fonte: OMS 2004.

No Brasil, entre 1997 e 1998 foi realizado estudo avaliando os testes de sensibilidade dos isolados provenientes de 6.000 pacientes ambulatoriais em todo o país, demonstrando taxa de resistência primária de 9,2% e de resistência adquirida

de 21,8% (BRASIL 2002). Telles, *et al.* em estudo realizado na cidade de São Paulo entre março de 2000 e maio de 2002 mostraram 15,5% de resistência a pelo menos uma droga. A frequência de resistência para os casos sem tratamento anterior foi de 11% e para os casos com tratamento anterior de 27% (TELLES *et al.*, 2005). Albuquerque *et al.* em estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco entre 1994 e 1998 relatam resistência de 16,2% entre pacientes sem tratamento anterior e resistência de 39,7% entre pacientes com tratamento prévio, sendo a prevalência de resistência a apenas Isoniazida e Rifampicina de 0,4% para os casos novos e de 11,1% para os casos com tratamento prévio (ALBUQUERQUE *et al.*, 2001).

A Organização Mundial de Saúde define tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) como doença causada pelo bacilo da tuberculose resistente a pelo menos Isoniazida e Rifampicina. O termo Multidrogas resistente surgiu nos Estados Unidos como definição para bacilos resistentes à Isoniazida e Rifampicina conjuntamente, e tornou-se universalmente aceita a partir da adoção deste conceito pelo Centro de Controle de doenças (CDC). No Brasil considera-se multirresistente bacilos que apresentam resistência além da Rifampicina e Isoniazida a uma terceira droga dos esquemas padronizados de tratamento em virtude de haver um esquema de reserva para o retratamento de casos (BRASIL 2002). Ormerod caracteriza como TB-MDR organismos que apresentam resistência a Isoniazida e Rifampicina, com ou sem resistência a outras drogas antituberculose (ORMEROD, 2005). As regiões com maior prevalência de TB-MDR são o Leste Europeu e Ásia (CONSTANT *et al.*, 2004).

No estudo divulgado pela OMS mostrando o perfil de resistência a drogas anti tuberculose envolvendo 62 países, quando analisado os novos casos de tuberculose MDR a variação foi de 0% em Andorra, Camboja, Islândia, Luxemburgo, Malta, Nova Zelândia, Oman, Escócia, Eslovênia e Suíça a 14,2% no Cazaquistão e Israel com média de 1,1% (Figura 2.3). Dez regiões tiveram prevalência acima de 6,5% (Kazaquistão, Israel, Tomsk Oblast-Rússia, Karakalpakstan- Uzbequistão, Estônia, Liaoning-China, Lituânia, Letônia, Henan e Equador). A resistência entre novos casos a três ou quatro drogas foi menor que 2% em 80% das regiões. Seis regiões apresentaram resistência acima de 10% como Cazaquistão (25,3%),

Karakalpakstan- Uzbequistão (19,8%), Israel (14,6%), Estônia (13,4%), Tomsk Oblast-Russia (13,1%) e Latívia (10,3%) (OMS 2004).

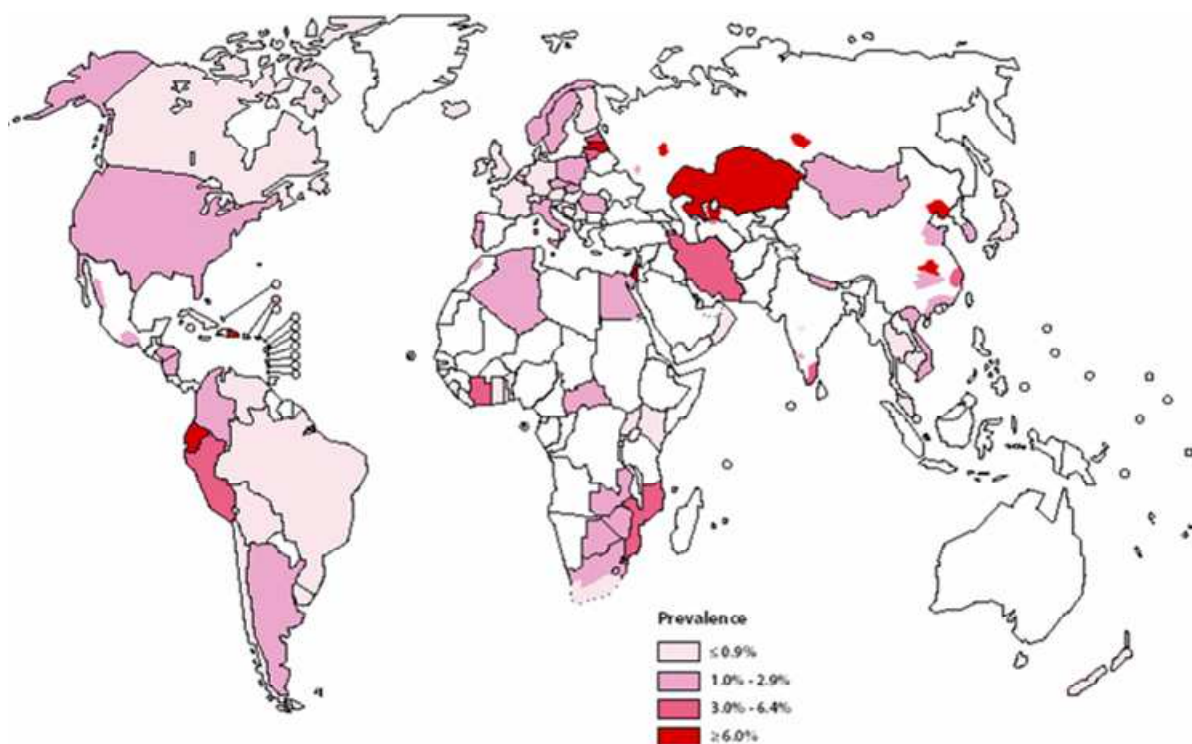


Figura 2.3: Mapa mostrando as regiões no mundo com maior prevalência de tuberculose multidrogas resistente (TB-MDR) entre indivíduos sem tratamento anterior para tuberculose, entre 1994 e 2002.

Fonte: OMS 2004.

A prevalência média para os casos com tratamento anterior que apresentaram TB-MDR foi de 7%, com maior prevalência no Cazaquistão (56,4%) e Oman (58,3%) (Figura 2.4). Considerando três ou quatro drogas, a maior prevalência de TB-MDR foi observada na Federação Russa de Orel Oblast (52,9%), Oman (58,3%) e Cazaquistão (62,3%) (OMS, 2004).

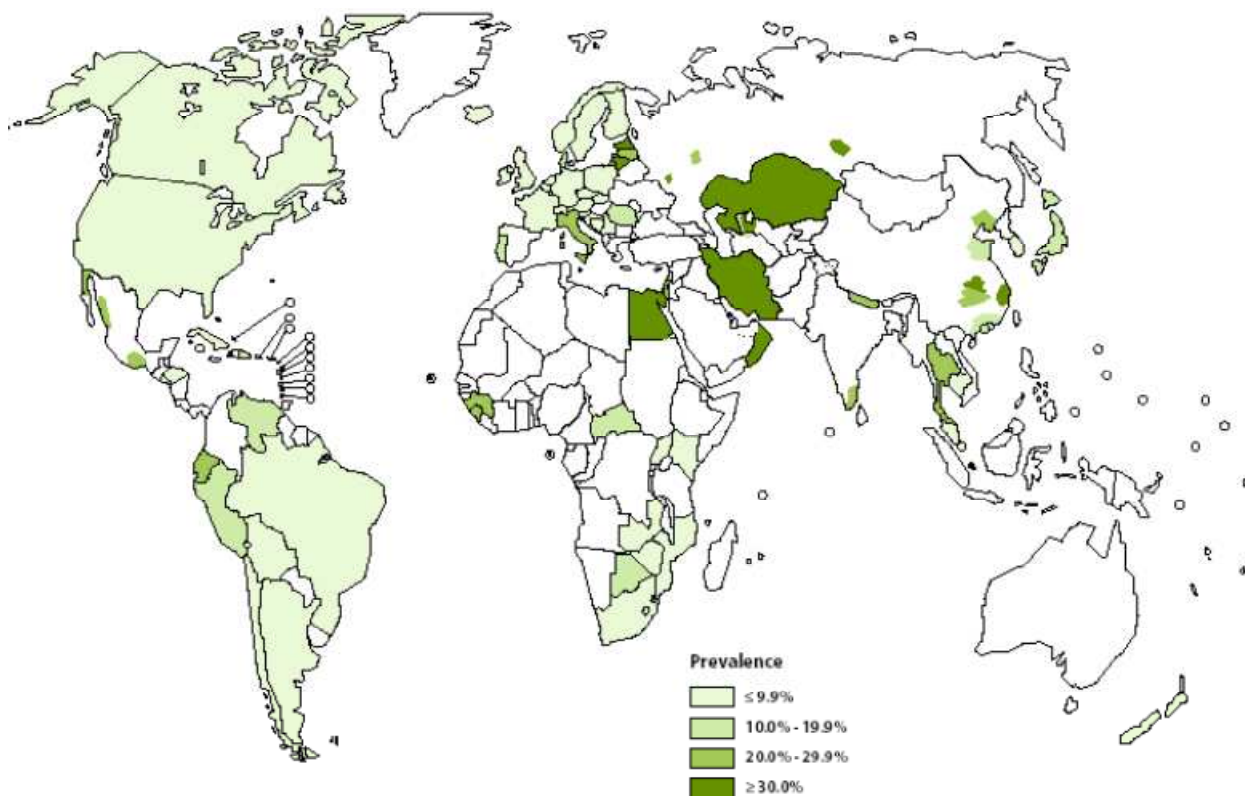


Figura 2.4: Mapa mostrando as regiões no mundo com maior prevalência de tuberculose multidrogas resistente (TB-MDR) entre casos previamente tratados, no período de 1994 a 2002.

Fonte: OMS 2004.

Em estudo retrospectivo realizado por Kart, *et al.* na Turquia, foi visto prevalência para TB-MDR de 7,3% no período de 1982-1991 e prevalência de 6,6% no período de 1992-1999. No entanto, a prevalência para uma droga foi maior entre 1992-1999 que passou de 14,6% entre 1982 e 1991 para 32,2% entre 1992 e 1999 (KART *et al.*, 2002). Surucuoglu *et al.* relataram prevalência de TB-MDR de 7,3% no oeste da Turquia entre 1997 e 2003, com prevalência de TB-MDR significativamente maior em pacientes com tratamento prévio (22,4%) em relação aos novos casos (4,4%) (SURUCUOGLU *et al.*, 2005). Dewan *et al.* descrevem prevalência TB-MDR de 9,3% entre os casos novos de tuberculose e 54,2% entre os pacientes previamente tratados no ano de 2002 na Lituânia (DEWAN *et al.*, 2005). Em Taiwan, a prevalência de cepas TB-MDR variou de 1 a 3 % nos casos novos e de 15 a 46% para os casos previamente tratados no período de 1990-2002. Os autores relatam que não houve diferenças no padrão de resistência nas diferentes áreas geográficas

analisadas, no entanto houve aumento na taxa de resistência primária para Isoniazida, Rifampicina, Estreptomicina e TB-MDR (HSUEH *et al.*, 2005). Em Bangladesh, estudos realizados em área urbana (Dhaka) e rural (Matlab) para avaliar o padrão de TB-MDR, encontraram 45,2% de resistência para Estreptomicina, 14,2% para Isoniazida, 7,9% Etambutol, 6,4% Rifampicina e 5,5% MDR, considerando ambas as regiões. Em Dhaka a prevalência de MDR para casos novos foi de 3,3% e para os casos com tratamento prévio de 14,3%. Em Matlab, para os casos novos a prevalência foi de 0% e para os casos com tratamento prévio de 27,3%. Houve considerável aumento na prevalência de cepas MDR na área rural de Bangladesh quando comparado com estudo anterior realizado por Deuen, *et al.* (1999) encontrando 0,23% para os casos novos e 5,56% para os casos de retratamento (ZAMAN, *et al.* 2005). Munsiff *et al.* em estudo realizado entre 1995 e 1997 na cidade de Nova Iorque mostram freqüência de 4,9% para TB-MDR (MUNSIFF *et al.*, 2002). Segundo Granich, *et al.*, apesar do número de casos de tuberculose na Califórnia ter diminuído anualmente em 33% durante o período do estudo (1994 a 2003) a prevalência de cepas MDR permanece aproximadamente 1,4%. Além disso, 83% dos casos TB-MDR apresentam resistência a uma terceira droga além da Isoniazida e Rifampicina (GRANICH, *et al.*, 2005). Na região de Buenaventura - Colômbia, Moreira *et al.* relatam prevalência de 6% para casos de TB-MDR em dois estudos realizados entre agosto de 1997 a janeiro de 1998 e novembro de 2000 a novembro de 2001. Apesar da prevalência de TB-MDR ter permanecido em 6% em ambas as pesquisas, a prevalência de resistência a uma ou mais drogas passou de 25% para 32%, principalmente Estreptomicina que subiu de 6% para 22% (MOREIRA *et al.*, 2004). Palmero *et al.* em estudo realizado entre 1991 e 2000, em Buenos Aires, relatam 72,9% de casos TB-MDR adquiridos e 27,1% de casos TB-MDR primária (PALMERO *et al.*, 2003). Timperi *et al.* relatam 55% de TB-MDR em Lima-Peru em estudo realizado entre 1996 e 2001, sendo que destes, 5% foram resistentes a somente Isoniazida e Rifampicina e 40% foram resistentes a pelo menos cinco drogas de primeira linha (TIMPERI *et al.*, 2005).

No Brasil, Barroso *et al.* apontam uma baixa prevalência combinada de TB-MDR no estado do Ceará (1.1%) em estudos realizados entre 1990 e 1999 (BARROSO *et al.*, 2001). Telles, *et al.* mostraram, em estudo realizado em São Paulo entre março de 2000 e maio de 2002, freqüência de TB-MDR de 1% para os casos novos e de 16.7% para os casos com tratamento anterior (TELLES, *et al.*, 2005).

Muitos países ainda apresentam baixa frequência de cepas MDR com prevalência abaixo de 2% em pacientes sem tratamento anterior. A OMS refere prevalência de 3% de TB-MDR como ponto de corte entre novos casos de tuberculose (OMS 2004). Fatores de risco para o aumento global de cepas circulantes resistentes a drogas têm sido analisados.

Além das cepas multidroga resistentes, a Organização Mundial de Saúde manifesta preocupação com um novo tipo de cepas altamente resistentes, denominado XDR (extremamente resistentes). Essas cepas além de serem multidroga resistentes, apresentam resistência a três ou mais das seis classes de medicamentos de segunda linha utilizadas no tratamento da tuberculose. Em inquéritos realizados pela OMS entre 200 e 2004 mostra que tuberculose XDR foi identificada em todas as regiões do mundo, mas é mais freqüente nos países da ex-União Soviética e da Ásia. Na Letônia, país com um dos mais altos índices de tuberculose multidroga resistente, 19% dos casos de MDR preenchem os critérios para XDR, e nos Estados Unidos, 4% dos casos MDR cumpriam os critérios para XDR (OMS 2006).

2.1.1- Mecanismos de Resistência às Drogas

O desenvolvimento de resistência pelas bactérias é devido a eventos aleatórios, sendo estimado que mutações ocorram em 1 de 10^6 replicações bacterianas desenvolvendo resistência a Isoniazida e em 1 de 10^8 replicações bacterianas desenvolvendo resistência a Rifampicina (PARAMASIVAN and VENKATARAMAN, 2004; SIDDIQI, *et al.* 2002), com probabilidade de mutações espontâneas causarem resistência a ambas Rifampicina e Isoniazida de 1 em 10^{14} replicações (SHARMA and MOHAN, 2004). Mutações podem ocorrer em pequenas proporções mesmo na ausência de pressão antibiótica e o desenvolvimento de resistência é mais comum quanto mais numerosa é a população bacteriana ou quando uma droga é usada isoladamente (BRASIL 2002). São eventos a nível molecular que parece não envolver elementos genéticos móveis como plasmídios, mas o DNA cromossomal da bactéria (PFYFFER, 2000). Muitos estudos mostram que em 95 a 98% das linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a Rifampicina são causadas por mutações no gene *rpoB* que codifica a subunidade beta da RNA polimerase (MOKROUSOV, *et al.* 2003). Essas mutações são

geralmente mutações de sentido trocado, ou menos comumente, pequenas deleções ou inserções dentro ou próximo de uma região de 81 pares de bases denominada RRDR (rifampicin resistance-determining region) (SHARMA e MOHAN, 2004; MOKROUSOV, *et al.* 2003). Mais de 60 mutações dentro ou próximo da região RRDR do gene *rpoB* tem sido determinado por sequenciamento desse locus e dependendo da localização geográfica e grupos étnicos dos pacientes infectados com tuberculose, mutações nos códons 531, 526 ou 516 são as mais comuns (AHMAD e MOKADDAS, 2005), como encontrado por Hsueh *et al.* (2005) em Taiwan a mutação mais freqüente no gene *rpoB* foi na posição 531 (serina), similar aos achados na China, Japão e Coréia. Mutações no gene *katG* (enzima catalase – peroxidase) provocam resistência à Isoniazida. No entanto, alguns isolados apresentam resistência a Isoniazida e Etionamida em pacientes que não haviam sido tratados com Etionamida, sugerindo que ambas as drogas possam ter alvos comuns para resistência (AINSA *et al.* 2001). Em estudo de caracterização molecular de isolados MDR no norte da Índia, Siddiqi *et al.* (2002) encontraram padrões de mutação nos genes *rpoB*, *katG* e *rpsL* similares aos descritos em outras partes do mundo. Em isolados resistentes a Isoniazida encontraram significativamente mais deleções e inserções em relação a mutações por substituição de bases, ressaltando que o polimorfismo não contribui para resistência por si, no entanto, as deleções e inserções no locus *katG* resultam em cadeias truncadas e terminações, gerando polipeptídeos sem função. Mutações nos genes *inhA*, *kasA* e *ahpC-oxyR* também podem gerar resistência a Isoniazida como mostra a tabela 2.2. Além disso, são descritos quatro famílias de proteínas transmembrana expressas em organismos procariotos e eucariotos, incluindo células humanas, que funcionam como bombas. A glicoproteína P é um análogo humano desses transportadores expresso em células efectoras do sistema imune e tem sido observado que em infecção de células experimentais por *Mycobacterium tuberculosis* resulta no aumento da expressão de glicoproteína P e diminuição do acúmulo de Isoniazida dentro da célula (SHARMA *et al.* 2004).

Droga	Alvo na Célula	Gene	Produto	Função
Isoniazida	Parede Celular	KatG	Catalase - Peroxidase	Ativação de Prodroga
		InhA	Enoil coenzima A redutase	Síntese de ácido micólico
		KasA	Proteína sintetase	Síntese de ácido micólico
		OxyR-ahpC	Hidroperóxido redutase	Desconhecido
Etambutol	Parede Celular	embB	Arabinosil transferase	Polimerização do arabinano
Estreptomicina	Síntese de Proteína	rpsL	Proteína ribossomal S12	Tradução
		rrs	RNAr 16S	Tradução
Rifampicina	Ácido Nucléico	rpoB	Subunidade beta da RNA Polimerase	Transcrição
Pirazinamida	Desconhecido	pncA	Pirazinamidase - Nicotinamidase	Ativação de prodroga
Fluoroquinolonas	Ácido Nucléico	gyrA	Subunidade da DNA Girase	Replicação do DNA

Tabela 2.2- Mostra os alvos celulares para as drogas anti tuberculose e os respectivos genes que podem sofrer mutações promovendo resistência em *Mycobacterium tuberculosis*.

Fonte: Pfyffer GE. (2000) Drug-resistant tuberculosis: resistance mechanisms and rapid susceptibility testing. *Schweiz Med Wochenschr.* 130: pag. 1911.

2.1.2- Fatores de Risco

O risco de um indivíduo desenvolver tuberculose aumenta quando há queda do sistema imune (Health-Cares.net), assim, infecção por HIV é um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento da tuberculose doença (POZNIAK, 2001). Além da AIDS, outras doenças podem suprimir a imunidade como diabetes, silicose

(doença que afeta o pulmão), receber tratamento com corticosteróide ou quimioterapia (Health-Cares.net), dentre outros. Dyck *et al.*, em estudo realizado numa população de aborígine (Saskatchewan) e não aborígine (Indianos), relataram correlação entre diabetes tipo 2 e tuberculose. Os autores encontraram risco de 2.7 (IC: 1.28 – 5.72) entre mulheres não aborígenes na faixa etária de 50 a 59 anos e risco de 3.9 (IC: 1.58 – 9.67) entre mulheres aborígenes na mesma faixa etária em desenvolver tuberculose quando comparado com o grupo controle (sem diabetes) (DYCK *et al.*, 2007). A doença se espalha mais facilmente em locais onde predomina aglomeração de indivíduos e pobreza, típico de países em desenvolvimento (PEREIRA *et al.*, 2005). A pobreza está relacionada com má nutrição devido à falta de comida, sendo considerado fator de risco para desenvolver tuberculose (HERNANDES-GARDUNO e PEREZ-GUSMAN, 2007). Além destes, alcoolismo e uso de droga intravenosa também aumentam o risco para contrair tuberculose (Health-Cares.net). Albuquerque *et al.*, Em estudo realizado num hospital escola da cidade do Recife – Pernambuco, relatam que o hábito de ingerir bebida alcoólica, a co-infecção pelo HIV, história de tratamento anterior e presença de resistência a duas ou mais drogas constituíram-se em fatores prognóstico independentes para o desfecho desfavorável (Alta por abandono, óbito ou falência no tratamento) do tratamento da tuberculose pulmonar bacilífera entre os indivíduos estudados (ALBUQUERQUE *et al.*, 2001).

Estudo realizado em quatro condados na província de Shandong na China por Cheng *et al.* (2005) avaliaram fatores associados com a demora dos pacientes em buscar cuidados quando doentes. Os autores descrevem relação significativa quanto à idade, nível de escolaridade e facilidade no acesso ao serviço de saúde para o primeiro atendimento associado à demora do paciente em procurar cuidados. Pacientes com idade entre 40 e 59 anos foram os que demoraram mais em procurar atendimento a partir do aparecimento dos primeiros sintomas, com o dobro do tempo com relação a outros grupos. Aqueles com maior nível de escolaridade apresentaram um menor tempo em procurar cuidados, em média um terço a menos do tempo com relação aqueles sem nenhum nível de escolaridade, e entre aqueles que tinham dificuldades no acesso ao atendimento 24,7% disseram que não sabiam que a doença era séria, 21,1% atribuiu o fato à pobreza e 54,2% não apresentaram razões específicas (CHENG *et al.*, 2005). A tabela 2.3 resume as causas mais comuns para tratamento inadequado.

Tuberculose multidroga resistente e imigração podem estar relacionadas com o alto risco de transmissão de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* MDR pelos imigrantes (FAUSTINI *et al.*, 2006), e sua importância epidemiológica está associada principalmente aos países com baixa prevalência de tuberculose (LILLEBAEK *et al.*, 2002). No sul de Israel, Gilad *et al.* relatam frequência de TB-MDR variando entre 8 e 17% dependendo da sub população (imigrantes), ressaltando que essa diferença pode ser atribuída a imigração de indivíduos de países com alta prevalência de TB-MDR como observado em imigrantes provenientes dos países que formavam a União Soviética os quais apresentaram 17% de TB-MDR comparado com o grupo geral estudado que apresentaram 8,5% de TB-MDR (GILAD *et al.* 2000). Yang *et al.* em estudo retrospectivo de oito anos (1995-2002) na região de Calgary – Canadá relatam que todos os isolados resistentes encontrados foram de pacientes que nasceram em outro país, sendo mais comum em pacientes provenientes da Ásia (19%) e em pacientes previamente tratados (26%) (YANG *et al.*, 2005). No entanto, Faustine *et al.* (2006) chama atenção para os casos com tratamento prévio de tuberculose podendo ser um fator de confusão (FAUSTINE *et al.*, 2006).

O abandono do tratamento também é um fator importante no desenvolvimento de resistência às drogas. Tanguis *et al.* (2000) evidenciaram que o abandono do tratamento esteve relacionado principalmente com baixo nível sócio-econômico (TANGUIS *et al.*, 2000). Albuquerque *et al.* (2007) em estudos realizados com 1.396 casos de tuberculose entre maio de 2001 e julho de 2003 na cidade do Recife, Pernambuco, evidenciaram como fatores prognóstico na falha do tratamento de pacientes com tuberculose demora em iniciar o tratamento, história prévia de tratamento, baixo grau de escolaridade e alcoolismo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

O aumento gradual de cepas resistentes em regiões com alta prevalência de pessoas imunocomprometidas, tanto pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) como pela má nutrição foi descrito (PABLOS-MÉNDEZ, *et al.* 2002). Nunes *et al.* mostraram que indivíduos portadores de HIV em Maputo-Mocambique apresentaram tuberculose resistente em pelo menos uma droga em 18% dos casos e MDR em 9%. Os fatores de risco para o desenvolvimento de tuberculose resistente a drogas nesta população foram níveis baixos de células CD4⁺ < 100/μl (p<0,02) e presença de sintomatologia associada a níveis baixos de células CD4⁺ (p=0,01). Os autores discutem o fato de que pacientes com número reduzido de células CD4⁺ apresentam uma resposta imune deficiente para eliminação do bacilo

no pulmão, explicando o desenvolvimento de quadros mais severos de tuberculose, a necessidade de re-tratamento e a alta frequência de resistência a drogas (NUNES *et al.*, 2005). Entretanto, a ocorrência de tuberculose resistente a drogas não estava associada à presença de infecção pelo HIV na população estudada por Eyob *et al.* na Etiópia, cuja frequência de HIV era de 46% do total. Os autores referem uma frequência de resistência primária de 18% e adquirida em 42%, sugerindo que história de tratamento anterior e a transmissão de cepas já resistentes a drogas desempenham um papel importante no surgimento da tuberculose resistente a drogas independente da co-infecção pelo HIV, contudo, ressalva o fato da mortalidade por tuberculose ser significativamente maior em pacientes HIV positivos (EYOB *et al.*, 2004). Uma alta taxa de tuberculose resistente a drogas e MDR foi relatada em indivíduos portadores de HIV na Itália, principalmente aqueles com história de tratamento prévio (VANACORE *et al.*, 2004). Em estudos realizados no distrito de Dashoguz - Turkmênistão e Karakalpakstão - Uzbequistão na Ásia Central entre 2001 e 2002, a análise de regressão logística mostrou associação entre MDR-TB e tratamento prévio para tuberculose de 5.1 (IC95% = 2,8 - 9,3) (COX *et al.*, 2004). Por outro lado, no estudo populacional na cidade de São Paulo envolvendo 13 distritos sanitários na zona norte ou 21% dos casos esperados de tuberculose na cidade mostrou uma frequência semelhante de resistência para casos novos, casos com tratamento prévio e MDR independente do resultado da sorologia para HIV (TELLES *et al.*, 2005). Da mesma forma, Pereira *et al.* (2005) encontraram prevalência similar da tuberculose resistente a uma droga ou MDR entre pacientes infectados ou não pelo HIV em Pune - Índia, indicando que a infecção pelo HIV pode não estar associada com o desenvolvimento à resistência do *Mycobacterium tuberculosis*, apesar do risco de adoecimento do indivíduo infectado pelo *Mycobacterium tuberculosis* e portador de HIV ser de 10% ao ano enquanto aqueles HIV negativo o risco é de 10% durante toda a vida (POZNIAK, 2001).

