UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

SOLANGE ALVES VINHAS

ESTUDO SOBRE CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADOS DE PACIENTES COM E SEM LESÕES CAVITÁRIAS

Vitória
2013

SOLANGE ALVES VINHAS

ESTUDO SOBRE CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADOS DE PACIENTES COM E SEM LESÕES CAVITÁRIAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Doenças Infecciosas.
Orientador: Prof.Dr. Moisés Palaci
Co-Orientador: Dr. Philip Noel Suffys

Vitória
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Vinhas, Solange Alves, 1953-

V784e Estudo sobre características genéticas de Mycobacterium tuberculosis isolados de pacientes com e sem lesões cavitárias / Solange Alves Vinhas. – 2013.

140 f. Ilus.

Orientador: Moisés Palaci.
Coorientador: Philip Noel Suffys.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Mycobacterium tuberculosis. I. Palaci, Moisés. II. Suffys, Philip Noel. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE TESE DE DOUTORADO

A doutoranda SOLANGE ALVES VINHAS apresentou a tese intitulada: "**ESTUDO SOBRE CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADO DE PACIENTES COM E SEM LESÕES CAVITÁRIAS**" em sessão pública, no dia 30 de agosto de 2013, como requisito final para obtenção do titulo de **Doutora em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a tese para habilitar a bióloga SOLANGE ALVES VINHAS a obter o Grau de DOUTORA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 30 de agosto de 2013

Prof. Dr. Affânio Lineu Kritski
(Membro Externo)

Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes
(Membro Externo)

Profa. Dra. Liliana Cruz Spano
(Membro Interno)

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira
(Membro Interno)

Prof. Dr. Moises Palaci
(Orientador)

Prof. Dr. Philip Noel Suffys
(Coorientador)

Dedicatória

Dedicatória

Os que lutam...

"Há aqueles que lutam um dia e são bons;
há outros que lutam um ano e são melhores
Há aqueles que lutam muitos anos; e são muito bons;
Porém há aqueles que lutam toda a vida; esses são imprescindíveis."

Bertold Brecht

A três mulheres imprescindíveis:

Conceição Alves Vinhas , minha mãe, uma das mulheres mais corajosas que conheci; exemplo daqueles que lutam toda a vida.

Eliane Coelho Brasil e Elenice Moreira Lemos, duas grandes amigas, que frente às adversidades da vida continuam lutando, com alegria de viver.

A elas, com todo o meu respeito, eu dedico este trabalho.

Agradecimentos

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Moisés Palaci não apenas pela orientação mas por todos esses anos de convivência. Mesmo tendo diferentes pontos de vista, sempre acabamos em um ponto comum. Muito obrigada, Moisés.

Ao Dr. Philip Noel Suffys, por abrir as portas de seu laboratório no Instituto Oswaldo Cruz permitindo essa colaboração e pela co-orientação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Reynaldo Dietze, por seu apoio a esse trabalho e pela amizade desde o início do Núcleo de Doença Infecciosas.

À Dra. Kathleen D. Eisenach, pela amizade e pelo incentivo para que eu fizesse o doutorado e pelos ensinamentos a cerca da técnica de RFLP.

À Dra. Lucilaine Ferrazoli (Lucy), pela primeiras lições em como utilizar o programa Bio-Numerics.

Ao Dr. Harrison Magdinier Gomes, pelos ensinamentos sobre *Spoligotyping* e pela amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Micobactérias, em especial, a Márcia Quinhones e Sidra Vasconcelos.

Ao Prof. Dr. Fausto Edmundo Pereira por sua disposição inesgotável em esclarecer nossas dúvidas e por seus contínuos ensinamentos.

À Dra. Ethel Leonor Noia Maciel, nossa colaboradora nas análises estatísticas, grande amiga e incentivadora desde o início do Núcleo de Doença Infecciosas.

Ao Dr. Valdério do Valle Dettoni, nosso colaborador, sempre disposto a esclarecer nossas dúvidas .

À Dra. Elenice Moreira Lemos, amiga e companheira de trabalho, sempre disposta a colaborar na leitura dos manuscrito. Obrigada pelo grande incentivo para a realização deste trabalho de tese.

À Juliana Brambrila Carnielli pela ajuda inestimável e a todas as amigas do Laboratório de Leishmaniose do NDI pela amizade e apoio.

À amiga Renata Lyrio Peres Nóbrega, companheira de trabalho em todos os momentos, sempre disposta a auxiliar no trabalho diário de bancada. Obrigada por compreender algumas das minhas limitações e por estar ao meu lado nos momentos que mais necessitei.

Aos farmacêuticos Hebert Silva Marques e Paola Poloni Lobo de Aguiar, que começaram no Núcleo de Doenças Infecciosas como estudantes e tiveram participação ativa nesta tese, realizando um trabalho de excelente qualidade.

À João Batista Pereira da Silva, técnico do laboratório de micobacteriologia, por sua incansável ajuda. Obrigada , amigo.

Aos colegas do Laboratório de Micobacteriologia, Fabíola Ribeiro, Tatiana de Rezende Có Pelição, Débora Corona, Hildete Nunes, Luiz Guilherme S. Castelani, Pedro Souza de Almeida Jr. e Maria José Chiabai, pelo companheirismo e disposição para me ajudar.

À Priscila Formiga Figueiredo, gerente de dados do Núcleo de Doenças Infecciosas, no auxílio na manipulação das planilhas de dados.

A Lorenzo Lyrio Stringari, pela grande ajuda no trabalho com as figuras inseridas e formatação deste trabalho.

Às colegas de trabalho, Carla Barone Cunha, Valéria Pereira Cabral, Luciana Bueno de Freitas e Laudicéia Pereira Rosa Couto pela disposição para ajudar sempre.

Às recepcionistas Rosiane Corrêa Custódio e Ariany Fernandes da Silva pelo apoio diário. Obrigada meninas.

À todos do NDI-UFES que de certa forma contribuiram para realização deste trabalho.

Ao Sr. Henri Bergs, pela assistência contínua com o programa Bio-Numerics.

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento e apoio na realização deste estudo.

Agradecimentos Especiais

A Adriano de Araújo Lima Faquini, meu marido, por compreender minha ausência durante a realização desse trabalho.

À Sra. Adahyr Ribeiro do Valle de Araújo Lima, por tão generosamente me receber em sua casa nos períodos que precisei passar no Rio de Janeiro.

À minha querida amiga Eliane Coelho Brasil, por também por tão generosamente me receber em sua casa me dando todo o apoio nos períodos que precisei passar no Rio de Janeiro.

À minha amiga-irmã, Laura Maria Cardoso Pereira, ao seu marido Rinaldo Gama e ao seu filho Gabriel Gama, por terem me acolhido em sua casa em São Paulo e pela amizade desde nossos 11anos.

A bactéria...

“It is not the strongest of the species that survives, or the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change”

Charles Darwin

O hospedeiro...

Pneumotórax

Febre, hemoptise, dispnéia e suores noturnos.
A vida inteira que podia ter sido e que não foi.
Tosse, tosse, tosse.

Mandou chamar o médico:
- Diga trinta e três.
- Trinta e três... trinta e três... trinta e três...
- Respire.

- O senhor tem uma escavação no pulmão esquerdo e o pulmão direito infiltrado.
- Então, doutor, não é possível tentar o pneumotórax?
- Não. A única coisa a fazer é tocar um tango argentino.

Manoel Bandeira

Resumo

Resumo

Introdução: Baseado na hipótese de que a variabilidade genética de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) pode influenciar a virulência e a gravidade da doença os perfis genéticos de isolados clínicos de MTB foram avaliados para detectar associação entre diversidade genética e gravidade da doença. **Objetivos:** Analisar características genéticas de isolados de MTB e verificar sua possível associação com a gravidade da TB pulmonar. **Métodos:** Estudo retrospectivo, caso controle, conduzido em Vitória-ES, utilizando isolados de MTB (2003 a 2006, n=214) de pacientes com TB pulmonar, cavitária (127) e não cavitária (87). Realizou-se genotipagem por meio de RFLP-IS*6110*, *Spoligotyping*, MIRU-VNTR 24 loci, e a análise de deleções e inserções, como RD^{Rio}, RD174 utilizando PCR multiplex, bem como a detecção do $Ag85C^{103}$. Realizou-se análise estatística, para verificação dos padrões de distribuição das variáveis, seguida de análises bivariadas para verificação de associações entre elas, empregando-se os teste exato de Fisher ou Chi-quadrado, ambos com 95% de intervalo de confiança e nível de significância (ρ) < 0,05. **Resultados:** Após a regressão logística, as variáveis que contribuíram no modelo explicativo da doença foram baciloscopia (OR_{ajust} = 5,96; IC= 2,58-13,73) e produção de escarro (OR_{ajust} = 4,55; IC= 1,28-16,12). Não houve associação estatisticamente significativa com o restante das variáveis.A família LAM foi a mais frequente entre os dois grupos analisados, representando 65 (62%) dos isolados no grupo cavitário e 40 isolados (38%) do grupo não cavitário. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à deleção RD^{Rio} (*p*=0,65) e com relação à deleção RD174 (*p*=0,65). Dentre os 205 isolados analisados, 25 (12%) isolados do grupo não cavitário e 43 (21%) do grupo cavitário, estavam em *cluster*. não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de *clusters* e os grupos analisados (*p*= 0,4). **Conclusões:** Foi determinado o perfil genotípico dos isolados de pacientes com doença pulmonar, cavitária e não cavitária. Não houve associação entre a presença de cavidade e os genótipos encontrados. Não houve associação do genótipo com nenhum dos marcadores moleculares avaliados.

Palavras Chaves: *Mycobacterium tuberculosis*, genotipagem molecular, RFLP-IS*6110*, MIRU-VNTR 24 loci , Spoligotyping.

Abstract

Abstract

Background: Based on the hypothesis that genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) could influence virulence and immunopathology we analyzed genetic profiles of different MTB strains in order to detect relatedness between genetic diversity and presence of cavity (disease severity). **Methods:** We conducted a retrospective molecular study in Vitória – ES, based on TB strains (2003 to 2006, n = 214) from patients with pulmonary cavitary and non-cavitary TB using IS6110-RFLP, Spoligotyping and MIRU-VNTR methodologies. **RESULTS**: Initially, we compared the association of the demographic and clinical characteristics of patients with the presence of cavities. After logistic regression the variables that most contributed to explain the model of the disease were smear positive (OR_{ajust} = 5.96; IC= 2.58-13.73) and sputum production (OR_{ajust} = 4.55; IC= 1.28-16.12), there was no statistically significant association with the remaining variables. The LAM family was the most frequent within the samples of the two groups analyzed, representing 65 (62%) of the isolates in the cavitary group and 40 isolates (38%) of the non-cavitary. After comparing the proportions of LAM and other spoligotyping families there was no statistically significant difference between the groups (p=0.17). In relation to deletions RD^{Rio} (p=0.65) and RD174 (p=0.65) there were no statistically significant difference between the groups. Amongst the 205 isolates analyzed, 25 (12%) belonging to the non-cavitary group and 43 (21%) belonging to the cavitary group, were grouped in clusters. The statistical analysis of the association of the occurence of clusters with the presence of cavity showed no statistically significant difference between the quantity of clusters and the groups that were analyzed, (p= 0.4). **Conclusion:** The genotipic profile for the isolates from patients with cavitary and non-cavitary disease was determined. Our data showed that LAM9 was the most frequent among the strains between cavitary and non-cavitary groups, corroborating findings that this family is the most frequent in Brasil. There were no statistical differences that could show association among the variables analyzed related to presence of cavity or disease severity.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, molecular genotyping, Spoligotyping, RFLP-IS6110, MIRU-VNTR 24 loci.

Listas

Lista de Equações

Equação 1: Cálculo da diversidade alélica 68

Equação 2: Cálculo do poder discriminatório das técnicas moleculares 69

Equação 3: Cálculo da taxa de agrupamento 69

Lista de Tabelas

Tabela 1: Diferentes denominações dos *loci* MIRU-VNTR 24 *loci* 48

Tabela 2: Correspondência de nomenclatura do MTBC definidas por *spoligotyping* e por LSP. 50

Tabela 3: Comparação da terminologia por *Spoligotyping* e SNP 52

Tabela 4: Análise das variáveis demográficas e clínicas dos pacientes com TB cavitária e TB não cavitária. 80

Tabela 5: Frequência de cada *Shared International Type* (SIT), subfamílias e perfis de *Spoligotyping* pelo *SITVITWEB*. 84

Tabela 6: Frequência de padrões novos encontrados e probabilidades pelo *Spotclust* 85

Tabela 7: Análise dos resultados de *Spoligotyping* pelo banco MIRU-VNTR plus e resultados de SNPs e deleções. 87

Tabela 8: Frequência dos SIT e subfamílias associados aos Isolados RD^{Rio}. 90

Tabela 9: Diversidade alélica de cada *lócus* e número de ocorrência de cada alelo. 95

Tabela 10: Número de cópias dos MIRU 02 e MIRU 40 dos isolados RD^{Rio} e non-R^{Rio} 96

Tabela 11: Número de perfis encontrados, agrupamentos e poder discriminatório do RFLP e MIRU-VNTR 24 loci. 97

Lista de Figuras

Figura 1: Progressão do curso natural da tuberculose. 39

Figura 2: Diagrama dos genes deletados na LSP RD^{Rio}.. 41

Figura 3: Cromossomo do *M. tuberculosis*, cepa hipotética. 44

Figura 4: Distribuição geográfica global das principais linhagens de *M. tuberculosis* no SITVITWEB.. 45

Figura 5: Estrutura populacional global e distribuição geográfica de *M. tuberculosis* 51

Figura 6: Sítios de restrição da enzima *Mnl*I no produto amplificado. 73

Figura 7: Fluxograma da seleção dos pacientes e dos métodos moleculares utilizados no estudo. 78

Figura 8: Imagem dos espoligotipos de 43 dos isolados testados. 82

Figura 9: Distribuição das diferentes famílias de *Spoligotyping* pela análise no *SITVITWEB*. 83

Figura 10: Distribuição das diferentes famílias de *Spoligotyping* pela análise no banco de dados *MIRU VNTR plus*. 86

Figura 11:PCR-Multiplex RD^{Rio} de isolados de *M. tuberculosis*. 89

Figura 12:Dendograma e perfil de RFLP-IS*6110* dos isolados que compõem a família 14 93

Figura 13:Distribuição dos tamanhos de *Clusters* obtidos com base no RFLP-IS*6110* e MIRU-VNTR 24 *loci*. 96

Figura 14: Alinhamento da sequência do fragmento do gene *pks*15/1. 97

Lista de Abreviaturas e Siglas

AIDS - *Acquired Immunedeficiency Syndrome* - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa

CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DNA - *Desoxiribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucléico

DVR - *Direct Variable Repeat* - Repetições Variáveis Diretas

H – *Haarlem*

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* - Vírus da Imunodeficiência Humana.

IL - Interleucina.

IS*6110* - Sequência de Inserção *6110*

kb - kilobase

LAM - *Latin American Mediterranean*

LACEN-ES - Laboratório Central de Saúde do Estado do Espírito Santo.

LSP - *Large Sequence Polymorphism* - Polimorfismo em Sequências Longas.

MIRU - *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* - Unidades Repetitivas Micobacterianas Intercaladas.

MTB - *Mycobacterium tuberculosis.*

MTBC - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

NDI-UFES - Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

Pb - Pares de Base.

PGL - *Phenolic Glycolipid* - Glicolipídio fenólico.

RD - *Region Differences* - Regiões de Diferenças.

REDE-TB - Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose.

RFLP- IS*6110* - *Restriction Fragment Lenght Polymorphism* - Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição baseado no IS*6110*.

SIT - *Shared International Type.*

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* - Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

TB - Tuberculose.

VNTR - *Variable Number in Tandem Repeats* - Repetições de Número Variável em Sequência.