O tratamento inadequado associado ou não a não-aderência ao tratamento pelo paciente, quer seja por abandono ou efeitos adversos da medicação, é um importante fator de risco para o desenvolvimento da resistência na tuberculose (CONSTANT *et al.*, 2002; ORMEROD, 2005). A baixa qualidade das drogas, a falta freqüente e prolongada de medicamentos antituberculose nos postos de saúde e inadequado acompanhamento dos pacientes por parte das autoridades de saúde

são fatores de risco ligados à eficiência do programa de controle da tuberculose (OMS, 1997; PFYFFER, 2000; PARAMASIVAN e VENKATARAMAN, 2004).

Os testes de sensibilidade são realizados apenas por laboratórios centrais (LACENS) os quais não estão presentes em todos os estados, limitando-se os exames a casos com problemas terapêuticos mais complicados (MELO *et al.*, 2002), desta forma, corre-se o risco de se optar por esquema de tratamento não adequado. Além disso, cepas MDR são mais difíceis de tratar e necessitam de tempo maior para o paciente deixar de ser infectante (ORMEROD, 2005), favorecendo a transmissão de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* multidroga resistente (FAUSTINI *et al.*, 2006).

Sistema de Saúde:	Droga:	Paciente:
Regime inadequado	Fornecimento / qualidade inadequada	Quantidade inadequada da droga
Diretrizes inadequadas	Sem qualidade	Não aderência
Não concordância com as diretrizes	Indisponibilidade de algumas drogas (Acabou no estoque ou interrupção da entrega)	Falta de informação
Ausência de diretrizes	Falta de condições de estocagem	Falta de dinheiro
Falta de treinamento	Dose ou combinação errada	Falta de meio de transporte
Não acompanhamento do tratamento		Efeitos adversos
Desorganização ou falta de recursos para os programas de controle		Barreiras sociais
		Má absorção
		Dependência de substâncias químicas

Tabela 2.3: Identifica os fatores mais comuns para um tratamento anti tuberculose inadequado aumentando o risco de desenvolvimento de cepas MDR.

Fonte: OMS, 2006.

2.1.3- Tratamento

A quimioterapia para tuberculose é muito diferente das utilizadas em outras bactérias infecciosas. O bacilo da tuberculose requer um longo tempo de geração e apresenta capacidade para dormência com atividade metabólica baixa o que dificulta a terapia (GILLESPIE, 2002). A resistência a drogas no tratamento da tuberculose é conhecida desde a introdução de quimioterapia eficaz, em 1946, quando a Estreptomicina foi administrada como monoterapia (PFYFFER, 2000), contudo esse fenômeno não suscitou grandes preocupações uma vez que a implantação de esquemas terapêuticos com mais de dois fármacos permitiam normalmente a cura (CONSTANT *et al.*, 2004). Rifampicina é a droga mais potente usada no tratamento da tuberculose a qual tem atividade bactericida contra bacilos extracelulares bem como bacilos ativos e latentes que podem residir dentro dos macrófagos (GILLESPIE, 2002), sendo esta e a Isoniazida as principais drogas de primeira linha utilizadas contra o bacilo da tuberculose (YUEN, *et al.*, 1999). Isoniazida reduz rapidamente o número de bacilos viáveis por ser bastante ativa contra organismos crescendo aerobicamente nas cavidades pulmonares. A Pirazinamida, a terceira droga a ser utilizada no Esquema I de tratamento (Tabela 2.4), é a droga que reduz mais rapidamente o tempo de contagiosidade e apresenta menos recidiva quando comparada ao Etambutol, somente é ativa em baixo pH, sendo ideal para matar organismos nos focos de necrose caseosa. Outras drogas de primeira linha são Etambutol e Estreptomicina que fazem parte do Esquema I reforçado e Esquema III (Tabela 2.5 e 2.6). As drogas antituberculose atuam sobre as enzimas envolvidas na formação da parede celular da bactéria (Isoniazida, Etambutol), síntese de proteínas (Estreptomicina) e na transcrição (Rifampicina) ou na replicação do DNA (fluoroquinonas) (PFYFFER, 2000).

No tratamento de tuberculose MDR devem ser utilizados medicamentos de segunda linha. Os aminoglicosídeos mais utilizados são a kanamicina que é um dos mais baratos, a amikacina tão ativo quanto à kanamicina e a capreomicina, utilizado no caso de resistência aos anteriores. No grupo das tioamidas estão a Etionamida e

protionamida que são dois representantes diferentes da mesma substância ativa. As fluoroquinolonas representadas pela ofloxacina e ciprofloxacina são medicamentos diferentes que apresentam resistência cruzada e atividade bactericida baixa. Apesar de não apresentarem resistência cruzada com outras drogas, as cicloserinas apresentam grande toxicidade o que limita o seu uso. O ácido paraaminosalicílico (PAS) atua como agente bacteriostático sendo utilizado para prevenir a resistência a outras drogas (OMS, 1997).

Balabanova *et al.* (2005) relata variação no sucesso do tratamento para TB-MDR com as drogas de segunda linha entre 48 e 80%. Apesar de essas drogas serem utilizadas como alternativa no tratamento de TB-MDR, Cox *et al.* (2004) relata resistência a protionamida (16%), Capreomicina (2%), Ofloxacina (2%) em pacientes TB-MDR no Uzbequistão e a Protionamida (9%) em pacientes TB-MDR no Turkmenistão. A Organização Mundial de Saúde preconiza o uso de DOTS (Tratamento Diretamente Observado) no tratamento de tuberculose em situações de falência no tratamento. O uso de somente DOTS nos casos de TB-MDR pode ser insuficiente (FARMER e KIM, 1998). No entanto, programas de sucesso em países desenvolvidos e em desenvolvimento indicam que o uso da estratégia DOTS previne TB-MDR (PABLOS-MÉNDES *et al.* 2002). Esforços complementares têm sido feitos nas regiões consideradas de “zonas quentes” para TB-MDR, denominado “DOTS-plus”, onde casos de TB-MDR entram em regime de tratamento individual (FARMER e KIM, 1998). A medida considerada mais importante para a prevenção da tuberculose e, neste caso, da TB-MDR é a rápida identificação e tratamento correto dos casos de tuberculose (CONSTANT *et al.* 2004). A duração ideal de tratamento para TB-MDR é pouco conhecida e, muitos casos são tratados por dois anos após a cultura ter convertido para negativo (POZNIAK, 2001).

Fases do tratamento	Drogas	Peso do Paciente			
		Até 20 kg	Mais de 20 kg e até 35 kg	Mais de 35 kg e até 45 kg	Mais de 45 kg
		Mg/kg/dia	Mg/dia	Mg/dia	Mg/dia

1ª fase	R	10	300	450	600
(2 meses – RHZ)	H	10	200	300	400
	Z	35	1000	1500	2000
2ª fase	R	10	300	450	600
(4 meses – RH)	H	10	200	300	400

Tabela 2.4: Mostra o Esquema I (E-I - 2RHZ / 4RH) de tratamento para tuberculose indicado nos casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar

Fonte: Brasil 2002. Controle da Tuberculose: Uma proposta de integração ensino-serviço. *Centro de Referência Helio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.*

Siglas: Rifampicina – R; Isoniazida – H; Pirazinamida – Z.

Fases do tratamento	Drogas	Peso do Paciente			
		Até 20 kg	Mais de 20 kg e até 35 kg	Mais de 35 kg e até 45 kg	Mais de 45 kg
		mg/kg/dia	Mg/dia	Mg/dia	Mg/dia
1ª fase	R	10	300	450	600
(2 meses – RHZE)	H	10	200	300	400
	Z	35	1000	1500	2000
	E	25	600	800	1200
	2ª fase	R	10	300	450
(4 meses – RHE)	H	10	200	300	400
	E	25	600	800	1200

Tabela 2.5: Mostra o Esquema I Reforçado (E-IR – 2RHZE / 4RHE) de tratamento para tuberculose indicado nos casos de recidiva após cura ou retorno após abandono do esquema I

Fonte: Brasil 2002. Controle da Tuberculose: Uma proposta de integração ensino-serviço. *Centro de Referência Helio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.*

Siglas: Rifampicina – R; Isoniazida – H; Pirazinamida – Z; Etambutol – E.

Fases do tratamento	Drogas	Peso do Paciente			
		Até 20 kg	Mais de 20 kg e até 35 kg	Mais de 35 kg e até 45 kg	Mais de 45 kg
		mg/kg/dia	Mg/dia	Mg/dia	Mg/dia
1ª fase (3 meses – SZEET)	S	20	500	1000	1000
	Z	35	1000	1500	2000
	E	25	600	800	1200
	Et	12	250	500	750
2ª fase (9 meses – EEt)	E	25	600	800	1200
	Et	12	250	500	750

Tabela 2.6: Mostra o Esquema III (E-III – 3SZEET / 9EEt) de tratamento para tuberculose indicado nos casos de falência de tratamento dos Esquemas I e IR.

Fonte: Brasil 2002. Controle da Tuberculose: Uma proposta de integração ensino-serviço. *Centro de Referência Helio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.*

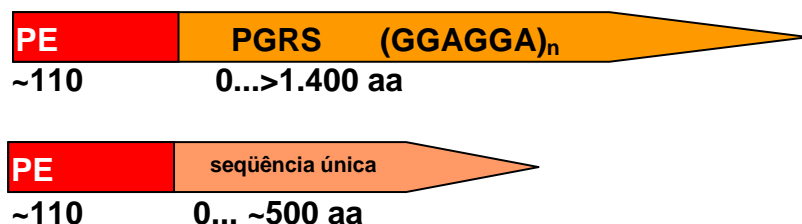
Siglas: Rifampicina – R; Isoniazida – H; Pirazinamida – Z; Etambutol – E; Estreptomina – S; Etionamida - Et

2.2- GENOTIPAGEM

A genotipagem emprega metodologias capazes de caracterizar indivíduos baseados no polimorfismo do seu genoma. Sendo assim, o conhecimento da seqüência completa do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* permite entender melhor a sua biologia e ajuda na concepção de novas técnicas.

O genoma do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv é composto de 4.411.529 pares de bases, sendo 65,6% representados por guanina e citosina e 3.924 quadros de leitura identificados contabilizando aproximadamente 91% do seu potencial de codificação. Destes, 10% são dedicados a duas grandes famílias de genes denominados PE e PPE que codificam proteínas ricas em glicina e que muitas vezes tem como base múltiplas cópias de seqüências repetitivas polimórficas denominada PGRS (Polymorphic GC-rich Repetitive Sequence) e MPTR (major polymorphic tandem repeats), respectivamente (Figura 2.5), (COLE *et al.*, 1998). Vários dos genes dessas famílias (PE - 104 genes e PPE – 68 genes) expressam proteínas que tem sido localizadas na parede celular e membrana celular do bacilo, além de serem responsáveis pela codificação de enzimas para o metabolismo de ácidos graxos, o qual pode estar relacionado com sua capacidade de crescer no tecido do hospedeiro (SMITH, 2003). Geneticamente, os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* são extremamente semelhantes com 99,9% de similaridade ao nível de nucleotídeo e com seqüências idênticas do RNA ribossomal 16S (BROSCH *et al.*, 2002).

Representação da Família PE



Representação da Família PPE

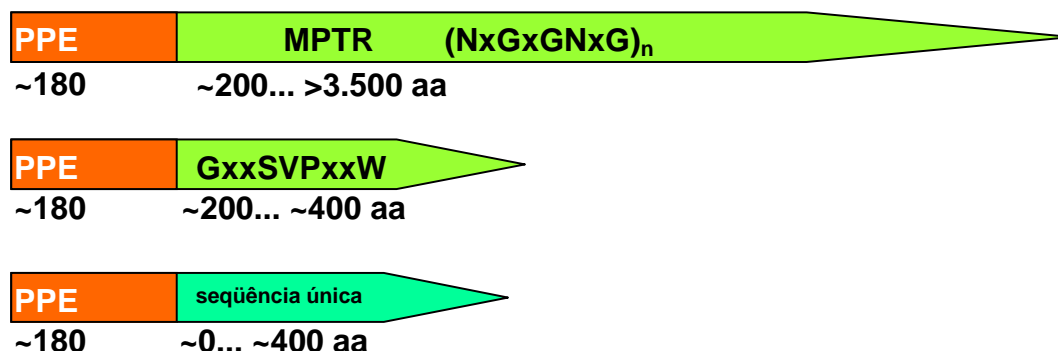


Figura 2.5: Representação esquemática das famílias de proteínas PE e PPE.

Fonte: Cole *et al.* (1998). *Nature*. **393**: 537-544.

2.2.1- Marcadores Genéticos

O genoma do *M. tuberculosis* é rico em DNA repetitivo e seqüências IS (Insertion Sequence) como IS6110, IS1081; PGRS (Polymorphic GC-rich Repetitive Sequence) (COLE *et al.*, 1998); DR (Direct Repeat) (KAMERBEEK *et al.*, 1997); ETR (Exact Tandem Repeat), (FROTHINGHAM and MEEKER-O'CONNELL, 1998) e MPTR (Multiple Polymorphic Tandem Repeats), (HERMANS *et al.*, 1992). Esses elementos são utilizados como seqüências alvos para diferenciação entre linhagens de micobactérias (tabela 2.7), (KANDUMA *et al.*, 2003).

Seqüência Repetitiva	Micobactéria	Número de Cópias	Polimorfismo
IS6110 (IS986, IS987)	<i>M. tuberculosis</i>	0 a 20	Alto
	<i>M. africanum</i>	0 a 20	Alto
	<i>M. bovis</i>	0 a 20	Alto
	<i>M. bovis BCG</i>	1 a 2	Nenhum

IS1081	<i>M. tuberculosis</i>	5 a 6	Baixo
	<i>M. africanum</i>	5 a 6	Baixo
	<i>M. bovis</i>	5 a 6	Baixo
	<i>M. bovis BCG</i>	5 a 6	Baixo
DR	<i>M. tuberculosis</i>	1	Alto
	<i>M. africanum</i>	1	Alto
	<i>M. bovis</i>	1	Alto
	<i>M. bovis BCG</i>	1	Nenhum
MPTR	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	~ 80	Baixo
PGRS	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	26 a 30	Alto

Tabela 2.7: Mostrando elementos repetitivos presentes no genoma de espécies pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* utilizadas como marcaores na diferenciação entre linhagens.

Fonte: Kanduma *et al.* (2003). *Journal of Applied Microbiology*. **94:** 781-791.

Os elementos IS são segmentos de DNA com capacidade de transposição dentro de vários sítios em plasmídeo bacteriano, fagos e cromossomos sem necessitar de homologia com os mesmos, variando em número de cópias e localização devido à transposição ou outro tipo de rearranjo cromossomal (MENDIOLA *et al.*, 1992). O IS6110 é o elemento mais comumente utilizado como sonda para estudos utilizando como marcador o RFLP. É uma seqüência de inserção contendo 1.355 pares de bases (COLE *et al.*, 1998), pertencentes à família IS3 enterobacterial (THIERRY *et al.*, 1990; MCADAM *et al.*, 1990), variando em número de 0 a 20 cópias no genoma (Das *et al.*, 1995; Mendiola *et al.*, 1992), dependendo da espécie e da cepa, sendo encontrado em muitas linhagens do *M. tuberculosis* entre 8 e 15 cópias em diferentes posições do genoma (figura 2.6) embora linhagens com uma única cópia seja comum (KANDUMA *et al.*, 2003). Mendiola *et al.* (1992) sugerem que todas as cópias do IS6110 sejam derivadas de um ancestral comum das linhagens do complexo *M. tuberculosis* e que transposição, via mecanismos replicativos, foi responsável pelo polimorfismo nos diferentes isolados clínicos do *M. tuberculosis* utilizados no estudo dos autores (MENDIOLA *et*

al., 1992). O mapa físico da seqüência IS6110 (figura 2.7) indica que várias enzimas de restrição podem cortar dentro do elemento gerando polimorfismo nos tamanhos dos fragmentos de restrição (VAN EBDEM *et al.*, 1993). Eventos como mutações em um único nucleotídeo podem criar um novo sítio ou retirar um sítio de restrição preexistente, ou ainda inserções, deleções, duplicações ou inversões causam trocas no fragmento de restrição (IJAZ *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos confirmam o alto grau de estabilidade em relação à proporção de mudanças no perfil do polimorfismo do IS6110, sendo que outros indicam uma alta variabilidade (NIEMANN *et al.*, 2000). Warren *et al.* (2002) conduziram estudos com o objetivo de medir a estabilidade do padrão de bandeamento do IS6110 em pacientes com tuberculose persistente. Os autores realizaram cultura das amostras de pacientes que tiveram mais de um isolado, identificando pelo IS6110-RFLP aproximadamente 96% das amostras com o mesmo padrão e uma proporção de 4% de variação no padrão do IS6110-RFLP. Ainda neste estudo, comparação entre pacientes com cepas sem mudanças no perfil genético e cepas com mudanças no perfil genético não demonstrou qualquer diferenças entre variáveis demográficas. Contudo, história previa de doença foi associado com o aparecimento de linhagens variantes ($P = 0.045$) sugerindo que a evolução clonal das cepas variantes pode ter ocorrido durante a fase de latência da doença após prévia infecção ou durante o processo de reativação, tendo como prováveis eventos genéticos para essas alterações transposição replicativa, deleção e mutação cromossomal (WARREN *et al.*, 2002). Em outro estudo, mudanças entre 1 a 2 bandas no perfil de cepas, provavelmente devido evolução, ocorreram em 1.4% dos indivíduos durante o tratamento, 11.1% durante recorrência e 10.7% durante transmissão (GLYNN *et al.*, 2004). Contudo, Kato-Maeda *et al.*, (2001) observaram padrões de deleção idênticos para um mesmo clone de micobactéria, mas diferindo entre diferentes clones sugerindo que os sistemas de genotipagem são apropriados para estudos epidemiológicos (KATO-MAEDA *et al.*, 2001).

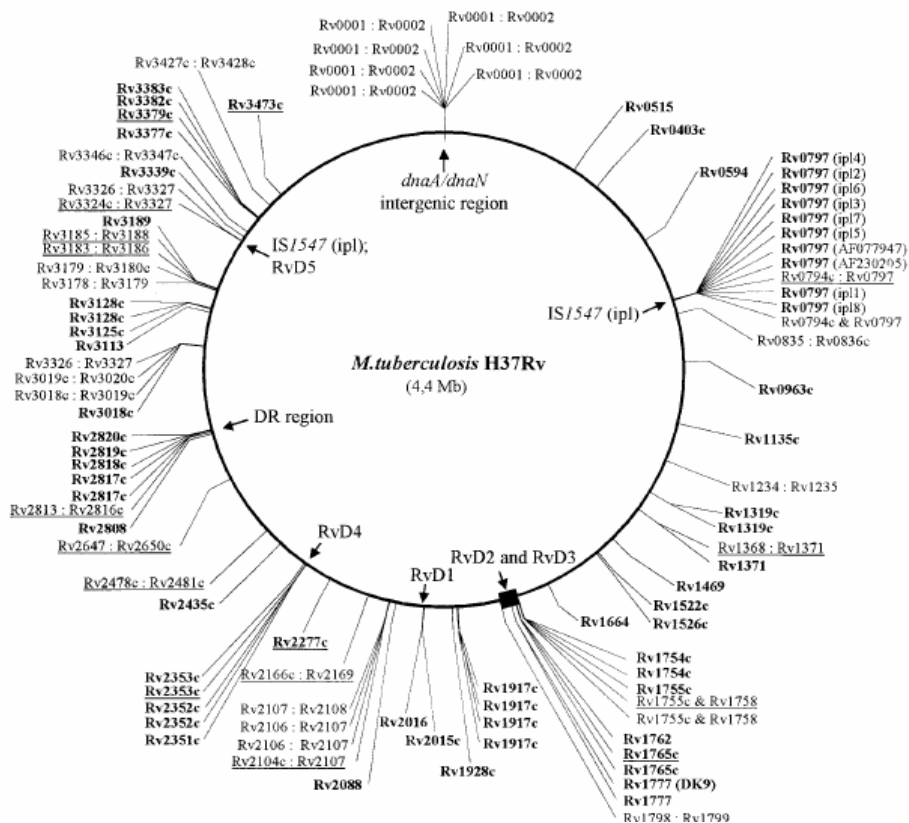


Figura 2.6: Distribuição dos loci de inserção do IS6110 relacionado ao quadro de leitura do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. A identificação do quadro de leitura de genes interrompidos esta ressaltado em negrito, enquanto as inserções intergênicas estão representadas por dois números do quadro de leitura separados por dois pontos. Os sítios de inserção do *M. tuberculosis* H37Rv estão sublinhados. Vários sítios de integração dentro de um único gene ou região intergênica estão mostradas por várias entradas com a mesma identificação. A posição relativa das regiões DR e locus *ipl* são mostradas e a posição das regiões deletadas do *M. tuberculosis* H37Rv relativa ao *M. bovis* estão indicadas por RvD.

Fonte: Sampson *et al.* (2001). *J. Clin. Microbiol.* **9** (39): 3423-3424.

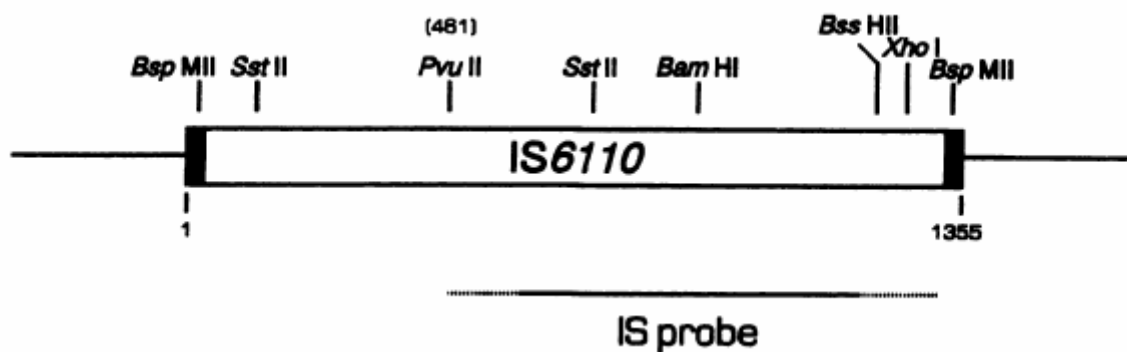


Figura 2.7: Mapa físico do elemento de inserção IS6110 mostrando sítios de clivagem para diversas enzimas de restrição.

Fonte: van Embden et al. (1993). *J. Clin. Microbiol.* **31** (2):406-409.

A seqüência de inserção IS1081, também presente no complexo *M. tuberculosis*, com tamanho de 1.324 pares de base apresentam um baixo grau de polimorfismo devido à baixa atividade transposicional. Seu número de cópias é menor que o IS6110, limitando seu uso em estudos epidemiológicos (KANDUMA *et al.*, 2003).

O marcador DR presente no complexo *Mycobacterium tuberculosis* é um membro da família de seqüências CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (BRUDEY *et al.*, 2006), contendo de 10 a 50 cópias de 36 pares de bases separadas uma da outra por espaçadores com diferentes seqüências. Entretanto, essas seqüências espaçadores entre dois DR específico são conservados entre linhagens do *Mycobacterium* (BARNES e CAVE, 2003).

Frothingham et al. (1998) identificaram no genoma do *M. tuberculosis* H37Rv 11 loci contendo um número variável de repetições consecutivas (VNTR), constituídas de 5 repetições polimórficas maiores (MPTR-A, MPTR-B, MPTR-C, MPTR-D e MPTR-E) e 6 repetições consecutivas exatas (ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E e ETR-F), espalhados em uma região de 4.600 pares de base do genoma da micobactéria (FROTHINGHAM *et al.*, 1998). MPTR consiste em repetições curtas com um tamanho de 10 pares de base separadas por uma seqüência de DNA de 5 pares de base inseridas no quadro de leitura de um gene de 1.551 pares de base que codifica para uma proteína de choque térmico de 65 kDa, resultando em uma seqüência repetida de aminoácidos que possivelmente representa epítomos imuno dominantes (HERMANS *et al.*, 1992). Cada um dos 6 loci

ETR contém várias repetições consecutivas de uma mesma seqüência de DNA e a seqüência de cada locus diferem entre si variando de 53 a 79 pares de base. ETR-A assim como o MPTR-A estão localizados dentro do quadro de leitura de um gene enquanto os demais ETR estão localizados dentro de espaço intergênico (FROTHINGHAM *et al.*, 1998).

PGRS é o elemento repetitivo mais abundante no complexo *M. tuberculosis*, presente em pelo menos 26 loci, possui 96 pares de bases da seqüência consenso CGGCGGCAA rica em guanina e citosina (Kanduma *et al.*, 2003; Poulet e Cole, 1995). Estudos recentes mostram que os padrões de bandeamento do PGRS permanecem estáveis após múltiplas culturas de amostras de um único episódio da doença (0,5% de alteração), e durante transmissão do bacilo entre pacientes que mantiveram contato (1.9% de alteração) (RICHARDSON *et al.*, 2004).

2.2.2- Métodos de Genotipagem

Um dos métodos mais utilizados na diferenciação de linhagens do *M. tuberculosis* é o RFLP-IS6110. A variação em número de cópias do IS6110 no genoma da micobactéria é a base para o polimorfismo (Mostrom *et al.*, 2002) o qual é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição (*PvuII*) e observado por hibridização destes fragmentos utilizando como sonda o elemento IS6110 (VAN EMBDEN, 1993). Este método é considerado padrão-ouro apresentando 100% de reprodutibilidade (KREMER *et al.*, 1999). No entanto, a aplicação do RFLP na genotipagem requer grande quantidade de DNA necessitando realizar cultura do *M. tuberculosis* (GORI *et al.*, 2005). Além disso, algumas cepas não contêm o marcador IS6110 (FARNIA *et al.*, 2004) ou podem ser pouco discriminatório entre cepas com pequeno número desse marcador (COWAN *et al.*, 2002; TORREA *et al.*, 1995). Da mesma forma, um grande número de IS6110 pode gerar um perfil complexo, como os encontrados nas linhagens da família W/Beijing (SOLA *et al.*, 2003), necessitando de um método de genotipagem adicional nesses casos (BARNES e CAVE, 2003).

Os padrões encontrados na genotipagem permitem agrupar cepas com perfil genético idêntico (epidemiologicamente relacionados) em relação àqueles com perfil diferente, mas alguns estudos aceitam agrupamentos entre cepas quando há diferenças no perfil genético em uma banda (GLYNN *et al.*, 2004) como o realizado

por Ijaz *et al.* (2002) que relatam evidências epidemiológicas de transmissão entre pacientes cujos isolados apresentam padrão similar (não idêntico) de genotipagem pelo IS6110-RFLP, diferindo por uma única banda, podendo estes padrões ser utilizados para investigação de ligação epidemiológica uma vez que essas cepas similares pelo IS6110-RFLP tiveram perfil idêntico quando genotipado por outro método (IJAZ *et al.*, 2002). Assim, a interpretação dos resultados na epidemiologia molecular em infecções pelo *M. tuberculosis* depende do entendimento quanto à estabilidade e características evolutivas desses marcadores de DNA usados para classificar isolados clínicos (WARREN *et al.*, 2002).

Outros métodos baseados em PCR (Polimerase Chain Reaction) têm sido propostos como alternativa ao RFLP, entre eles o spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) (KAMERBEEK *et al.*, 1997), DRE-PCR (Double-Repetitive-Element - Polymerase Chain Reaction) (FRIEDMAN *et al.*, 1995), VNTR (Frothingham *et al.*, 1998), MIRU (SOLA *et al.*, 2003), principalmente quando utilizados em associação permitindo um maior poder discriminatório na genotipagem (COWAN *et al.*, 2002; FILLIOL *et al.*, 2000). Uma das principais vantagens em se utilizar esses métodos em relação ao IS6110-RFLP é sua capacidade de fornecer um rápido perfil genético das linhagens de *Mycobacterium* possibilitando uma rápida intervenção pelos serviços de saúde (SCOTT *et al.*, 2005).