WHO - *World Health Organization.*

Sumário

1. Prefácio **24**

2. Introdução **26**

3. Revisão de Literatura **29**

3.1Aspectos Históricos 29
3.2Aspectos Epidemiológicos 32
3.3Agente Etiológico 33
3.4Transmissão de *M. tuberculosis* 34
3.5Patogênese 35
3.6Fatores relacionados com o MTB que podem interferir na patogênese das lesões 39
3.7Métodos Moleculares para Identificação de *M. tuberculosis* 41

4. JUSTIFICATIVA **55**

5. OBJETIVOS **57**

5.1Objetivo Geral 57
5.2Objetivos Específicos 57
5.2.1 Caracterizar o perfil clínico e demográfico dos pacientes com tuberculose pulmonar não cavitária e cavitária. 57
5.2.2 Caracterizar o perfil genotípico de isolados de MTB provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar não cavitária e cavitária. 57
5.2.3 Verificar a associação dos perfis genotípicos obtidos à gravidade da doença pulmonar. 57
5.2.4 Analisar a existência de alterações (inserções e deleções) em sequências gênicas definidas dos isolados de *M. tuberculosis* (pks15/1 e RD^{Rio}) e associá-las a gravidade da doença. 57

5.2.5 Avaliar o poder discriminatório das técnicas RFLP-IS6110 e MIU-VNTR 24 loci e sua concordância com os dados encontrados na investigação de *clusters*. 57

6. MATERIAIS E MÉTODOS 59

6.1Hipótese 59
6.2Local e Modelo do Estudo 59
6.3Caracterização das cepas de origem pulmonar: 60
6.4Definição de Caso 61
6.4.1 Caso 61
6.4.2 Controle 62
6.5Cultura e Identificação dos isolados selecionados para o estudo 62
6.6Técnicas de Identificação Molecular 62
6.6.1 Análise do Tamanho dos Fragmentos de Restrição baseado na sequência de inserção IS*6110* (RFLP- IS*6110*) 62
6.6.2 Análise da Região Direct Repeat (DR)– Spacer Oligonucleotide Typing (Spoligotyping) 65
6.6.3 Análise do *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit* (MIRU) – Número Variável de Repetições em Sequência 67
6.7Analise computacional 67
6.8Cálculo da Diversidade Alélica 68
6.9Poder Discriminatório 68
6.10Taxa de Agrupamento (*Clustering Rate*) 69
6.11Caracterização da linhagem RD^{Rio} 70
6.11.1 Detecção da LSP - Deleção RD^{Rio} 70
6.11.2 Detecção da Deleção da Região RD174 71
6.12Detecção do SNP $Ag85C^{103}$ (G103A) por PCR-RFLP (Gibson *et al.*, 2008). 72
6.13Detecção dos SNPs MTB I a VII 74
6.14Análise da sequência de fragmento do gene *pks*15/1 74
6.15Cálculo do tamanho amostral 75
6.16Análise Estatística 76
6.17Aspectos Éticos 76

7. Resultados 78

7.1Isolados 78
7.2Dados demográficos e clínicos 78
7.3Identificação Molecular 81
7.3.1 Spoligotyping 81
7.3.2 Detecção da deleção RD^{Rio} 88
7.3.3 Detecção de deleção na região RD174 90
7.3.4 Identificação e avaliação do $Ag85C^{103}$ 91
7.3.5 RFLP- IS*6110* 91
7.3.6 MIRU-VNTR 94
7.3.7 Comparação entre a técnica MIRU-VNTR 24 *loci* e a técnica RFLP-IS*6110* 96
7.3.8 Análise da sequência de fragmento do gene *pks15/1* 97

8. Discussão 100

9. Conclusões 108

10. Comentários 110

11. Referências 112

12. Anexos 131

12.1Anexo 01: Parecer do CONEP para o Ensaio Clínico 131
12.2Parecer do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. para o Projeto de Tese 132
12.3Formulário de Avaliação Inicial dos Pacientes 133
12.4Anexo 4: Formulário de Avaliação de Raio-X de Tórax 140

Prefácio

1. Prefácio

No início de 2002 em parceria com a Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB) e com o apoio financeiro do Projeto Institutos do Milênio – CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), o Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI-UFES) consolidou uma parceria com os municípios da região metropolitana de Vitória (Vitória, Vila Velha, Cariacica e Serra) e o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-ES), para realização de ensaios clínicos em tuberculose. Uma consequência imediata desta parceria foi a implantação de uma rede diagnóstica com a padronização e informatização do banco de dados de tuberculose (TB) da região metropolitana de Vitória que antes era fragmentada nos respectivos municípios. Paralelamente a isto, o NDI também implantou, nos quatro municípios supracitados, um sistema simples de cultura de escarro utilizando o método de Ogawa-Kudoh. Isto permitiu um incremento no diagnóstico da tuberculose nos municípios trabalhados na ordem de 24%.

A partir dessa colaboração entre os laboratórios das Secretarias Municipais de Saúde e o NDI-UFES, foi possível a implantação de um banco de dados eletrônico denominado TB *Notes* para os casos de tuberculose e a criação de uma coleção de cepas isoladas de pacientes destes municípios.

Concomitante a este processo de organização de rede de laboratórios, o NDI-UFES obteve financiamento do CNPq (Edital Doenças Negligenciadas/2006) para implantação da técnica de polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição de IS*6110* (RFLP- IS*6110*) para análise de cepas de *M. tuberculosis* (MTB). Com os recursos disponibilizados por este projeto foi possível equipar e iniciar a análise molecular das cepas de MTB, em colaboração com o Dr. Philip Noel Suffys responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz - RJ).

Para a realização deste projeto dispusemos de isolados bem caracterizados (dados clínicos e laboratoriais dos pacientes dos quais foram obtidos) provenientes de ensaios clínicos exploratórios realizados pelo NDI-UFES. Com estes isolados foi realizada a caracterização genotípica e a análise de inserções e/ou deleções de sequências gênicas presentes no MTB e assim contribuir para o conhecimento do mecanismo que leva a diferentes quadros clínicos de tuberculose e/ou extensão da doença.

Introdução

2. Introdução

O *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é o agente etiológico da TB, um patógeno estrito que causa uma das doenças mais antigas do mundo e que transcendeu o tempo e os esforços da humanidade em erradicá-lo. Esse é um dos patógenos humanos de maior sucesso, sobrevivendo em focos latentes da infecção em um terço da humanidade, ainda assim causando necrose pulmonar em um número suficiente de indivíduos para assegurar sua transmissão (BRITTON *et al.*, 2007).

A tuberculose (TB) é uma importante causa de morbidade e mortalidade, apesar de ser passível de prevenção e cura. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em torno de 8,7 milhões de novos casos de TB surgem a cada ano. Isto resulta em um milhão de mortes anuais (WHO, 2012). As mais altas incidências da doença estão geralmente associadas a fatores como: baixo nível sócio-econômico, aglomerações, desnutrição e pobreza, típicos de nações em desenvolvimento. Nas últimas duas décadas, este panorama foi agravado com a pandemia do HIV (*Human Immunodeficiency Virus* - Vírus da Imunodeficiência Humana) e o surgimento de bacilos resistentes a múltiplos fármacos, resultante de terapias inadequadas e uso indiscriminado de antibióticos (RUFFINO-NETTO, 2002; AHMAD, 2011).

O sequenciamento do genoma de MTB possibilitou o progresso do conhecimento da biologia do bacilo, apesar de ainda se saber muito pouco acerca da virulência e patogenicidade (HUARD *et al.*, 2006). Apesar de o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) ser considerado monomórfico, isto é, ser relativamente homogêneo em termos de sequência de DNA (*Desoxiribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucleico), um número cada vez maior de variações genéticas inerentes às espécies e cepas, tem sido descritas. Essas diferenças têm sido utilizadas como marcadores para estudos epidemiológicos e filogenéticos. O uso destes marcadores facilitou a investigação da disseminação do microrganismo, permitindo a diferenciação entre transmissão recente, reativação endógena e re-infecção. A utilização desses marcadores permitiu também a detecção de contaminação cruzada de culturas de micobactérias em laboratórios e possibilitou a detecção de certas linhagens de MTB que prevalecem em determinados nichos ecológicos. Além disso auxilia no conhecimento sobre virulência, transmissibilidade e resistência adquirida do bacilo da TB aos antimicrobianos (AHMAD, 2011).

Embora técnicas para estudos globais de genotipagem, tais como tipagem por (RFLP-IS*6110*), *Spacer Oligonucleotide Typing* (*Spoligotyping*), *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats* (MIRU-VNTR), tipagem por deleções e identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), sejam muito úteis para o entendimento acerca da estrutura das populações de MTBC, estudos mostrando associação entre os resultados de genotipagens moleculares de isolados de MTB e a gravidade da tuberculose são escassos na literatura (GAGNEUX *et al.*, 2006). Neste sentido, a caracterização genotípica e a análise de genes envolvidos na virulência de isolados de MTB obtidos de pacientes com formas da tuberculose pulmonar cavitária e não cavitária poderiam contribuir para o entendimento dos diferentes quadros clínicos da tuberculose e/ ou extensão da doença.

Revisão de Literatura

3. Revisão de Literatura

A TB é uma das doenças transmissíveis mais antigas do mundo e tem afetado o homem ao longo da história, desde a pré-história até os dias de hoje, deixando sua marca na humanidade em diferentes áreas como na arte, literatura, poesia e música. Considerada uma “doença romântica”, influenciou também a ciência médica e o cuidado com os pacientes. Antigamente pensava-se que havia uma associação direta da tuberculose com a genialidade, pois muitas das grandes contribuições das artes e literatura foram feitas por pessoas ativamente afetadas pela tuberculose. A lista de personalidades que sofriam de tuberculose inclui poetas e autores como John Keats e Edgar Allen Poe, músicos como Nicolo Paganini e Frederic Chopin (DANIEL, 2006). A poesia e literatura brasileiras também foram afetadas pela TB tendo em sua lista poetas como Castro Alves e Manoel Bandeira, entre outros (ROSEMBERG, 1999).

A tuberculose é hoje a principal infecção causadora de morte em adultos no mundo devido a um único agente infeccioso. O agente etiológico da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), já levou a óbito mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiano (DANIEL, 2006; LEÃO e PORTAELS, 2007).

3.1 Aspectos Históricos

A origem do gênero *Mycobacterium* é datada de mais de 150 milhões de anos (DANIEL, 2006). Um ancestral de MTB foi provavelmente contemporâneo aos hominídeos e com eles evoluiu no leste da África há três milhões de anos. Membros recentes do complexo MTB podem ter se originado a partir de um ancestral comum há cerca de 20.000 – 35.000 anos (NAVIN *et al.*, 2002; GUTIERREZ *et al.*, 2005).

A TB foi a primeira doença a ser estudada utilizando métodos biomoleculares modernos, devido à combinação de uma parede celular resistente do bacilo e DNA rico em GC (guanina-citosina), o que levou a uma excelente preservação do DNA (DONOGHUE *et al.*, 2004). Esta doença era muito difundida no Egito e Roma antigos (ZINK *et al.*, 2003; DONOGHUE *et al.*, 2004); existia em Bornéu antes mesmo de qualquer contato europeu (DONOGHUE *et al.*, 2004) e na América pré-colombiana

(SALO *et al.*, 1994; KONOMI *et al.*, 2002; SOTOMAYOR *et al.*, 2004; DONOGHUE, 2008). Muito se indagava se a tuberculose teria surgido nas Américas com a vinda dos colonizadores a este continente. Contudo a identificação de DNA micobacteriano em uma lesão pulmonar, típica de tuberculose, em múmia peruana (SALO *et al.*, 1994) fortalece a teoria de que o bacilo da tuberculose já existiria antes da vinda dos colonizadores.

A TB foi conhecida por uma variedade de denominações sendo uma delas a denominação grega “phthisis”, adaptada à língua portuguesa como tísica. Por volta de 460 AC, a tísica foi identificada por Hipócrates como a doença de maior disseminação na época que, mais comumente, acometia jovens entre 18 e 35 anos de idade e quase sempre era fatal. O definhamento progressivo, ou consumação corporal, conduziu à denominação de *consumption*, em inglês, havendo registros bíblicos com esse significado no antigo testamento (DANIEL, 2006).

No início do século XVII ocorreu a epidemia de TB, que continuou pelos 200 anos subsequentes. Neste período foi denominada de "Grande Peste Branca". O desenvolvimento urbano e consequentemente a alta densidade populacional e precárias condições sanitárias que caracterizavam cidades europeias e norte-americanas propiciaram a disseminação da doença.

Embora o bacilo já existisse na América antes da chegada de Colombo, a doença causada por este agente era rara entre os nativos (LEÃO e PORTAELS, 2007).

Após a descoberta da TB, alguns colonizadores jesuítas chegavam ao Brasil doentes, mantinham contato permanente com os índios e infectavam dezenas de nativos. Acredita-se que o padre Manoel da Nóbrega, que chegou ao Brasil em 1549, tenha sido o primeiro morador ilustre a morrer da doença (CAMPOS e PIANTA, 2001).

A partir do século XVII descrições anatomopatológicas precisas começaram a aparecer. Nesta época Franciscus Sylvius de la Böe (1614-1672) foi o primeiro a descrever a presença de tubérculos, como mudança consistente e característica nos pulmões e em outras áreas de pacientes tísicos; podendo as lesões dos tubérculos progredir para úlceras e cavidades. O médico inglês Richard Morton (1637-1698) acreditava que a doença tinha três estágios: inflamação (formação do tubérculo), ulceração e tísica. Tanto Franciscus Sylvius de la Böe como Morton consideravam a doença como hereditária, embora Morton não descartasse a transmissão por contato íntimo (LEÃO e PORTAELS, 2007).

Gaspard Laurent Bayle (1690-1752) provou que os tubérculos eram a causa da doença. O nome tuberculose foi cunhado em 1839 pelo professor de medicina alemão Johann Lukas Schölein (1793-1864) para descrever doenças com tubérculos, que considerava escrófula e tísica como entidades separadas. René Théophile Laënnec (1781-1878) propôs que todas a manifestações de tísica caracterizadas por lesões na forma de tubérculos, acometendo qualquer órgão, constituíam uma só doença; as demais deveriam ser classificadas como outras formas de tísica (LEÃO e PORTAELS, 2007).

O médico inglês Benjamin Marten (1690-1752) em sua publicação "A New Theory of Consumptions", em 1720, foi o primeiro a conjecturar que a TB poderia ser causada por "criaturas vivas minúsculas", que uma vez dentro do corpo do paciente poderiam gerar lesões e sintomas da tísica. Este autor também declarou que a TB poderia ser adquirida por uma pessoa sadia que incorporasse parte da exalação que um paciente com TB emitisse de seus pulmões (LEÃO e PORTAELS, 2007).

O dia 24 de março de 1882 ficou marcado na história da tuberculose, quando em Berlin, Hermann Heinrich Robert Koch (1843-1910) proferiu, diante de uma plateia cética, sua apresentação *Die Aetiologie der Tuberculose* (A Etiologia da Tuberculose), anunciando o agente causador da TB. Ele não apenas convincentemente demonstrou a causa bacteriana da doença como estabeleceu critérios aplicados à maioria das doenças causadas por bactérias utilizados até hoje. Esses critérios são denominados "Postulados de Koch". Robert Koch isolou e cultivou o *M. tuberculosis*, a partir de tubérculos macerados, identificando-o como o agente etiológico da tuberculose e que passou então a ser conhecido como bacilo de Koch (DANIEL, 2005).

Em 1890, Koch produziu um filtrado de cultura que erroneamente afirmava poder ser utilizado na cura da doença, mas que mais tarde, após ser parcialmente purificado, tornou-se o principal meio de diagnosticar uma infecção, conhecido atualmente como teste de tuberculina ou PPD. Koch, em 1905, recebeu o Prêmio Nobel de Medicina ou Fisiologia por sua descoberta do agente causador da Tuberculose. Clemens von Pirquet desenvolveu o Teste Tuberculínico em 1907 e, 3 anos depois, utilizou-o para demonstrar a infecção tuberculosa latente em crianças sintomáticas (DANIEL, 2005).

Em 1908 Albert Calmette e Camille Guérin isolaram *M. bovis* de tubérculos bovinos e cresceram os bacilos em meio de cultura contendo bile bovina. Depois de 230 passagens sucessivas feitas no laboratório entre 1908 e 1921 os pesquisadores

observaram uma variante morfológica, que se mostrava avirulenta em muitos animais, e que os imunizava contra o MTB virulento. Em 1921, esta variante foi utilizada pela primeira vez em humanos para imunizar uma criança cuja mãe havia morrido durante o parto, vítima de tuberculose. Conhecida como BCG (bacilo Calmette e Guérin), esta é a vacina mais utilizada mundialmente no combate à tuberculose, através da administração profilática, em crianças, de bacilos vivos atenuados (LEÃO e PORTAELS, 2007).

O avanço mais importante na luta contra a tuberculose veio em meados da segunda guerra mundial, com a introdução de fármacos como estreptomicina, isoniazida e ácido para-amino-salicílico, que revolucionaram a quimioterapia contra a doença, reduzindo consideravelmente a mortalidade. Mais tarde surgiram outros fármacos como o etambutol e a rifampicina. No final de 1970 e início de 1980, com os regimes de tratamento de TB e a melhora nos sistemas de saúde pública, a taxa da doença diminuiu em países industrializados, tendo sido considerada por muitos como controlada. Porém, no período entre 1980 e 1990 o aparecimento do HIV e o ressurgimento da tuberculose em vários países desenvolvidos, respectivamente, levaram a OMS a adotar uma série de medidas e planos para o controle da doença (LEÃO e PORTAELS, 2007; WHO, 2009).