O spoligotyping é baseado no polimorfismo do locus DR cromossomal. Este locus compreende séries de elementos DR de 36 pares de bases separados por uma única seqüência espaçador, a qual varia em tamanho de 34 a 41 pares de bases. As linhagens variam em números de DR e na presença ou ausência de um determinado espaçador (figura 2.8) (KAMERBEEK *et al.*, 1997). O método permite concomitante identificação e diferenciação de linhagens (GORI *et al.*, 2005), através de amplificação do DNA genômico por PCR e posterior hibridização do produto amplificado a um grupo de 43 oligonucleotídeos imobilizados em uma membrana, onde cada um destes corresponde a uma única seqüência de DNA espaçador (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

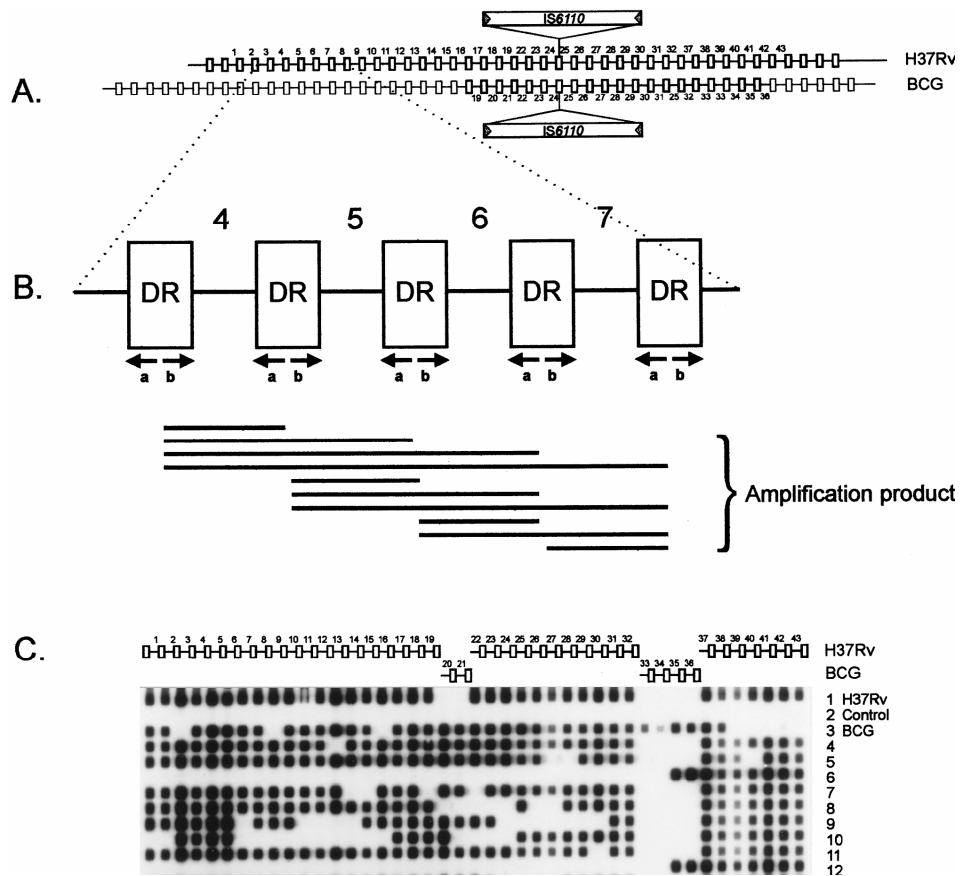


Figura 2.8: Representação esquemática do spoligotyping. (A) estrutura do lócus DR no genoma da micobactéria. (B) Princípio da amplificação in vitro da região DR por PCR. (C) padrão de hibridização (spoligotyping) do DNA amplificado da micobactéria.

Fonte: Kamerbeek *et al.* (1997). *J. Clin. Microbiol.* **35**: 907–914.

As principais linhagens de *M. tuberculosis* caracterizadas pelo spoligotyping estão representadas pelas famílias: **Beijing** caracterizada pela ausência dos espaços 1 ao 34; **EAI** (East-African Indian) identifica pela ausência dos espaços 29 ao 32 e 34, e presença de pelo menos um espaço entre 1 e 30; **Haarlem** definida pela ausência dos espaços 31 e 33 ao 36, e presença de pelo menos um espaço entre 1 e 30; **LAM** (Latin-American and Mediterranean) caracterizada pela ausência dos espaços 21 ao 24 e 33 ao 36, e presença de pelo menos um espaço entre 1 e 30; **X** identificada pela ausência dos espaços 18 e 33 ao 36; **T** definida pela ausência dos espaços 33 ao 36, e presença de pelo menos um espaço entre 1 e 30 mais presença dos espaços 9 ou 10 e 31, e presença de pelo menos 1 espaço entre

21 e 24; e finalmente, **CAS** (Central Asian) caracterizada pela ausência dos espaços 4 ao 7 e 23 ao 34 (figura 2.9) (FERDINAND *et al.*, 2004).

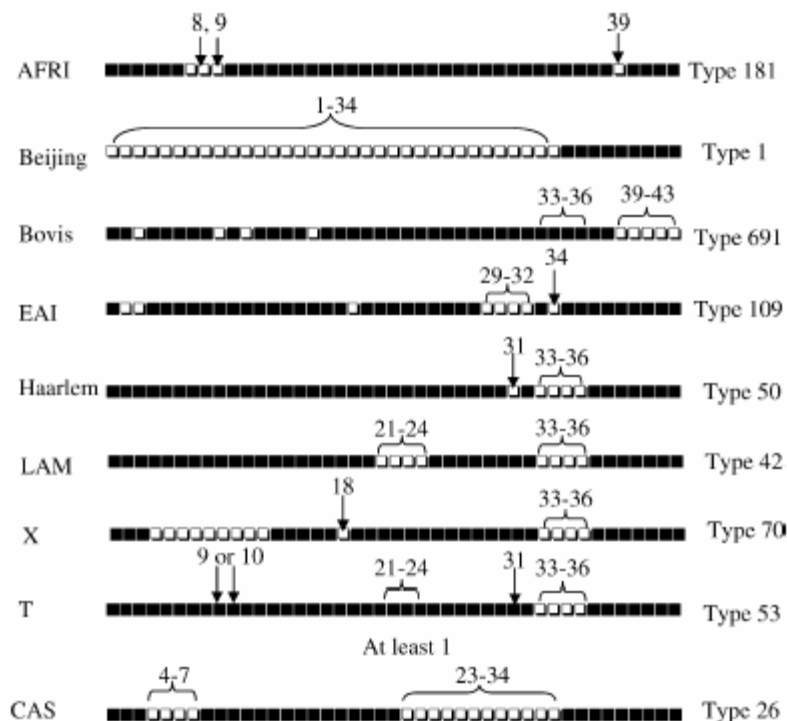


Figura 2.9: Descrição do spoligotyping de linhagens das maiores famílias do *Mycobacterium tuberculosis*. A coluna da esquerda mostra a família, a coluna central mostra o perfil do spoligotyping e a coluna da direita mostra o número da linhagem (SpolDB4). A primeira (*Mycobacterium africanum*) e terceira (*Mycobacterium bovis*) famílias de cima para baixo fazem parte do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Fonte: Ferdinand *et al.* (2004). *ELSEVIER*. **155:** 647-654.

O Instituto Pasteur (Guadalupe) mantém um banco de dados (SpolDB4) com o perfil do spoligotyping de aproximadamente 40 mil isolados provenientes de mais de 120 países, os quais podem ser acessados através do endereço eletrônico <http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spolddb4>. Os resultados de estudos locais podem ser analisados e comparados com linhagens de *M. tuberculosis* de outras regiões do mundo permitindo um melhor entendimento da distribuição das famílias de *M. tuberculosis* mais comuns (ELDHOLM *et al.*, 2006; VIEDMA *et al.*, 2005; BRUDEY *et al.*, 2004).

Brudey *et al.* (2006), utilizando 39.295 perfis do spoligotyping cadastrados no banco de dados SpolDB4 mostraram a distribuição das principais famílias no mundo. As linhagens da família Beijing são prevalentes no extremo oriente da Ásia (45,9%), Oriente Médio e Ásia Central (16,5%) e Oceania (17,2%). A família EAI também apresenta alta prevalência nestas áreas (33,8% no extremo oriente da Ásia, 24,3% no Oriente Médio e Ásia Central, 22,9% na Oceania). A família CAS1-Delhi é prevalente no Oriente Médio e Ásia Central, mas tem sido encontrada em diversas outras regiões como África (5,3%), América Central (0,1%), Europa (3,3%), Extremo Oriente da Ásia (0,4%), América do Norte (3,3%) e Oceania (4,8%). A família X apresenta alta prevalência na América do Norte (21,5%) e América Central (11,9%). A família LAM apresenta alta frequência na América Central, Sul da África e América do Sul, além de estar presente também em outras regiões do mundo (BRUDEY *et al.*, 2006).

O DRE-PCR (Double Repetitive Element – Polymerase Chain Reaction) é um método de genotipagem baseado em amplificação por PCR de segmentos de DNA do *M. tuberculosis* localizados entre duas cópias dos elementos repetitivos IS6110 e PGRS. O princípio deste método está baseado no fato de que a distância entre os elementos repetitivos e o número de cópias do IS6110 e PGRS varia de linhagem para linhagem (figura 2.10). Essas variações originam diferentes tamanhos e números de fragmentos de DNA gerando padrão de bandejamento único nas diferentes linhagens de *M. tuberculosis* (FRIEDMAN *et al.*, 1995).

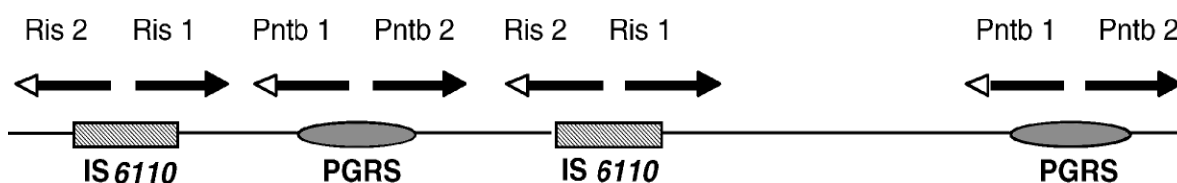


Figura 2.10: Representação esquemática da seqüência replicada utilizando DRE-PCR. Localização dos Primers Ris1, Ris2, pntb1 e pntb2 utilizados em relação aos elementos de inserção IS6110 e PGRS.

Fonte: Friedman *et al.* (1995). *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1383–1384.

Entretanto, DRE-PCR apresenta baixa reprodutibilidade (58%), com diferenças na intensidade em todo padrão de bandejamento o qual resulta em desaparecimento de bandas fracas e interpretações inconsistentes (KREMER *et al.*, 1999). Como um teste de segunda opção, utilizado em associação com outro método, o DRE-PCR mostrou ter grande potencial discriminatório. Sola *et al.* (1998) sugerem que testes de genotipagem pelo spoligotyping em associação com IS6110-RFLP podem ser satisfatoriamente substituídos por spoligotyping seguido de DRE-PCR (SOLA *et al.*, 1998).

VNTR é um método de rotina para teste de paternidade e forense em humanos (FROTHINGHAM, 2001). Em bactérias também tem sido identificados loci VNTR possibilitando sua utilização na genotipagem do *M. tuberculosis*. O método consiste na amplificação das regiões ETR-A a ETR-F e MPTR-A com posterior visualização do padrão de bandejamento em corrida eletroforética (FROTHINGHAM AND MEEKER-O'CONNELL, 1998). O perfil alélico pode ser facilmente analisado dependendo do número de cópias repetidas por locus (figura 2.11), por exemplo: a cepa do *M. tuberculosis* H37Rv apresenta 16 repetições para o locus MPTR-A, 3 para o locus ETR-A, 3 para o locus ETR-B, 4 para o locus ETR-C, 3 para o locus ETR-D, 3 para o locus ETR-E e 3 para o locus ETR-F, tendo assim o perfil alélico 6334333 (FROTHINGHAM, 2001; FROTHINGHAM e MEEKER-O'CONNELL, 1998).

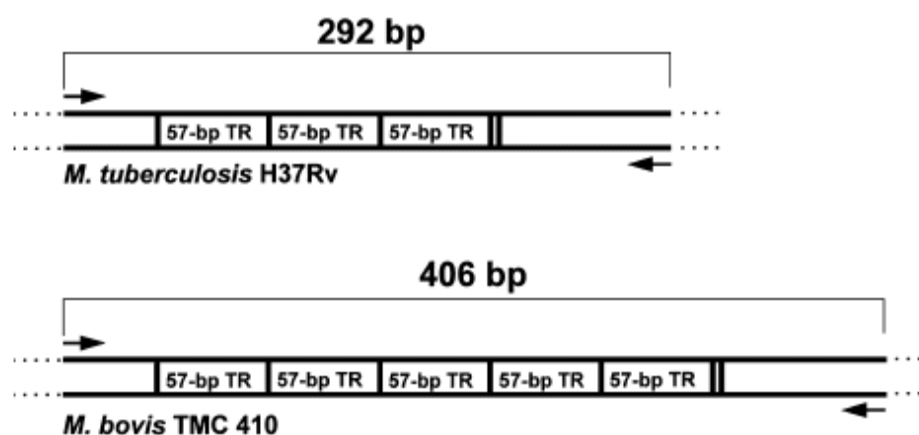


Figura 2.11: Exemplo de locus VNTR. A figura mostra o locus ETR-B em *M. Tuberculosis* H37Rv e *M. bovis*. A amplificação desse locus usando PCR com primers complementares anelando na posição indicada pelas setas geram produtos de PCR com 292 e 406 pares de bases, respectivamente. O DNA do *M. tuberculosis*

H37Rv contem três cópias completas da repetição em tandem de 57 pares de bases. O DNA do *M. bovis* tem cinco cópias completas da repetição em tandem de 57 pares de bases.

Fonte: Frothingham et al. (1998). *Microbiology*. **144**: 1189-1196.

A utilização do VNTR em conjunto com spoligotyping tem sido descrita como a metodologia de escolha para genotipagem do *M. tuberculosis*. VNTR apresentou 97% de reprodutibilidade em estudos realizados por Kremer et al. (1999), entretanto, os autores justificam que pode ter havido erros não inerentes ao método. VNTR tem a vantagem de que seus resultados podem ser facilmente expressos em um simples formato digital como ocorre com spoligotyping (KREMER et al., 1999; FROTHINGHAM e MEEKER-O'CONNELL, 1998). Filliol *et al.* (2000) relatam em seus estudos um menor poder discriminatório do VNTR como único método de tipagem (HGI=0,863), em relação ao resultado obtido pela associação ao spoligotyping (HGI=0,982) e pela associação com a combinação do spoligotyping e DRE-PCR (HGI=0,992), sugerindo que VNTR tem um potencial uso como método de genotipagem em associação com um segundo método como o spoligotyping (FILLIOL *et al.*, 2000). Sola et al. (2001) em estudos realizados na Sicília (Itália) relatam 82% de agrupamento dos isolados pelo VNTR enquanto spoligotyping e IS6110-RFLP agruparam 60 e 15 %, respectivamente. A combinação de spoligotyping e VNTR resultou em 43% de agrupamento, com todos os agrupamentos pelo IS6110-RFLP sendo também identificados por essa combinação, sugerindo que o uso de métodos combinados baseados em PCR é uma estratégia importante em estudos de epidemiologia molecular da tuberculose (SOLA *et al.*, 2001).

Uma outra região semelhante ao loci VNTR tem sido descrita como um importante marcador em genotipagem. São doze mini satélites denominados MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) que apresentam alta reprodutibilidade (SOLA *et al.*, 2003). Cada isolado pode ser tipado pelo número de cópias de unidades repetidas desses 12 loci espalhados por todo o genoma. Essas unidades apresentam tamanhos entre 52 a 77 nucleotídeos e o número de unidades repetidas pode ser determinado pelo tamanho do fragmento produzido na amplificação do locus (COWAN *et al.*, 2002). Kwara et al. (2003) analisando os perfis genéticos de

cepas isoladas de pacientes que tiveram contato entre si mostraram que MIRU-VNTR foi capaz de manter os mesmos grupos definidos pelo IS6110-RFLP, o que não ocorreu com spoligotyping, diferindo em um isolado (KWARA et al., 2003). A estabilidade dos 12 loci MIRU-VNTR foi analisada por Savine et al. (2002) utilizando isolados de *M. tuberculosis* de pacientes com infecção crônica por um longo período (acima de 6 anos) em uma área geográfica de alta incidência da doença. Os resultados mostraram que MIRU-VNTR permaneceram altamente estáveis durante este período, com perfil idêntico em 55 dos 56 isolados analisados (SAVINE et al., 2002). Vários estudos mostram que MIRU-VNTR é uma poderosa ferramenta para genotipagem do *M. tuberculosis*, inclusive podendo ser usado como um método de primeira escolha (SUPPLY et al., 2001; COWAN et al., 2002; FERDINAND et al., 2004).

A epidemiologia molecular surge como uma ferramenta aplicada no estudo da tuberculose visando prevenção e controle da doença. A utilização dos diversos marcadores moleculares descritos acima possibilita a identificação de subgrupos do *M. tuberculosis* com aplicação em estudos epidemiológicos visando um melhor entendimento dos fatores que influenciam na sua transmissão; avaliação de programas de controle regionais permitindo um desenho mais adequado das medidas de controle; identificação de transmissão em profissionais de saúde e entre pacientes internados em centros de saúde; elucidação de infecção exógena ou reativação endógena; identificação de contaminação em laboratórios com graves conseqüências, aos pacientes, na conduta clínica; diferenciação entre espécies de bacilos; Identificação de cepas com localização geográfica específica; filogenia (SOLA et al., 2005; BARNES e CAVE, 2003; SOLA et al., 2003; KANDUMA et al., 2003; KRUUNER et al., 2002; BROSCHE et al., 2002; HERNÁNDEZ-GARDUÑO et al., 2002; LEMAITRE et al., 1998; SUFFYS et al., 1997; HOPEWELL e SMALL, 1996).

3- OBJETIVOS

3.1- GERAL

Estudar a influência de fatores ambientais e de virulência do *M. tuberculosis* envolvidos no desenvolvimento da tuberculose doença utilizando-se como estratégia metodológica uma coorte prospectiva e, estudar a influência de fatores genéticos no adoecimento de tuberculose tendo como estratégia metodológica um estudo de caso-controle aninhado à coorte.

3.2- ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil clínico epidemiológico dos indivíduos atendidos com suspeita de tuberculose e os portadores de tuberculose atendidos no município do Cabo de Santo Agostinho entre 2000 e 2003.
- Determinar o perfil de resistência a drogas de cepas isoladas no Município do Cabo de Santo Agostinho entre 2000 e 2003.
- Identificar fatores de risco para o desenvolvimento de tuberculose resistente a drogas.
- Determinar a diversidade genética das cepas de *M. Tuberculosis* isoladas do Município do Cabo de Santo Agostinho entre 2000 e 2002 através da técnica do spoligotype.
- Descrever a distribuição de agrupamentos de cepas geneticamente semelhantes no Município do Cabo de Santo Agostinho.
- Avaliar o uso desta ferramenta para o programa de controle da tuberculose.
- Analisar a influência do grau de parentesco e intensidade de exposição com a ocorrência de segundo caso da doença no ambiente intradomiciliar.
- Descrever a frequência genotípica para os alelos de classe II presentes no locus HLA-DR de indivíduos expostos à tuberculose no ambiente familiar independente do grau de parentesco.

4- ARTIGOS

4.1- High frequency of drug resistance to isoniazid and rifampicin in tuberculosis in the city of Cabo de Santo Agostinho, an urban area of Northeast of Brazil.

Este primeiro artigo teve como objetivos analisar o perfil clínico epidemiológico dos indivíduos atendidos com suspeita de tuberculose bem como dos portadores de tuberculose atendidos no município do Cabo de Santo Agostinho entre 2000 e 2003, determinar o perfil de resistência a drogas de cepas isoladas no Município do Cabo de Santo Agostinho neste mesmo período e identificar fatores de risco para o desenvolvimento de tuberculose resistente a drogas.

Este artigo foi submetido à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical estando o mesmo aceito para publicação.

High frequency of drug resistance to isoniazid and rifampicin in tuberculosis in the
City of Cabo de Santo Agostinho, an urban area of Northeast of Brazil

Alta frequência de resistência às drogas isoniazida e rifampicina em tuberculose na
Cidade do Cabo de Santo Agostinho, uma área urbana do Nordeste do Brasil

Marcilio Baliza^{1, 7}, Artur Henrique Bach¹, Gabriel Lobo de Queiroz¹, Inês Cardoso
Melo², Maria Madileuza Carneiro³, Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque¹,
Philip Suffys⁴, Laura Rodrigues⁵, Ricardo Ximenes⁶ and Norma Lucena-Silva^{1, 8}.

1. Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz. Recife, PE, 2. Secretaria de Saúde do Cabo de Santo Agostinho,
Posto de Saúde Herbert de Souza, Cabo de Santo Agostinho, PE, 3. Laboratório
Central da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, Recife, PE, 4.
Departamento de Micobacterioses, Instituto Oswaldo cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro, RJ, 5. Department of Epidemiology of the London School of Hygiene
Tropical Medicine, London, United Kingdom, 6. Departamento de Medicina Tropical,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 7. Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Santo Antônio de Jesus, BA, 8.
Laboratório de Biologia Molecular, Serviço de Oncologia do Instituto Materno Infantil
Prof. Fernando Figueira, Recife, PE.

Financial Support: This work was supported by FACEPE grant number: 23-CSD-
08/00-01/01-29; CNPq Brazilian TB-Network, grant number 62.0055/01-4-PADCT
III/MILÊNIO.

Address to: Dra Norma Lucena Silva. Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz. Av. Moraes Rego, S/N, Campus da UFPE,
50670-420 Recife, PE.

Tel: 55 81 9962-3975; Fax: 55 81 3453-2449.

e-mail: nlucena@cpqam.fiocruz.br

Abstract

The objective of the present study is to investigate the frequency and risk factors for developing Multi-drug resistance tuberculosis in Cabo de Santo Agostinho (Brazil). A prospective study conducted from 2000-2003 in which suspected cases were investigated by bacilloscopy and culture. Of 232 confirmed cases of tuberculosis, 174 had culture and antibiotic susceptibility test performed. Thirty-five out 174 cultures showed resistance to any drug. The frequency of primary and acquired resistances to any drug were 14% and 50% respectively while frequency of primary and acquired multi-drug resistance were 8.3% and 40%. Having had a previous tuberculosis treatment or abandonment were risk factors for drug resistant tuberculosis. The high levels of primary and acquired combined isoniazid and rifampicin resistances contribute to the difficulties in controlling tuberculosis transmission in the city.

Key-words: Tuberculosis. Drug resistance. Multi-drug resistance. Risk factors

Resumo

O objetivo do presente estudo é investigar a freqüência e fatores de risco para o desenvolvimento de tuberculose multidroga resistente no Cabo de Santo Agostinho (Brasil). Este é um estudo prospectivo realizado entre 2000-2003 onde casos suspeitos foram investigados por baciloscopia e cultura. De 232 casos de tuberculose confirmados, 174 tiveram cultura e antibiograma realizados. Trinta e cinco das 174 culturas mostraram resistência a qualquer uma das drogas. A freqüência de resistência primária e adquirida a qualquer droga foi 14% e 50% respectivamente enquanto que a freqüência primária e adquirida para multidroga resistência foi 8,3% e 40%. Tratamento prévio para tuberculose ou abandono de tratamento consistiu em fatores de risco para resistência a drogas. Os altos níveis de resistência primária e adquirida a combinação isoniazida e rifampicina contribuem para as dificuldades no controle da transmissão da tuberculose no Cabo.

Palavras-chaves: Tuberculose. Resistência a drogas. Multidroga resistência. Fatores de risco.

The increase in frequency of drug resistant tuberculosis (TB), leading to failure to respond to both isoniazid (INH) and rifampicin (RMP) is of great concern for successful use of regional and large scale TB control programs. In Brazil, the first line

drugs for TB treatment are INH and RMP for six months associated to pyrazinamide (PZA) for the first two months since 1982; the drugs are supplied by the government with no cost for the patient and the treatment is based on self administration.

The World Health Organization (WHO) defines multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) as that involving resistance to at least INH and RMP, but the Brazilian Consensus for Tuberculosis took place in 1997 and classified MDR-TB as that caused by *Mycobacterium* resistant to more than two drugs including INH and RMP¹¹. Primary resistance refers to the presence of resistant isolates of *Mycobacterium* in patients who, in response to direct questioning, deny having had any prior anti-TB treatment and is a consequence of transmission of resistant isolates. Acquired resistance is defined as a presence of resistant isolates of *Mycobacterium* in patient who, in response to direct questioning, admit having been treated for tuberculosis and is due to selection of the bacterial population that developed mutation(s) that confer(s) a survival advantage under antibiotic selective pressure¹⁵. The recommended treatment for multi-drug resistant tuberculosis is more toxic, takes at least three times longer and is hundred times more expensive than a short course treatment. It is also less successful¹⁶.

In 2004, WHO published a survey of frequency of drug resistance tuberculosis simultaneously in 74 countries around the world. Among new TB cases, the median prevalence of overall resistance, monoresistance and multiresistance were 10.2%, 7.0% and 1.1% respectively. The prevalence of any monoresistance to streptomycin (SM) was 6.3%, to INH 5.6%, to RMP 1.4%, and to (EMB) 0.8%. Analysis among previously treated cases was possible for 65 different settings, where the median prevalence of any resistance was 18.4%, with eleven settings reporting resistance over 50% while the median prevalence to multi-drug resistance was 7.0%²⁴. The prevalence of any monoresistance was 11.4% to SM, 14.4% to INH, 8.7% to RMP and 3.5% to EMB. This study reported resistance data of 39 more settings than the previous worldwide survey, but in spite of the great variation on prevalence for TB resistance, it was possible to identify new hotspots with high prevalence of MDR among new cases.

Having been treated previously for tuberculosis is the predominant determinant for development of MDR-TB^{5 20}. Other risk factors are poor adherence to treatment, the presence of cavitory lesions in chest X-ray and HIV infection^{6 18 22}.

In Brazil, culturing and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains is not performed in routine basis and except for some studies; information available on drug resistance is scarce. Information from the global survey coordinated by WHO estimated that, in the country, the national prevalence of acquired resistance to any drug was less than 20% and MDR was less than 10%. Primary resistance to any drug was less than 10% and to MDR was less than 1%²⁴. However, Brazil is a very large country with considerable regional differences on cultural and socioeconomic conditions. Demographic factors vary also within each region; therefore, heterogeneity is expected in these rates. This was demonstrated by recent studies such as that performed in São Paulo, Brazil's largest city, with an overall resistance of 15.5%. Among the previously treated cases, prevalence of resistance was 27% and MDR was 16.7%. Among new cases, prevalence of any resistance was 11% and MDR was only 1%²¹. Cabo de Santo Agostinho, the area of the present study, is an industrial city in Northeast Brazil with an annual incidence of TB of about 60 per 100,000 inhabitants, a 20% abandon rate and with no information on frequency of drug resistance until this study was conducted. The prospective cohort presented here was designed to characterize the drug resistance profile of *Mycobacterium* strains isolated from patients attended for TB investigation at public out-patient clinics and to investigate risk factors for development of MDR-TB in the City of Cabo de Santo Agostinho.

Material and Methods

Study design and population. A cohort study was designed to analyze newly diagnosed TB cases among 773 patients with TB-like respiratory symptoms that attended public out-patient facilities in Cabo de Santo Agostinho between February 2000 and December 2003. At the beginning of this study the TB diagnosis in Cabo was centralized thus all suspect TB patients were referred to the Herbert de Souza Health Center where they were seen by an expertise physician and were invited to have an appointment with the research team. Patients who were seen by the research team and who agreed in participating in this study signed an informed consent form prior to answering a clinical and epidemiological questionnaire. Sputa were also collected and sent to the Central Laboratory of Pernambuco, the reference laboratory of the State of Pernambuco for tuberculosis diagnosis, for bacilloscopy,

culture and resistance testing. Blood samples were sent to the Public Laboratory of Olinda for HIV infection testing.

TB cases were defined by the physician who attended the patient based on the clinic, X-ray and bacilloscopy. Because not all suspected TB cases were looked for by the research team, the study population represented a fraction of TB cases notified during the period of study. Unfortunately, it was not possible to perform a comparison study between notified TB cases included in the research database and the universe of TB cases, because the variables used in the official notification form were different from those in the study questionnaire, except age and gender which were similar, therefore the results presented here might be not representative of the whole population of TB cases diagnosed in Cabo de Santo Agostinho City in the period of study.

The Ethical Committee of the Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation approved this study.

Microbiological analysis. Acid-fast bacilli were detected by Ziehl-Neelsen stain. Sputa were then decontaminated according to Petroff method and a 0.1ml fraction was plated on Löwenstein-Jensen medium containing or not the following antibiotics (Sigma, USA): isoniazid (0.2µg/ml), streptomycin (4µg/ml), pyrazinamide (2µg/ml), ethambutol (2µg/ml), ethionamide (2µg/ml), rifampicin (40µg/ml) or p-nitrobenzoic acid (500µg/ml). Resistance was determined by the proportion method¹¹. In order to increase bacillary load all smear negative or weak positive samples (+) were first grown on medium without antibiotics for two weeks and then submitted to resistance testing. Growing-fast Mycobacteria were sent to the National TB Reference Laboratory Professor Hélio Fraga/MS, in Rio de Janeiro, for species identification as a routine when these cases were detected by Regional Laboratories members of the Public Laboratory Net. When a resistant strain was identified at the diagnosis additional sputum was collected within two or three months after the treatment beginning for a culture and resistance testing follow up, here called control cultures.

Data analysis. A database was constructed with clinical epidemiological and laboratorial information obtained from all patients under investigation for TB at the Public Health Center Hebert de Souza using the Epi Info 6.04 software. In order to estimate the amount of notified TB cases included in the cohort, we also analyzed

official registers of tuberculosis notification from 2000 to 2003 provided by the Health Secretary of Cabo de Santo Agostinho. Both databases were first revised to exclude any inconsistent data. It was considered duplicate two identical entrances done within 30 days. It was excluded those cases under treatment at the beginning of the study period.

For the resistance analysis, frequency of both mono and multiple resistances was determined. To allow comparison to international data, it was considered multidrug resistant strains those resistant to at least INH and RMP as defined by WHO. For determination of the resistance index, it was first selected files from positive culture at diagnosis and then it was excluded files from atypical strains which are normally resistant to multiple drugs and not a subject of our study. Nevertheless, it was included in the analysis another files from patients which developed resistance during the course of treatment, understanding that it represented an infection by a new strain based on its resistance profile (Figure 1). The Resistance Index was classified of either primary or acquired resistance and was calculated by dividing the number of patients with resistant strains among new cases by the total number of new cases with culture and resistance testing for primary or by dividing the number of patients with resistant strains among previously treated cases by the total number of previously treated cases with culture and resistance testing for acquired. The risk ratios for development of drug resistant TB were calculated for biological, clinical and socio-economical factors, including history of previous TB and abandonment using logistic regression. The significance of these associations was determined using the chi-squared test and p-values and Yates correction when indicated.

Results

Cohort characterization. In the present study 773 symptomatic respiratory cases were investigated for TB (Figure 1). The TB diagnosis was confirmed for 232 cases interviewed which represented 50.5% of the 459 notified cases for the study period. The official incidence of TB was around 60 new cases per 100,000 inhabitants per year in the City of Cabo de Santo Agostinho. Although some fluctuation of the yearly incidence rates could be noticed, no clear upward or downward tendency could be clearly observed. A different scenario was apparent when observing two epidemiologic aspects that are associated with drug resistance: treatment abandon and disease relapse (Table 1). A considerably higher number was observed during

the first two years of the study when comparing with the two following years; presenting a mean frequency of abandonment during 2000-2001 of 15.5% while this number decreased to 5% during the period 2002-2003 ($p= 0.004$). The mean frequency of TB relapse was respectively 5.5% and 2.5% during the consecutive two year periods but this difference was not significant ($p= 0.346$). It is important to point out two interventions done by the Health Secretary during the research study: the community-based surveillance in 2002 and by decentralization of the health care system implemented in 2003 that might have influences on the drop of abandonment tax.

Tuberculosis was more frequent in men than in women (2:1), with the majority of cases (86.6%) occurring in the economically active age group (20 up to 64 years). Alcohol consumption and smoking were reported by 65.7% and 59.7% of the cases respectively. History of previous TB contact and anti-TB vaccination was present in 32.5% and 59.7% of cases respectively. During analysis it was identified a bias of information when assessing social-economic factors using variables employment and income, measured by minimal official salary in Brazil. It was registered as employment activities with no regular incomes, leading to imprecise quantification. About 70% of the patients were literate.

Culture results and bacteriological characterization of mycobacterial isolates.

Among all 773 suspected cases, *Mycobacterium* were isolated by Löwenstein-Jensen culture in 181 (23.4%) samples, while 559 (72.3%) were negative cultures, 10 (1.3%) showed any technical problem during isolation procedure and 23 (3%) were not submitted to culture. Among the 181 positive cultures, 137 (75.7%) were positive for alcohol-acid staining while 44 (24.3%) were smear negative. All negative cultures were also smear negative. The bacilloscopy performed by the State Laboratory had sensitivity of 75.7%, specificity of 100%, positive predictive value of 100%, and negative predictive value of 92.7%.

There were 30 out 169 isolate strains with resistant testing at diagnosis showing resistance to at least one drug, however a further five isolates were obtained from patients under treatment and were included in the resistance analysis as they were judged to represent a new strain (their resistance testing showed a different profile then at the diagnosis). However, it was not possible to discriminate whether it was due to a new infection or to a selection of a mutant strain during the treatment course. All 35 *Mycobacterium tuberculosis* isolates were resistant to at least

isoniazid. Any resistance to at least rifampicin was found in 24 (14%) of the isolates. Monoresistance to isoniazid occurred in 7 (4%) of the isolates. It was not found monoresistance to rifampicin and the association of isoniazid and rifampicin occurred in 16 (9%) of cases. Any resistance to isoniazid and rifampicin, or MDR, occurred in 24 (14%) of the cases. The frequency of primary resistance was 14% and of acquired resistance was 50%. The frequency of MDR-TB among new cases was 8% and among previously treated cases was 40%. The proportion of resistance in previously treated cases and new cases was 3.6 for mono resistance, 2.6 for two drugs resistance and 8.0 for resistance to three or more drugs (Table 2). Secondary and primary resistance to specific combined isoniazid and rifampicin was 20% and 6.3% with a ratio of 3.2. In a recent visit to the Cabo Health Center, we investigated the outcome of the patients with drug resistant TB reported here; and found that cases of monoresistance to isoniazid either recidivated or was cured with the scheme 1. We also observed that most MDR cases complete the six month treatment of scheme 1 even though the culture results were provided by the research team (data not shown).

Risk factors for developing drug resistance tuberculosis. Upon comparison of biological, clinical and epidemiological characteristics of the patient group with drug sensitive and that with resistant isolates, we observed there were no significant statistical differences in frequency of age, gender, literacy, being or not employed, income category or presence of clinical symptoms of the patient from both groups. However, having been submitted to previous TB treatment and/or presenting a history of treatment abandon was strongly associated with resistance (Table 3). The risk of developing MDR-TB was higher for those who reported previous TB treatment (RR=4.9; CI95%=2.48-9.77; p=0.00004) and treatment abandon (RR=3.7; CI95%=1.82-7.56; p=0.0033). Among 232 notified TB cases, 185 were submitted to HIV testing being three samples positive and 13 inconclusive so the frequency of TB-HIV co-infection was 1.6%. None of MDR-TB cases were positive for HIV infection.

Discussion

In the present study, MDR- TB, defined as resistance to at least isoniazid and rifampicin was responsible for 14% of the overall and 69% of drug resistant TB cases had in the City of Cabo de Santo Agostinho. Prevalence of MDR-TB was as high as 8% in new TB cases and 40% in patients with previous treatment for the disease.

There is still not enough data published on MDR-TB in Brazil. A retrospective study covering a decade (1990-1999) in Ceará, a city also in the northeast of Brazil, reported an acquired MDR-TB frequency of 0.6%². In Rio de Janeiro, a Brazilian city with high demographic density and worth scenario for tuberculosis, a frequency of acquired MDR-TB in the year 1994 was 5.2%¹³. More recently, a study in a district of São Paulo, Brazil's largest city, reported a frequency of 16.7% for the year 2000-2002²¹. Such differences of MDR-TB prevalence as observed in Brazil have been reported in other countries, an example is Bangladesh with an overall MDR rate of 5.5% but considerably higher levels in the regions of Dhara (14.3%) and Matlab (27.3%)²⁵. The resistance rate observed in Cabo is on the other hand similar to that reported in some regions where drug resistance and MDR has been reported as a major concern such as 54% in Lithuania⁴, 40.2% in Uzbekistan³ and 30.5% in Taiwan⁷.

The primary MDR level of 8% was also higher than the 0.1% observed during the national inquiry²³ and comparable to the reported 5.8% in Mozambique¹⁴, 6% in Colombia¹², 9.3% in Lithuania⁴ and 13% in Uzbekistan³. It has been reported that countries with cure rate above 85% report primary MDR-TB levels of less than 5% and a prevalence of MDR-TB is ten times higher in previously treated patient than in new cases¹⁶. This enforces the idea that primary resistance/MDR are related with failing TB control programs while secondary resistance/MDR seems to be a consequence of lack of treatment compliance. In Cabo, the cure rate currently still is below 85% and before the intervention by the TB Control Program in 2002; the rate of abandonment of treatment was as high as 15%. These epidemiologic characteristics might have contributed to the high levels of both types of resistance in the region, which might have led to a present prevalence of primary MDR-TB of 8%.

An important finding was the ratio of acquired and primary resistance when considering resistance to one or more drugs: this ratio was 3.6 for monoresistance, 2.6 when resistant against any two drugs and 8.0 to three or more drugs. Greater the ratio is, higher the acquired resistance, which could be explained by the historical high frequency of treatment abandonment in Cabo, even though the incidence and prevalence rates are been shown relatively stable (Table 1). A retrospective study on prevalence of resistance to at least one drug, covering three decades since 1972 performed in Turkey was reported. In this, an increment of 1.4% of the acquired and

primary MDR ratio for each decade was observed while this was accompanied by a decrease on the ratio between acquired and primary resistance to any drug over the decades (6.5, 5.1 and 4.6), suggesting that the increase on MDR prevalence is due to the raise of primary resistance⁸. Although the time frame of our study is too short for such an analysis, a lower ratio of acquired and primary MDR-TB (4.8) was observed when compared to the ratio for three or more drugs resistance (8.0). In the present study, the ratio of acquired and primary combining resistance to INH and RMP was 3.2, 4.8 or 8.0 depending whether the cases were only resistant to INH and RMP, were resistant to at least INH and RMP or were associated to others drug resistance. This observation could be interpreted to mean that specific resistance to INH and RMP might be occurring as a consequence of lack of effective TB-control strategy in Cabo which leads to the increase of the primary resistance to specific combined drugs lowering the ratio in relation to that of MDR-TB.

We verified levels of primary monoresistance against INH of 14% and absence of monoresistance to RMP. The observed pattern of resistance differed from the data presented in a recent review on twenty-one studies on the levels of primary resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates in India, reporting for 30% of TB cases worldwide. A high median prevalence of primary resistance to INH of 16.5% (3.2-32.9%) was observed in comparison to the level of 2.85% (0-11.8%) for RMP and of 1.5% (0-5.3%) for combined INH and RMP resistance¹⁷. A population study in Rio de Janeiro, Brazil, in 1994 showed a similar behavior of resistance frequency being 4.6% and 0.9% for primary monoresistance to INH and RMP respectively and 0.7% for the combined resistance¹³. This is due to the mutation rate of genes involved on INH resistance being higher than that related to rifampicin resistance. Double mutation is a rare event therefore; the development of combined resistance to INH and RMP is unlikely to occur if the patient receives adequate care. Acquired resistance cases is reported to be due to inappropriate or non-regular drug supply or to patient behavior manifested by non-adherence to treatment that favors the selection of spontaneously mutated *Mycobacterium tuberculosis* strains¹⁹. In the present study, patients that had a history of previous treatment at time of diagnosis had a five times higher risk of presenting a MDR-TB, association found by other authors^{5 6 10 20}. History of abandonment was also found to increase four times the risk of having MDR-TB in Cabo. Beside the frequency of the abandonment of treatment in Cabo when the study began was about 15%, we found a high frequency of alcohol

consumption which has been reported to be a risk factor for treatment abandonment¹.

The frequency of HIV co-infection in TB patients in Cabo was 1.6%. In Brazil, the rate of TB co-infection in patient with HIV/AIDS was estimated being 3-4% of cases⁹. All patients with HIV infection reported here had TB caused by drug susceptible mycobacterium. Development of drug resistant tuberculosis was, however, associated with HIV in five of the seven European countries reporting this variable in a recent published systematic review⁵.

In conclusion, primary and secondary resistance to both INH and RMP is high in Cabo suggesting the circulation of MDR strains. This is evidence of the patchy nature of the degree of MDR and suggests that it may be very relevant to study regional variations. The realization of culture and resistance testing is recommended for all previously treated cases of TB, for cases without clinical improvement after two months of therapy, and for new patients with MDR-TB close contacts. Therefore, a main challenge for the TB control program is to provide a good lab support and to assure that the physicians are informed about the results of the laboratory tests. The decision for adjusting the TB treatment schedule should be discussed for all cases with monoresistance to INH, including addition of new drug to the therapeutic schedule and using longer treatment periods. Application of molecular methods to genotype strains and identify mutations causing drug resistance from patients that do not respond well to treatment could be an additional tool to avoid delays in cure, transmission of MDR strains and mortality.

Acknowledgements

We thank the Health Secretary of Cabo de Santo Agostinho for the access to the patient and the Central Laboratory of Pernambuco for their help in performing the microbiological work. We are also grateful to Clenildo Filho, Fábio de Souza, Márcio Bezerra and Leonardo Dutra for their technical help.

References

1. Albuquerque MFPM, Ximenes RAA, Lucena-Silva N, Souza WV, Dantas AT, Dantas OMS, Rodrigues LC. Factors associated with treatment failure, dropout, and death in a cohort of tuberculosis patients in Recife, Pernambuco State, Brazil. *Caderno de Saúde Pública* 23: 105-114, 2007.
2. Barroso EC, Rodrigues JLN, Pinheiro VGF, Campelo CL. Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. *Jornal de Pneumologia* 27: 310-314, 2001.
3. Cox HS, Orozco JD, Male R, Ruesch-Gerdes S, Falzon D, Small I, Doshetov D, Kebede Y, Aziz M. Multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia. *Emerging Infectious Diseases* 10: 865-872, 2005.
4. Dewan P, Sosnovskaja A, Thomsen V, Cicenaitė J, Laserson K, Johansen I, Davidaviciene E, Wells C. High prevalence of drug-resistant tuberculosis, Republic of Lithuania, 2002. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 9:170-174, 2005.
5. Faustini A, Hall AJ, Perucci CA. Risk factors for multi-drug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax* 61:158-163, 2006.
6. Granich RM, Oh P, Lewis B, Porco TC, Flood J. Multi-drug resistance among persons with tuberculosis in California, 1994-2003. *Journal of American Medical Association* 293: 2732-2739, 2005.
7. Hsueh PR, Liu YC, So J, Liu CY, Yang PC, Luh KT. *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *Journal of Infection* 52:77-85, 2006.
8. Kart L, Altin R, Tor M, Gulmez I, Oymak SF, Atmaca HM, Erdem F. Anti-tuberculosis drug resistance patterns in two regions of turkey: a retrospective analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 16: 1-6, 2002.
9. Kritski AL, Ruffino-Netto A. Health sector reform in Brazil: impact on tuberculosis control. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 4: 622-626, 2000.
10. Min SM, Kelly P, Byrne C, Clancy L. Antibiotic resistant tuberculosis and bovine tuberculosis in an Irish hospital population (1991 to 2001). *Irish Medical Journal* 98: 38-40, 2005.
11. Ministério da Saúde do Brasil. Tuberculose-guia de vigilância epidemiológica/ elaborado pelo Comitê Técnico-científico de Assessoramento à Tuberculose

- e Comitê Assessor para Co-infecção HIV-Tuberculose. Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde, Brasília, 2002, 100p.
12. Moreira CA, Hernandez HL, Arias NL, Castano MC, Ferro BE, Jaramillos E. Initial drug resistance as a threat for tuberculosis control: the case of Buenaventura, Colombia. *Biomedica* 1: 73-79, 2004.
 13. Natal S, Valente JG, Sánchez AR, Penna MLF. Resistência a isoniazida e rifampicina e história de tratamento anterior para tuberculose. *Caderno de Saúde Pública* 19: 1277-1281, 2003.
 14. Nunes EA, De Capitani EM, Coelho E, Joaquim OA, Figueiredo IRO, Cossa AM, Panunto AC, Carvalho-Ramos M. Patterns of anti-tuberculosis drug resistance among HIV-infected patients in Maputo, Mozambique, 2002-2003. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 9: 494-500, 2005.
 15. Ormerod LP. Multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment. *British Medical Bulletin* 73-74: 17-24, 2005.
 16. Pablo-Méndez A, Gowda DK, Frieden TR. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. *Bulletin of the World Health Organization* 80: 489-500, 2002.
 17. Paramasivan CN, Venkataraman P. Drug resistance in tuberculosis in India. *Indian Journal of Medical Research* 120: 377-386, 2004.
 18. Pozniak A. Multidrug-resistant tuberculosis and HIV infection. *Annals New York Academy of Science* 953: 192-198, 2001.
 19. Raviglione MC, Gupta R, Dye CM, Espinal MA. The burden of drug-resistant tuberculosis and mechanisms for its control. *Annals New York Academy of Science* 953: 88-97, 2001.
 20. Surucuoglu S, Ozkutuk N, Celik P Gazi H, Dinc G, Kurutepe S, Koroglu G, Havlucu Y, Tuncay G. Drug-resistant pulmonary tuberculosis in western Turkey: prevalence, clinical characteristics and treatment outcome. *Annals Saudi Medicine* 25: 313-318, 2005.
 21. Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA, Giampaglia CM, Martins MC, Ueki SY, Chimara E, Silva CA, Cruz V, Waldman CC, Heyn I, Hirono IU, Riley LW. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 9: 970-976, 2005.

22. Vanacore P, Koehler B, Zacchini F, Bassetti D, Antonucci G, Hipólito G, Girardi E, GISTA-SIMIT Study Group. Drug-resistant tuberculosis in HIV-infected persons: Italy 1999-2000. *Infection* 32: 328-332, 2004.
23. World Health Organization. Anti-TB drug resistance in the world. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. WHO, Geneva, 1997.
24. World Health Organization. Anti-TB drug resistance in the world. Prevalence of drug resistance. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. WHO, Geneva, 2004.
25. Zaman K, Rahim Z, Yunus M, Arifeen SE, Baqui AH, Sack DA, Hossain S, Banu S, Islam MA, Ahmed J, Breiman RF, Black R.E. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in selected urban and rural areas in Bangladesh. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 37: 21-26, 2005.

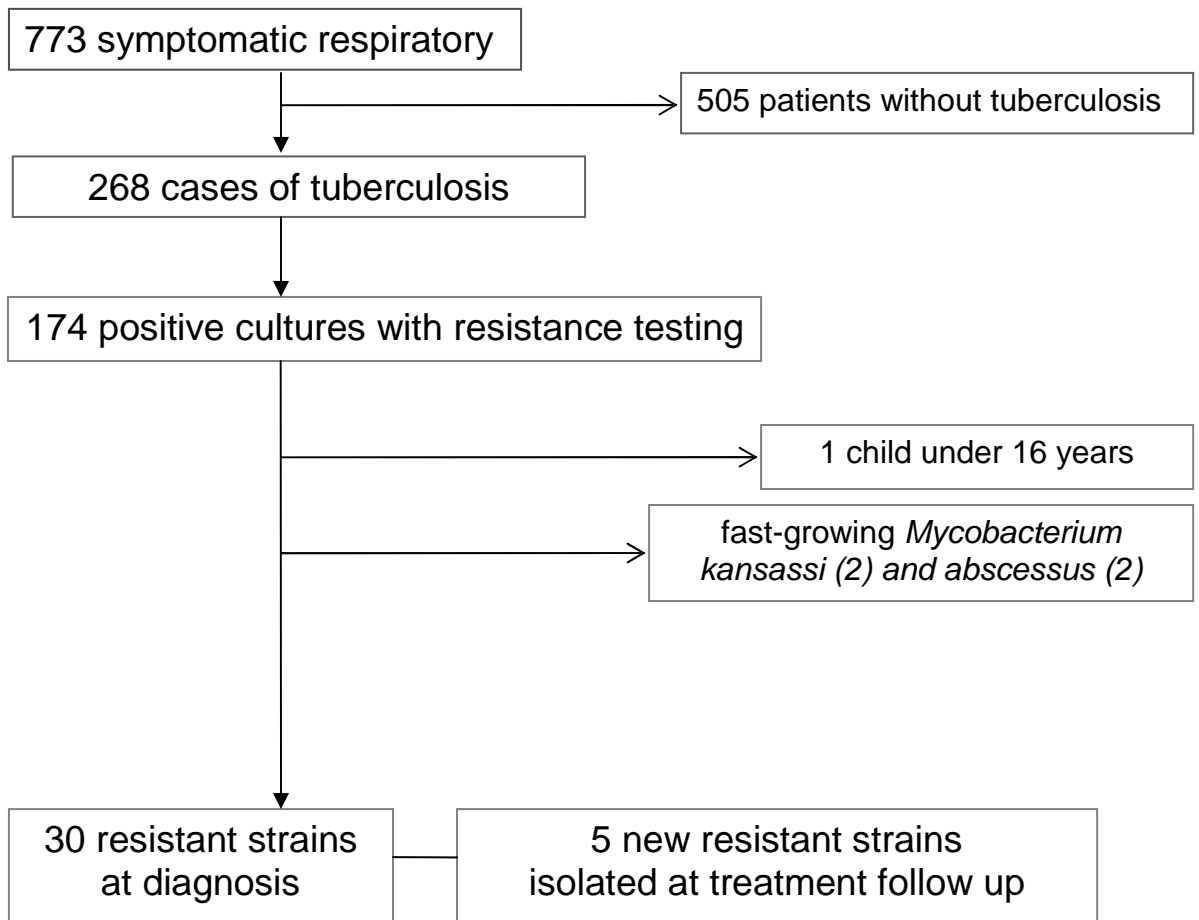


Figure 1- The study population selection. Of the 268 tuberculosis cases screened, 232 were notified by the Health Secretary of Cabo de Santo Agostinho during the period of study.

	2000	2001	2002	2003	Total
Coefficients (per 100,000)					
incidence	61.4	58.8	52.3	67.3	
prevalence	81.7	76.5	61.4	80.4	
Total notified cases	125	117	94	123	459
new cases	94	90	80	103	367
re-treatment					
abandon	19	19	3	8	45
relapse	8	6	3	3	20
transferred			8	9	17
not classified	4	2			6
Total studied cases	60	70	42	60	232

Table 1- Coefficients of tuberculose in Cabo de Santo Agostinho, 2000-2003.

	Number	Frequency (%)	Prevalence of primary resistance	Prevalence of acquired resistance	Ratio of acquired and primary
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates	174		13.9	50.0	3.6
Any resistance	35	20			-
isoniazid (H)	35	20	-	-	-
streptomycin (S)	7	4	-	-	-
rifampicin (R)	24	14	-	-	-
ethambutol (E)	5	3	-	-	-
ethionamide (Et)	4	2	-	-	-
pyrazinamide (Z)	1	1	-	-	-
H, R (MDR)	24	14	8.3	40.0	4.8
H, S	6	3	-	-	-
Specific resistance					
H	7	4	2.8	10.0	3.6
H, S	2	1			
H, E	1	1			
H, Et	1	1	9.0	23.3	2.6
H, R	16	9			
H, R, S	3	2			
H, R, E	1	1			
H, R, E, Et	2	1	2.1	16.7	8.0
H, R, S, E	1	1			
H, R, Z, S, Et	1	1			

Table 2- Frequency of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* among cases diagnosed at Cabo de Santo Agostinho, 2000-2003.

	Tuberculosis*				Risk relative	p
	resistant		not resistant			
	n°	%	n°	%		
Gender <=34						
yes	20	21.3	74	78.7	1.13 [0.62-2.07]	0.82227
no	15	18.8	65	81.3		
Sex female						
yes	11	20.8	42	79.2	1.05 [0.55-1.98]	0.94727
no	24	19.8	97	80.2		
Alcohol consumption						
yes	22	18.6	96	81.4	0.76[0.42-1.39]	0.49836
no	13	24.5	40	75.5		
Employment						
yes	12	19.7	49	80.3	1.05 [0.53-2.11]	0.94345
no	14	18.7	61	81.3		
Income <=2 national minimal salary						
yes	25	22.7	85	77.3	1.70 [0.82-3.54]	0.20160
no	8	13.3	52	86.7		
Illiterate						
yes	11	27.5	29	72.5	1.51 [0.81-2.81]	0.28995
no	8	18.2	108	81.8		
Previous treatment						
yes	15	50	15	50	3.60 [2.09-6.19]	0.00002
no	20	13.9	86	50.0		
Abandonment						
yes	10	52.6	9	47.4	3.26 [1.87-5.70]	0.00057
no	25	16.1	130	83.9		

* missing data was subtracted before statistic analysis.
retired data was excluded from employment variable.

Table 3- Risk factors for the development of drug resistant tuberculosis in Cabo de Santo Agostinho.

4.2- Analysis of the genetic diversity and distribution of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a cohort population established in Cabo de Santo Agostinho (Brazil).

Este segundo artigo teve como objetivos determinar a diversidade genética das cepas de *M. Tuberculosis* isoladas do Município do Cabo de Santo Agostinho entre 2000 e 2002 através da técnica do spoligotype, descrever a distribuição de agrupamentos de cepas geneticamente semelhantes no Município do Cabo de Santo Agostinho e avaliar o uso desta ferramenta para o programa de controle da tuberculose.

Este artigo está em fase final de elaboração sendo previsto sua submissão para publicação em fevereiro de 2008.

Analysis of the genetic diversity and distribution of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a cohort population established in Cabo de Santo Agostinho (Brazil).

Marcilio Baliza, Artur Henrique Bach, Gabriel Lobo de Queiroz, Harisson Magdinier Gomes, Maria Madileuza Neves, Maria de Fátima Militão de Albuquerque, Judith Glynn, Laura Rodrigues, Ricardo Ximenes, Philip Noel Suffys and Norma Lucena-Silva

Abstract

A total of 83 clinical isolates from Cabo de Santo Agostinho-PE (Brazil) were typed by spoligotyping. Five (6%) of them were excluded from the analysis because represented duplicates of other samples as previously defined. The transmission pattern of tuberculosis was defined by using by spoligotyping to genotype strains. A total of 40 distinct patterns were observed: one pattern with 9 isolates, three patterns with 5 isolates each, three other patterns with 4 isolates, two patterns with 3 isolates, five patterns with 2 isolates each, and 26 patterns with 1 isolate alone. Geographical analysis of cases residing in Cabo compared with those evaluated at the post of Health in Lessa de Andrade in Recife (a reference health service for greater Pernambuco) revealed that both municipalities shared common isolates. A more complete understanding of *M. Tuberculosis* genetic polymorphisms in certain population groups, allow us to better assess the mechanisms of disease transmission and ultimately contribute to the control of tuberculosis.