3.2 Aspectos Epidemiológicos

A incidência elevada da TB deve-se principalmente a causas como a desigualdade social, o envelhecimento da população, aglomerações, desnutrição e pobreza, típicos de nações de terceiro mundo, o aumento da taxa de abandono ao tratamento, o aumento na incidência de resistência a drogas, o surgimento da epidemia de HIV/AIDS no início de 1980 e o aumento de imigrantes de países com alta prevalência da doença para países desenvolvidos, entre outras (RUFFINO-NETTO, 2002; WHO, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2012 estimativas da tuberculose global, quando se estimou a ocorrência de 8,7 milhões casos novos (125 casos/100.000 habitantes). Desse total de casos, 2,9 milhões (33%) são mulheres, 500 mil (6%) são crianças e 1,1 milhões (13%) são indivíduos infectados pelo HIV. A maioria do número estimado de casos ocorreu na Ásia (59%) e na África (26%), enquanto uma

menor proporção de casos ocorreu na região leste do Mediterrâneo (7,7%), na Europa (4.3%) e nas Américas (3%). Os cinco países com maior número de casos em 2011 foram Índia (2,0-2,5 milhões), China (0,9-1,1 milhões), África do Sul (400-600 mil), Indonésia (400-500 mil) e Paquistão (300-500 mil). Globalmente, as taxas de incidência permaneceram relativamente estáveis de 1990 até 2001, entre 2010 e 2011, houve um declínio que foi de 2,2% (WHO, 2012).

Em relação à mortalidade, 990 mil mortes ocorreram entre indivíduos HIV negativo (equivalente a 14 mortes/100000 habitantes) e 430 mil entre indivíduos infectados pelo HIV. No total, aproximadamente 1,4 milhões de pessoas morreram de tuberculose em 2011 e 500000 foram mulheres (WHO, 2012).

Foram estimados 630 mil casos de TB multirresistente (MDR-TB) em 2012, sendo que 86% desses casos estão albergados em 27 países (WHO, 2012).

No Brasil, a estimativa da TB em 2013 foi de 83.000 casos novos, com uma taxa de incidência anual de 42 casos por 100.000 habitantes. Em 2011 o Brasil passou a ocupar a 18ª posição entre os 22 países que abrigam 80% dos casos de TB no mundo e o 108ª quando se avalia a incidência. Em 2013, no estado do Espírito Santo, foram notificados 1262 casos novos, e, acompanhando a tendência nacional houve uma redução na incidência de aproximadamente 55 casos por 100.000 habitantes para 36 casos para 100.000 habitantes (BRASIL, 2013; WHO, 2012).

3.3 Agente Etiológico

O MTB é um dos patógenos humanos de maior sucesso, sobrevivendo em focos latentes da infecção em 1/3 da humanidade, ainda assim causando necrose pulmonar em um número suficiente de indivíduos para assegurar sua transmissão (BRITTON *et al.*, 2007). Esta espécie pertence a um complexo chamado complexo *M. tuberculosis* (MTBC) composto de outras seis espécies que incluem *M. africanum, M. bovis, M. canettii, M. microti, M. caprae* e *M. pinnipedii.* Em 2010 foi publicado a identificação de novo patógeno pertencente ao MTBC,o *M. mungi*. Este patógeno é responsável por altas taxas de mortalidade em mangustos, em Botswana na África, em associação estreita com humanos (ALEXANDER *et al.*, 2010; VAN INGEN *et al.*, 2012). Somente as duas

primeiras espécies juntamente com o MTB causam doença em humanos (DUCATI *et al.*, 2006).

Os membros do MTBC possuem características comuns como longo período de crescimento, além de serem considerados geneticamente monomórficos com alto nível de similaridade, levando à hipótese de que são patógenos que derivaram de um ancestral comum (COMAS *et al.*, 2009; HOMOLKA *et al.*, 2010).

O gênero *Mycobacterium*, composto por mais de uma centena de espécies, compreende bastonetes retos ou ligeiramente curvos, com dimensões de 0,2-0,7 x 1,0-10 μm, imóveis, não esporulados, e não capsulados. Diferem de outros gêneros bacterianos em uma série de propriedades, muitas das quais diretamente relacionadas com a quantidade e tipos de lipídeos presentes em sua parede celular. Calcula-se que, aproximadamente, 60% do peso seco seja devido a ácidos graxos tais como ácidos micólicos e ceras, o que lhe confere resistência peculiar ao álcool-ácido, evidenciada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen e resistência a álcalis, ácidos, antissépticos e um amplo espectro de antibióticos (WAYNE e KUBICA, 1986).

O MTB, principal representante do gênero, é um micro-organismo intracelular facultativo, aeróbio estrito que multiplica-se muito lentamente, sendo seu tempo de geração de aproximadamente 18 horas em condições de temperatura próximas a 37°C. Essas características, aliás, correlacionam-se com a predileção desta bactéria pelos pulmões devido à tensão de O_2 existente nestes órgãos e com o longo período de tempo para sua detecção em meios de cultura e para ação eficiente dos fármacos anti-tuberculose (CASTRO e TRABULSI, 1991).

3.4 Transmissão de *M. tuberculosis*

A infecção se inicia pela inalação de aerossóis, partículas de 1-5 μm de tamanho constituídas de dois a três bacilos viáveis envolvidos por secreção pulmonar desidratada, denominadas núcleos de Wells. Somente esses núcleos produzidos pela tosse, espirro ou fala são capazes de atingir bronquíolos e alvéolos pelas via aéreas distais (DIETZE *et al.*, 2009). Devido ao tamanho diminuto, esses aerossóis podem permanecer em suspensão por minutos ou até horas. O risco de infecção depende de

vários fatores tais como, o estreito contato entre indivíduos, a carga bacilar inalada, e o sistema imune do potencial hospedeiro (AHMAD, 2011).

As pequenas partículas inaladas evitam as defesas dos bronquíolos, devido ao seu tamanho e penetram nos alvéolos onde são fagocitadas pelos macrófagos alveolares residentes e células dendríticas envolvidos na internalização inicial do bacilo. O MTB pode também infectar células não fagocíticas no espaço alveolar, incluindo células M, células endoteliais alveolares e células epiteliais tipo 1 e 2 (pneumócitos) (HENDERSON *et al.*, 1997; AHMAD, 2011; SAIGA *et al.*, 2011).

3.5 Patogênese

Os bacilos introduzidos nos alvéolos com o ar inspirado são rapidamente fagocitados pelo macrófagos alveolares, células dendríticas residentes e células do epitélio alveolar. No entanto as primeiras respostas que ocorrem nos alvéolos são ainda pouco esclarecidas, especialmente as relacionadas com a evocação dos mecanismos inatos de defesa que podem ter sucesso na eliminação precoce dos bacilos. Os mecanismos pelos quais os bacilos escapam da resposta inata são também pouco conhecidos (HOUBEN *et al.*, 2006), mas a história natural da infecção mostra que essa progride em apenas um percentual pequeno de pessoas infectadas (DIETZE *et al.*, 2009; AHMAD, 2011; KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011).

Também pouco se conhece do que ocorre nas pessoas infectadas nas quais não ocorre progressão da infecção, admite-se que, uma vez nos pulmões, pode ocorrer um dos seguintes eventos com o MTB:

(a) Eliminação dos Bacilos - a resposta inicial pode ser completamente efetiva, o hospedeiro elimina a infecção através de barreiras físicas do sistema respiratório, como por exemplo, a mucosa ciliada existente nos brônquios; podendo também ser através da fagocitose dos bacilos por células da imunidade inata, com ação dos macrófagos presentes nos alvéolos pulmonares, de forma que o indivíduo não tem chance de desenvolver a doença.

(b) Latência - os bacilos podem ficar latentes e nunca causar doença. Essa infecção latente acontece quando o sistema imune do hospedeiro monta uma resposta adaptativa capaz de controlar, mas não de eliminar a infecção. Essa resposta é caracterizada por

inflamação granulomatosa com necrose caseosa, rica em bacilos, que se cura com fibrose e calcificação, admitindo-se que bacilos viáveis, latentes, permaneçam nessas lesões anatomicamente curadas. Como ocorre bacteremia precoce, bacilos se localizam em outros órgãos onde podem permanecer latentes, independentemente de ter ocorrido reação inflamatória. Nesses casos admite-se que os bacilos possam residir em alguns tecidos especialmente no adiposo (NEYROLLES *et al.*, 2006). A reativação dessa infecção latente pode ocorrer por alteração da resposta imune, levando ao aparecimento dos sinais e sintomas da doença, evento conhecido como reativação endógena. Indivíduos com infecção latente com o MTB, apesar de serem assintomáticos e não serem contagiosos representam um grande reservatório de MTB e podem permanecer nessa fase por meses a anos ou mesmo a vida inteira.

(c) Desenvolvimento da doença ativa - aparece quando há um desequilíbrio da relação parasita-hospedeiro permitindo que a micobactéria comece a se multiplicar e crescer imediatamente após a infecção, causando a doença conhecida como tuberculose primária (DIETZE *et al.*, 2009; AHMAD, 2011).

Em aproximadamente 5% dos indivíduos imunocompetentes a infecção poderá progredir para doença ativa em torno de dois anos; e em outros 5% a reativação pode acontecer mais tardiamente (MOUTINHO, 2011). Em 90%, ou o bacilo é eliminado ou permanece latente nos tecidos como descrito acima (AHMAD, 2011).

Após a inalação dos bacilos ocorre a formação do complexo primário da TB caracterizando a primoinfecção (infecção inicial) tuberculosa que ocorre em indivíduos virgens do contato com o bacilo, geralmente em crianças saudáveis nas regiões de alta endemicidade, e em adolescente e adultos nas regiões onde a prevalência da doença é muito baixa (MILBURN, 2001).

Na fase mais inicial da infecção, o MTB internalizado pelas células fagocíticas se replica intracelularmente, e estas células contendo bacilos atravessam as barreiras alveolares o que leva á disseminação sistêmica. Essa replicação intracelular e a disseminação simultânea do patógeno para os linfonodos pulmonares e para vários outros sítios extrapulmonares ocorrem antes do desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Isso exemplifica a extraordinária capacidade de MTB de estabelecer um nicho onde ele possa evitar sua eliminação pelo sistema imune e persistir latente indefinidamente (AHMAD, 2011).

O macrófago constitui uma das primeiras linhas de defesa contra a infecão micobacteriana e está equipado com uma variedade de respostas microbicidas. Estes mecanismos ocorrem de forma sequencial e incluem a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, a maturação do fagossomo em fagolisossomo, acompanhada de acidificação, a produção de citocinas e a apresentação de antígenos (HESTVIK *et al.*, 2005).

Alguns estudos mostram que, no interior dos fagossomos, as micobactérias não patogênicas, como *M. smegmatis,* são destruídas eficientemente pelos macrófagos em 24-48 h, em oposição às micobactérias patogênicas, como o MTB, que sobrevivem dentro dos macrófagos por várias semanas (ANES *et al.*, 2006). O *MTB* pode ser endocitado por células não-fagocitárias, como as células epiteliais alveolares (SATO *et al.*, 2005) e essa interação seria uma alternativa para escapar das agressões do meio e dos poderes microbicidas dos macrófagos (BERMUDEZ e GOODMAN, 1996). O aumento da ligação de *M. tuberculosis* a células epiteliais e/ou macrófagos alveolares pode representar um fator de risco para o desenvolvimento clínico da TB (VAN CREVEL *et al.*, 2002).

Na grande maioria dos indivíduos infectados, uma resposta imune mediada por células desenvolve-se 2-8 semanas após a infecção, que reduz a multiplicação do bacilo (Figura 1). Macrófagos, linfócitos T e outras células imune ativadas formam granulomas, que circunscrevem os bacilos, dificultando a sua disseminação. Se a resposta adaptativa do tipo Th1 for eficiente, os granulomas sofrem cura por fibrose e calcificação, se houve necrose nos mesmos. Nesses casos a doença não progride. Se a resposta adaptativa não for eficaz (menor resposta Th1 e maior resposta Th2) os granulomas sofrem necrose, os bacilos disseminam, ampliando a área inflamada com formação de novos granulomas e novas áreas de necrose, promovendo desse modo a progressão das lesões para nódulos caseificados e cavernas (lesões escavadas). Embora haja processo de fibrose nessas lesões, esta não é suficiente para circunscrevê-las, isolando-os (DIETZE *et al.*, 2009; AHMAD, 2011).

Na infecção primária, evolutiva, pode ocorrer disseminação miliar (tuberculose miliar) que pode ser restrita aos pulmões ou ser generalizada, dependendo da eficiência da resposta adaptativa montada contra o bacilo (DIETZE *et al.*, 2009).

A lesão tuberculosa inicial (foco primário) geralmente se localiza nos lobos inferiores ou nas partes inferiores dos lobos superiores, localizações mais freqüentes

dos nódulos fibrocalcificados (nódulos de Gohn) encontrados nas necrópsias de adultos em regiões onde a tuberculose é endêmica. Já as lesões observadas na tuberculose progressiva (denominada forma secundária da doença) são geralmente localizadas nas partes superiores dos lobos superiores (lesões apicais e sub apicais). Não se sabe se essas lesões são decorrentes de bacilos latentes que na infecção primária aí se localizaram e posteriormente induziram as lesões (dai o nome tuberculose secundária) ou se são bacilos de uma infecção primária que ai se localizaram e desenvolveram lesões (DIETZE *et al.*, 2009).

As lesões da tuberculose crônica progressiva, geralmente localizadas nos ápices dos pulmões, podem se apresentar como nódulos caseificados (lesões mais recentes, fechadas) ou como lesões escavadas, que drenaram a necrose através dos brônquios (cavernas).

As lesões pulmonares na tuberculose, geradas a partir de uma resposta inflamatória à presença de MTB em proliferação nos alvéolos, podem evoluir de diferentes formas. Em uma delas, pode ocorrer adoecimento com acometimento localizado, com formação de focos fechados ou disseminação restrita a uma pequena área do pulmão (forma mínima). Pode ocorrer também uma evolução para formas mais graves decorrentes de necrose tecidual, que resulta na formação de cavidades e produz maior grau de disseminação bacilar para outras áreas dos pulmões. Estas formas mais graves são categorizadas como formas moderada ou avançada, dependendo da extensão das lesões resultantes e do número e diâmetro das cavidades. As manifestações radiográficas da doença traduzem o estado da evolução das lesões pulmonares, e com base nesses aspectos estabeleceu-se uma classificação radiológica da doença, qual seja: doença mínima, moderada e avançada (FALK *et al.*, 1969).

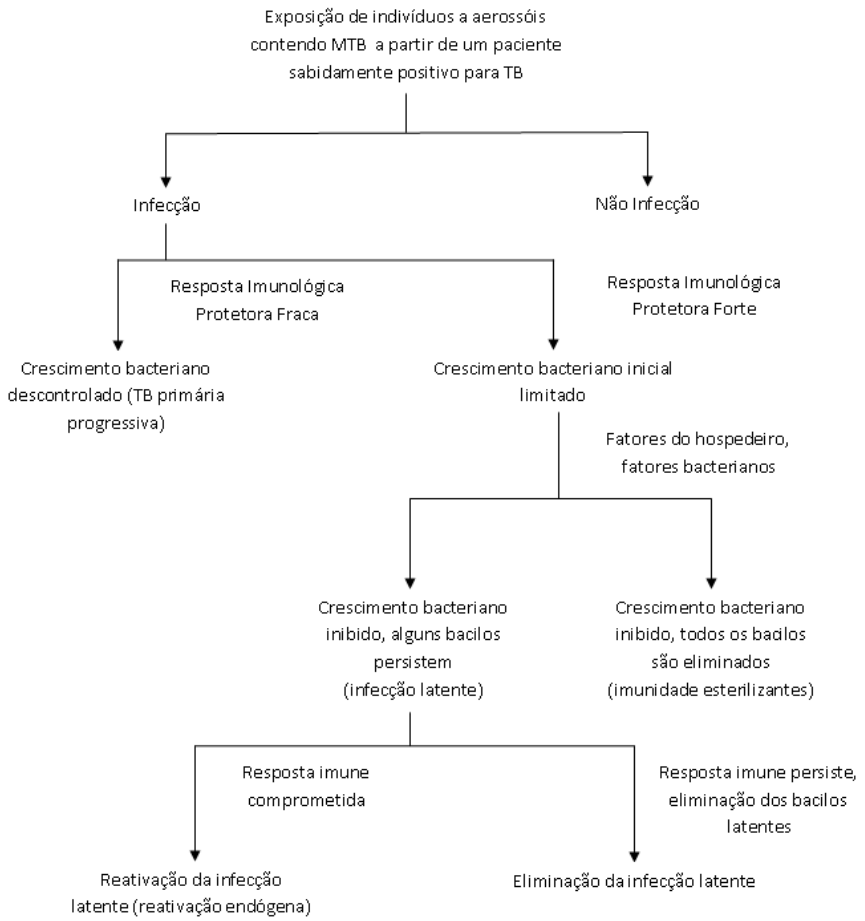


Figura 1:Progressão do curso natural da tuberculose em indivíduos imunocompetentes após exposição a aerossóis contendo *M. tuberculosis*, expectorado por um paciente fonte com TB pulmonar, baciloscopia positiva. Adaptado de AHMAD (2011).