Introduction

Tuberculosis is a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, this pathogen well adapted to humans (FLYNN and CHAN 2005). Having been considered under control, the disease resurfaces in the 90s and is now a serious public health problem. The molecular epidemiology emerges as a tool applied in the study of tuberculosis aimed at prevention and control of disease. The use of various molecular markers allows the identification of subgroups of *M. Tuberculosis* with application in epidemiological studies aimed at a better understanding of factors that influence in their transmission; Evaluation of programs to control regional allowing a design more appropriate measures to control; Identification of transmission between health professionals and patients admitted in health centers; elucidation of infection exogenous or endogenous reactivation; identification of contamination in laboratories with serious consequences to patients in clinical practice; Identification of strains with specific geographical location (BARNES and CAVE, 2003; McNabb *et al.* , 2002).

Patients infected with *M. Tuberculosis* who exhibit similar patterns in genotyping are considered epidemiologically linked. These strains identical potentially represent recent transmission in the population and are considered for being a part of a probable chain of transmission

The Restriction Fragment Length Polymorphism (IS6110 - RFLP) analyzes is considered the gold standard in fingerprinting to *M. Tuberculosis*. But this method requires a lot of time and strains with few copies of IS6110 are poorly discriminatory and require viable bacterial growth.

Methods based on amplification by PCR (Polymerase Chain Reaction) are simple with rapid typing isolates and enable the production of a digital profile allowing for better documentation and comparison with results of other studies.

Spoligotyping is generally the PCR based method most used on genotyping of *M. Tuberculosis* due to the possibility to compare results between laboratories (Dale, 2001), and its ability to provide a quick profile of the genetic strains of *Mycobacterium* enabling rapid intervention by the health services (SCOTT *et al.* , 2005).

The method allows concurrent identification and differentiation of lineages (GORI *et al.*, 2005), through amplification of DNA genomic and subsequent hybridization of amplified product to a group of 43 oligonucleotide immobilized in a membrane, where each is a single sequence DNA spacer (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

We used spoligotyping DNA fingerprinting to *Mycobacterium tuberculosis* strain isolated between February 2000 and December 2003 in a population-based study of tuberculosis to detect active tuberculosis transmission and to determine predictors associated with being in clusters in order to better understand the transmission of tuberculosis in Cabo de Santo Agostinho – Brazil.

Materials and Methods

Study design

A cohort study was designed to analyzed newly diagnosed TB cases among patients with TB-like respiratory symptoms that attended public health centers in Cabo de Santo Agostinho between February 2000 and December 2003. The project was approved by the Ethical Committee of the Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation. Recruited patients, who agreed in participating and signed an informed consent form, answered a clinical epidemiological questionnaire and sputum samples were collected and sent to the Central Laboratory of Pernambuco (LACEN-PE), the reference laboratory of the state of Pernambuco for tuberculosis diagnosis.

Culture and DNA extraction

Sputum samples were decontaminated according to Petroff method prior plated on Löwenstein-Jensen medium and incubated at 37°C for 45-60 days. *Mycobacterium* cultures were heat-killed and their genomic DNA was extracted as described by Van Soolingen *et al.* 1991.

Spoligotyping

The spoligotyping were performed in Dept of Mycobacterioses of the Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil. The reaction mixture had a final volume of 25µl and contained 20 ng of genomic DNA, 40 pM of the primers DRa (5' –GGT TTT GGG TCT GAC GAC- 3') and DRb (5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC–3'), 200µM of each dNTP, 1 U of *Taq* polymerase and 1X amplification buffer. The PCR reaction was performed by submitting the samples to 96°C for 3 min, followed by 20 cycles at 96°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 30 sec, with an extension at 72°C for 5 min. For hybridization, 150 µl of 2X SSPE was added to 30 µl PCR product, the

samples were denatured for 10 min at 99 °C and immediately placed on ice. Meanwhile, the nylon membrane containing oligonucleotides specific for 43 different spacers between the 36-bp direct repeats at the DR region (Isogen, the Netherlands) was washed for 5 min at 60°C in 2X SSPE/0.1% SDS and assembled in the miniblotter support (Immunelectrics, Cambridge, Massachusetts). Afterwards, 20 µl of the PCR product was diluted in 150 µl of 2X SSPE/0.1% SDS and incubated with the membrane for 60 min. Subsequently, the PCR product solution was removed and the membrane washed with 2X SSPE/0.5% SDS for 10 min at 60 °C, followed by the addition of 2.5 µl of Streptavidin-Peroxidase conjugate (Boehringer, 500 U/ml) in 10 ml of 2X SSPE/0.5% SDS and incubated for 60 min at 42°C. After two washes in 2X SSPE/0.5% SDS each for 10 min at 42°C, the membrane was saturated with ECL detection liquid (Amersham Pharmacia International) and after exposition to Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia International) for 90 min, the film was developed.

Analysis

Two isolates from the same patient collected within a period of two months were considered duplicates and one was excluded. The obtained Spoligopatterns were compared to the SpolDB4 database to assigned families and subfamilies. A dendrogram was created by converting the presence or absence of 43 defined spacers of the isolates into a Jaccard based pair-wise distance matrix with the computer program NTSYS-PC. Epidemiological linkers were investigated in the study database using the computer program Epi info version 6.04.

Results

Genetic diversity of M. tuberculosis isolates.

A total of 83 clinical isolates were typed by spoligotyping. Five (6%) of them were excluded from the analysis because represented duplicates of other samples as previously defined. Two patients contributed with two samples collected more than two months apart, one patient with samples 350a and 350b, other patient with samples 532a and 715a. A total of 40 distinct patterns were observed. There were a pattern with nine isolates, three patterns with five isolates each, other three patterns with four isolates, two patterns with three isolates, five patterns with two isolates and 26 patterns with a single isolate (figure 1). Four isolates presenting a new genetic

pattern (Octal: 77777607540731; 777603404060471; 773777607560771 e 470000377413031) according the international database SpolDB4Demo (SITVIT Database - <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/index.jsp>) and three isolates had an orphan pattern (Octal: 77777667560771; 67777607760751 e 674000003760771), (Table 1). Four of five isolates of the type 439 cluster were multi-drug resistant (MDR-TB) (Table 2).

Limitation of spoligotyping method.

Two isolates from patients with epidemiological linkage (mother and son, sample 422 and 226 respectively) presented similar genetic pattern with a difference on position thirty-ninth (Table 3). A further analysis of two isolates from the same patient collected within one month interval presented also a genetic pattern differing only on the position twenty-ninth (isolates 359 and 359a) (Table 3).

Epidemiological link of clustered isolates.

The geographical distribution of isolated groups and not grouped in our analysis are represented in Figure 3.

ST42 is a group with 9 different subjects with age ranging from 16 to 44 years (mean age, 28 years). This group presents an individual with a drug resistant strain. Two individuals had TB in the past and four reported prior contact with infected patients, of which 3 contact household said. Five of 9 are from neighboring municipalities, of which 4 are in Ipojuca. From 4 remaining 2 are the same neighborhood (Ponte dos Carvalhos). Three strains isolated in each year 2000-2001 and 2002.

ST20 is a group with 5 representatives with age ranging from 26 to 63 years (mean age, 39.4 years). All strains are sensitive to drugs. Four are from different districts of the Cabo and one is from Ipojuca. Three reported contact with sick, that, two were household contact. One not mentioned contact reported TB in the past. Two occurred in 2000, two in 2001 and one in 2002.

ST439 is a group with 5 strains representatives. Four of the five strains are resistant, two of which are in the same patient with 4 months of difference (diagnosed in 2001 and relapse in 2002). Age ranges from 36 to 81 (mean age, 54.5 years). The four individuals are the Cabo, two presently live in Ponte dos Carvalhos and one another lived 36 years to Ponte dos Carvalhos, but at 20 years ago. All patients had an

episode in 2002. Two patients had TB in the past and another said contact with sick. The only epidemiological link between them is to have lived in Ponte dos Carvalhos. ST17 is a group with 5 strains being all sensitive to drugs. The age varies from 33 to 51 (mean age, 41.6 years). One patient said household contact with sick and another with past of TB. Four of the five are from the Cabo, of which 2 are of Malaquias. The other is Jaboatão. Two cases occurred in 2000 and three in 2001.

ST64 is a group with 4 strains being all sensitive to drugs. The age of patients ranges from 25 to 50 years, (mean age, 34.2 years). All patients had primary TB and said contact with sick family. All patients were residents of the Cabo, being two of the district of Ponte dos Carvalhos. These were diagnosed in 2002, and the other two in 2000 and 2001.

ST2511 is a group with four strains, with only one resistant strain isolated from a patient with multiple episodes of TB in the past. The age varies from 16 to 46 years, (mean age, 29.3 years). Three were diagnosed in 2001 and one in 2002. All patients were from the Cabo, being two of Cohab.

ST137 is a group of 4 strains, being 2 of the same patient obtained in the range of 3 months. All strains are sensitive to the drugs. The age varies from 23 to 69 years, (mean age, 45.3 years). All are from the Cabo, being two of the district of São Francisco. All patients referred contact with sick family, one of which relates abandonment of the previous treatment. All were diagnosed in 2002.

ST47 is a group of 3 strains sensitive. The age varies from 32 to 40 years (mean age, 36.7 years). Two of these patients had contact with the family; one of them said household contact. Each of the patients lived in different cities (Cabo, Escada and Jaboatão). All were diagnosed in 2002.

ST2553 is a group of 4 strains. Two sisters living a part showed isolates with the same genetic pattern (patient A: isolates 350, 350a and 350b; patient B: isolates 128b) and resistance to isoniazid and rifampicin. However, patient B presented other isolate (128c) with different genetic pattern and being sensitive to the current anti-TB drugs (Table 4). Patient B referred TB 30 years ago, one year after their mother.

The groups ST 50, 52, 53, 60, 157 and 2554 showed only two strains.

The recent rate of transmission was 48.7%. This rate was calculated by the formula $[T(c) - N(c)] / T(a)$, where T (c) is the total number of isolated grouped, N (c) the number of groups and the T (a) total number of isolated.

Tuberculosis control surveillance.

Of the 17 isolates obtained in 2000, 12 were in cluster. In 2001, 16 of 31 isolates were in cluster; and in 2002, 24 of 30 isolates were also in cluster. The cumulative frequency of the clustered isolates from 2000 and 2002 were 12, 28 and 52 respectively, and for the non-clustered isolates were 5, 20 and 26 respectively (Figure 2).

Discussion

We used spoligotyping and conventional epidemiologic methods to investigate active tuberculosis transmission in Cabo de Santo Agostinho between February 2000 and December 2003, With annual incidence is approximately 60 new cases per 100,000 inhabitants.

78 isolates were fingerprinting, being observed a total of 40 distinct patterns. These, there were a pattern with nine isolates, three patterns with five isolates each, other three patterns with four isolates, two patterns with three isolates, five patterns with two isolates and 26 patterns with a single isolate. This high degree of genetic diversity of the profile of the strains isolated in Cabo suggests a high polymorphism by splogotyping. Similar data were found for DE LA Salmonière *et al.* (1997) in Paris, France. The family LAM and Haarlem were the most predominant in our study. The family LAM presents high frequency in Central America, southern Africa and South America, in addition to also be present in other parts of the world (BRUDEY *et al.*, 2006). Comparing the profile of isolates with the database SpolDB4Demo, four isolates represented a new genetic profile and 3 orphan patterns. These isolates with new genetic profile by spoligotyping may be due to strains that had endogenous reactivation.

A limitation found in spoligotyping is the possibility of strains with variation in a spacer be linked epidemiologically. In our study, two isolated from patients with epidemiological link and two isolates from the same patient showed differences in the genetic pattern in a position (absence of the spacer 39 and 29, respectively). Isolates of the patients epidemiologically linked and with the similar pattern of RFLP showed absence of a spacer in spoligotyping (Kamerbeek *et al.* 1997). It is possible that these spacers absences are due to deletion mutations in this region.

ST439 is a group with 5 strains representatives. Four of the five strains are resistant (MDR), two of which are in the same patient with 4 months of difference (diagnosed

in 2001 and relapse in 2002). Data from the literature suggest a possible transmission recent between these isolates resistant and is not a risk factor for the resistance the profile genetic of strains (Munsiff *et al.* 2002). The four individuals are the Cabo, two presently live in Ponte dos Carvalhos and one another lived 36 years to Ponte dos Carvalhos, but at 20 years ago. All patients had an episode in 2002. Two patients had TB in the past and another said contact with sick. The only epidemiological link between them is to have lived in Ponte dos Carvalhos.

ST2553 is a group of 4 strains. Two sisters living a part showed isolates with the same genetic pattern (patient A: isolates 350, 350a and 350b; patient B: isolates 128b) and resistance to isoniazid and rifampicin. However, patient B presented other isolate (128c) with different genetic pattern and being sensitive to the current anti-TB drugs. The other standard presented by the patient B had grouped by spoligotyping (ST53). It is likely that the patient B had contact with another patient and had a second infection or that is an endogenous reactivation since that patient B referred TB 30 years ago, one year after their mother. Molecular methods for genotyping can be very useful in clarifying the transmission household of tuberculosis (Takahara *et al.* 2003).

The analysis of the geographical distribution of cases grouped met in Cabo compared to the results of previous studies done in the Post of Health Lessa de Andrade in Recife, which serves patients from around the state of Pernambuco, showed that strains are grouped into neighboring municipalities. The cluster ST42 is the largest grouping found in the Cabo, but also presented strains in Jaboatão (1), Camaragibe (1) and Recife (2). This group is fairly distributed geographically, and also one of the largest groups by spoligotyping found in studies in Harare, Zimbabwe (Easterbrook *et al.* 2004). Brazil was one of the largest countries in the world trade in slaves. It is possible that this genetic profile has been introduced in the country this season.

The cluster ST50 was identified in the Cabo, São Lourenço da Mata and Recife with two representatives and Olinda with a representative. Also a strain (688/01) with a single identified in the Cabo, has been grouped with a strain isolated from patient answered in 1998 in Recife, the search of the epidemiological link showed that they lived in the same street. The only clusters with isolated identified only in the Cabo were ST439, ST137, ST2511, ST2553. Molecular epidemiology studies have shown that the dynamics of transmission of TB varies geographically (Barnes *et al.* , 2004).

Regions where the population presents high incidence of tuberculosis as the Cabo, the identification of sites of transmission is extremely important for the effective control of tuberculosis.

To identify risk factors for recent infection with *M. Tuberculosis*, 52 isolates grouped by spoligotyping were compared with 26 isolates not grouped. Epidemiological characteristics such as sex, age, smoking, previous history of TB had no relationship with the fact of the strains are grouped. However, there was a tendency to individuals who consume alcohol have grouped strains ($p = 0.0630$; $CI = 0.45-1.09$). Easterbrook et al. (2004) Report in their studies the factors that were not associated with strains were grouped of age, HIV infection status, household crowding level, history of TB in the household in the last 5 years.

66.7% of our isolates appear grouped suggesting recent transmission. Diaz et al. (2001) reported 45% of grouping by RFLP in studies in Havana, Cuba, and Bruchfeld et al. (2002) reported 42,1% in studies in Addis Ababa, Ethiopia. ^aBrudey et al. (2006) reported 77.3% of clusters by spoligotyping in studies in French Departments of the Americas. We found a rate of recent transmission of 48.7%. This rate is relatively high compared to found by Brudey et al. (2004) in studies in Sweden (14.1%) where the author uses spoligotyping associated with the VNTR and ^aBrudey et al. (2006) reported a rate of transmission of 68.9% by spoligotyping in French Departments of the Americas. This high rate of transmission reflects a high incidence of tuberculosis.

Spoligotyping show to be an important tool in studies of transmission of tuberculosis when combined with conventional epidemiology. Isolates of *M. Tuberculosis* showing differences in only a spacer in spoligotyping should be investigated for possible epidemiological link.

Acknowledge

We thank the Health Secretary of Cabo de Santo Agostinho for the access to the patient and the Central Laboratory of Pernambuco for their help in performing the microbiological work. We are also grateful to Clenildo Filho, Fábio de Souza, Márcio Bezerra and Leonardo Dutra for their technical help.

Characteristics	C n = 52	%	NC n = 26	%	P	IC95%
Gender						
Male	36	69.2	16	61.5	0.6711	0.79-1.60
Female	16	30.8	10	38.5		
Age range (years)						
< =34	22	42.3	11	42.3	0.8079	0.73-1.37
> 34	30	57.7	15	57.7		
History of contact with TB patient						
Yes	23	44.2	9	34.6	0.5688	1.14-1.55
No	29	55.8	17	65.4		
History of previous TB						
Yes	12	23.1	2	7.7	0.1239	1.03-1.83
No	40	76.9	24	92.3		
Álcohol consumption						
Never drink	11	21.1	10	41.7	0.0630	0.45-1.09
Yes	41	78.9	14	58.3		
Smoking						
Never smoking	17	32.7	13	52.0	0.1684	0.92-1.87
Yes	35	67.3	12	48.0		
Hostage <i>M.tuberculosis</i> resistant strain						
Yes	9	18.4	4	16.7	1.000	0.69-1.56
No	40	81.6	20	83.3		
Employment						
Yes	22	(43.1)	15	60.0	0.2552	0.58-1.11
No	29	56.9	10	40.0		
Income (Minimal salary)						
<= 2	30	63.8	13	50.0	0.3672	0.85-1.78
> 2	17	36.2	13	50.0		
Drug resistance						
Yes	10	19.2	4	15.3	1.0000	0.74-1.56
No	42	80.8	21	80.7		

Table 5: Epidemiological characteristics of TB cases that hostage genetic clustered (C) and non-clustered (NC) *Mycobacterium* isolates.

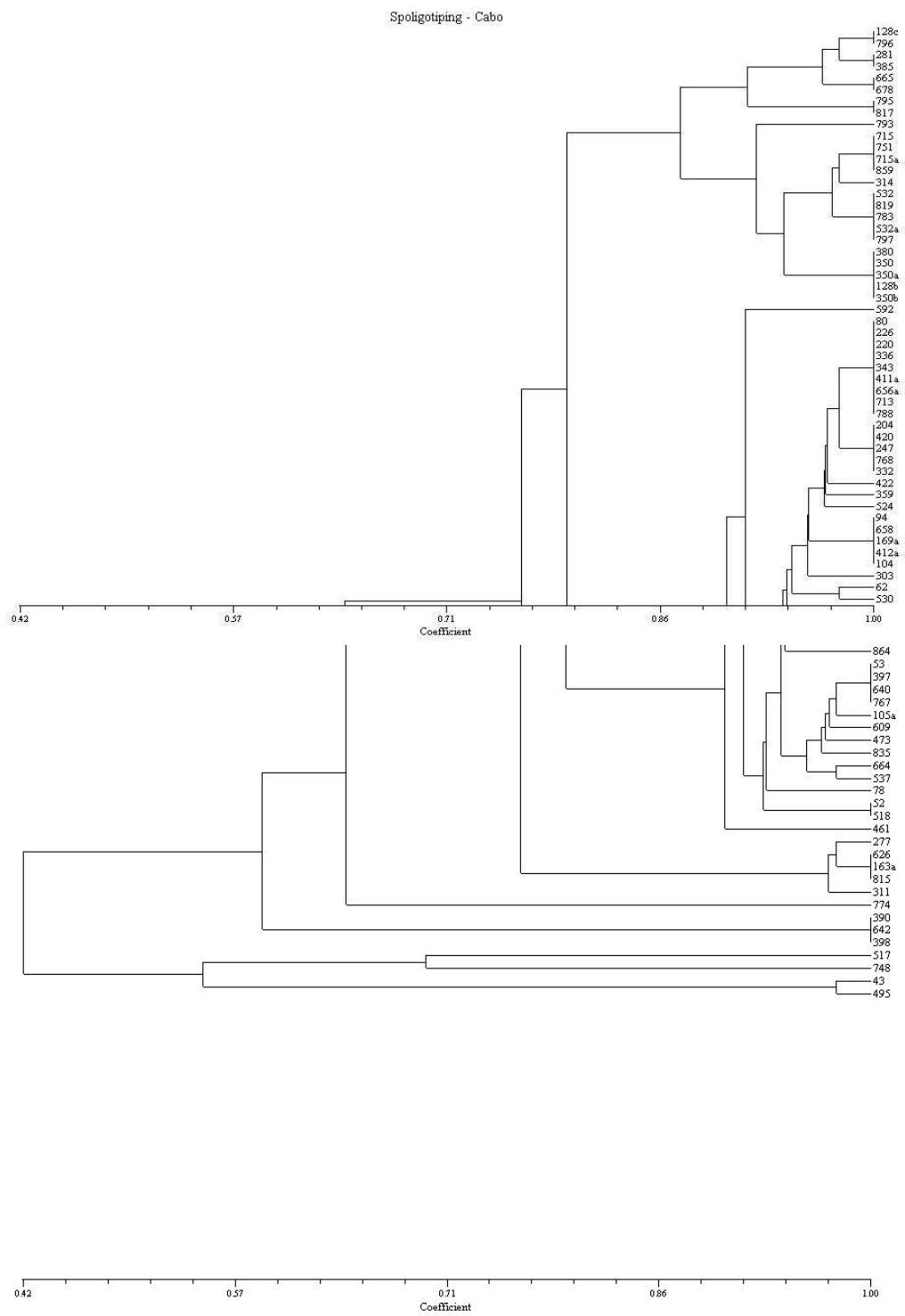


Figure 1: Neighbor-joining tree of the isolates of Mycobacterium.

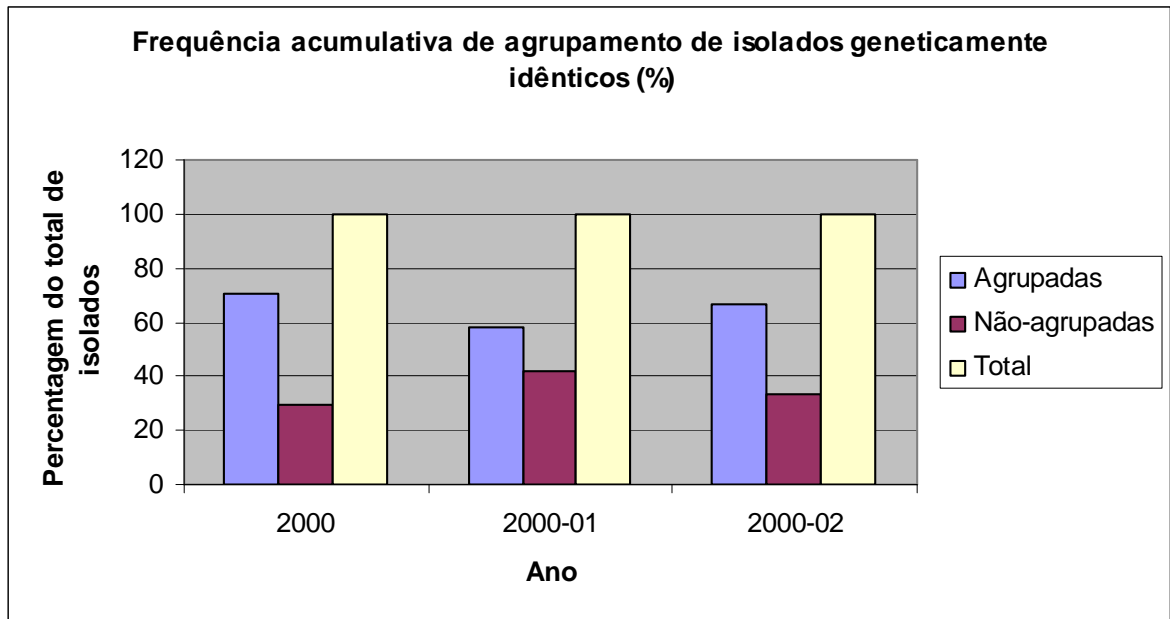


Figure 2: Cumulative frequency of identical cluster isolates (%) from 2000 to 2002.

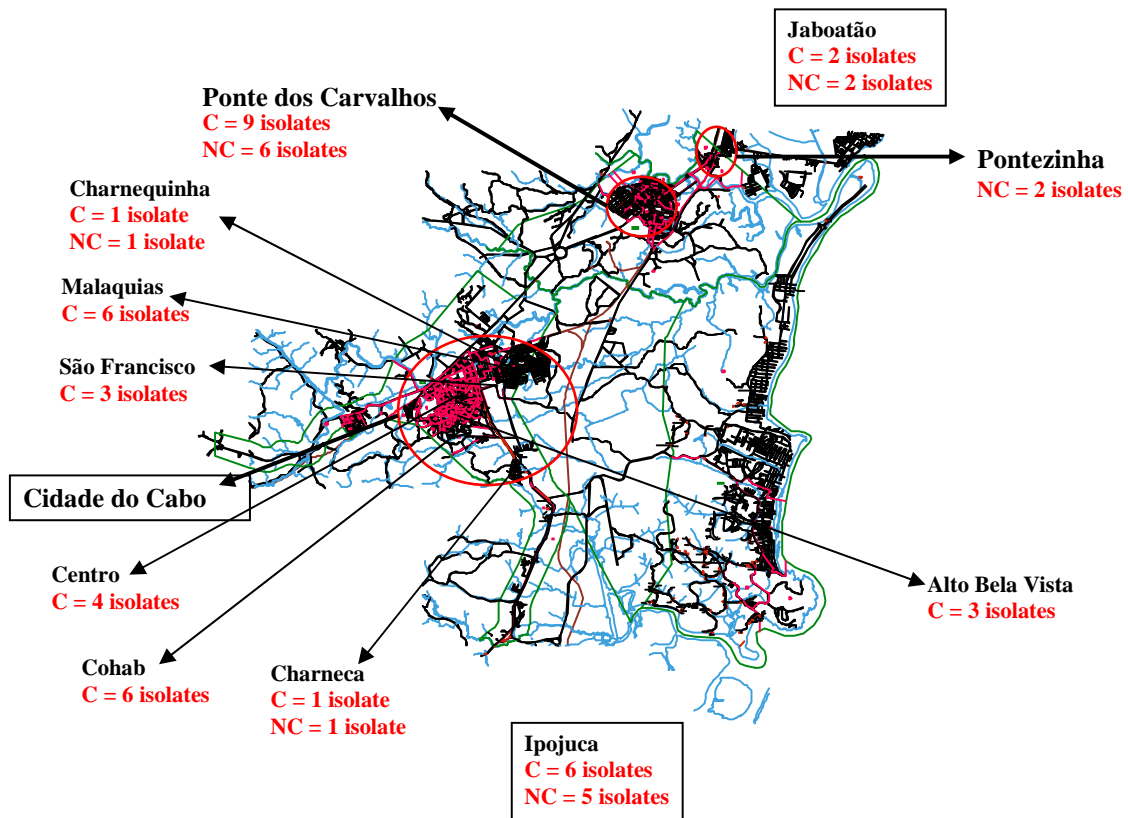


Figure 3: Map of Cabo de Santo Agostinho showing the geographic distribution of clustered (C) and non-clustered (NC) *Mycobacterium* isolates defined by spoligotyping, 2000-2002.

References

Barnes PF, Cave MD. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. The New England Journal of Medicine 2003; 349(12):1149-1156.

Bruchfeld J, Aderaye G, Palme IB, Bjorvatn B, Ghebremichael S, Hoffner S and Lindquist L. Molecular epidemiology and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis isolates from Ethiopian pulmonary tuberculosis patients with and without human immunodeficiency virus infection. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40(5):1636-1643.

Brudey K, Gordon M, Mostrom P, Svensson L, Jonsson B, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Western Sweden. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42(7):3046-3051.

Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Viedma DG, Garzelli C, Gazolla L, Gomes HM, Guttierrez MC, Hawkey PM, Van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ly HM, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofo-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rusch-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, Van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMB Microbiology 2006; 6(23):2180-2196.

^aBrudey K, Filliol I, Ferdinand S, Guernier V, Duval P, Maubert B, Sola C and Rastogi N. Long-Term Population-Based Genotyping Study of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in the French Departments of the Americas. Journal of Clinical Microbiology 2006; 44(1):183-191.

Dale, J. W., D. Brittain, A. A. Cataldi, D. Cousins. J. T. Crawford, J. Driscoll, H. Heersma, T. Lillebaek, T. N. Quitugua, N. Rastogi, D. van Soolingen, V. Wright.

2001. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*: recommendations for standardized nomenclature. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5:216–219.

DE LA Salmonière YOG, Li HM, Orrea G, Bunschoten A, Embden JV and Gicquel B. Evaluation of Spoligotyping in a Study of the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35(9):2210-2214.

Diaz R, Gomez RI, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Court J, Valdivia JA and Van Soolingen D. Transmission of tuberculosis in Havana, Cuba: a molecular epidemiological study by IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism typing. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2001; 96(4):437-443.

Easterbrook PJ, Gibson A, Murad S, Lamprecht D, Ives N, Ferguson A, Lowe O, Mason P, Ndudzo A, Taziwa A, Makombe R, Mbengeranwa L, Sola C, Rostogi N and Drobniewski F. High Rates of Clustering of Strains Causing Tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a Molecular Epidemiological Study. *Journal Of clinical Microbiology* 2004; 42(10):4536-4544.

Gori A, Bandera A, Marchetti G, Esposti AD, Catozzi L, Nardi GP, Gazzola L, Ferrario G, van Embden JDA, van Soolingen D, Moroni M, Franzetti F. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11(8):1242-1248.

Flynn JL and Chan J. What's good for the host is good for the bug. *ELSEVIER: TRENDS in Microbiology* 2005; 13(3):98-102.

Frothingham R. and Meeker-O'Connell W.A..(1998) Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 144: 1189-1196.

Kamerbeek J, Schouls L, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden JDA. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol* 1997; 35:907–914.

McNabb SJN, Braden CR and Navin TR. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: lessons learned and implications for the future. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8(11):1314-1319.

Munsiff S, Bassoff T, Nivin B, Li J, Sharma A, Bifani P, Mathema B, Driscoll J and Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8(11):1230-1238.

Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN, Thibert L, Kozak R, Joseph L, Schwartzman K, Behr MA. Sensitivities and Specificities of spoligotyping and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing Methods for Studying Molecular Epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(1):89-94.

Takahara M, Yajima Y, Miyazaki S, Aiyoshi M, Fujino T, Otsuka Y, Sekiguchi J, Saruta K, Kuratsuji T and Kirikae T. Molecular epidemiology of intra-familial tuberculosis transmission. *Jpn. J. Infect. Dis* 2003; 56:132-133.

5- ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA) – Relacionado ao Desenvolvimento da Tuberculose Doença no Hospedeiro.

Neste capítulo abordaremos os aspectos genéticos do hospedeiro. Considerando que os indivíduos que compartilham o mesmo domicílio com os casos de tuberculose estão sujeitos a um mesmo fator ambiental e a exposição à mesma cepa de bactéria. Assim, avaliamos o papel de marcadores genéticos (HLA) do hospedeiro na predisposição para tuberculose em comunicantes de casos índices diagnosticados no Recife, uma vez que o número de casos de tuberculose é aproximadamente 10 vezes maior a cada ano em relação ao Município do Cabo de Santo Agostinho.

5.1- INTRODUÇÃO

O Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) ou Antígeno Leucocitário Humano (HLA) é formado por grupos de genes presentes no braço curto do cromossomo 6 que codifica antígenos da superfície celular (MONTE *et al.*, 2004), contendo 4×10^6 nucleotídeos localizados entre as posições 6p21.1 e p21.3 (MEHRA e KAUR 2003). Existem 3 classes de genes do MHC: gene HLA de classe I que incluem os loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G; gene HLA de classe II que incluem os loci HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM e a região HLA de classe III que codifica os componentes do complemento C2 e C4, Fator B, TNF-alfa e beta, HSP70 (figura 5.1), (TERÁN-ESCANDON *et al.*, 1999).

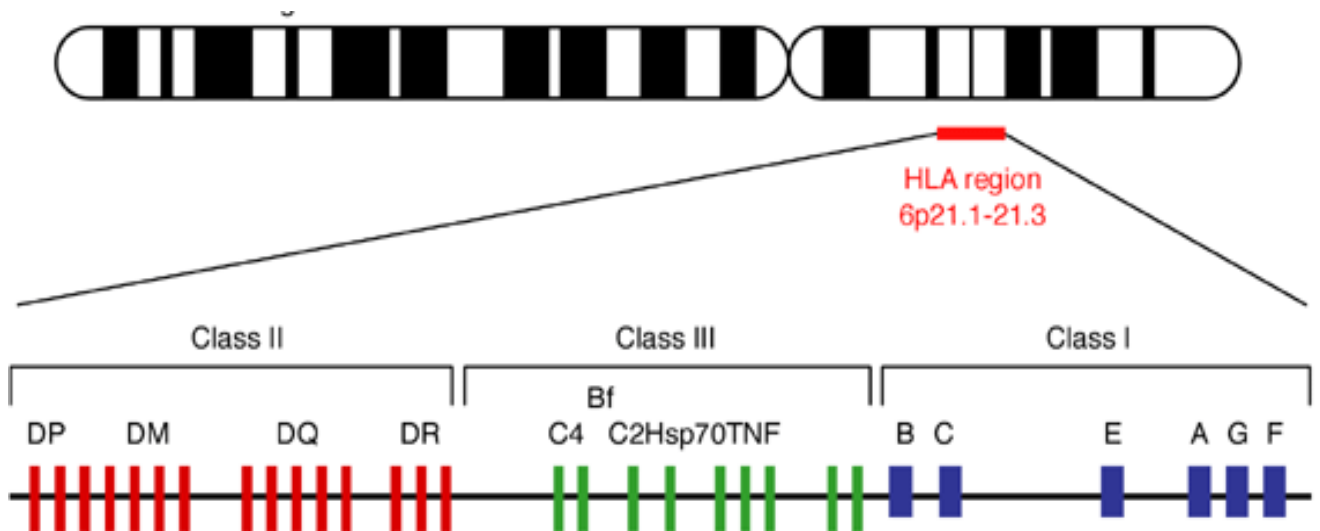


Figura 5.1: Mapa Genético da região do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) presente no braço curto do cromossomo 6 humano.

Fonte: Mehra e Kaur (2003). Expert Reviews in Molecular Medicine. Disponível em <http://www.expertreviews.org/>.

Os genes do HLA de classe I codificam glicoproteínas de superfície celular cuja função é apresentar peptídeos antigênicos aos linfócitos T citotóxicos CD8+, com resposta imune mediada contra antígenos endógenos e alvos de infecção viral (MEHRA e KAUR 2003; TERÁN-ESCANDON *et al.*, 1999). Enquanto os genes do HLA de classe II codificam proteínas envolvidas na apresentação de antígenos

exógenos às células T helper (MEHRA e KAUR 2003), tendo um papel fundamental na regulação da resposta imune, incluindo suscetibilidade a algumas doenças (THONNARD *et al.*, 1995).

O sistema HLA é altamente polimórfico e diferenças nas populações são representadas por frequências de diferentes alelos e subtipos (TERÁN-ESCANDON *et al.*, 1999), variando entre os diferentes grupos populacionais e étnicos (MONTE *et al.*, 2004). A chance de duas pessoas terem HLA idênticos em todos os loci é muito baixa, entretanto irmãos apresentam 25% de chances de terem o mesmo HLA (MEHRA e KAUR, 2003). Cinco loci apresentam mais de 100 alelos detectados na população humana, dentre esses, os mais variáveis são HLA B e HLA DRB1 (tabelas 5.1 e 5.2), (ANSWERS.COM 2007).

Lócus	Variante
HLA A	349
HLA B	627
HLA C	182
HLA E	5
HLA F	2
HLA G	15

Tabela 5.1: Mostra o número de alelos variantes nos loci do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) de classe I

Fonte: Human Leukocyte Antigen [on line]. Disponível em: <http://www.answers.com/topic/human-leukocyte-antigen>.

HLA	-A1	-B1	-B3 ao -B5	Potencial Combinações
DM-	4	7		28
DO-	8	9		72
DP-	22	116		2.552
DQ-	28	61		1.708

Tabela 5.2: Mostra o número de alelos variantes nos loci do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) de classe II

Fonte: Human Leukocyte Antigen [on line]. Disponível em: <http://www.answers.com/topic/human-leukocyte-antigen>

A imunidade protetora contra o *Mycobacterium tuberculosis* e outras bactérias intracelulares dependem de citocinas tipo-1 secretadas por células T helper CD4+ do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) classe II e células CD8+ do MHC classe I (CHARO *et al.*, 2001), embora a contribuição de células T CD8+ ainda não esteja bem estabelecida (GELUK *et al.*, 2000). Essas citocinas exercem funções como recrutar fagócitos mononucleares para o local da infecção e ativar macrófagos parasitados, entre elas está o IFN-gama (COOPER *et al.*, 1993), que tem um importante papel em manter o controle da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (PATHAN *et al.*, 2000). A expressão de IL-10 e IL-4 estão relacionadas com o perfil Th2 da resposta imune. IL-10 funciona como um inibidor das funções das células T, expressão de MHC classe II, proliferação antígeno específico e síntese de IFN-gama e está inversamente correlacionado com IFN-gama na tuberculose humana (DHEENADHAYALAN *et al.*, 2001). Selvaraj *et al.*, (2007) relatam que o alelo HLA-DRB1 modula diferencialmente a respostas de varias citocinas a antígenos do *M. tuberculosis* o qual pode influenciar na resposta imune celular e humoral na infecção pelo *M. tuberculosis* em hospedeiro suscetível (SELVARAJ *et al.*, 2007). Peptídeos derivados da região ESAT-6 estão relacionados com a resposta de células T CD4 e CD8 antígeno específico para liberação de IFN-gama, sendo específicos para *Mycobacterium tuberculosis* (PATHAN *et al.*, 2000; PATHAN *et al.*, 2001). Genes variantes de diversas citocinas têm sido associados com suscetibilidade do hospedeiro em tuberculose. Em estudos realizados no Brasil, Amin *et al.* (2007) relatam associação do alelo mutante +874A (baixa produção de INF-gama) com tuberculose doença (AMIN *et al.*, 2007).

Há evidências de que suscetibilidade à tuberculose em humanos seja poligênico, dentre elas o aumento da concordância da doença em gêmeos monozigóticos em relação a gêmeos dizigóticos e também em populações

consangüíneas (VEJBAESSYA *et al.*, 2002; KAUFMANN *et al.*, 2005). Polimorfismo em diversos genes humano tem sido associado com suscetibilidade à tuberculose (TAKIFF 2001), como os codificando HLA-DRB1, receptores de vitamina D, NRAMP-1 e INF-gama (KAUFMANN *et al.*, 2005). Um outro gene, o *Ipr1* (intracellular pathogen resistance 1), é expresso em macrófagos após infecção por *Mycobacterium tuberculosis* mas não é expresso em fagócitos suscetíveis, favorecendo apoptose em macrófagos e conferindo resistência contra o bacilo (KAUFMANN *et al.*, 2005). Entretanto, nenhum gene aparece individualmente com papel dominante no desenvolvimento da doença em qualquer população, tendo o ambiente, exposição do indivíduo ao bacilo e o estado nutricional papel importante no desenvolvimento da tuberculose (TAKIFF 2001). Além disso, apesar da influência genética associada ao HLA ter um papel importante no desenvolvimento da doença, essa suscetibilidade pode não ser relevante em pacientes com imunodeficiência severa como a AIDS (TERÁN-ESCANDÓN *et al.*, 1999).

Vários estudos usando métodos moleculares descrevem associação entre tuberculose com os subtipos DR e DQ. A tabela 5.1 resume os resultados de diversos trabalhos fazendo referência a possíveis alelos de suscetibilidade e resistência para tuberculose. Terán-Escandon *et al.* (1999), em estudos realizados no México, mostraram associação entre a freqüência dos alelos DQA1*0101, DQB1*0501 e DQB1*1501 e tuberculose pulmonar. Segundo os autores, a freqüência de alguns alelos HLA dos loci DR e DQ foi significativamente aumentada em pessoas do grupo controle (sem doença) em relação aos alelos HLA dos pacientes com tuberculose pulmonar, sugerindo que esses alelos podem conferir alguma resistência a tuberculose (TERÁN-ESCANDON *et al.*, 1999). Estudos realizados por Dheenadhayalan *et al.* (2001) identificaram alelos DRB1* relacionados com níveis de expressão de IFN-gama, dentre eles HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*09, HLA-DRB1*10 e HLA-DRB1*1502. O nível mais alto de IFN-gama foi observado com o alelo HLA-DRB1*03 e o nível mais baixo foi observado com o alelo HLA-DRB1*08, em indivíduos do grupo controle. Os autores sugerem que a expressão de IFN-gama identificada somente em controles provenientes de áreas endêmicas, mas não em pacientes, é alelo dependente (HLA-DRB1*) e pode ser obstruída nos pacientes pela infecção por si (DHEENADHAYALAN *et al.*, 2001). Ravikumar *et al.* (1999), em estudos realizados no sul da Índia em 126 pacientes com tuberculose pulmonar e 87 controles,

encontraram associação entre os alelos HLA-DRB1*1501 e DQB1*0601 com tuberculose pulmonar, entretanto o alelo DPB1*04 foi preventivo no desenvolvimento da doença (RAVIKUMAR *et al.*, 1999). Wang *et al.* (2001) analisando o alelo HLA-DRB1, em 74 pacientes e 90 controles na população chinesa, encontraram correlação entre o alelo HLA-DRB1*15 e suscetibilidade para tuberculose pulmonar, referindo ainda que o alelo DRB1*11 pode ser protetor para o desenvolvimento da doença (WANG *et al.*, 2001). Dubaniewicz *et al.* (2000) analisando 31 pacientes com tuberculose pulmonar e 58 voluntários saudáveis na população Polonesa, sugerem que a presença do alelo HLA-DRB1*16 pode aumentar o risco de desenvolver tuberculose pulmonar, enquanto o alelo HLA-DRB1*13 pode conferir resistência à tuberculose (DUBANIEWICZ *et al.*, 2000). Hamid *et al.* (2003) analisando uma série de casos de base hospitalar no Iran, sendo 44 pacientes com tuberculose pulmonar e 108 controles saudáveis sem história prévia de tuberculose, encontram freqüências aumentadas para os alelos HLA-B17 e HLA-DR14 em pacientes quando comparado com o grupo controle, enquanto que a freqüência dos alelos HLA-A26 e HLA-B27 estavam aumentadas no grupo controle em relação aos pacientes (HAMID *et al.*, 2003). Vijaya, *et al.* (2006) encontraram associação entre o alelo HLA-B51 e suscetibilidade para tuberculose e associação entre o alelo HLA-B52 com resistência para tuberculose (VIJAYA *et al.*, 2006). Vejbaessya *et al.* (2002) analisando 82 pacientes com tuberculose pulmonar diagnosticados no hospital Siriraj em Bangkok e 160 indivíduos saudáveis utilizados como controle, encontraram freqüência do alelo HLA-DQB1*0502 aumentada em pacientes com tuberculose em relação ao grupo controle e freqüências menores dos alelos HLA-DQA1*0601 e HLA-DQB1*0301 em pacientes em relação ao grupo normal. Esses resultados sugerem que o alelo DQB1*0502 pode estar envolvido com o desenvolvimento da tuberculose e que os alelos DQA1*0601 e DQB1*0301 podem estar associados com proteção contra tuberculose. Entretanto, os autores justificam a discrepância entre seus resultados e os resultados encontrados em outras populações como podendo ter sido causada por freqüências diferentes dos subtipos DR e DQ, desequilíbrio de ligação com diferentes padrões e pelo uso de diferentes métodos de seleção clínica (VEJBAESSYA *et al.*, 2002). Além disso, pacientes e grupo controle devem ser expostos ao mesmo fator etiológico, sendo que exposição a tuberculose pela população utilizada como controle não pode ser confirmada por testes tuberculínicos

positivo uma vez que pode haver reação cruzada como por exemplo a BCG e bactérias ambientais (BOTHAMLEY 2002).

Região / País	Alelos		Fonte
	Suscetibilidade	Resistência	
México	DQA1*0101; DQB1*0501; DQB1*1501		TERÁN- ESCANDON (1999)
Sul da Índia	HLA-DRB1*1501; DQB1*0601	DPB1*04	RAVIKUMAR (1999)
China	HLA-DRB1*15	DRB1*11	WANG (2001)
Polônia	HLA-DRB1*16	HLA-DRB1*13	DUBANIEWICZ (2000)
Iran	HLA-B17 e HLA-DR14	HLA-A26; HLA-B27	HAMID (2003)
Bangkok	HLA-DQB1*0502	HLA-DQA1*0601; HLA- DQB1*0301	VEJBAESSY (2002)
România	HLA-B18	HLA-B7; HLA-B61	VALISCA (2004)

Tabela 5.3: Mostra os alelos relacionados com suscetibilidade em desenvolver tuberculose doença e os alelos relacionados com proteção para tuberculose, em diversas populações no mundo.

Estudos de família baseados em ligação genética e estudos de população baseado em associação são duas estratégias complementares utilizadas para identificar genes envolvidos em doenças de causa multifatorial (BELLAMY 1998). Miller *et al.*, (2004) analisando 16 famílias (178 indivíduos) com casos de tuberculose e 21 famílias (173 indivíduos) com casos de hanseníase no Brasil identificaram regiões cromossomal com evidências de ligação. Três regiões (10q26.13, 11q12.3 e 20p12.1) tiveram evidências sugestivas para ligação com tuberculose e três regiões (6p21.32, 17q22 e 20p13) tiveram evidências sugestivas para ligação com hanseníase (MILLER *et al.*, 2004).

5.2- OBJETIVOS

5.2.1- GERAL

Estudar a influência de fatores genéticos no adoecimento de tuberculose tendo como estratégia metodológica um estudo de caso-controle aninhado a uma coorte.

5.2.2- ESPECÍFICOS

- Analisar a influência do grau de parentesco e intensidade de exposição com a ocorrência de segundo caso da doença no ambiente intradomiciliar.
- Descrever a frequência genotípica para os alelos de classe II presentes no locus HLA-DR de indivíduos expostos à tuberculose no ambiente familiar independente do grau de parentesco.

5.3- MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do Estudo

Caso controle aninhado a uma coorte, considerando que os indivíduos que compartilham o mesmo domicílio com os casos de tuberculose estão sujeitos a um mesmo fator ambiental e a exposição à mesma cepa de bactéria.

População de Estudo

De 1550 casos de tuberculose identificados nas unidades de saúde para tratamento da tuberculose em Recife, 241 relataram haver outro caso na família. Estes indivíduos foram visitados e para aqueles que concordaram em fazer parte da pesquisa e assinaram um termo de consentimento informado preencheram um

questionário com dados clínicos epidemiológicos e sua história de contato intradomiciliar foi investigada. Quando o intervalo entre o diagnóstico dos casos foi maior que 5 anos, a família foi excluída da pesquisa.

Cinqüenta famílias tinham pelo menos dois casos com diagnóstico dentro de cinco anos, e estas famílias são a população deste estudo. Os indivíduos que foram diagnosticados primeiro como tendo tuberculose foram considerados o caso índice. Indivíduos que relataram contato intradomiciliar e que também viviam no endereço do caso índice no momento do diagnóstico foram incluídos no estudo, sendo considerados comunicantes doentes (que tiveram contato e adoeceram) e comunicantes saudáveis (que tiveram contato e não adoeceram).

O grau de parentesco genético foi definido como de primeiro, segundo e terceiro grau baseado na proporção de alelos compartilhados em relação ao caso índice. Foram considerados como tendo parentesco de primeiro grau indivíduos que se espera compartilhar 50% do genoma como irmãos e pais. Foram considerados com parentesco de segundo grau indivíduos em que se espera compartilhar 25% do genoma como tios, sobrinhos, avós e netos. Foram considerados como tendo parentesco de terceiro grau indivíduos como primos. Foram considerados como agregados os indivíduos sem relação de parentesco com o caso índice como cônjuges, parentes dos cônjuges e amigos.

Amostra Clínica

Foram coletados 5mL de sangue de cada indivíduo participante do estudo. As amostras foram encaminhadas ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães para extração de DNA genômico humano. Foram coletados também amostras de escarro de indivíduos que no momento da entrevista apresentavam sintomatologia suspeita de tuberculose, e encaminhadas ao LACEN para diagnóstico microbiológico.

Extração de DNA

Células do sangue foram separadas por gradiente de Ficoll e estocadas em freezer a -80°C. DNA genômico foi extraído resuspendendo as células em 3 ml de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2) em tubo de polipropileno de 15 mL. O material foi incubado durante a noite com 0.2 ml de

SDS 10% e 0.5 ml de solução de proteinase K (1 mg de proteinase K em 1% de SDS e 2 mM de Na₂EDTA), a 37°C. No dia seguinte, 1 mL de NaCl saturado (6M) foi adicionado e o tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos, seguido por centrifugação a 2.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo de polipropileno de 15 mL. Em seguida foram adicionados 2 volumes de etanol a temperatura ambiente e o tubo foi invertido diversas vezes para precipitação do DNA. O DNA foi em seguida transferido para um tubo 1.5 mL contendo 200 microlitros de TE (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM Na₂EDTA, pH 7.5). O DNA foi dissolvido por 2 horas a 37°C.

Tipagem do HLA de Classe II

DNA genômico humano foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador Eppendorf utilizando o kit de alta resolução HLA Class II SSP2H (One Lambda, Canoga Park, USA) para análise do polimorfismo da região HLA (antígeno leucocitário humano) de classe II (loci HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 e HLA-DRB5) como especificado pelo fabricante. O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2.5% e corado com brometo de etídio. A análise dos alelos tipados foi feita utilizando o programa DNA/LMT (One Lambda) versão 10.1.

Análise Estatística

Nós estimamos a taxa de ataque secundário de tuberculose em contatos intradomiciliares de acordo com o grau de parentesco, controlando idade e o fato de dormir no mesmo quarto com o caso índice. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Epiinfo versão 6.04. A fração atribuível à população foi estimada tendo $PAF = p (RR - 1) / \{p (RR - 1) + 1\}$, sendo p a proporção de comunicantes intradomiciliares relacionados ao caso índice e RR sendo o risco relativo para associação entre ser um caso secundário de tuberculose e estar relacionado com o caso índice.

5.4- RESULTADOS

Foram incluídos em nosso estudo 50 casos índices e 257 comunicantes intradomiciliares. Destes, 54 não apresentavam qualquer grau de parentesco e 203 com algum grau de parentesco em relação ao caso índice, sendo 136 de primeiro grau, 54 de segundo grau e 13 de terceiro grau. Foram 82 comunicantes doentes, dos quais, 15 sem parentesco, 46 com parentesco de primeiro grau, 17 com parentesco de segundo grau e 4 com parentesco de terceiro grau em relação ao caso índice. A taxa de ataque secundário para tuberculose foi de 0.34 (95%IC:0.26-0.43) para parentesco de primeiro grau, 0.32 (95%IC:0.20-0.46) para parentesco de segundo grau, 0.31 (95%IC:0.10-0.61) para parentesco de terceiro grau e 0.28 (95%IC:0.17-0.42) para comunicantes sem parentesco como mostra a tabela 5.4.

COMUNICANTES INTRADOMICILIARES					
Caso de TB secundário	Grau de Parentesco				Total
	1º Grau	2º Grau	3º Grau	Sem Parentesco	
Sim	46	17	4	15	82
Não	90	37	9	39	175
Taxa de Ataque Secundário*	0.34 [0.26-0.43]	0.32 [0.20-0.46]	0.31 [0.10-0.61]	0.28 [0.17-0.42]	
RR*	1.22 [0.75-1.99]	1.13 [0.63-2.03]	1.11 [0.44-2.78]	1	

Tabela 5.4- Mostra a taxa de ataque secundário (OR e 95%IC) para tuberculose em comunicantes intradomiciliares de acordo com o grau de parentesco.

[95%IC]*

O risco relativo para desenvolver tuberculose foi de 1.22 (95%IC:0.75-1.99) para parentesco de primeiro grau, 1.13 (95%IC:0.63-2.03) para parentesco de segundo grau e 1.11 (95%IC:0.44-2.78) para parentesco de terceiro grau quando comparados com os comunicantes sem grau de parentesco. Dormir no mesmo

quarto com o caso índice não aumentou o risco de adoecer por tuberculose. A taxa de ataque secundário variou com a idade: 41% em comunicantes com idade entre 16 e 59 e 14% em comunicantes com idade abaixo de 15 anos ou acima de 60 anos ($p < 0.0001$). A tabela 5.5 mostra os resultados para a faixa etária entre 16 e 59 anos (a qual inclui 66% de todos os casos): o risco relativo para tuberculose entre comunicantes foi de 1.29 (95%IC:0.79-2.11) para parentesco de primeiro grau, 1.54 (95%IC:0.85-2.76) para parentesco de segundo grau e 1.32 (95%IC:0.51-3.43) para parentesco de terceiro grau quando comparados com comunicantes sem grau de parentesco.

COMUNICANTES INTRADOMICILIARES					
Caso de TB Secundário	Grau de Parentesco				Total
	1º Grau	2º Grau	3º Grau	Sem Parentesco	
Sim	40	12	3	14	69
Não	55	12	4	29	100
Taxa de Ataque Secundário*	0.42 [0.32-0.53]	0.50 [0.30-0.70]	0.43 [0.12-0.80]	0.33 [0.20-0.49]	
RR*	1.29 [0.79-2.11]	1.54 [0.85-2.76]	1.32 [0.51-3.43]	1	

Tabela 5.5- Mostra a taxa de ataque secundário (OR e 95%IC) para tuberculose em comunicantes intradomiciliares na faixa etária entre 16 e 59 anos de acordo com o grau de parentesco.

[95%IC]*

Tendo uma estimativa de aumento na taxa de ataque secundário em comunicantes intradomiciliares como sendo geneticamente relacionados com o caso índice e controlados por idade (RR = 1,38), e sendo que 79% dos contatos intradomiciliares estavam relacionados com o caso índice, PAF foi estimado em 23%. Em outras palavras, a partir de nossos dados 23% dos casos de tuberculose entre os contatos intradomiciliares são atribuídos a serem geneticamente

relacionados com o caso índice (tendo em conta a exposição) e os restantes 77%, são atribuídos à exposição intradomiciliar apenas.

Nós analisamos a frequência alélica em 77 indivíduos com história de tuberculose, juntamente com 119 indivíduos controles (sem história anterior de tuberculose). Em seis casos positivos e oito negativos não foi possível confirmar a homozigose alélica. Nenhum dos alelos analisados foi associado com suscetibilidade à tuberculose. Apenas o alelo DRB5*01 aparece ligado à resistência para tuberculose (OR= 0.45; IC95%= 0.20 – 0.98; $p= 0,0441$) e o alelo DRB3*02 mostra uma tendência de associação com resistência à tuberculose (OR= 0.59; IC95%= 0.32 – 1.08; $p= 0,0905$) (tabela 5.6).