3.6 Fatores relacionados com o MTB que podem interferir na patogênese das lesões

A ausência de fatores clássicos de virulência neste patógeno indica que suas características de virulência estão relacionadas com propriedades metabólicas e/ou estruturais do bacilo, que modulam a resposta imune do hospedeiro e criam um ambiente favorável à sua sobrevivência, replicação e disseminação (HESTVIK *et al.*, 2005; MATHEMA *et al.*, 2006). Sendo assim, a variabilidade genética e a consequente alteração dessas propriedades metabólicas e/ou estruturais seriam cruciais para determinar uma virulência maior ou menor em diferentes cepas de *M. tuberculosis*.

Desde a primeira metade do século 20 numerosos estudos utilizando cobaias mostraram que cepas isoladas de pacientes com tuberculose na Índia eram menos

virulentas do que os isolados de pacientes no Reino Unido. Na sequência desses estudos iniciais, modelos animal e celular (utilizando macrófagos) têm sido usados repetidamente para evidenciar efeitos de características específicas de cepas na virulência e imunogenicidade, fornecendo evidências crescentes de que a variabilidade genética em MTB tem influência nas diferenças fenotípicas (GAGNEUX e SMALL, 2007).

Neste sentido, vários estudos tem descrito diferentes genótipos responsáveis por diversos surtos de tuberculose nos Estados Unidos da América, entre os quais o genótipo da cepa *HN878*, também conhecida como cepa 210, responsável pelo adoecimento de 27% dos pacientes estudados em Los Angeles e no estado do Texas, que exibe um fenótipo hipervirulento em vários modelos experimentais. A cepa *HN878* pertence à linhagem East-Asia, que inclui a família Beijing considerada também hipervirulenta em monócitos humanos, em camundongos BALB/c e em primatas não humanos (ZHANG *et al.*, 1999; GAGNEUX e SMALL, 2007). Além desse, pode-se citar o genótipo "*CDC1551"* responsável por surtos de tuberculose em regiões rurais do Tennessee *e* Kentucky nos Estados Unidos (VALWAY *et al.*, 1998; MANCA *et al.*, 1999), o genótipo "C" (C-strain) isolado predominantemente de pacientes portadores da coinfecção tuberculose-HIV em Nova Iorque (FRIEDMAN *et al.*, 1997), e isolados pertencentes à família W-*Beijing*, responsáveis por vários surtos em âmbito mundial e pelo ressurgimento da doença na cidade de Nova Iorque nos EUA na década de 1990.

No Brasil, pode-se destacar uma linhagem de *M. tuberculosis* membro da família *Latin American – Mediterranean* (LAM), que apresenta uma grande deleção (Long Sequence Polymorphism - LSP) de 26,3 Kb na sequência do seu DNA, com deleção de 10 genes (Figura). Tal linhagem, descrita recentemente como RD^{Rio} por Lazzarini e colaboradores (2007), foi isolada em alta frequência na população de pacientes estudados na cidade do Rio de Janeiro. Segundo esses autores, uma associação entre a linhagem RD^{Rio} e uma alta prevalência de tuberculose poderia estar relacionada a uma maior virulência e/ou adaptação específica desta linhagem às populações hospedeiras Euro-Latino Americanas. O MTB RD^{Rio} apresenta o espoligotipo característico da família LAM e um perfil de RFLP-IS*6110* de oito a 13 bandas, como mostram os resultados de Lazzarini (2007). Esses mesmos autores, em 2008, encontraram, por meio de uma análise multivariada, uma associação significante entre as cepas RD^{Rio} e doença

cavitária. Nosso grupo também já havia demonstrado que há uma clara associação entre doença cavitária, carga bacilar e maior gravidade da doença (PALACI *et al.*, 2007).

Apesar da diversidade encontrada entre as diferentes cepas descritas, pouco se conhece sobre a associação entre a diversidade genética de MTB e os aspectos clínicos da doença.

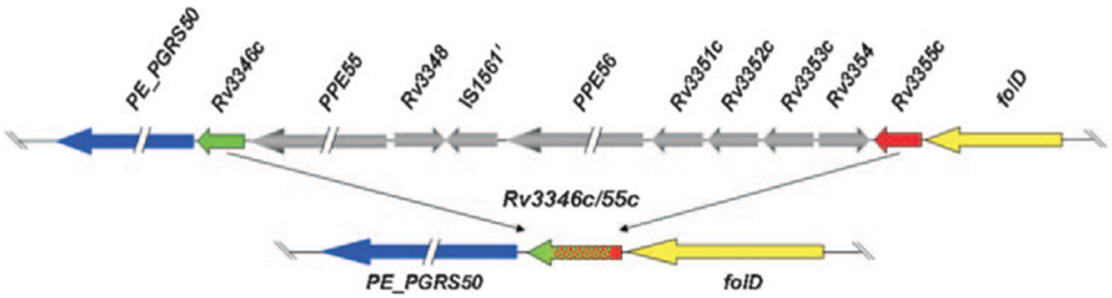


Figura 2: Diagrama dos genes deletados na LSP RD^{Rio}. Todos os elementosentre os genes *Rv3346c* e *Rv3355c* foram excisados, resultando na deleção de 26,3 Kb da sequência de DNA. Adaptado de Lazzarini *et al (2007).*

3.7 Métodos Moleculares para Identificação de *M. tuberculosis*

O desenvolvimento de métodos moleculares para caracterização genética de MTB tem contribuído para a compreensão da dinâmica da transmissão, na elucidação da história natural da tuberculose e na avaliação dos programas de controle (GENCER e SHINNICK, 2005).

Atualmente, uma variedade considerável de métodos tem sido descrita para a genotipagem dos membros do MTBC, que são agrupados em métodos genômicos para estudos de DNA e métodos que utilizam a amplificação de sequências específicas do DNA (ROZO-ANAYA e RIBON, 2010). A figura 3 representa o cromossomo de uma cepa hipotética de *M. tuberculosis* salientando 3 métodos de genotipagem molecular.

Em 1993, van Embden e colaboradores publicaram um protocolo aceito internacionalmente, para a tipagem de isolados de MTB baseado na detecção da sequência de inserção IS*6110*, um elemento genético móvel, transponível, pertencente à família IS3 que contém 1.355 pares de base (bp) que se integra em diferentes sítios do

genoma de MTB. Estes elementos "saltadores" estão envolvidos na ruptura ou regulação gênica e juntamente com seu polimorfismo posicional (tamanho dos fragmentos de restrição), podem ser deletados ou replicados em diferentes posições do genoma micobacteriano levando a um número de cópias altamente variável (variação entre 0 e 25 cópias). A sequência de inserção IS*6110* é encontrada em todos os membros do complexo MTB e, aparentemente, é restrita a este grupo de microrganismos (NIEMANN *et al.*, 2000; EISENACH *et al*., 1988).

O método de análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP-IS*6110*) requer digestão do DNA cromossômico coma a enzima de restrição *Pvu*II, a separação dos produtos da restrição por eletroforese em gel de agarose, hibridização com sonda de DNA marcado complementar à sequência do IS*6110* e a detecção das sondas marcadas por quimioluminescência. O perfil de bandas resultante do RFLP-IS*6110* é uma característica específica de uma cepa de MTB. Estudos tem demonstrado que o IS*6110* evolui rápido o suficiente para diferenciar eventos epidemiológicos distantes, e, no entanto, lento o suficiente para definir com precisão eventos epidemiológicos recentes (HERMANS *et al.*, 1990; VAN SOOLINGEN *et al.*, 1991). Estas propriedades fazem do RFLP-IS*6110* um marcador útil para genotipagem de cepas de MTB.

Com o auxílio dessa técnica as cepas são genotipadas de acordo com o padrão eletroforético de bandas gerado por diferenças no número de cópias do IS*6110* e em sua localização no cromossomo. Isolados de pacientes infectados com cepas epidemiologicamente não relacionadas apresentarão perfis de RFLP diferentes enquanto que isolados de pacientes com relação epidemiológica apresentarão perfis de RFLP idênticos (BARNES e CAVE, 2003). Isolados com pequenas alterações no número ou no tamanho das bandas, devido à inserção, deleção ou inversão, podem ser identificados como pertencentes a um mesmo grupamento ou família (TENOVER *et al.*, 1997). Esse método é considerado padrão ouro entre os métodos de tipagem molecular de MTB, devido ao seu alto poder discriminatório e por ser realizado de forma padronizada e reprodutiva (KREMER *et al.*, 1999). Entretanto, este método tem várias limitações que dificultam seu uso: requer grandes quantidades de DNA de boa qualidade o que demanda tempo de cultivo, seu poder discriminatório diminui quando utilizada para a análise de isolados com baixo número de cópias de IS*6110*, sendo necessário a utilização de métodos de genotipagem complementares, exige trabalho intenso e é caro,

além de que as comparações interlaboratoriais tornam-se complicadas devido à complexidade da padronização da metodologia e interpretação dos *fingerprints* obtidos. Apesar disso, o RFLP- IS*6110* tem contribuído para o entendimento atual da dinâmica da transmissão de MTB em diferentes cenários de estudos (BEHR *et al.*, 1999) bem como, para a diferenciação entre reativação endógena e reinfecção exógena em casos de TB recorrente (VAN RIE *et al.*, 1999), identificação de surtos, confirmação de contaminação cruzada em laboratórios, identificação do local onde ocorre a transmissão (i.e. contatos domiciliares) e ajudado a definir a estrutura da população global de cepas de MTB em diferentes regiões geográficas.

Para contornar as limitações associadas com o RFLP-IS*6110*, foram desenvolvidos métodos de tipagem molecular baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), podendo-se destacar duas metodologias baseadas nos *Clustered Regulatory Short Palindromic Repeats* (CRISPR) e *Variable Number Tandem Repeats* [VNTR] (COMAS *et al.*, 2009).

Os métodos CRISPR e VNTR foram estabelecidos para muitas bactérias patogênicas geneticamente monomórficas incluindo o *Mycobacterium leprae*. Para o complexo MTB os métodos CRISPR e VNTR são conhecidos como *Spoligotyping* e *Micobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable in tandem Repeat* (MIRU-VNTR) respectivamente (BARNES e CAVE, 2003; COMAS *et al.*, 2009).

O método *Spolygotyping* baseia-se no polimorfismo de DNA no lócus DR do genoma micobacteriano. O lócus DR contém repetições de 36 pb, idênticas, que são intercaladas com sequências espaçadoras, diferentes, não repetitivas, cujo tamanho varia de 35 a 41 pb, este conjunto é denominado *direct variable repeat* (DVR). A variabilidade do lócus DR ocorre principalmente por meio de recombinação homóloga entre repetições vizinhas ou distantes, por transposição mediada por sequências de inserção (IS) e por polimorfismos em nucleotídeo único (SNPs). A presença ou ausência dos DVRs é averiguada por amplificação dessas regiões e hibridização subsequente em membrana contendo 43 sequências DVR diferentes. A variação dos espaçadores entre as regiões DR é utilizada para diferenciar isolados de MTB gerando os espoligotipos (do inglês *spoligotypes*) (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

O método de *Spoligotyping* é mais rápido e mais simples que o RFLP-IS*6110*, requer quantidades menores de DNA e pode ser realizado em extratos brutos de DNA direto de amostras clínicas, evitando assim o trabalho de tempo intensivo associado ao

crescimento lento das micobactérias e é capaz de discriminar entre isolados com menos de cinco cópias de IS*6110 (KAMERBEEK et al., 1997)*.

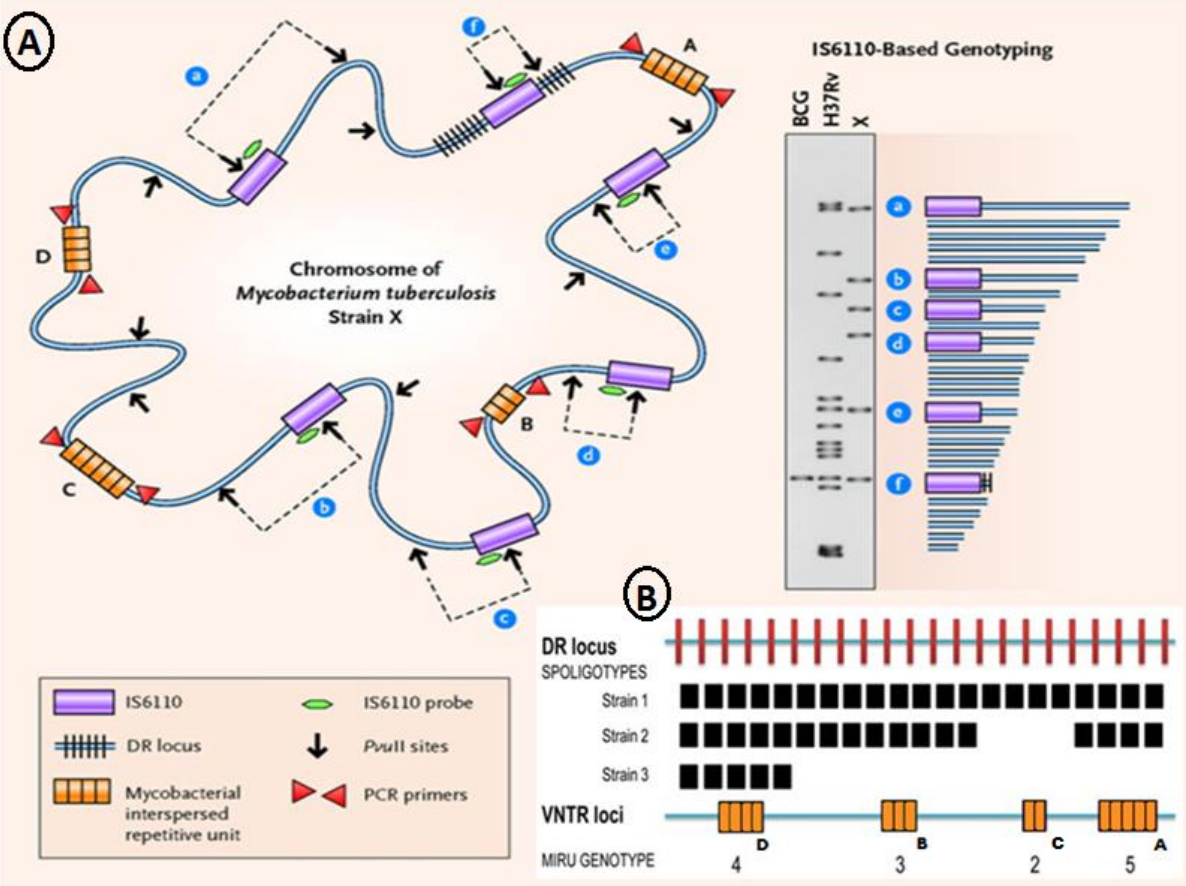


Figura 3: A - Cromossomo do *M. tuberculosis*, cepa hipotética X, genótipos de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv e cepa X com base no RFLP-IS*6110*. B- Genótipos de três cepas hipotéticas (*strains* 1, 2 e 3) com base no *Spoligotyping* e *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* - MIRUs. Adaptado de Comas *et al (2009)*; Barnes & Cave (2003).

Apesar disso, este método requer aparelhagem e reagentes especiais para hibridização e detecção do sinal, tem poder discriminatório menor que o RFLP-IS*6110* e é incapaz de definir com precisão eventos de transmissão levando a uma superestimativa desses eventos. Outra limitação do *Spoligotyping* é que o lócus DR pode sofrer uma evolução convergente levando cepas epidemiologicamente não relacionadas a compartilhar padrões idênticos de *Spoligotyping*. Entretanto, apesar dessas limitações, este método fornece um panorama da estrutura populacional das cepas de MTB em diferentes regiões geográficas, já que cepas que evoluíram de um

ancestral comum podem ser agrupadas em linhagens evolutivas de acordo com suas assinaturas de *Spoligotyping* únicas (STREICHER *et al.*, 2007).

A organização de uma base de dados internacional de espoligotipos possibilitou uma visão da distribuição geográfica global dos genótipos de MTB (SOLA *et al.*, 2001). O quarto banco internacional de espoligotipos, SpolDB4, foi construído para determinar a estrutura populacional global do MTBC bem como sua transmissão e evolução. Este banco de dados contém 1939 perfis compartilhados (*Shared International Type* - SIT), representando um total de 39.295 isolados clínicos originários de 141 países (BRUDEY *et al.*, 2006). Além de fornecer uma visão global da diversidade genética do complexo MTB, seu livre acesso permite a utilização das informações para o estabelecimento de análises e comparações genéticas e epidemiológicas.

Em 2012, Demay e colaboradores descreveram um banco de dados internacional denominado SITVITWEB que incorpora dados de Spoligotyping permitindo a avaliação da diversidade genética global do MTBC baseado em 62582 isolados clínicos correspondente a 153 países de origem dos pacientes. Neste banco há reportado 7105 perfis de *Spoligotyping*, agrupados em 2740 SITs e 4364 padões orfãos além de um total de 2379 perfís de MIRU de isolados clínicos de 87 países de orígem dos pacientes. Na figura 4 pode-se observar a distribuição geográfica das principais linhagens do MTBC de acordo com os dados de *Spoligotyping* no SITVITWEB.