	TB	Não TB	OR	IC95%	<i>p</i>
DRB1*01 (+)	20	21	1.67	0.83 - 3.35	0.1677
DRB1*01 (-)	124	217			
DRB1*03 (+)	11	17	1.08	0.46 – 2.51	0.9822
DRB1*03 (-)	133	221			
DRB1*04 (+)	17	18	1.64	0.77 – 3.47	0.2263
DRB1*04 (-)	127	220			
DRB1*07 (+)	20	34	0.97	0.51 – 1.82	0.9652
DRB1*07 (-)	124	204			
DRB1*08 (+)	11	14	1.32	0.54 – 3.21	0.6460
DRB1*08 (-)	133	224			
DRB1*09 (+)	3	5	0.99	0.18 – 4.84	1.00
DRB1*09 (-)	141	233			
DRB1*10 (+)	3	2	2.51	0.34 – 21.72	0.3698
DRB1*10 (-)	141	236			
DRB1*11 (+)	11	22	0.81	0.36 – 1.82	0.7240
DRB1*11 (-)	133	216			
DRB1*12 (+)	1	3	0.55	0.02 – 5.95	1.00
DRB1*12 (-)	143	235			
DRB1*13 (+)	17	30	0.93	0.47 – 1.83	0.9443
DRB1*13 (-)	127	208			
DRB1*14 (+)	8	14	0.94	0.35 – 2.47	0.9253
DRB1*14 (-)	136	224			
DRB1*15 (+)	15	39	0.59	0.30 – 1.17	0.1411
DRB1*15 (-)	129	199			
DRB1*16 (+)	9	9	1.70	0.60 – 4.79	0.3929
DRB1*16 (-)	135	229			
DRB3*01 (+)	14	38	0.57	0.28 – 1.13	0.1162
DRB3*01 (-)	130	200			
DRB3*02 (+)	19	49	0.59	0.32 – 1.08	0.0905
DRB3*02 (-)	125	189			
DRB3*03 (+)	3	5	0.99	0.18 – 4.84	1.00
DRB3*03 (-)	141	233			
DRB4*01 (+)	22	54	0.61	0.34 – 1.10	0.1039
DRB4*01 (-)	122	184			
DRB4*02 (+)	1	1	1.66	0.00 – 61.06	1.00
DRB4*02 (-)	143	237			
DRB5*01 (+)	10	34	0.45	0.20 – 0.98	0.0441
DRB5*01 (-)	134	204			
DRB5*02 (+)	7	13	0.88	0.31 – 2.45	0.9852

Tabela 5.6- Mostra a freqüência dos alelos HLA de classe II em contatos intradomiciliares com e sem história prévia de tuberculose, Recife-PE.

5.5- DISCUSSÃO

Em nosso trabalho vimos que o risco de tuberculose em comunicantes intradomiciliares (no período de 5 anos após o diagnóstico do caso índice) não é estatisticamente significativo em parentes do caso índice, mas é consistente com um papel limitado do efeito genético na suscetibilidade à tuberculose (a melhor estimativa do efeito sendo um aumento de 1.4 vezes, coerente com um aumento máximo de 2). Baseado no aumento estimado aqui, 23% de todos os casos secundários entre os contatos intradomiciliares resultou de uma maior suscetibilidade genética.

Este é um novo e simples desenho que permite explorar o papel da genética no risco de doenças infecciosas, o que é possível devido à elevada taxa de ataque secundário de tuberculose em contatos intradomiciliares. O estudo de contatos intradomiciliares permite que indivíduos tenham probabilidade de exposição similar ao *Mycobacterium tuberculosis*. Nós assumimos que a exposição foi semelhante nos parentes e não parentes. Os nossos resultados mostraram que não houve associação estatisticamente significativa entre os níveis de exposição (se dormiam no mesmo quarto que o caso índice) e risco de desenvolver a doença em contatos intradomiciliares. Provavelmente, isso se deve pelo fato das casas serem pequenas, pouco ventiladas e com muitos moradores e provavelmente, dormir no mesmo quarto não aumenta a exposição.

Nós não controlamos o intervalo entre o caso índice e o surgimento do segundo caso de tuberculose, pois não consideramos que a duração da exposição ao *Mycobacterium tuberculosis* foi relacionada a este intervalo. Há evidências de que a transmissão em contatos intradomiciliar acontece antes do diagnóstico da doença (POSPELOVA *et al.*, 2005). Isso devido os casos serem infecciosos antes do diagnóstico, mas a infectividade diminui muito rapidamente após o início do tratamento. Assim, para a grande maioria dos contatos intradomiciliares os casos

índices não serão infecciosos após o diagnóstico e o tempo entre o diagnóstico do primeiro caso e do segundo caso não está relacionado com a duração da exposição.

O tamanho da amostra foi relativamente pequeno e, embora os resultados não forneçam evidências concretas da intensidade do efeito genético, eles fornecem uma primeira estimativa da sua magnitude. A principal estimativa é de um aumento de 1.4 vezes, onde o intervalo de confiança indica que os nossos resultados são consistentes com um máximo efeito genético em duplicar o risco de tuberculose em parentes de primeiro grau, mas também consistente com nenhum aumento no risco. O aumento do risco em contatos indradomiciliares atribuível a suscetibilidade genética a tuberculose foi de aproximadamente 23%. Isso deve refletir a soma dos efeitos genéticos, incluindo todos os candidatos genotípicos conhecidos e desconhecidos. A magnitude de qualquer efeito genético na população como um todo seria em função da frequência do gene, de saber se algum efeito genético depende do grau de polimorfismo, da frequência alélica e da expressividade do gene.

Em nosso estudo não encontramos qualquer alelo associado com suscetibilidade para adoecimento por tuberculose. Entretanto, o alelo DRB5*01 (OR= 0.45; IC95%= 0.20-0.98; $p= 0.0441$) aparece ligado à resistência para tuberculose e o alelo DRB3*02 (OR= 0.59; IC95%= 0.32-1.08; $p= 0.0905$) mostra uma tendência de associação com resistência em desenvolver tuberculose. Terán - Escandon *et al.* (1999), em estudos no México, mostraram associação entre a frequência dos alelos DQA1*0101, DQB1*0501 and DQB1*1501 e tuberculose pulmonar (TERÁN - ESCANDON *et al.*, 1999). Ravikumar *et al.* (1999), em estudos realizados no sul da Índia, em 126 doentes com tuberculose pulmonar e 87 controles, encontraram associação entre alelos HLA-DRB1*1501 e DQB1*0601 com tuberculose pulmonar (RAVIKUMAR *et al.*, 1999). Wang *et al.* (2001) analisando o alelo HLA-DRB1 em 74 pacientes e 90 controles na população chinesa, encontraram uma correlação entre o alelo HLA-DRB1*15 e suscetibilidade à tuberculose pulmonar, e evidências de que o alelo DRB1*11 pode ser protetor para o desenvolvimento da doença (WANG *et al.*, 2001). Dubaniewicz *et al.* (2000) sugere que a presença do alelo DRB1*16 pode aumentar o risco de o indivíduo desenvolver tuberculose na população polonesa e que o alelo DRB1*13 pode conferir resistência à tuberculose (DUBANIEWICZ *et al.*, 2000). Os resultados apresentados aqui

mostraram que esse desenho de estudo epidemiológico pode prever a contribuição dos efeitos genéticos em agregados familiares para doenças infecciosas e enfatizar a necessidade de estudar marcadores moleculares de suscetibilidade e resistência à tuberculose.

O próximo passo em nosso estudo de HLA será fazer uma análise pareada entre indivíduo doente e indivíduo saudável sem qualquer relação de parentesco, ou seja, sem relação genética. Este tipo de análise nos permitira entender melhor se existe algum alelo HLA relacionado à suscetibilidade ou resistência à tuberculose em nossa população de estudo. Outra análise possível é fazer um pareamento entre indivíduo doente e indivíduo saudável que tenham uma descendência direta. Essa abordagem nos possibilitará entender se a suscetibilidade ou resistência à tuberculose tem relação com o alelo transmitido pelo caso índice aos seus descendentes diretos.

6- CONCLUSÕES

Após ter sido considerada sob controle, a tuberculose ressurgiu na década de 90, sendo atualmente um sério problema de saúde pública envolvendo aspectos sociais e econômicos. Para entender os fatores envolvidos na transmissão e adoecimento pela tuberculose faz-se necessário compreendermos o tripé de sustentação da doença: ambiente, bacilo e hospedeiro.

Em nosso estudo, a estratégia metodológica utilizada foi uma coorte prospectiva para as etapas de avaliação dos fatores ambientais e dos fatores de virulência do agente infeccioso envolvidos no desenvolvimento da tuberculose doença. Considerando que os indivíduos que compartilham o mesmo domicílio com os casos de tuberculose estão sujeitos a um mesmo fator ambiental e a exposição à mesma cepa de bactéria, foi desenhado um caso-controle aninhado à coorte para o estudo da influência de fatores genéticos no adoecimento de tuberculose. Nós esperávamos encontrar um grande número de comunicantes doentes nesses últimos cinco anos referentes ao período de coorte da pesquisa no município do Cabo de Santo Agostinho para realização do estudo de HLA. Entretanto, nossas perspectivas foram frustradas pelo pequeno número de comunicantes doentes atendendo os critérios de inclusão na pesquisa. A solução encontrada foi utilizarmos à população do Recife (a qual o Cabo de Santo Agostinho se insere como parte da Região Metropolitana do Recife), uma vez que o número de casos de tuberculose é aproximadamente 10 vezes maior a cada ano.

A tuberculose ocorre em maior frequência nos agrupamentos humanos com piores condições sócio-econômicas tais como favelas, invasões, populações que vivem em ambientes socialmente fechados como presídios e abrigos sociais. A intensidade do contato é uma das condições que fazem com que a tuberculose esteja associada à população de baixa renda, onde famílias numerosas convivem muito proximamente em casas pequenas, mal ventiladas e úmidas como é o caso da nossa população de estudo.

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado do paciente são considerados a principal estratégia de intervenção na tuberculose. A associação medicamentosa adequada, doses corretas e o uso por tempo suficiente são as formas para evitar a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência às drogas. Entretanto, um dos principais obstáculos no controle da doença é o

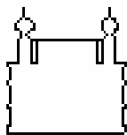
abandono do tratamento. Inquéritos de resistência podem ser utilizados como instrumento para medir a frequência e tendência da resistência primária e adquirida, e para monitorar a qualidade dos tratamentos nos programas de controle da tuberculose. Em nosso estudo, um dos efeitos imediatos da realização do teste de sensibilidade às drogas foi uma mudança de conduta no tratamento dos casos de falência por resistências do bacilo aos medicamentos. Medidas preconizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como busca ativa e Tratamento Diretamente Observado (DOTs) são estratégias importantes no controle da doença. Entre 2000 e 2003 observamos uma tendência de aumento no número de casos novos e diminuição na taxa de abandono no período em que a vigilância epidemiológica iniciou com campanhas de busca ativa (2002) e foi implementada a descentralização dos serviços de saúde (2003). Esse aumento no número de casos novos pode não estar relacionado com falhas no programa de controle, mas com sub notificação dos casos nos anos anteriores.

O reconhecimento de cepas individuais do *Mycobacterium tuberculosis* permite avaliar melhor a transmissão da doença, uma vez que cepas idênticas isoladas em dois ou mais indivíduos sugerem transmissão recente de uma cepa e que esses indivíduos tiveram contato recente ou pertencem a uma cadeia de transmissão. O uso dessas tecnologias moleculares permitiu ampliar o conhecimento sobre a transmissão da tuberculose trazendo contribuições tais como identificação de rotas de transmissão de cepas particulares e na definição de novas medidas de controle da doença.

Além dos fatores ambientais e de fatores inerentes à micobactéria, a relação bacilo-hospedeiro também contribui para a manutenção da tuberculose dificultando seu controle. Um dos grandes problemas da tuberculose está relacionado com o alto grau de adaptação dos bacilos ao homem. Os bacilos podem sobreviver por anos dentro do hospedeiro em estado de latência e o indivíduo infectado pode não manifestar a doença. A infecção se mantém sob controle, mas não eliminada, mantendo um reservatório enorme de tuberculose. Neste processo adaptativo, o bacilo desenvolveu mecanismos apropriados para sobreviver ao sistema de defesa do homem conseguindo assim manter-se vivo por longos períodos dentro de células de defesa. Os mecanismos de escape do bacilo à proteção imunológica do hospedeiro envolvem principalmente os casos de indivíduos imunossuprimidos

devido à AIDS, stress, uso de drogas imunossupressoras, abuso de álcool e desnutrição. Fatores imunogenéticos relacionados ao hospedeiro podem contribuir para o desenvolvimento da tuberculose. Diversos estudos mostram relação entre uma frequência aumentada de determinados alelos HLA-DR e tuberculose ativa. Em nosso estudo não encontramos qualquer alelo associado com suscetibilidade para adoecimento por tuberculose. Entretanto, o alelo DRB5*01 (OR= 0.45; IC95%= 0.20-0.98; $p= 0.0441$) aparece ligado à resistência para tuberculose e o alelo DRB3*02 (OR= 0.59; IC95%= 0.32-1.08; $p= 0.0905$) mostra uma tendência de associação com resistência em desenvolver tuberculose. O polimorfismo genético de certas populações pode ser usado como marcadores genéticos para se estudar grupos com maior ou menor risco de desenvolver tuberculose ativa contribuindo para o controle da tuberculose.

7- ANEXOS



Ministério da Saúde / MS
Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / CPqAM

Norma Lucena C. L. Silva, MD, PhD
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Dept. Imunologia

Av. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife, 50670-420, Brasil.
e-mail: nluca@cpqam.fiocruz.br
fone: 55-81-2714000, ext:37 FAX: 55-81-4531911

“Consentimento Informado”

Título do Projeto: Estudo da dinâmica de transmissão da Tuberculose no Município do Cabo de St. Agostinho através da Caracterização Genotípica e Distribuição de Cepas de *M. tuberculosis*.

Objetivo : Caracterização genotípica de cepas do complexo *M. tuberculosis* locais e a sua distribuição no município do Cabo visando o estudo da dinâmica de transmissão da Tuberculose local e o fornecimento de subsídios ao Serviço de Saúde para o aperfeiçoamento das abordagens de controle da TB.

Metodologia: Após informar ao paciente sobre os objetivos da pesquisa e apenas aqueles que assinarem o termo de consentimento terão as suas amostras clínicas analisadas através da cultura + antibiograma e análise molecular para diagnóstico e tipagem da micobactéria. Amostras de escarro e sangue dos pacientes tratados, em tratamento e com suspeita de TB, incluindo os comunicantes, atendidos pelo Sistema Público de Saúde do Município do Cabo de Santo Agostinho a partir do ano 1999 serão coletadas. Os comunicantes serão avaliados quanto à infecção através do teste da tuberculina.

Riscos: Isento de riscos para o paciente pois a coleta de escarro é método não invasivo rotineiramente utilizado para o diagnóstico de TB e a punção venosa será feita por profissional experiente, com seringas e agulhas descartáveis e com o consentimento do paciente. O teste da tuberculina é utilizado pelo Sistema de Saúde no diagnóstico de infecção da TB, e é isento de efeitos colaterais. A tuberculina será aplicada com agulhas descartável.

Benefícios: Diagnosticar cepas MDR permitindo uma conduta terapêutica mais apropriada, determinar a viabilidade de implementar métodos diagnósticos moleculares e sorológicos para a tuberculose, e proporcionar estudo epidemiológico quanto a distribuição e prevalência de cepas MDR na região estudada, investigar a relação entre grupo de cepas geneticamente semelhante e parâmetros clínico-epidemiológicos, identificar fatores genéticos do paciente, da cepa e ambientais que possam estar relacionados com a recidiva/SUSCETIBILIDADE/resistência a doença Tuberculose.

Desta forma, eu: _____

RG nº _____ expedido por _____

Abaixo assinado, atesto que entendi o conteúdo deste consentimento informado e concordo de livre e espontânea vontade em participar neste estudo. E que esclareci todas as minhas dúvidas com o profissional de saúde que no momento é responsável por esta entrevista.

Assinatura do paciente

Data: ___/___/___

Testemunha

Data: ___/___/___

Projeto TB / Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ.

Questionário de identificação: N° do caso índice: (Preenchimento do CPqAM)

N° do prontuário: Data do atendimento:

N° do SINAN: Unid/APA: _____

1. Nome: _____

2. Filiação (pai): _____

(mãe): _____

3. Nascimento: data Local _____

4. Endereço atual (Referência) _____

5. Tempo de moradia: anos meses

6. Endereço anterior: _____

7. Tempo de moradia: anos _____ meses _____

8. Idade: : anos meses

9. Sexo: masculino feminino

10. Grau de instrução: Pai Mãe Caso

Preencher campo pai / mãe somente se caso for	Analfabeto
	Sabe lê e escrever
	Primário menor (até 4º série concluída)
	Primário maior (8º série concluída)
	Científico concluído
	Universidade concluída
	Curso técnico
	Mestrado/Doutorado
	Ignorado

11. Situação familiar (caso ou pais): Solteiro Casado/Vive juntos Separado

Questionário profissional: (Caso ou Mãe)

12. Categoria profissional:

- Autônomo
- Empregador
- Empregado serviço público
- Empregado serviço privado
- Empregado doméstico
- Desempregado
- Aposentado
- Outros
- Não se aplica

13. Atividade profissional:

- Comércio
- Indústria
- Agro-Pecuária
- Prestação de serviços
- Prestação de serviços de saúde
- Hospitais públicos
- Hospitais particulares
- Clinica particulares
- Postos de saúde
- Laboratórios públicos
- Laboratórios particulares
- Outros

14. Tempo de trabalho: anos

15. Renda Familiar: Menos que um salário mínimo De 1 à 2 salários (inclusive)
 De 2 à 4 salários (inclusive) De 4 à 6 salários (inclusive)
 Mais que 6 salários Não sabe informar

16. Quantas pessoas vivem na casa que o Sr mora:

17. A casa do senhor tem quantos cômodos (quartos/sala):

18. Esgoto: Fossa Céu aberto Outros _____

19. Água encanada: 20. Água de beber:
 Não Encanada (torneira) Cacimba
 Sim Filtrada Fervida
 Mineral Outros _____

Questionário clínico

21. Vida Sexual: N° parceiros _____

22. Uso de drogas injetáveis: Não Sim **Há quanto tempo?** _____

23. Sintomas: Tosse Febre persistente Adenomegalia
 Expectoração Sudorese Pneumonia de repetição
 Dor torácica Dispnéia Outros _____
 Perda de peso Hemoptise **Há quanto tempo?** _____

24. Tabagismo : 25. Álcool:
 Nunca fumou Tipo: Não bebe
 Fuma Cigarro bebe esporadicamente
 Fumou <5anos Fumo de corda Bebe todo dia
 Fumou de 5-10 anos Cachimbo Parou - **Há quanto tempo?**
 Fumou > de 10 anos

26. História: Contato com doente de TB **Quem?** _____
 Contato com paciente suspeito de TB **Quem?** _____
 Paciente com passado de TB (Episódio único Episódios múltiplos)
 Ignorado

27. Uso de medicamentos tuberculostático:

No passado		
Tratamento correto (completou o esquema)	Não	Sim

No presente	
Esquema iniciado na consulta	Isoniazida Estreptomocina Rifampicina Etambutol

Quimioprofilaxia	Não	Sim			Pirazinamida
			Esquema em curso		Etionamida
					Outros
			Tratamento correto ?	Não	Sim
			(toma diariamente dose correta)		

28. Abandono de tratamento: Falta de informação / orientação
Intolerância ao medicamento
Há quanto tempo? _____ Transferência /óbito
Falta de medicamento
Dificuldade de deslocamento ao posto fornecedor

29. BCG: Sim (Cicatriz presente) uma dose mais de uma dose
Não

30. Mantoux: < 5 mm 5-10mm < 10 mm Não realizado
(não reator) (reator fraco) (reator forte)

31. Aspecto radiológico:

Normal	Infiltrativo	Cavidade	Micronodular	Alveolo- intersticial
Não Realizado	Alveolar	Derrame	Nodular	Mista

Hipótese diagnóstica: _____

Conduta: _____

PROJETO TB

Ficha do Comunicante Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ.

Questionário de identificação: N° do Indivíduo: (Preenchimento do CPqAM)

Identificação: 1-caso 2-controle

N° do prontuário:

Data da entrevista:

N° do SINAN:

Unid/APA: _____

1.Nome: _____

2.Nascimento: data Local _____ Idade

3. Sexo: 1-masculino 2- feminino

4. Endereço atual

(Referência) _____

5. Existe alguém que mora na sua residência que já teve tuberculose no passado?

1- Sim 2- Não

6. Quantas pessoas já tiveram tuberculose na sua casa?

7. Qual o nome da pessoa que teve tuberculose primeiro na sua casa? _____

8. Há quanto tempo essa pessoa tem/teve tuberculose? _____ anos meses

9. O que essa pessoa é sua?:

1- Cônjuge 2-Filho(a) 3-Pai/mãe 4-irmão/irmã 5-Namorado(a) 6- Outros _____

10. Dorme no mesmo cômodo que essa pessoa?: 1- Sim 2-Não

11. Há quanto tempo essa pessoa mora nessa casa?: anos meses

12. Há quanto tempo você mora nessa casa?: anos meses

13. Quantas pessoa moram na sua casa?

14. Você está fazendo tratamento para tuberculose? 1-Sim 2-Não

15. Você já teve tuberculose antes?: 1-Sim 2-Não

16. Você já tomou vacina para tuberculose? 1-Sim 2-Não 3-Ignorado

17. Quantas doses de vacina para tuberculose você tomou? 1-uma 2- Duas 3-nenhuma

18. Registro de vacina para tuberculose no cartão vacinal:

1-uma 2- Duas 3-Nenhuma 4-Não apresentou cartão

19. BCG: presença de cicatriz- 1-uma 2- Duas 3-nenhuma
20. Mantoux: 1- 0 –4mm 2- 5-9mm 3- ≥10mm 4- Não realizado 5- Sem informação
(não reator) (reator fraco) (reator forte)
21. Baciloscopia: 1- Positiva 2- Negativa 3- Não realizada
22. Cultura para Mtb: 1- Positiva 2- Negativa 3- Não realizada
23. Radiografia de Tórax
1- Normal 2- Infiltrativo 3- Cavidade 4- Micronodular 5- Alveolo-
intersticial
6- Alveolar 7- Derrame 8- Nodular 9- Mista 10- Não Realizado
24. Sorologia para HIV: 1- Positivo 2- Negativo 3- Indefinido 4- Não realizado
25. Padrão do complexo HLA:

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8.1- Introdução

Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S, Hartley C, O'Connell MA, Hopper RL. Comparison of Mycobacteria Growth Indicator Tube with BACTEC 460 for Detection and Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34(9):2236-2239.

Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine Production at the Site of Disease in Human Tuberculosis. *Infection And Immunity* 1993; 61(8):3482-3489.

Bennedsen J, Thomsen VO, Pfyfer GE, Funke G, Feldmann K, Beneke A, Jenkins PA, Hegginkbothom M, Fahr A, Hengstler M, Cleator G, Klapper P, Wilkins GL. Utility of PCR in Diagnosing Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34(6):1407-1411.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª edição. Rio de Janeiro. 2002.

Brasil^a. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Análise da situação dos casos de tuberculose segundo coorte e mês de tratamento. 2006. [On line]. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/sinanweb>>. Acesso em 04/04/2007.

Brasil^b. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2006. [on line] Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tuberculose_2006.pdf>. Acesso em 28/03/07.

Brasil^a. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica. 2007. [on line]. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21445>. Acesso em 28/03/07.

Brasil^b. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. 2007. [on line]. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21446>. Acesso em 31/05/07.

Brasil^c. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Um problema Mundial. 2007. [on line]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/datas/bcg/mundial.html>. Acesso em: 20/06/2007.

Brasil^d. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Tuberculose. 2007. [On line]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet>. Acesso em 20/06/2007.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. PNAS 2002; 99(6):3684-3689.

Carpentier E, Drouillard B, Dailloux M, Moinard D, Vallee E, Dutilh B, Maugein J, Bergogne-Berezin E, Carbonnelle B. Diagnosis of Tuberculosis by Amplicor Mycobacterium tuberculosis Test: a Multicenter Study. Journal of Clinical Microbiology 1995; 33:3106-3110.

Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC. Mycobacterium tuberculosis Complex differentiation using gyrB-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(7):745-748.

Cilliers FJ, Warren RM, Hauman JH, Wiid IJF, van Helden PD. Oligonucleotide (GTG)₅ as an Epidemiological Tool in the Study of Nontuberculous Mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology 1997; 35(6):1545-1549

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S,

Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrel BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393:537-544.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodríguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. Tuberculosis is deals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; 53:1305-1314.

Delacourt C, Poveda JD, Chureau C, Beydon N, Mahut B, de Blic J, Scheinmann P, Garrigue G. Use of Polymerase Chain Reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *The Journal of Pediatrics* 1995; 126(5):703-709.

D'Amato RF, Hochstein LH, Colaninno PM, Scardamaglia M, Kim K, Mastellone AJ, Patel RC, Alkhaja S, Tevere VJ, Miller A. Application of the Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* (PCR) Test to Specimens Other Than Respiratory Secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24:15-17.

Del Portillo P, Thomas MC, Martinez E, Maranon C, Valladares B, Patarroyo ME, López MC. Multiprimer PCR System for Differential Identification of *Mycobacteria* in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34(2):324-328.

DiDomenico N, Link H, Knobel R, Caratsch T, Weschler W, Loewy ZG, Rosenstraus M. COBAS AMPLICOR™: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR. *Clinical Chemistry* 1996; 42(12):1915-1923.

Dolin P, Dye C, Raviglione M, Kochi A. Current status of the global tuberculosis epidemic. In: *Nature* 1998; Disponível em: <http://www.nature.com/nature2/serv>.

Dubaniewicz A, Lewko B, Moszkowska G, Zamorska B, Stepinski J. Molecular subtypes of the HLA-DR antigens in pulmonary tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases* 2000; 4(3): 129-133.

Dunlap NE, Bass J, Fujiwara P, Hopewell P, Horsburgh CR, Salfinger M, Simone PM. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adult and children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161:1376-1395.

Flynn JL e Chan J. What's good for the host is good for the bug. *ELSEVIER: TRENDS in Microbiology* 2005; 13(3):98-102.

Frothingham R, Meeker-o'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on Variable Numbers of Tandem DNA Repeats. *Microbiology* 1998; 144:1189-1196.

Garcia GF, Corrêa PCRP, Melo MGT, Souza MB. Prevalência da infecção pelo HIV em pacientes internados por tuberculose. *J. Pneumologia* 2000; 26(4):189-193.

Hamid MNH, Ghader K, Pedran F. Allelic Distribution of Human Leucocyte in Iranian Patient with Pulmonary Tuberculosis. *Human Immunology* 2003; 64:124-129.

Hashimoto A, Koga H, Hohno S, Miyazaki Y, Kaku M, Hara K. Rapid Detection and Identification of *Mycobacteria* by Combined Method of Polymerase Chain Reaction and Hybridization Protection Assay. *Journal of Infection* 1996; 33:71-77.

Hongmanee P, Stender H, Rasmussen OF. Evaluation of a Fluorescence In Situ Hybridization Assay for Differentiation between Tuberculous and Nontuberculous *Mycobacterium* Species in Smears of Lowenstein-Jensen and *Mycobacteria* Growth Indicator Tube Cultures Using Peptide Nucleic Acid Probes. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(3):1032-1035.

José MES, Valdés L, Saavedra MJ, Vega JM, Alvarez D, Vinuela J, Penela P, Valle JM, Seoane R. Lymphocyte populations in tuberculous pleural effusions. *Ann Clin Biochem* 1999; 36:492-500.

Kaminski DA, Hardy D. Seletive utilization of DNA probes for identification of *Mycobacterium* species on the basis of cord formation in primary BACTEC 12B cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33(6):1548-1550.

Kato-Maeda M, Bifani PJ, Kreiswirth BN, Small PM. The nature and consequence of genetic variability within Mycobacterium tuberculosis. The Journal of Clinical Investigation 2001; 107(5):533-537.

Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World health Organization. Tubercle 1991; 72:1-6.

Kruuner A, Pehme L, Ghebremichael S, Koivula T, Hoffner SE, Mikelsaar M. Use of Molecular Techniques to Distinguish between Treatment Failure and Exogenous Reinfection with Mycobacterium tuberculosis. Clinical Infectious Diseases 2002; 35:146-155.

Lemaitre N, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, Cambau E, Derenne JP, Bricaire F, Grosset J, Jarlier V. Use of DNA fingerprinting for primary surveillance of nosocomial tuberculosis in a large urban hospital: detection of outbreaks in homeless people and migrant workers. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2(5):390-396.

OMS – Organização Mundial de saúde. Normas para la prevención de la transmisión de la tuberculosis em los establecimientos de asistencia sanitária em condiciones de recursos limitados. Geneva, World Health Organization. 2002.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Global Health Atlas. Country Profiles on Tuberculosis. Geneva, World Health Organization 2005. [on line]. Disponível em: <http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/index.asp?strSelectedCountry>. Acesso em 18/08/2007.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva, World Health Organization 2007. [on line]. Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em 28/03/07.

OMS^a – Organização Mundial de Saúde. Incidence of tuberculosis (per 100.000 population per year). Geneva, World Health Organization 2007. [on line]. Disponível em <http://www.who.int/whosis/indicators/2007TBIncidenceRate/en/index.html>. Acesso em 03/08/07.

Ravikumar M, Dheenadhayalan V, Rajaram K, Lakshmi SS, Kumaran PP, Paramasivan CN, Balakrishnan K, Pitchappan RM. Associations of HLA-DRB1,

DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. *Tubercle and Lung Disease* 1999; 79(5):309-317.

Severo LC, Ferreira RLT, Giustina MLD, Horn CL, Wolffenbuttel I. *Micobacterioses e SIDA (AIDS)*. In: *Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública*. Picon PD, Rizzon CFC, Ott WP. Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro 1993; pp. 619-630.

Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16(3):463-496.

Suffys P, Araújo MEI, Degraive WM. The Changing of the Epidemiology of Tuberculosis due to Molecular Strain Typing – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92(3):297-316.

Sun H, Wang Y, Ma X, Pei F, Sun H, Zhang Y, Yu B. A method of oligochip for single nucleotide polymorphism genotyping in the promoter region of the interleukin-1 beta gene and its clinical application. *Oligonucleotides* 2007; 17(3): 336-344.

Terán-Escandon D, Ortiz LT, Olvera AC, Avila GG, Marin MAV, Granados J, Selman M. Human Leukocyte Antigen-Associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. *CHEST* 1999; 115(2):428-433.

Torrea G, Levee G, Grimont P, Martin C, Chanteau S, Giquel B. Chromosomal DNA Fingerprinting Analysis Using the Insertion Sequence IS6110 and the Repetitive Element DR as Strain-Specific Markers for Epidemiological Study of Tuberculosis in French Polynesia. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33(7):1899-1904.

Trindade RC, Souza AM, Melo CB, Andrade DEMM, Alves MFS, Junior CLO. *Epidemiologia molecular de Mycobacterium tuberculosis no estado de Sergipe*. II Seminário de Pesquisa-FAP-SE 2004; 1-3.

Tufariello JM, Chan J, Flynn J. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *The Lancet Infectious Diseases* 2003; 3(9):578-590.

Vejbaesya S, Chierakul N, Luangtrakool K, Srinak D, Stephens HAF. Associations of HLA class II alleles with pulmonary tuberculosis in Thais. *European Journal of Immunogenetics* 2002; 29:431-434.

Vlaspolder F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic Value of an Amplification Method (Gen-Probe) Compared with That of Culture for Diagnosis of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33(10):2699-2703.

Young, DB. Blueprint for the white plague. *Nature* 1998; 393:515-516.

Wang J, Song C, Wang S. Association of HLA-DRB1 genes with pulmonary tuberculosis. *Zhonghua Jie He Hu Xi Za Zhi* 2001; 24(5):302-305.

8.2- Tuberculose e Resistência

Ahmad S, Mokaddas E. The occurrence of rare rpoB mutations in rifampicin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 26:205-212.

Aínsa JA, Martín C, Gicquel B. Molecular Approaches to Tuberculosis. *Molecular Microbiology* 2001; 42(2):561-570.

Albuquerque MFM, Leitão CCS, Campelo ARL, Souza WV, Salustiano A. Fatores prognósticos para o desfecho do tratamento da tuberculose em Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 2001; 9(6):368-374.

Albuquerque MFPM, Ximenes RAA, Lucena-Silva N, Souza WV, Dantas AT, Dantas OMS, Rodrigues LC. Factors associated with treatment failure, dropout, and death in a cohort of tuberculosis patients in Recife, Pernambuco State, Brazil. *Caderno de Saúde Pública* 2007; 23:105-114 [no prelo].

Balabanova Y, Ruddy M, Hubb, Yates M, Malomanova N, Fedorin I, Drobniewski F. Multidrug-resistant tuberculosis in Russia: clinical characteristics, analysis of second-line drug resistance and development of standardized therapy. *Eur J Clin Microbiol Dis* 2005; 24:136-139.

Barroso EC, Rodrigues JLN, Pinheiro VGF, Campelo CL. Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. *J Pneumol* 2001; 27(6):310-314.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª edição. 2002.

Buchmeier NA, Newton GL, Coledin T, Fahey RC. Association of micothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. *Molecular Microbiology* 2003; 47(6):1723-1732.

Butt T, Ahmad RN, Kazmi SY, Rafi N. Multi-drug resistant tuberculosis in Northern Pakistan. *Pak Med Assoc* 2004; 54(9):469-472.

Cheng G, Tolhurst R, Li RZ, Meng QY, Tang S. Factors affecting delays in tuberculosis diagnosis in rural china: a case study in four counties in Shandong Province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 99:355-362.

Constant CA, Ferreira PB, Valadas E, Antunes F. Tuberculose Multirresistente. *Acta Médica Portuguesa* 2004; 17:157-166.

Cox HS, Orozco JD, Male R, Ruesch-Gerdes S, Falzon D, Small I, Doshetov D, Kebede Y, Aziz M. Multidrug-resistant Tuberculosis in Central Asia. *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10(5):865-872.

Deun AV, Aung KJM, Chowdhury S, Saha S, Pankaj A, Ashraf A, et al. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in a rural area of Bangladesh and its relevance to the national treatment regimens. *Int. J. Tuberc Lung Dis* 1999; 3:143-148.

Dewan P, Sosnovskaja A, Thomsen V, Cicenaitė J, Laserson K, Johansen I, Davidaviciene E, Wells C. High prevalence of drug-resistant tuberculosis, Republic of Lithuania, 2002. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9:170-174.

Dyck RF, Klomp H, Marciniuk DD, Tan L, Stang MR, Ward HA, Hoepfner VH. The relationship between diabetes and tuberculosis in Saskatchewan: comparison of registered Indians other Saskatchewan people. *Can J Public Health* 2007; 98(1):55-59.

Eyob G, Guebregabher H, Lemma E, Wolday D, Gebeyehu M, Abate G, Rigouts L, Van Soolingen D, Fontanet A, Sanders E, Dorigo-Zetsma JW. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-infected and –uninfected Ethiopians and its impact on outcome after 24 months of follow-up. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8(11):1388-1391.

Farmer P, Kim JY. Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: introducing “DOTS-plus”. *JBM* 1998; 317:671-674.

Faustini A, Hall AJ, Perucci CA. Risk factors for multi-drug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax* 2006; 61:158-163.

Gilad J, Borer A, Riesenberk K, Peled N, Sci M, Schlaeffer F. Epidemiology and Ethnic Distribution of Multidrug-Resistant Tuberculosis in Southern Israel, 1992-1997. *CHEST* 2000; 117:738-743.

Gillespie SH. Evolution of Drug Resistance In *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46(2):267-274.

Granich RM, Oh P, Lewis B, Porco TC, Flood J. Multidrug resistance among persons with tuberculosis in California, 1994-2003. *JAMA* 2005; 293:2732-2739.

Health-Care.net: What're the risk factors for tuberculosis? [on line]. Disponível em: <http://respiratory-lung.health-cares.net/tuberculosis-risk-factors.php>. Acessado em 23 de março de 2007.

Hernandez-Garduno E, Perez-Gusman C. Appetite and tuberculosis: Is the lack of appetite an unidentified risk factor for tuberculosis? *Med Hypotheses* 2007; Mar 19. [Epub ahead of print].

Hsueh PR, Liu YC, So J, Liu CY, Yang PC, Luh KT. *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *Journal of Infection* 2005; xx:1-9.

Kart L, Altin R, Tor M, Gulmez I, Oymak SF, Atmaca HM, Erdem F. Antituberculosis drug resistance patterns in two regions of turkey: a retrospective analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2002; 16:1-6.

Lillebaek T, Andersen AB, Dirksen A, Smith E, Skovgaard LT, Kok-Jensen A. Persistent High Incidence of Tuberculosis in Immigrants in Low-Incidence Country. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8(7):679-684.

Melo FAF, Penteado CB, Almeida EA, Spada DTA, Santos MAA. Resistência pos-primaria de *Mycobacterium tuberculosis* às drogas antituberculosas segundo os antecedentes terapêuticos em uma unidade de referencia na cidade de São Paulo. *Bol Pneumol Sanit* 2002; 10(2):21-26.

Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Allele-Specific rpoB PCR Assays for Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Smears. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47(7):2231-2235.

Montoro E, Echemendia M, Lemus D, Marrero A, Llanes MJ, Valdivia JA. Vigilancia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas antituberculosas em Cuba, 1995-1998. *Biomédica* 2004; 24:80-84.

Moreira CA, Hernandez HL, Arias NL, Castano MC, Ferro BE, Jaramillos E. Initial drug resistance as a threat for tuberculosis control: the case of Buenaventura, Colombia. *Biomédica* 2004; 1:73-79.

Munssif SS, Bassoff T, Nivin B, Li J, Sharma A, Bifani P, Mathema B, Driscoll J, Kreiswirth BN. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant Tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 11(8): 1230-1238.

OMS – Organização Mundial de saúde. Directrices para el Tratamiento de la Tuberculosis farmacorresistente. WHO, Geneva. 1997.

OMS – Organização Mundial de saúde. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-TB drug resistance in the world. Prevalence of drug resistance. WHO, Geneva. 2004.

- OMS – Organização Mundial de Saúde. Guidelines for the Programmatic Management of Drug-resistant Tuberculosis. WHO, Geneva. 2006.
- Ormerod LP. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment. *British Medical Bulletin* 2005; 73 and 74:17-24.
- Pablos-Méndez A, Gowda DK, Frienden TR. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and Access to expensive drugs: a rational framework. *Bulletin of the World Health Organization* 2002; 80(6):489-500.
- Palmero D, Ritacco V, Ambroggi M, Natiello M, Barrera L, Capone L, Dambrosi A, Lonardo MD, Isola N, Poggi S, Vescovo M, Abbate E. Multidrug-Resistant Tuberculosis in HIV-Negative Patients, Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 8(9):965-969.
- Paramasivan CN, Venkataraman P. Drug resistance in tuberculosis in India. *Indian J Med Res* 2004; 120:377-386.
- Pereira M, Tripathy S, Inamdar V, Ramesh K, Bhavsar M, Date A, Iyyer R, Acchammachary A, Mehendale S, Risbud A. Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in seropositive and seronegative HIV-TB patients in Pune, India. *Indian J Med Res* 2005; 121:235-239.
- Pfyffer GE. Drug-resistant tuberculosis: resistance mechanisms and rapid susceptibility testing. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130:1909-1913.
- Pozniak A. Multidrug-resistant tuberculosis and HIV infection. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 953:192-198.
- Rao SN, Mookerjee AL, Obasanjo OO, Chaisson RE. Errors in the Treatment of Tuberculosis in Baltimore. *Clinical Investigations* 2000; 117(3):734-737.
- Sharma SK, Mohan A. Multidrug-resistant tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120:354-376.
- Siddiqi N, Shamin M, Hussain S, Choudhary RK, Ahmed N, Prachee, Banerjee S, Savithri GR, Alam M, Pathak N, Amin A, Hanief M, Katoch VM, Sharma SK, Hasnain

SE. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Patients in North India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46(2):443-450.

Surucuoglu S, Ozkutuk N, Celik P, Gazi H, Dinc G, Kurutepe S, Koroglu G, Havlucu Y, Tuncay G. Drug-resistant pulmonary tuberculosis in western Turkey: prevalence, clinical characteristics and treatment outcome. *Ann Saudi Med* 2005; 25:313-318.

Tanguis HG, Caylà JA, Olalla GP, Jansà JM, Brugal MT. Factors predicting non-completion of tuberculosis treatment among HIV-infected patients in Barcelona (1987–1996). *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2000; 4(1):55-60.

Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA, Giampaglia CM, Martins MC, Ueki SY, Chimara E, Silva CA, Cruz V, Waldman CC, Heyn I, Hirono IU, Riley LW. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9:970-976.

Timperi R, Han LL, Sloutsky A, Becerra MC, Nardell EA, Salazar JJ, Smith-Fawzi MC. Drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* isolates: five years' experience and insight into treatment strategies for MDR-TB in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9(2):175-180.

Vanacore P, Koehler B, Zacchini F, Bassetti D, Antonucci G, Hipólito G, Girardi E, the GISTA-SIMIT Study Group. Drug-resistant tuberculosis in HIV-infected persons: Italy 1999-2000. *Infection* 2004; 32:328-332.

Zaman K, Rahim Z, Yunus M, Arifeen SE, Baqui AH, Sack DA, Hossain S, Banu S, Islam MA, Ahmed J, Breiman RF, Black RE. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in selected urban and rural areas in Bangladesh. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2005; 37:21-26.

Yuen LKW, Leslie D, Coloe PJ. Bacteriological and Molecular Analysis of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Australia. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(12):3844-3850.

8.3- Genotipagem

Barnes PF, Cave MD. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. The New England Journal of Medicine 2003; 349(12):1149-1156.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. PNAS 2002; 99(6):3684-3689.

Brudey K, Gordon M, Mostrom P, Svensson L, Jonsson B, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Western Sweden. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42(7):3046-3051.

Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Viedma DG, Garzelli C, Gazolla L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, Van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ly HM, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofoa-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rusch-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, Van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMB Microbiology 2006; 6(23):2180-2196.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 1998; 393:537-544.

- Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis Isolates with Low Copy Numbers of IS6110 by Using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(5):1592–1602.
- Das S, Paramasivan DB, Lowry DB, Prahakar R, Narayanan PR. IS6110 restriction fragment polymorphism typing of clinical isolates of M. tuberculosis from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76:550–554.
- Eldholm V, Matee M, Mfinanga SGM, Heun M, Dahle UR. A first insight into the genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Dar es Salaam, Tanzania, assessed by spoligotyping. *BMC Microbiology* 2006; 6(76). Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1592105&blobtype=pdf>. Acesso em: 20/06/2007.
- Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, Varnerot A, Zarifi AZ, Tabatabaee J, Douraghei M, Ghazisaeedi K, Mansorri D, Bahadori M, Vincent V, Gutierrez C, Velayati AA. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. *Journal of Infection* 2004; 49:94-101.
- Ferdinand S, Valétudie G, Sola C, Rastogi N. Data mining of Mycobacterium tuberculosis complex genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validates the clonal structure of spoligotyping-defined families. *ELSEVIER* 2004; 155:647-654.
- Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C, Rastogi N. Molecular Typing of Mycobacterium tuberculosis Based on Variable Number of Tandem DNA Repeats Used Alone and in Association with Spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38(7):2520-2524.
- Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WD, Riley LW. Double-repetitive-element PCR method for subtyping Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *J. Clin. Microbiol* 1995; 33:1383–1384.

Frothingham R. A practical guide to Mycobacterium tuberculosis typing using variable-number tandem repeat (VNTR) analysis. Laboratory of Mycobacterial Genetics. Durham VA Medical Center 2001.

Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998; 144:1189-1196.

Gori A, Bandera A, Marchetti G, Esposti AD, Catozzi L, Nardi GP, Gazzola L, Ferrario G, van Embden JDA, van Soolingen D, Moroni M, Franzetti F. Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11(8):1242-1248.

Hermans PWM, van Soolingen D, van Embden JDA. Characterization of a Major Polymorphic Tandem repeat in Mycobacterium tuberculosis and its potential use in the epidemiology of Mycobacterium kansasii and Mycobacterium gordonae. *Journal of Bacteriology* 1992; 174 (12):4157-4165.

Hernández-Garduño E, Kunitomo D, Wang L, Rodrigues M, Elwood RK, Black W, Mak S, FitzGerald JM. Predictors of clustering of tuberculosis in Greater Vancouver: a molecular epidemiologic study. *CMAJ* 2002; 167(4):349-352.

Hopewell PC, Small P. Applications of Molecular Epidemiology to the Prevention, Control, and Study of Tuberculosis. *Tuberculosis* 1996; 113-127. in: *Tuberculosis*. Boston: Little, Brown, 1996.

Glynn JR, Yates MD, Crampin AC, Ngwira BM, Mwaungulu FD, Black GF, Chaguluka SD, Mwafulirwa DT, Floyd S, Murphy C, Drobniewski FA, Fine PEM. DNA Fingerprint Changes in Tuberculosis: Reinfection, Evolution, or Laboratory Error? *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 190:1158-1166.

Ijaz K, Yang Z, Matthews S, Bates JH, Caves MD. Mycobacterium tuberculosis transmission between cluster members with similar fingerprint patterns. *Emerging Infectious diseases* 2002; 8(11):1257-1259.

Kamerbeek J, Schouls L, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden JDA. Simultaneous detection and

strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol* 1997; 35:907–914.

Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *Journal of Applied Microbiology* 2003; 94:781-791.

Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, Small PM. Comparing Genomes within the Species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Research* 2001; 11:547-554.

Kremer K, VAN Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PWM, Marti'n C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, VAN Embden JDA. Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(8):2607-2618.

Kruuner A, Pehme L, Ghebremichael S, Koivula T, Hoffner SE, Mikelsaar M. Use of Molecular Techniques to Distinguish between Treatment Failure and Exogenous Reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 35(2):146-155.

Kwara A, Schiro R, Cowan LS, Hyslop NE, Wiser MF, Harrison SR, Kissinger P, Diem L, Crawford JT. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(6):2683-2685.

Lemaitre N, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, Cambau E, Derenne JP, Bricaire F, Grosset J Jarlier V. Use of DNA fingerprinting for primary surveillance of nosocomial tuberculosis in a large urban hospital: detection of outbreaks in homeless people and migrant workers. *Int J. Tuberc Lung Dis* 1998; 2(5):390-396.

MacAdam RA, Hermans PW, van Solingen D, Zainuddin ZF, Catty D, van Ebdem JD Dale JW. Characterization of a *M. Tuberculosis* sequence belonging to the IS3 family. *Molecular Microbiology* 1990; 4:1607-1613.

Magdalena J, Vachée A, Supply P, Locht C. Identification of a new DNA region specific for members of Mycobacterium tuberculosis Complex. *J. Clin. Microbiol* 1998; 36:937-943.

Mentiola MV, Martin C, Ota I, Gicquel B. Analysis of the region responsible for IS6110 RFLP in a single Mycobacterium tuberculosis strain. *Res. Microbiol* 1992; 143:767-772.

Mostrom P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods Used in the Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2002; 8(11):694-704.

Niemann S, Rusch-Gerdes S, Richter E, Thielen H, Heykes-Uden H, Diel R. Stability of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of Mycobacterium tuberculosis Strains in Actual Chains of Transmission. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38(7):2563-2567.

Richardson M, van der Spuy GD, Sampson SL, Beyers N, van Helden PD, Warren RM. stability of Polymorphic GC-Rich Repeat Sequence-Containing Regions of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(3):1302-1304.

Sampson S, Warren R, Richardson M, van der Spuy G, van Helden P. IS6110 Insertions in Mycobacterium tuberculosis: Predominantly into Coding Regions. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 9(39):3423-3424.

Savine E, Warren RM, van der Spuy G, Beyers N, van Helden P, Locht C, Supply P. Stability of Variable-Number Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units from 12 loci in serial isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(12):4561-4566.

Smith I. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16(3):463-496.

Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN, Thibert L, Kozak R, Joseph L, Schwartzman K, Behr MA. Sensitivities and Specificities of spoligotyping and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing Methods for

Studying Molecular Epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(1):89-94.

Sola C, Horgen L, Maisetti J, Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Spoligotyping followed by Double-Repetitive-Element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(4):1122-1124.

Sola C, Ferdinand S, Mammina C, Nastasi A, Rastogi N. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and Variable Number of Tandem DNA Repeats and Comparison with a Spoligotyping Database for Population Based Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(4):1559-1565.

Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution* 2003; 3:125-133.

Sola C, Ferdinand S, Sechi LA, Zanetti S, Martial D, Mammina C, Nastasi A, Fadda G, Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* molecular evolution in western Mediterranean Islands of Sicily and Sardinia. *Infection, Genetics and Evolution* 2005; 5:145-156.

Suffys PN, Araujo MEI, Degraeve WM. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing – A review. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 1997; 92:297-316.

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated High-Throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(10):3563-3571.

Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Insertion Sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28(12):2668-2673.

Torrea G, Levee G, Grimont P, Martin C, Chanteau S, Gicquel B. Chromosomal DNA Fingerprinting Analysis Using the Insertion Sequence IS6110 and the Repetitive Element DR as Strain-Specific Markers for Epidemiological Study of Tuberculosis in French Polynesia. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33(7):1899-1904.

van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin McAdam CR, Shinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol* 1993; 31:406–409.

Viedma DG, Bouza E, Rastogi N, Sola C. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes in Madrid and identification of two new families specific to Spain-related settings. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(4):1797-1806.

Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Borgdorff MW, Behr MA, van Helden PD. Calculation of the stability of the IS6110 banding patterns in patients with persistent *Mycobacterium tuberculosis* disease. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(5):1705-1708.

8.4- Antígeno Leucocitário Humano (HLA) – relacionado ao desenvolvimento da tuberculose doença no hospedeiro.

Amin LH, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredó CS, Rabahi MF, Melo MH, Ribeiro FC, Mello FC, Oliveira MM, Lapa ES Jr, Ottenhoff TH, Kritski AL, Santos AR. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilian subjects. *Mol Biol Rep* 2007. (Epub ahead of print) (Resumo).

Answers.com. Human Leukocyte Antigen [on line]. [Acesso em 18 de junho de 2007]. Disponível em: <http://www.answers.com/topic/human-leukocyte-antigen>.

Bellamy R. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. *Thorax* 1998; 53:588-593.

Bothamley GH. Treatment, Tuberculosis, and Human Leukocyte Antigen. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 166:907-908.

Charo J, Geluk A, Sundback M, Mirzai B, Diehl AD, Malmberg KJ, Achour A, Huriguchi S, van Meijgaarden KE, Drijfhout JW, Beekman N, van veelen P, Ossendorp F, Ottenhoff THM, Kiessling R. The identification of a common pathogen-specific HLA class I A*0201-restricted cytotoxic T cell epitope encoded within the heat shock protein 65. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31:3602-3611.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russel DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in Interferon γ gene-disrupted mice. *J. Exp. Med.* 1993; 178:2243-2247.

Dheenadhayalan V, Shanmugalakshmi S, Vani S, Muthuveeralakshmi P, Arivarigan G, Nageswari AD, Pitchappan RM. Association of interleukin-10 cytokine expression status with HLA non-DRB1*02 and *Mycobacterium bovis* BCG scar-negative status in South India pulmonary tuberculosis patients. *Infection and Immunity* 2001; 69(9):5635-5642.

Dubaniewicz A, Lewko B, Moszkowska G, Zamorska B, Stepinski J. Molecular subtypes of the HLA-DR antigens in pulmonary tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases* 2000; 4(3): 129-133.

Monte SJH, Moita Neto JM, Rampim GF, Shulzhenko N, Morgun A, DeLima MG. Polimorfismo do sistema HLA em uma amostra de mestiços da população de Teresina, Piauí. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2004; 50(4):422-426.

Gerluk A, van Meijgaarden KE, Franken KLMC, Drijfhout JW, D'Souza S, Necker A, Huygen K, Ottenhoff THM. Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* AG85B that are recognized by HLA-A*0201-restricted CD⁺ T cells in HLA-transgenic mice and humans. *The Journal of Immunology* 2000; 165:6463-6471.

Hamid MNH, Ghader K, Pedran F. Allelic Distribution of Human Leucocyte in Iranian Patient with Pulmonary Tuberculosis. *Human Immunology* 2003; 64:124-129.

Kaufmann SHE, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *JEM* 2005; 201(11):1693-1697.

Mehra NK, Kaur G. Gene map of human leukocyte antigen (HLA) region. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003; 5(24). Disponível em <http://www.expertreviews.org/>.

Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, Fakiola M, Hudson D, Peacock CS, Cordell HJ, Shaw MA, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes & Immunity* 2004; 5(1):63-67.

Pathan AA, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Latif M, McShane H, Pasvol G, Hill AVS, Lalvani A. High frequencies of circulating IFN- γ -secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted *Mycobacterium tuberculosis*-infected subjects without disease. *Eur. J. Immunol* 2000; 30: 2713-2721.

Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G, Hill AVS, Lalvani A. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN- γ -secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *The Journal of Immunology* 2001; 167:5217-5225.

Pospelova LE, Matrashkin AG, Larionova EE, Ereemeev VV, Mes'ko EM. The association of tuberculosis with the specificities of the HLA gene DRB1 in different regions of Tuva. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2005. 7:23-5.

Ravikumar M, Dheenadhayalan V, Rajaram K, Lakshmi SS, Kumaran PP, Paramasivan CN, Balakrishnan K, Pitchappan RM. Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. *Tubercle and Lung Disease* 1999; 79(5):309-317.

Selvaraj P, Nisha RD, Jawahar MS, Narayanan PR. Influence of HLA-DRB1 alleles on Th1 and Th2 cytokine response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2007; 87(6): 544-550.

Takiff H. El papel que cumplen los factores genéticos en humanos en la susceptibilidad a la tuberculosis. *Acta Cient Venez* 2001; 52(1):16-18.

Terán-Escandon D, Ortiz LT, Olvera AC, Avila GG, Marin MAV, Granados J, Selman M. Human Leukocyte Antigen-Associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. *CHEST* 1999; 115(2):428-433.

Thonnard J, Deldime F, Heusterspreute M, Delepaut B, Hanon F, De Bruyère M, Philippe M. HLA Class II Genotyping: Two Assay Systems Compared. *Clinical Chemistry* 1995; 41(4):553-556.

Valisca V, Oana R, Munteanu D, Zungun F, Constantinescu D, Carasevici E. HLA-A and -B phenotypes associated with tuberculosis in population from north-eastern Romania. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2004; 63(3-4): 209-221.

Vejbaesya S, Chierakul N, Luangtrakool K, Srinak D, Stephens HAF. Associations of HLA class II alleles with pulmonary tuberculosis in Thais. *European Journal of Immunogenetics* 2002; 29:431-434.

Vijaya LV, Rakh SS, Anu RB, Hari SPV, Pantula V, Jasti S, Suman LG, Murthy KJ. Role of HLA-B51 and HLA-B52 in susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol* 2006; 6(6): 436-439.

Wang J, Song C, Wang S. Association of HLA-DRB1 genes with pulmonary tuberculosis. *Zhonghua Jie He Hu Xi Za Zhi* 2001; 24(5):302-305. (Resumo).

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](#)