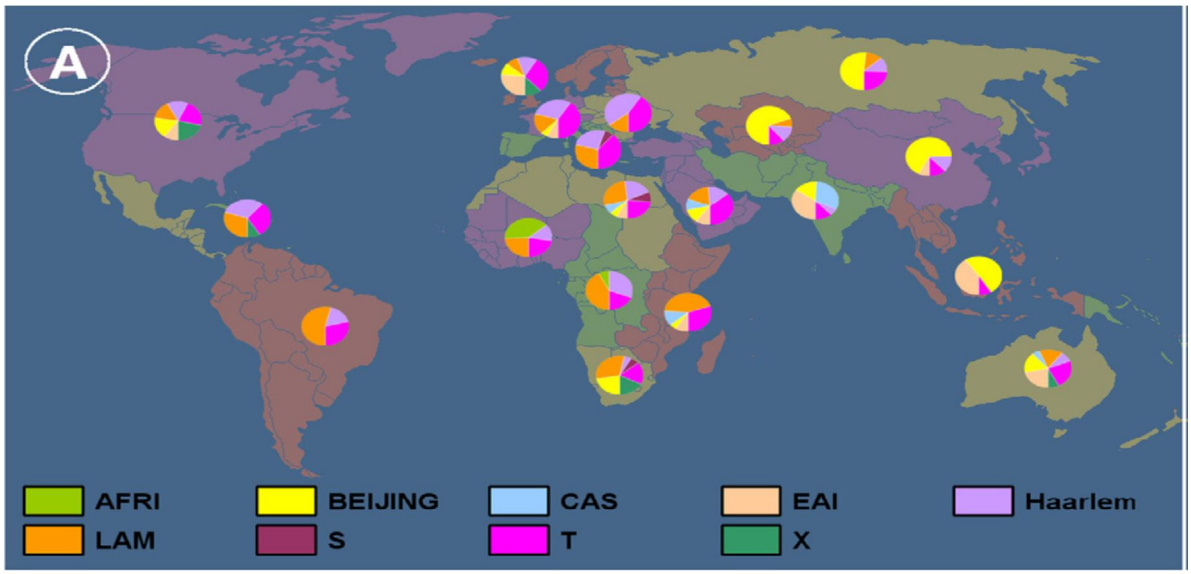


Figura 4: Distribuição geográfica global das principais linhagens de *M. tuberculosis* baseado em dados de Spoligotyping no SITVITWEB. Adaptado de Brudey et al.(2006).

Os VNTRs, por sua vez, comparam o número de repetições de sequência curtas de DNA em diferentes posições do genoma bacteriano, específico de cada cepa. Sequências repetidas *in tandem* estão dispersas em número variáveis de cópias nos genomas de eucariotos. Os loci com pequenas sequências repetidas (SSR) de 1 a 13 pb são geralmente chamadas de microssatélites, e aqueles com sequências repetidas de 10 a 100 pb de minissatélites. Muitos desses loci apresentam hipervariabilidade em seus números de repetições em humanos e animais e são por isso, denominados VNTR (SUPPLY *et al.*, 2000).

Em 1997, Supply e colaboradores identificaram 41 loci VNTR no genoma de MTB e revelou que 12 dos 41 loci MIRUs presentes em MTB H37Rv correspondiam a regiões VNTR tipo minissatélites do genoma humano. Os doze loci tipo minissatélite de MTB contêm número variável de cópias de 51 a 77 pb. Portanto, para cada *lócus*, o número de unidades variáveis pode ser calculado medindo-se o tamanho dos fragmentos amplificados com iniciadores que anelam com as regiões de DNA flanqueadoras. Esse fato possibilitou a utilização dos *loci* MIRU para estudos de genotipagem e epidemiologia da TB (MAZARS *et al.*, 2001).

Todos estes loci contém VNTR de elementos genéticos denomimados coletivamente *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRUs), localizadas principalmente em regiões intergênicas dispersas ao longo do genoma de MTB com comprimento de 50 a 100 pb, e pertencem à categoria dos VNTR minissatélites (SUPPLY *et al.*, 1997; SUPPLY *et al.*, 2000; SUPPLY *et al.*, 2001).

De acordo com o momento e finalidade de sua descoberta e/ou caracterização as repetições receberam nomes característicos e, por isso, existe uma nomenclatura variável para os VNTRs. Assim, cinco repetições exatas *in tanden* (ETR) foram identificadas pelas letras de A a E (FROTHINGHAM e MEEKER-O'CONNELL, 1998). Outro conjunto de *loci* foi denominado QUB (Queens University of Belfast), mesmo nome do local de sua descoberta (SKUCE *et al.*, 2002). Estes contêm sequências de repetições perfeitas, ou quase perfeitas, seguido por repetições parciais de diferentes comprimentos. Os *loci* VNTR deste último conjunto atualmente são QUB 11a, 11b, 26, 1895, 3336, 3232, 18, 5 e 4156 (SUPPLY *et al.*, 2006).

Além de alguns nomes específicos, todos os MIRU-VNTR também podem ser denominados de acordo com sua localização no genoma bacteriano. A Tabela 1

apresenta as nomeações de 24 regiões MIRU-VNTR mais usadas em estudos moleculares conforme publicado por Supply et al. (2006).

Os MIRUs são classificados em três tipos principais (I, II e III) com base no seu comprimento, sequência nucleotídica e organização. As sequências Tipo I contêm aproximadamente 77 pb. MIRUs Tipo II e tipo III são caracterizados por um intervalo (gap) de 24 pb e 15 pb nas extremidades 3' e 5' das sequências do tipo I, respectivamente. MIRUs mistos tipo III/II que contêm ambos os tipos de intervalos também foram encontrados, por exemplo, nos loci oito e 20 (SUPPLY *et al.*, 1997).

Com os avanços e melhoria dos métodos de tipagem utilizando VNTR, foi desenvolvido um sistema, baseado nos MIRU-VNTR, mais rápido e que combina a análise de PCR multiplex para o loci alvo em um analisador de DNA fluorescente, com o uso de um sistema de automação computadorizada (SUPPLY *et al.*, 2001). Foi demonstrado que este sistema é altamente reprodutível intra e interlaboratórios (SUPPLY *et al.*, 2000; COWAN *et al.*, 2005).

Supply e colaboradores em 2006 propuseram a utilização desse sistema automatizado utilizando 15 loci (mais discriminatórios) como padrão para estudos de epidemiologia molecular de isolados de MTB, e a utilização de 24 loci, os mesmos 15 loci anteriores e nove loci adicionais, como uma ferramenta de alta resolução para estudos filogenéticos. Os MIRUs propostos incluem: Miru 04, Miru 26, Miru 10, Miru 40, Miru 16, Miru 31, Mtub 04, ETRC, ETRA, Mtub 30, Mtub 39, QUB 4156, QUB 11b, Mtub 21, QUB 26, Miru 02, Miru 23, Miru 39, Miru 20, Miru 24, Miru 27, Mtub 29, ETRB, Mtub 34.

Tabela 1: Diferentes denominações dos *loci* MIRU-VNTR 24 *loci*

Lócus (VNTR)[a]	Nomes dos Alelos[b]	Comprimento de uma cópia (pb)[c]
580	MIRU 4; ETR D	77
2996	MIRU 26	51
802	MIRU 40	54
960	MIRU 10	53
1644	MIRU 16	53
3192	MIRU 31; ETR E	53
424	Mtub04	51
577	ETR C	58
2165	ETR A	75
2401	Mtub30	58
3690	Mtub39	58
4156	QUB-4156	59
2163b	QUB-11b	69
1955	Mtub21	57
4052	QUB-26	111
154	MIRU 2	53
2531	MIRU23	53
4348	MIRU 39	53
2059	MIRU 20	77
2687	MIRU 24	54
3007	MIRU 27; QUB-5	53
2347	Mtub29	57
2461	ETR B	57
3171	Mtub34	54

a. *Lócus* indica a localização, em kbp, do VNTR no genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.
b. Nome dos alelos referente a cada *lócus.*
c. Comprimento de cópia única das regiões em pares de bases. Obs: em alguns MIRU-VNTR as cópias podem apresentar tamanhos um pouco diferentes.

Diferente do RFLP-IS*6110*, este método pode ser automatizado utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluoróforos específicos produzindo assim produtos fluorescentes, que por sua vez podem ser analisados em um sequenciador automático de DNA, tornando esta técnica de genotipagem menos laboriosa e com resultados mais reprodutíveis permitindo comparações de dados interlaboratoriais. Os resultados obtidos por essa metodologia podem ser comparados aos resultados obtidos

em estudos em outras partes do mundo por meio da utilização da plataforma denominada MIRU-VNTR*plus*. Este serviço de livre acesso permite ao usuário analisar dados de genotipagem somente de suas amostras ou de suas amostras em comparação com cepas de um banco de dados referência. As análises e comparações dos genótipos, por meio desse banco de dados, podem ser baseadas no MIRU-VNTR, *spoligotyping*, LSP (large-sequence polymorphisms - polimorfismos de sequência longa) e SNP (singlenucleotide polymorphisms - polimorfismos em nucleotídeos únicos), além de padrões de RFLP-IS*6110* para a identificação de linhagens de MTBC (ALLIX-BEGUEC *et al.*, 2008; WENIGER *et al.*, 2010).

Vários estudos utilizando o MIRU-VNTR como método de tipagem mostram que esta técnica tem um poder discriminatório similar ao do RFLP-IS*6110* que poderia ser aumentado quando combinado com o *Spoligotyping* (KREMER *et al*., 2005; HAN *et al*., 2007).

As comparações da sequência do genoma microbiano inteiro tem revelado diferenças significantes no conteúdo gênico e na organização do genoma entre bactérias relacionadas. Sreevatsan e colaboradores (1997) propuseram a classificação das espécies do MTBC em três Grupos Genéticos Principais (*Principal Genetic Groups* - PGG) de acordo com a combinação de dois alelos de *katG463* e de *gyrA95.*

Em algumas espécies, como o MTB, a comparação da sequência do genoma completo tem identificado LSPs (TSOLAKI *et al.*, 2005) e SNPs (FILLIOL *et al.*, 2006; GUTACKER *et al.*, 2006) que caracterizam as principais linhagens que compreendem MTBC.

Os LSP e SNP elucidam linhagens genéticas do MTBC que diferem em sua distribuição geográfica, imunogenicidade, associação com a multiressistência da TB aos fármacos e virulência (WENIGER *et al.*, 2010).

LSP ou regiões de diferença (RD) podem incluir inserções e deleções genômicas e têm sido identificadas como uma das principais fontes de variabilidade genética em MTB e são detectadas na maioria dos isolados clínicos de MTB. São marcadores genéticos que mudam vagarosamente e são essencialmente limitados aos estudos filogenéticos (ALLAND *et al.*, 2007).

Gagneux *et al.* (2006) utilizaram LSPs para definir linhagens do MTBC, e encontraram uma relação destes com a distribuição geográfica (Tabela 2). Estes autores publicaram um estudo onde afirmam que a genética de população do MTBC é altamente estruturada e definida por 6 linhagens filogenéticas principais: West-African I,

West-African II, Euro-American, East-African-Indian, East-Asian e Indo-Oceanic. Os resultados desse estudo demonstraram que cada uma dessas 6 linhagens principais está associada a áreas geográficas particulares, e que os nomes das linhagens refletem essa associação geográfica. Exemplificando, a linhagem East-Asian é dominante em muitos países do oriente, e a linhagem Indo-Oceanic ocorre por todo oceano Índico. A linhagem Euro-American é claramente a linhagem mais frequente na Europa e Américas, mas sublinhagens específicas desta linhagem predominam também em regiões da África e Oriente Médio. Embora os autores tenham observado tal estrutura geográfica para a linhagem Euro-American, nenhuma outra sublinhagem estava associada com qualquer área geográfica específica (Figura 5).

Tabela 2: Correspondência de nomenclatura das principais linhagens do MTBC definidas por *spoligotyping* e por LSP.

***Spoligotyping* (Filliol 2003)**	**LSP (Gagneux 2006)**
EAI	Indo-Oceanic
Beijing	East-Asian
CAS	East-African-Indian
X, Haarlem, LAM	Euro-American
M. africanum	West-African 1
M. africanum	West-African 2

A linhagem Euro-American é a mais heterogênea das seis linhagens, sendo constituída de 10 sublinhagens distintas, cada uma delas definidas pela deleção de uma LSP específica (GAGNEUX *et al.*, 2006; RINDI *et al.*, 2012).

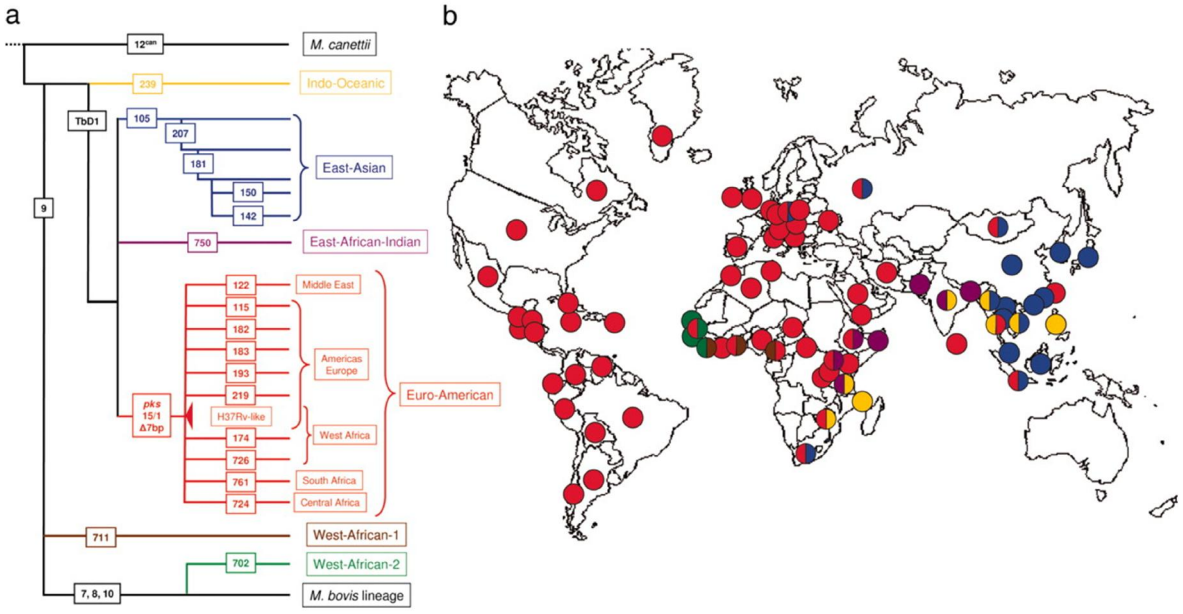


Figura 5: Estrutura populacional global e distribuição geográfica de *M. tuberculosis* (GAGNEUX *et al.*, 2006). (a) LSPs que definem a filogenia global de *M. tuberculosis*. Nos retângulos estão representados os nomes dos LSPs ou regiões de diferenças que definem as linhagens. As regiões geográficas associadas com as linhagens específicas estão indicadas. (b) Estrutura geográfica das seis linhagens principais de *M. tuberculosis*. As cores dos pontos correspondem às seis principais linhagens definidas na fig. 5a e indicam a(s) linhagem(s) dominante(s) nos respectivos países.

Foi demonstrado que a presença da deleção em RD 174 co-segrega com a deleção RD^{Rio}, que define a sub-linhagem RD^{Rio}, altamente prevalente no Rio de Janeiro (DAVID *et al.*, 2012; WEISENBERG *et al.*, 2012).

Gibson e colaboradores (2008) identificaram que uma região do gene *Rv0129c* que codifica a proteína Antígeno 85C (ou micolil transferase 85C ou proteina C ligante de fibronectina) contém um SNP sinônimo (GAG para GAA) no códon 103. Os autores propuseram o SNP $Ag85C^{103}$ como marcador específico da família LAM e sua presença tem sido usado para confirmação de família LAM nas cepas com LSP RD^{Rio}. Os autores sugerem que este marcador auxilia na classificação de cepas com espoligotipos difíceis de definir, além de detectar cepas LAM verdadeiras separando-as dos espoligotipos convergentes.

Atualmente a pesquisa sobre a evolução e epidemiologia molecular do MTBC se realiza explorando múltiplos marcadores tais como o lócus DR, sequências de inserção, regiões de deleção, mini-satélites, SNPs, entre outros (RASTOGI e SOLA, 2007). Sola e

colaboradores (2001),utilizando a combinação desses múltiplos marcadores para avaliar isolados de MTB, demonstraram um nível bom de congruência com *spoligotyping* e MIRU.

Baseado nos resultados apresentados por vários estudos, a árvore filogenética do MTBC apresenta quatro ramos contendo seis grupos de cluster por SNP: SCG1 a SCG6 (ALLAND *et al.*, 2007). A tabela 3 apresenta uma correlação da nomenclatura de grupos de MTBC definido por Spoligotyping e por SNPs.

Tabela 3: Comparação da terminologia por *Spoligotyping* e SNP

PGG (SREEVATSAN.,1997)	Spoligotyping (FILLIOL, 2003)	SCG (FILLIOL, 2006)	SNP (GUTACKER, 2006)
PGG	EAI	SCG 1	sSNP-I
PGG1	Beijing	SCG 2	sSNP-II
PGG1	CAS	SCG 3ª	sSNP-IIA
PGG1	Bovis	SCG 7	M. tuberculosis complex
PGG2	Haarlem	SCG 3b	sSNP-III
PGG2	X1	SCG 3c	sSNP-IV
PGG2	X1, X2, X3	SCG 4	sSNP-V
PGG2	LAM	SCG 5	sSNP-VI
PGG3	T (Miscelânia)	SCG 6	sSNP-VII
			sSNP-VIII

PGG = *Principal Genetic Group*
SCG = SNP *cluster group*
SNP = *Single nucleotide polymorphism*
EAI = *East African Indian*
CAS = *Central Asian (or Delhi)*

Com aprimoramento tecnológico na área molecular nos últimos anos, foi possível também identificar genes associados à virulência de MTB. Vários fatores de virulência relevantes são componentes da parede celular que tem papel importante na modulação da resposta imune do hospedeiro (BRENNAN, 2003; ASTARIE-DEQUEKER *et al.*, 2010). Entre os poucos genes que têm sido claramente associados a uma via metabólica em MTB e que parecem ter um papel na patogenicidade desse bacilo estão os genes envolvidos na biossíntese de um grupo de lipídios denominados dimicocerosatos ftiocerol e fenol-ftiocerol dimicocerosatos, encontrados na parede

celular do *M. leprae*, *M. ulcerans* e membros do complexo *M. tuberculosis* (COLE *et al.*, 1998; CONSTANT *et al.*, 2002). Um estudo realizado por Reed e colaboradores em 2004 identificou um glicolipídio fenólico, derivado da policerídeo sintase, num subgrupo de cepas W/Beijing conhecidas por sua “hiperletalidade”. Esse glicolipídio fenólico (PGL) demonstrou-se altamente ativo na modulação da resposta imune do hospedeiro, uma vez que a interrupção de sua produção pelo bacilo permitiu um aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-6 e IL-12) em culturas de células infectadas. Confirmando a atividade moduladora do PGL, a adição do bacilo com super expressão de PGL, ou até mesmo a adição do PGL purificado, a estas culturas inibiu a liberação dessas mesmas citocinas, provocando uma resposta imune pouco protetora para o hospedeiro.

Estudo, como o de Constant e colaboradores (2002) identificou o envolvimento do gene *pks*15/1 na biossíntese de PGL. O alinhamento da sequência desse gene em diferentes cepas mostrou a presença de uma inserção de sete pb em cepas produtoras de PGL, como o *M. tuberculosis* cepa 210 pertencente à família W-Beijing e *M. Canetti*, enquanto *M. bovis* e *M. bovis* BCG apresentam apenas a inserção de uma guanina. Esta inserção de sete pb causa uma mutação *frameshift* no gene *pks15*, resultando num gene *pks15/1* intacto. Outros estudos mostraram que cepas de *M. tuberculosis* dos genótipos *W- Beijing*, East-Asian (non-Beijing) e Indo-Oceanic, possuem o gene *pks15* intacto e produzem PGL e se associam a fenótipos hipervirulentos. Ao contrário, cepas da linhagem Euro-American são definidas pela deleção de 6-7 pares de base no gene *pks* 15/1 (CONSTANT *et al.*, 2002; REED *et al.*, 2004; TSENOVA *et al.*, 2005; GAGNEUX e SMALL, 2007). Este lócus é relatado como polimórfico entre os membros do MTBC (GAGNEUX e SMALL, 2007) e atualmente tem sido considerado um marcador potencial para a identificação das linhagens W-Beijing, Asian (non-Beijing) e Indo-Oceanic (ALONSO *et al.*, 2008). Entretanto, a caracterização deste marcador é praticamente desconhecida em isolados da America Latina.

Com base nas considerações apresentadas, e diante da necessidade de verificar a associação entre diversidade genética e aspectos clínicos da doença, o presente estudo visou avaliar a associação entre os genótipos de isolados de MTB e a gravidade da doença, utilizando os métodos de genotipagem RFLP-IS*6110*, *Spoligotyping*, MIRU bem como a análise da presença da deleção RD^{Rio} e da análise de mutação no gene *pks15/1.*

Justificativa

4. JUSTIFICATIVA

Embora a observação de diferentes eventos clínicos e epidemiológicos, seguida de uma investigação genética, seja fundamental para identificar e caracterizar linhagens ou sublinhagens de cepas de MTB, muito pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que direcionam esses eventos. Os mecanismos mais conhecidos referem-se principalmente aos eventos moleculares e celulares concernentes ao hospedeiro, em resposta à infecção, num quadro típico de tuberculose. Porém, isso não é suficiente para o esclarecimento e a explicação dos diversos quadros clínicos da doença em indivíduos imunocompetentes. Para compreender essas diferentes respostas provenientes da relação patógeno-hospedeiro, é necessário conhecer também a influência da diversidade genética dos bacilos na resposta imune do hospedeiro e na evolução da doença. Neste sentido, a caracterização genotípica e a análise de genes envolvidos na virulência de isolados de MTB obtidos de pacientes com formas mais graves da tuberculose pulmonar poderiam contribuir para o conhecimento do mecanismo que leva a diferentes quadros clínicos de tuberculose e/ ou extensão da doença.

Objetivos

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Analisar características genéticas de isolados de *M. tuberculosis* e verificar a associação com a gravidade da doença pulmonar.

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1 Caracterizar o perfil clínico e demográfico dos pacientes com tuberculose pulmonar não cavitária e cavitária.

5.2.2 Caracterizar o perfil genotípico de isolados de MTB provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar não cavitária e cavitária.

5.2.3 Verificar a associação dos perfis genotípicos obtidos à gravidade da doença pulmonar.

5.2.4 Analisar a existência de alterações (inserções e deleções) em sequências gênicas definidas dos isolados de *M. tuberculosis* (pks15/1 e RD^{Rio}) e associá-las a gravidade da doença.

5.2.5 Avaliar o poder discriminatório das técnicas RFLP-IS6110 e MIU-VNTR 24 loci e sua concordância com os dados encontrados na investigação de *clusters*.

Materiais e Métodos

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Hipótese

Acredita-se que a maior gravidade da tuberculose esteja associada à presença de inserções e deleções em sequências gênicas de MTB.

6.2 Local e Modelo do Estudo

Um estudo observacional retrospectivo do tipo caso-controle está sendo conduzido no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Micobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), no Rio de Janeiro, desde março de 2009 até fevereiro de 2013. Neste estudo foi analisado um total de 219 isolados de MTB de pacientes oriundos da região metropolitana de Vitória – ES e alguns municípios do estado, obtidos a partir de 716 pacientes incluídos em um ensaio clínico (JOHNSON *et al.*, 2009) realizado no período de 02/06/2004 a 05/12/2008 no NDI-UFES, intitulado "Estudo prospectivo, multicêntrico, randomizado, para a avaliação de esquema encurtado do tratamento padrão da tuberculose de 6 meses para 4 meses, em pacientes HIV negativos, infectados com cepas sensíveis às drogas, sem doença cavitária e com cultura negativa no segundo mês de tratamento".

O presente estudo foi realizado em três etapas. Na primeira etapa foram selecionados os isolados de MTB de acordo com a gravidade da tuberculose manifestada nos pacientes e, classificada com base no perfil radiográfico dos pulmões. Segundo esta classificação os pacientes foram categorizados como tendo doença mínima, moderada ou avançada. Os 219 isolados utilizados neste estudo eram provenientes de pacientes categorizados com doença cavitária e doença não cavitária.

6.3 Caracterização das cepas de origem pulmonar:

Todos os pacientes do estudo eram oriundos de ensaio clínico, portanto os dados clínicos e terapêuticos, a coleta de dados, o acompanhamento dos pacientes e a análise microbiológica das amostras de escarro foram rigorosamente controlados. O formulário de avaliação inicial dos pacientes encontra-se no Anexo 3.

Um total de 219 isolados de MTB obtidos de pacientes com tuberculose pulmonar oriundos da região Metropolitana de Vitória e de outros municípios do estado do ES e, mantidas em repositório no NDI – UFES foram submetidas à análise de tipagem molecular. Estes isolados são provenientes de pacientes de ambos os sexos, sem história pregressa de tuberculose, HIV negativos, com idade entre 18 e 60 anos, sem co-morbidades e com tempo de evolução de doença definido. A gravidade da doença nos dois grupos de pacientes foi determinada de acordo com os parâmetros radiográficos, cujo formulário de avaliação encontra-se no Anexo 4 preconizados pelo *US National Tuberculosis and Respiratory Disease Association* (NTRDA) que classifica a doença em mínima, moderadamente avançada e avançada (FALK *et al.*, 1969):

I. Forma mínima: Inclui lesões de densidade leve a moderada, mas sem a presença de cavitação. Essas lesões podem envolver uma pequena parte de um ou de ambos pulmões, mas sua extensão total, independente de sua distribuição , não deve exceder o volume de um dos lados dos pulmões. Estas lesões devem estar localizadas acima da segunda junção condroesternal e a espinha da quarta ou o corpo da quinta vértebra torácica. Esta classificação também pode ser aplicada às lesões não detectadas no exame radiográfico mas que estão associadas à presença de bacilos detectados pela cultura de escarro.

II. Forma moderada: a doença pode estar presente em um ou ambos os pulmões; a extensão total não deve ser mais do que o seguinte:

a) Lesões dispersas de densidade leve a moderada não deve envolver mais do que o volume total de um pulmão ou o volume equivalente de ambos.

b) Lesões densas e confluentes não devem envolver mais do que 1/3 do volume de um pulmão.

c) O diâmetro total da(s) cavidade(s) não deve ser maior do que 4 cm.

III. Forma avançada: lesões mais extensas do que as da forma moderada ou com somatório dos diâmetros das cavidades acima de 4 cm.

As radiografias dos pacientes foram examinadas por dois médicos, um radiologista e um pneumologista e os resultados de ambos os exames deveriam ser concordantes. Nos casos discordantes um segundo pneumologista examinava as radiografias e emitia o laudo definitivo. Os três profissionais foram cegos para a avaliação dos demais dados.

As informações clínicas e demográficas dos pacientes foram obtidas de seus prontuários e dos respectivos documentos fontes arquivados no NDI-UFES (Anexo 3 e 4).

Dessas informações foram selecionadas variáveis demográficas que incluíram sexo, idade, município de origem, estado civil e escolaridade, enquanto que as variáveis clínicas incluíram vacinação com BCG, extensão da doença, produção de escarro, tempo de produção de escarro, hemoptise, febre, tempo de febre, sudorese, perda de apetite, perda de peso, dispnéia, dor no peito, ser contato de TB, tabagismo, alcoolismo, presença de tosse e mediana do tempo de tosse e baciloscopia positiva. As variáveis bacteriológicas incluíram: estar agrupado em *cluster* e pertencer à família LAM (*Spoligotyping*).

6.4 Definição de Caso

Este estudo iniciou-se com 230 isolados, com casos e controles definidos com base na extensão da doença. Porém, após uma revisão nos documentos fonte dos pacientes, onze pacientes foram excluídos por apresentarem comorbidade, restando 219 pacientes. Além disso, optou-se por agrupar os isolados dos pacientes pela presença ou não de cavidade.

Neste trabalho utilizaremos as seguintes definições:

6.4.1 Caso

Isolados provenientes de pacientes do estado do Espírito Santo, categorizados com a forma cavitária da doença.

6.4.2 Controle

Isolados provenientes de pacientes do estado do Espírito Santo, categorizados com a forma não cavitária da doença.

Neste estudo não houve pareamento entre os grupos pois as amostras nele avaliadas eram provenientes de um ensaio clínico com critérios de inclusão que tornaram os dois grupos muito semelhantes.

6.5 Cultura e Identificação dos isolados selecionados para o estudo

Os 219 isolados selecionados para este estudo foram descongelados, inoculados em meio de cultura Ogawa-Kudoh e incubados a 37ºC por três semanas, quando alcançaram crescimento suficiente para extração de DNA. Todos os isolados foram identificados como MTB com base nas características fenotípicas das colônias (colônias rugosas, cremes e opacas), na sensibilidade ao ácido *p*-nitrobenzóico (500µg/ml) e na resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (2µg/mL) (KENT e KUBICA, 1985) e foram submetidos ao teste de sensibilidade às drogas anti-tuberculose pelo sistema BACTEC 460TB de acordo com recomendações do fabricante.

6.6 Técnicas de Identificação Molecular

Para minimizar problemas com a qualidade e reprodutibilidade dos testes moleculares, estes foram sempre realizados pelos mesmos técnicos, que estavam cegos para a identidade dos isolados e para os demais dados do estudo.

6.6.1 Análise do Tamanho dos Fragmentos de Restrição baseado na sequência de inserção IS*6110* (RFLP- IS*6110*)

Este método foi realizado de acordo com o protocolo preconizado, com algumas modificações, como descrito a seguir (VAN EMBDEN *et al.*, 1993).

Extração e Purificação do DNA: Duas alças cheias de cultura de micobactérias ressuspensos em 500µL de TE foram inativados em banho seco a 82°C por 30 minutos e resfriados à temperatura ambiente. A essa suspensão foram adicionados 50µL de solução de lisozima, os tubos foram invertidos 20X para homogeneizar e incubados em banho-maria a 37°C por 12 horas. Após a incubação foram adicionados 70µL de solução de SDS 10% e 6µL de proteinase K (10mg/mL), os tubos foram novamente invertidos 20X e incubados a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100µL de NaCl 5M, os tubos invertidos 20X e adicionados 80µL de solução n-cetyl N,N,N-trimethyl ammonium bromide (CTAB). Os tubos foram agitados em agitador tipo Vórtex até que a suspensão se tornasse leitosa quando foram então incubados a 65°C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados 700µL de solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram agitados novamente por 10 segundos e então centrifugados à temperatura ambiente por 5 minutos a 13.000xg. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos estéreis, foram adicionados 500µL de isopropanol e os tubos homogeneizados em agitador tipo vórtex. A mistura foi incubada a –20°C por pelo menos 1 hora e centrifugada por 15 minutos a 13.000xg. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, centrifugado por 5 minutos a 13.000xg e o sobrenadante descartado. Alíquotas de 20µL de TE foram adicionados aos tubos e incubados a 37ºC em banho-maria por 1 hora. A concentração do DNA foi obtida utilizando-se o aparelho NANODROP®. Os DNA foram diluídos para a concentração de 600ng/µL e conservados a 4°C para uso imediato ou a -20°C para uso futuro.

Digestão do DNA com Enzima *Pvu* II*:* Foram digeridos aproximadamente 4,5µg de cada amostra de DNA a ser analisada e da cepa de referência Mt14323 com *Pvu* II, em um volume final de 30µL. A mistura da reação foi preparada adicionando-se um volume de DNA contendo a quantidade desejada, 1µL da enzima *Pvu* II (10U/µL), tampão de enzima (10X) e quantidade de água destilada estéril para completar 30µL. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 3 horas.

Southern Blotting: A separação dos fragmentos provenientes da restrição das amostras de DNA com a enzima *Pvu* II foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 0,5X por 16 horas a 50 volts, e visualizado no sistema de imagem

MiniBis. Em seguida o gel recebeu tratamento com 500 mL de HCL 0,25M por 10 minutos seguido de duas lavagens com 500mL de NaOH 0,4M por 20 minutos. O gel foi colocado em um sistema *vacuum blotter apparatus* (*GE Healthcare Life Sciences*) para a transferência dos fragmentos de DNA para a membrana Hybond N-Plus (*GE Healthcare Life Sciences*). Após a transferência, a membrana contendo os fragmentos de DNA foi lavada com 500mL de solução SSC 2X (SSC 20X – NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M pH 7).

Produção da Sonda pela PCR: Foram utilizados 20ng de DNA da cepa de referência Mt14323 (*M. tuberculosis*) e os oligonucleotídeos iniciadores INS 1 – 5' CGT GAG ATC GAG GTG GC; INS 2- 5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA. O programa de amplificação consistiu de: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto. O produto da PCR foi submetido à dosagem da concentração do DNA utilizando-se o aparelho NANODROP® e armazenado a -20°C até o uso.

Marcação da Sonda IS6110: A sonda IS*6110* foi diluída com água do Kit ECL (*GE Healthcare Life Sciences*) para uma concentração de 10ng/µL, desnaturada a 100°C em banho-maria por 5 minutos e resfriada imediatamente em gelo por 5 minutos. A seguir foram adicionados volumes iguais de reagente de marcação e glutaraldeído (Kit ECL) homogeneizados cuidadosamente e, incubados a 37°C por 10 minutos. A sonda marcada foi utilizada imediatamente.

Hibridização e Detecção da IS*6110*: A membrana foi colocada numa garrafa de hibridização e adicionado tampão de hibridização aquecido a 42°C por 45 minutos. Em seguida, foi adicionada a sonda à membrana e incubada *overnight*. Após o tempo de incubação, a membrana foi submetida a duas lavagens com 50mL de SSC/SDS a 55ºC por 10 minutos, seguido de duas lavagens em 500 mL de tampão SSC 2X e uma lavagem em água destilada.

Detecção por Quimioluminescência: Finalizada a etapa de hibridização, a membrana foi tratada com a mistura de volumes iguais de reagente de detecção 1 (peroxidase) e reagente de detecção 2 (luminol - Kit ECL) e em seguida sobreposta por um Hyperfilm

ECL (*GE Healthcare Life Sciences*) por um período de 30 minutos para a detecção dos perfis de RFLP-IS*6110*. Os filmes foram revelados com solução reveladora (Kodak®) por um minuto, lavados em água deionizada por um minuto, fixados em solução fixadora (Kodak®) por um minuto, novamente lavados em água deionizada e água corrente abundante, e secos.

Análise dos Resultados de RFLP-IS*6110*

Depois de secos, os filmes foram digitalizados e os perfis analisados pelo software BioNumerics, versão 6.5 (Applied Maths – Bélgica). Este programa fornece uma análise dos *clusters* utilizando a análise de agrupamento pelo método de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) baseado no coeficiente de Dice para o pareamento, com uma tolerância de 1,0% e otimização de 1,5%.

Para a análise dos resultados foram seguidas as recomendações de Tenover e colaboradores (1997). Dois ou mais isolados foram considerados pertencentes a um mesmo *cluster* quando seus padrões de RFLP eram indistinguíveis, isto é, apresentaram o mesmo número de bandas e as mesmas posições dessas bandas. Aqueles *clusters* que apresentaram diferenças de uma até três bandas foram considerados membros de uma mesma família (similaridade de 99% até 65%). Os isolados que apresentaram padrões de RFLP totalmente diferentes dos demais isolados foram considerados padrões únicos (não *cluster*).

6.6.2 Análise da Região Direct Repeat (DR)– Spacer Oligonucleotide Typing (Spoligotyping)

Este método foi realizado de acordo com o protocolo preconizado a seguir (BRUDEY *et al.*, 2006).

Amplificação do Lócus DR: Foram utilizados nas reações de PCR 20ng de DNA e as cepas *M. tuberculosis* H37Rv *e M. bovis* BCG foram utilizadas como controles. A PCR foi realizada utilizando 20pmol dos iniciadores DRa 5’ CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3’ – biotinilado e DRb 5’ GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3’; 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM $MgCl_2$, perfazendo um volume total de 50µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial do DNA a 96°C por 3 minutos; 35 ciclos de

desnaturação a 96 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 30 segundos e um ciclo final de 72 °C por 5 minutos, em termociclador Gene Amp PCR System 2400 (*Perkin Elmer, USA*).

Hibridização com a Membrana e Revelação: Trinta microlitros do produto da PCR foram diluídos em 150µL de 2x SSPE/ 0,1% SDS e desnaturados a 100°C durante 10 minutos e em seguida colocados em banho de gelo. Esta suspensão foi aplicada ao *miniblotter* (MN45, Isogen, Holanda), onde previamente foi montada uma membrana (Isogen, Holanda e posteriormente Ocimum Biosolutions Inc., Hyderabad India) contendo as 43 sequências correspondentes aos espaçadores conhecidos na região DR de MTB, que foi lavada com 2x SSPE/ 0,1% SDS a 60°C por 5 minutos. A hibridização da membrana foi realizada a 60°C por 60 minutos. Em seguida a membrana foi lavada duas vezes com 2x SSPE/ 0,5% SDS a 60°C por 5 minutos cada, e incubada com um conjugado de estreptavidina-peroxidase, a 42°C por 60 minutos. A membrana foi então lavada duas vezes com 2x SSPE/ 0,5% SDS a 42 °C por 10 minutos, seguidos de 2 lavagens com 2x SSPE à temperatura ambiente. Em seguida foi tratada com a mistura de volumes iguais de reagente de detecção 1 e reagente de detecção 2 (IMMOBILON^{TM} WESTERN - Chemiluminiscent HRP Substrate - Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e em seguida, sobreposta por um filme por um período de 15 minutos.

Reutilização da membrana: As membranas de Spoligotyping podem ser utilizadas por mais de uma vez. A quantidade de vezes que pode ser utilizada depende da qualidade da membrana adquirida e da qualidade do tratamento da membrana (Stripping) após a hibridização e detecção, em alguns casos podem ser reutilizadas por mais nove vezes. Para a reutilização numa outra hibridização, os produtos de PCR são dissociados da membrana. Para isso a membrana é lavada duas vezes em SDS 1% a 80°C por 30 minutos cada lavagem. Em seguida a membrana é lavada em solução de EDTA 20 mM pH 8, por 15 minutos a temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo a membrana é armazenada em solução de EDTA 20 mM pH 8 a 4°C até o uso.

Interpretação e Tabulação dos Resultados

Após revelação, os sinais obtidos com os 43 espaçadores para cada isolado foram analisados, digitalizados, transformados para formato binário (0 é falta de sinal e 1

é presença de sinal) em tabela do Microsoft Excel e comparados aos padrões no banco de dados SITVITWEB (http//:www.pasteur- guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/) para identificar o *Shared Interntional Type* (SIT) (DEMAY *et al.*, 2012). A partir do SIT as famílias foram identificadas de acordo com o banco internacional de espoligotipos SpolDB4 (BRUDEY *et al.*, 2006). Os isolados que não obtiveram correspondência a um SIT no banco SpolDB4 foram denominados padrão novo e a probabilidade de pertencerem a uma subfamília foi calculada pelo *Spotclust* (http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_spotclust.html). Este software analisa os perfis com base numa mistura de modelos como o SpolDB3 e o Random Initialized Model - RIM (VITOL *et al.*, 2006). Como norma do laboratório, todo perfil novo era confirmado repetindo-se a PCR e a Hibridização.

6.6.3 Análise do *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit* (MIRU) – Número Variável de Repetições em Sequência

Os DNAs purificados e diluídos a uma concentração de 10ng/µl dos 219 isolados selecionados foram submetidos a tipagem por MIRU-VNTR pela GenoScreen (Lille, France). Esta empresa realizou a tipagem MIRU-VNTR de 24 loci de acordo com os padrões internacionais (SUPPLY *et al.*, 2006). Para monitorar e assegurar a qualidade e reprodutibilidade, um DNA controle negativo, e DNAs de dois controles positivos com perfis de MIRU-VNTR conhecidos (*M. tuberculosis e M, bovis* BCG P3) foram incluídos em triplicatas cegas em cada placa de 96 poços.

6.7 Analise computacional

O programa BioNumerics (*Applied Maths, Belgium*) foi utilizado para a análise de bioinformática dos padrões genéticos obtidos pelos métodos moleculares de tipagem. Para tal os dados foram organizados em planilhas Excel, formatados e em seguida importados para o programa *Bionumerics*. Os perfis de RFLP-IS*6110* foram inseridos neste software como *fingerprint type* e os resultados da tipagem por MIRU-VNTR foram inseridos como *Character type*.

Para a análise de caracteres binários, a similaridade foi calculada usando o coeficiente de Dice. Para caracteres não binários e categóricos o coeficiente escolhido foi Pearson.

A análise de formação de *clusters* foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Mathematical Averages*).

Na plataforma MIRU-VNTR*plus* pode-se comparar as cepas em estudo com cepas de referência, presentes na base de dados. Para essa comparação, estão disponíveis vários coeficientes de similaridade, sendo o coeficiente de diferença entre *loci,* o padrão adotado para a análise. Este coeficiente de diferença divide o número de marcadores com um alelo de diferença, pelo total de marcadores usados (ALLIX-BEGUEC *et al.*, 2008). Para o presente estudo foi usado o limite máximo de 0,17, o mesmo proposto pelo site, o que corresponde a uma tolerância de dois *loci* de diferença entre as cepas.

6.8 Cálculo da Diversidade Alélica

O cálculo da diversidade alélica (h) de cada lócus de MIRU-VNTR foi realizado conforme preconizado por Selander e colabotadores (1986), utilizando-se a fórmula:

$$h = 1 - \sum x_i^2 \, [(n/n - 1)],$$

Equação 1: Cálculo da diversidade alélica

onde $\mathbf{x_i}$ é a frequência do alelo i no lócus, e **n** é o número de isolados.

A diversidade alélica (*h*) é um bom índice indireto de heterogeneidade/polimorfismo das amostras e também um bom índice de poder discriminatório fornecido pelos loci em estudo (SELANDER *et al.*, 1986). Segundo Sola e colaboradores (2003), com base neste índice, a amostra é considerada altamente discriminatória/polimórfica se $h \geq 0,6$; moderadamente discriminatória se $0,3 \geq h \leq 0,6$ e fracamente discriminatória se $h \leq 0,3$.

6.9 Poder Discriminatório

O poder discriminatório de um método de tipagem é a sua habilidade de distinguir entre cepas não relacionadas. Isto é determinado pelo número de tipos definidos pelo método e a frequência relativa dos tipos (Hunter & Gaston, 1988). O índice

discriminatório de Hunter – Gaston (HGDI), disponível no endereço eletrônico: http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/)) pode ser utilizado como um parâmetro numérico do poder discriminatório de RFLP, MIRU-VNTR e *Spoligotyping*, isoladas ou em associação.

O HGDI foi calculado conforme preconizado por Hunter & Gaston (1988) por meio da utilização da fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} x_j(x_j - 1)$$

Equação 2: Cálculo do poder discriminatório das técnicas moleculares

onde D é o índice de poder discriminatório, N o número de linhagens testadas não relacionadas, S o número de tipos diferentes, e xj o número de cepas pertencentes ao tipo j, assumindo que os agrupamentos serão classificados em categorias exclusivas (HUNTER e GASTON, 1988). A equação de Hunter e Gaston é uma aplicação do índice de diversidade de Simpson (SIMPSON, 1949).

6.10 Taxa de Agrupamento (*Clustering Rate*)

A taxa de agrupamento pode ser calculada segundo a fórmula:

$$CR = (n_c - c)/n$$

Equação 3: Cálculo da taxa de agrupamento

onde **n** é o número total de casos no estudo, **c** é o número de genótipos representados por pelo menos dois casos, e $\mathbf{n_c}$ é o número total de casos em *clusters* de dois ou mais pacientes (SUPPLY *et al.*, 2006). Estes cálculos também podem ser feitos ingressando os dados na página da web www.miru-vntrplus.org (ALLIX-BEGUEC *et al.*, 2008).

6.11 Caracterização da linhagem RD^{Rio}

6.11.1 Detecção da LSP - Deleção RD^{Rio}

A LSP de 26,3kb chamado RD^{Rio} encontra-se entre os genes Rv3346c e Rv335c. Esta deleção pode ser detectada por uma PCR-Multiplex descrita por Lazzarini *e colaboradores* (2007).

A PCR foi realizada utilizando-se 20pmol dos iniciadores BridgeF: 5‘ – CAC TCC GGC TGC CAA TCT CGT C –3', BridgeR: 5‘ – CAC CGC GAG GCT GAA TGA GAC CA – 3', IS1561F: 5‘ – GAC CTG ACG CCG CTG ACA C –3', IS1561R: 5‘ – CAC CTA CAC CGC TTC CTG CC –3'; 1U Taq polimerase (*Invitrogen Life Technologies*), tampão de reação 1X, $MgCl_2$ 2.0 mM, DMSO 5%, dNTP 0,2 mM cada um e H_2O deionizada autoclavada para o volume final de 25 µL, DNA 20ng. A amplificação foi realizada em termociclador Gene Amp PCR System 2400 (*Perkin Elmer, USA*) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguido por 45 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C, 4 minutos a 72°C e extensão final de 10 minutos a 72°C. O tamanho dos produtos amplificados foram visualizados por meio de eletroforese (5V/cm) com 12µL de produto de PCR misturado a 3µL de tampão de corrida 6x, em gel de agarose 2% com tampão TBE 1x e posterior coloração com brometo de etídio (0,5µg/ml). Foram utilizados na reação 20ng de DNA das cepas *M. tuberculosis* H37Rv como controle positivo e água como controle negativo. Os produtos amplificados foram fracionados por meio de eletroforese (5V/cm) em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X e visualizados com posterior coloração com brometo de etídio (0,5µg/mL) e transiluminação. As imagens foram capturadas e armazenadas no sistema de imagem MiniBis (DNR Imaging Systems LTD, Israel). Os tamanhos dos fragmentos resultantes foram estimados comparando-se ao tamanho das bandas do marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen Life Technologies).* Um fragmento de 530 pb ou um fragmento de 1175 pb pode ser obtido. Se a região RD^{Rio} não estiver deletada os iniciadores IS1561F e IS1561R neste caso servem como controle positivo da reação de PCR uma vez que produzem um fragmento de 530pb de uma região interna ao alvo RD^{Rio}. Se a região estiver deletada os iniciadores BridgeF e BridgeR conseguem produzir um fragmento de 1175 pb, enquanto que o alvo dos iniciadores IS*1561* não estará mais presente.

6.11.2 Detecção da Deleção da Região RD174

Segundo Lazzarani e colaboradores (2007), a deleção dessa região é utilizada como marcador da família LAM, e este método será realizado de acordo com o protocolo preconizado a seguir (GIBSON *et al.*, 2008).

A reação de PCR para a análise da região de diferença RD174 (*Rv1994c-Rv1997c*) foi realizada baseado no método descrito por Gibson *e* colaboradores em 2008, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores que anelam nas regiões flanqueadoras e interna da sequência alvo. Estas reações foram realizadas utilizando 20 pmol dos iniciadores RD174F: 5'-AGC TGC TCC GGC TCG CGG TCC TCG TTG TC -3, RD174R: 5'-ATC GCA GCG GTG AAC GTT TCG ACG GCA TCT -3 e RD174IF: 5'- GCC TAT CCG CGG ACG GCA TCC ATT GTG A -3; 1U Taq polimerase (*Invitrogen Life Technologies*), tampão de reação 1X, $MgCl_2$ 2.0 mM, betaína 1M, dNTP 0,2 mM cada um e H_2O deionizada autoclavada qsp 50µL, DNA 20ng. A amplificação foi realizada no termociclador Gene Amp PCR System 2400 (*Perkin Elmer, USA*) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C seguido por 45 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C, 4 minutos a 72°C e extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para esta reação foram utilizados 20ng de DNA das cepas MTB H37Rv como controle positivo e água como controle negativo. Os produtos amplificados foram fracionados por meio de eletroforese (5V/cm) em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X e visualizados com posterior coloração com brometo de etídio (0,5µg/mL) e transiluminação. As imagens foram capturadas e armazenadas no sistema de imagem MiniBis (DNR Imaging Systems LTD, Israel). Os tamanhos dos fragmentos resultantes foram estimados comparando-se ao tamanho das bandas do marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen Life Technologies).* Na ausência de deleção da região RD174 o iniciador interno anela-se, produzindo um produto de 300pb, ao passo que, na presença da deleção será observada uma banda de 500pb dado que somente os iniciadores flanqueadores conseguem se anelar. Os produtos das reações do DNA de *M. tuberculosis* H37Rv serão os controles, uma vez que esta cepa não tem a região RD174 deletada.

6.12 Detecção do SNP Ag85C^{103} (G103A) por PCR-RFLP (Gibson *et al.*, 2008).

Esta técnica é utilizada para avaliar a presença do SNP (G⇨ A) identificado no códon 103 do gene codificador do Ag85C (*Rv0129c*), sendo esta substituição um marcador específico da linhagem LAM e foi realizada baseado no método descrito por Gibson e colaboradores em 2008.

Reação da PCR: foi realizada utilizando 20 pmol dos iniciadores Ag85C103F: 5'-CTG GCC GTT GCT CTG CGA GGG CTG ATA CCA –'3 e Ag85C103R: 5'-CGA TCT CGC GCT GCG GCC ACG ACA TT-'3, 1U Taq polimerase (*Invitrogen Life Technologies*), tampão de reação 1X, $MgCl_2$ 2.0 mM, DMSO 5% (v/v), 0,2 mM de dNTP, H_2O deionizada autoclavada qsp 50µL e 20ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Gene Amp PCR System 2400 (*Perkin Elmer, USA*) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguido por 45 ciclos de 95°C por 1 minutos, 65°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos e extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram fracionados por meio de eletroforese (5V/cm) em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X e visualizados com posterior coloração com brometo de etídio (0,5µg/mL) e transiluminação. As imagens foram capturadas e armazenadas no sistema de imagem MiniBis (DNR Imaging Systems LTD, Israel). Os tamanhos dos fragmentos resultantes foram estimados comparando-se ao tamanho das bandas do marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen Life Technologies).*

Restrição Enzimática: A restrição enzimática dos produtos amplificados (519 bp) foi realizada utilizando-se a enzima de restrição *Mnl* I (*Moraxella nonliquefaciens*), a 37°C, por quatorze horas. Esta enzima possui três sítios de restrição no produto amplificado (figura 6), indicados com triângulos pretos:

▼

5'...CCTC$(N)_7$ ... 3'

3'...GGAG$(N)_6$ ... 5'

▲

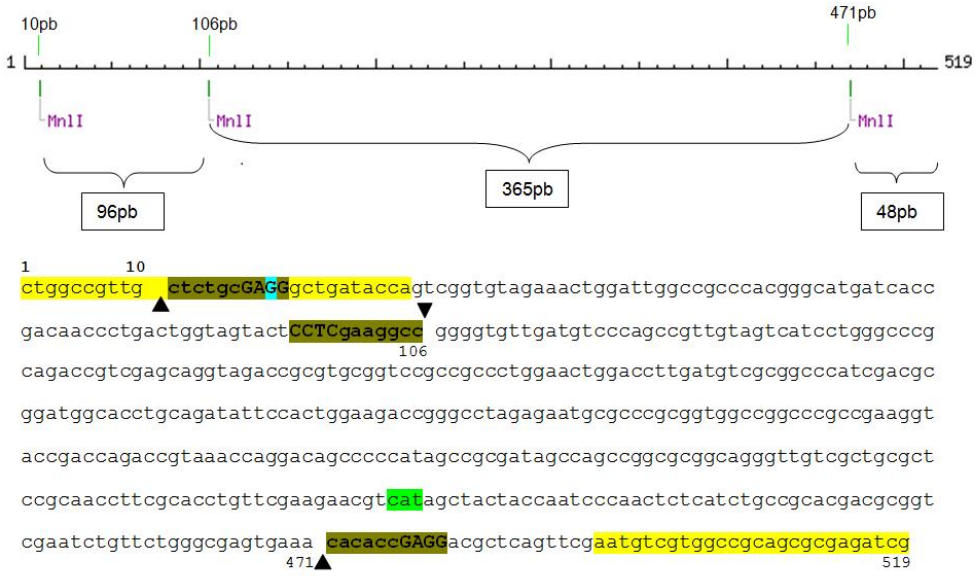


Figura 6: Sítios de restrição da enzima *Mnl*I no produto amplificado de 519pb com os tamanhos dos fragmentos principais produzidos. Na sequência, ressaltado em amarelo os sítios de anelamento dos iniciadores Ag85C103F e Ag85C103R. Ressaltado em verde claro a sequência complementar ao códon de iniciação do gene *Rv0129c*, em verde escuro os sítios de reconhecimento da enzima *Mnl* I, indicado com um triângulo preto os sítios onde acontecem os cortes de restrição. Ressaltado em azul o nucleotídeo G onde pode acontecer uma substituição (codon103 do gene *Rv0129c*).

A reação de restrição enzimática foi padronizada para 25 µl nas seguintes condições: 0,04U/µl *Mnl* I, tampão de reação NEBuffer 4 1X, 100 ng/µl BSA, 15 µl de produto de PCR e H_2O livre de DNAse qsp 25µl. Uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima requerida para digerir 1µg de DNA do fago λ a 37°C num volume total de 50µL. Os produtos da restrição enzimática foram fracionados por meio de eletroforese (5V/cm) em gel de agarose 3% com tampão TBE 1X e visualizados com posterior coloração com brometo de etídio (0,5µg/mL) e transiluminação. As imagens foram capturadas e armazenadas no sistema de imagem MiniBis (DNR Imaging Systems LTD, Israel). Os tamanhos dos fragmentos resultantes foram estimados comparando-se ao tamanho das bandas do marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen Life Technologies).* Os tamanhos dos fragmentos resultantes foram estimados comparando-se ao tamanho das bandas do marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen Life Technologies).* A presença do SNP (G^{103}) no gene *Rv0129c* resulta na perda de um dos

três sítios de restrição, visualizado por meio da presença de uma banda de 461 pb e outra de 48 pb. A sua ausência é caracterizada pela presença de três bandas de 365, 96, e 48 pb. Nem sempre é possível observar o produto de 48 pb pelo método de eletroforese em gel de agarose.

6.13 Detecção dos SNPs MTB I a VII

Foram selecionados aleatoriamente 70 amostras para a análise de SNPs filogenéticos com o intuito de melhorar a classificação dos isolados da família T.

Este teste foi realizado no laboratório do Dr. David Alland em New Jersey- EUA, conforme metodologia descrita por Filliol e colaboradores (2006).

6.14 Análise da sequência de fragmento do gene *pks*15/1

A detecção da inserção de 7pb no gene *pks15/1* em MTB, foi realizada por meio de sequenciamento desta região. A amplificação da região de interesse foi realizada conforme as condições descritas por Constant e colaboradores (2002).

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR): Para a amplificação, 2 µL de DNA purificado (25 a 50ng) foram adicionados à reação de PCR contendo 1M de Tampão de PCR 10X, 1,25mM de $MgCl_2$, 0,2mM dNTPs ,1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen-Brasil), 1M de Betaína e 20 pmol de cada iniciador, PKS 1F (CTG GGT TGG CCT GCA CGT GGG CCA TAA) e PKS 1R (GCC CCC GCA GAG GCG CCG GTT) em um volume final de 100µL. As condições de amplificação constituíram de uma desnaturação inicial à 94ºC por 5 minutos, seguida de 45 ciclos de: 94ºC por 1 minuto, 63ºC por 1 minuto e 72ºC por 1 minuto com uma extensão final de 72ºC por 10min. A amplificação produz um produto de 520pb que foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) e coloração do DNA com brometo de etídio (0,5µg/mL). Todas as imagens geradas foram capturadas e armazenadas no sistema de imagem MiniBis (DNR Imaging Systems LTD, Israel). Todos os fragmentos gerados foram analisados por sequenciamento.

Purificação, sequenciamento e análise dos genes *pks15/1*: A purificação dos produtos de PCR foi realizada com PCR Clean-up Kit (Invitrogen do Brasil). Para as reações de sequenciamento foi utilizado o kit *ABI Prism BigDye™ Terminator*, v 3.0 (*Applied Biosystems*). Após a purificação do produto amplificado, foram feitas reações contendo 1,5 µL do tampão (5X *Sequencing Buffer*), 0,5µL de *BigDye*, 3,2pmol dos iniciadores específicos, 5-20ng de DNA purificado num volume final de 10µL. As condições de amplificação constituiu de 40 ciclos de 96ºC por 10 segundos, 50ºC por 5 segundos e 60ºC por 4 minutos. Os produtos foram precipitados pela adição de 30µL de isopropanol 75%, agitado vigorosamente por 10 segundos. Esta mistura foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e em seguida centrifugada por 45 minutos a 12.000 xg a 20ºC. Desprezado o sobrenadante, foi adicionado ao sedimento 50µL de etanol 75%. Após uma segunda centrifugação por 15 minutos a 12.000 xg e 20ºC, o sobrenadante foi desprezado e a placa foi submetida à secagem em termociclador por 10 minutos a 60ºC, em seguida mantidos a -20ºC até o momento do sequenciamento. Antes do sequenciamento, os DNAs referentes às diferentes amostras foram desnaturados através da adição de 10µL de formamida (Hi-Di™, *Applied Biosystems*) e incubação a 95ºC por 3 minutos, sendo em seguida resfriado. O sequenciamento automático direto do produto de PCR foi realizado em sequenciador ABI3730 (*Applied Biosystems*). As sequências nucleotídicas foram analisadas utilizando SeqScape versão 2.6 (*Applied Biosystems*), na plataforma de seqüenciamento da FIOCRUZ-RJ (http://www.dbbm.fiocruz.br/PDTIS_Genomica/). As sequências foram alinhadas e comparadas com base na sequência já publicada do genoma de MTB H37Rv depositada no *GenBank* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/ M_tuberculosis).

6.15 Cálculo do tamanho amostral

Para analisar a associação entre doença cavitária e padrões moleculares calculamos o percentual de cepas em *cluster* em cada grupo como uma proxy de diferenças moleculares. Para isso calculamos uma diferença de 20% entre os grupos inferindo que pacientes cavitários teriam mais cepas em cluster, com 80% de poder do teste e 5% de significancia estatística do teste. Utilizou-se o programa STATA e para esses parâ/Kudohmetros o tamanho amostral calculado foi de 87 pacientes em cada grupo.

6.16 Análise Estatística

Foi realizada uma análise preliminar, por meio de técnicas exploratórias dos dados, para verificação dos padrões de distribuição e tendências das principais variáveis. Em seguida, procedeu-se análises bivariadas para verificar presença de associações entre elas. Foram empregados os testes Chi-quadrado ($\chi 2$) ou o teste exato de Fisher quando apropriado, ambos com 95 % de intervalo de confiança (IC) e nível de significância (p) < 0,05, para determinar associação entre as variáveis sócio-demográficas, clínicas e microbiológicas com a gravidade da doença. As variáveis que na análise bivariada apresentaram essa associação foram incluídas em um modelo de regressão logística para o cálculo do *Odds Ratio* ajustado. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa STATA (*Statistics/Data Analysis*) versão 11.

6.17 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos realizados para a obtenção dos isolados utilizados neste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos e com aprovação no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa sob Registro Nº 3319, parecer Nº 1135/2002 (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética local sob Nº 062/11 (Anexo 2).

Os procedimentos de coleta de amostras e os exames bacteriológicos para o diagnóstico da tuberculose nas Unidades de Saúde e nos Laboratórios dos Municípios participantes foram realizados de acordo com as práticas de biossegurança instituídas nestes locais. Os procedimentos bacteriológicos e de biologia molecular foram realizados de acordo com as normas de biossegurança e as Boas Práticas Laboratoriais instituídas nos locais da realização dos testes.

Resultados

7. Resultados

7.1 Isolados

Um total de 219 isolados foram descongelados, inoculados em meio Ogawa/Kudoh e incubados a 37ºC por 3 semanas. A figura 7 apresenta o fluxograma dos procedimentos realizados com os referidos isolados desde a triagem dos pacientes.

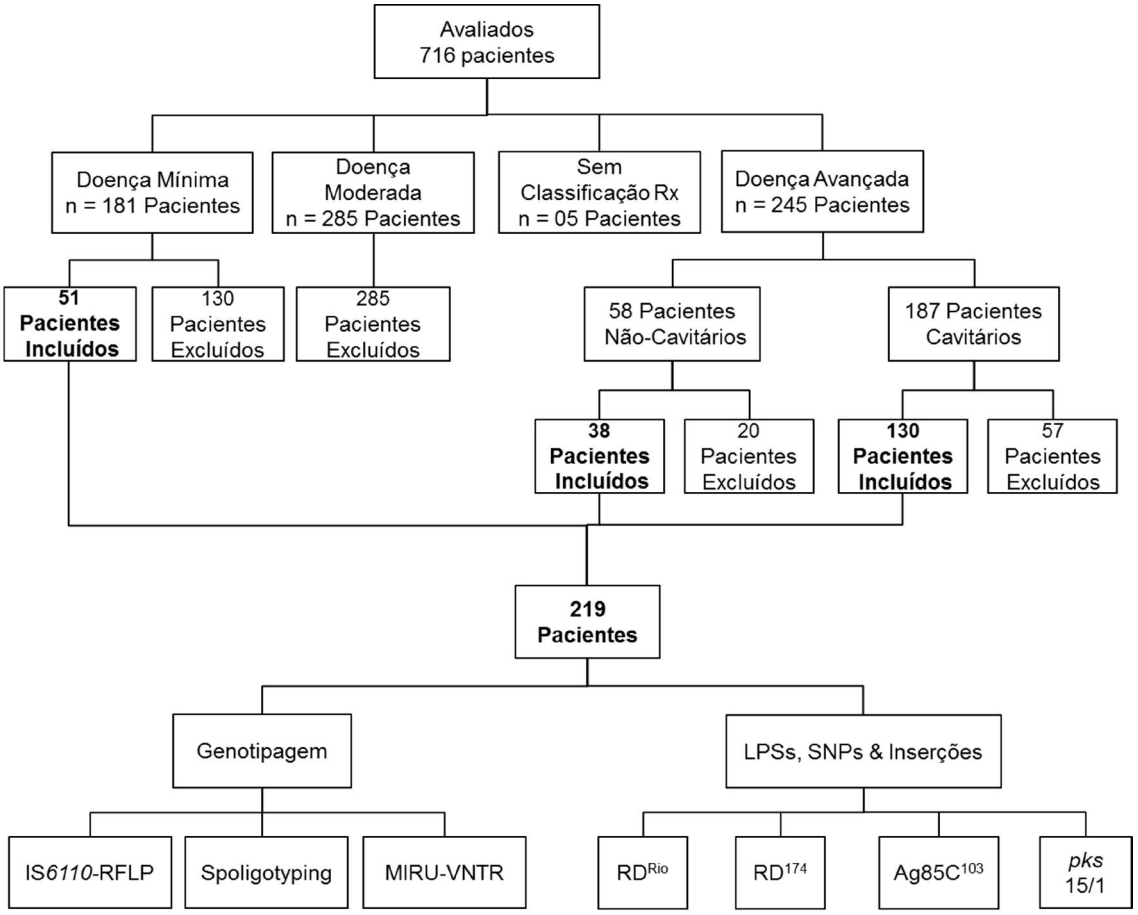


Figura 7: Fluxograma da seleção dos pacientes e dos métodos moleculares utilizados no estudo.

7.2 Dados demográficos e clínicos

Para a análise dos dados demográficos e clínicos dos pacientes, cujos isolados foram selecionados para o estudo, foi construído um banco de dados composto das diferentes variáveis disponíveis.

Todos os testes moleculares foram realizados para os 219 isolados previamente selecionados. No entanto, cinco destes isolados foram retirados das análises por causa da qualidade dos perfis do RFLP-IS*6110* e do MIRU-VNTR, restando 214 isolados para as análises finais. Desses, 127 pertenciam ao grupo caso (cavitários) e 87 ao grupo controle (não cavitários).

Quando se analisou os dados demográficos da população selecionada foi possível observar que a média de idade observada entre o grupo cavitário foi de 34 anos (Desvio Padrão -DP= 10 anos) e entre o grupo não cavitário foi de 35 anos (Desvio Padrão - DP= 11 anos) sendo essa diferença estatisticamente não significativa (*p*=0,58).

Em relação à variável sexo, 91 (28%) pacientes do grupo não cavitário e 55 (36%) pacientes do grupo cavitário eram do sexo masculino (*p*=0,19). Quanto à origem dos pacientes do grupo não cavitário, os municípios com maior número de indivíduos com tuberculose incluídos neste estudo foram Cariacica (29%), Serra (28%), Vitória (22%) e Vila Velha (16%). Os pacientes restantes (5%) eram oriundos de outros municípios do estado do Espírito Santo. No grupo cavitário os municípios com maior número de casos incluídos eram de Cariacica (28%), Serra (28%), Vitória (19%) e Vila Velha (20%). Os pacientes restantes (5%) eram oriundos de outros municípios do estado do Espírito Santo (*p*=0,60).

Quanto ao estado civil dos pacientes, observou-se que no grupo não cavitário 32 (49%) eram solteiros, 35 (47%) eram casados e 11 (52%) divorciados, enquanto no grupo cavitário 33 (51%) eram solteiros, 39 (53%) eram casados e 10 (48%) divorciados (*p*=0,91).

Quanto ao nível de escolaridade, foi possível observar que 53% dos pacientes do grupo não cavitário e 61% dos pacientes do grupo cavitário haviam frequentado a escola por um período inferior a quatro anos (*p*=0,21).

Ao investigarmos a presença de cicatriz vacinal, observamos que os resultados da análise desta variável não mostrou significância estatística. Entre o grupo cavitário a presença da cicatriz vacinal prevaleceu em 69% dos pacientes, enquanto no grupo não cavitário em 64% (*p*=0,53).

Os dados demográficos relativos ao sexo, procedência e cicatriz vacinal, bem como os dados clínicos dos pacientes cavitários *versus* não cavitários, foram analisados buscando uma possível associação. Nesta análise também foi considerada a mediana

do tempo de tosse que foi de 71 dias (intervalo interquartil: 30-120 dias). Estes dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Análise das variáveis demográficas e clínicas dos pacientes com TB cavitária e TB não cavitária.

Variáveis	Cavitário	%	Não Cavitário	%	Valor de p	OR[a] (IC)[b]	OR Ajustado (IC)
Demográficas							
Sexo Masculino	91	28	55	36	0,1900	0,67(0,36-1,27)	
Escolaridade	49	61	41	52	0,2100	1,41(0,78-2,55)	
Município de origem	24	19	19	22	0,6000	1,20(0,57-2,48)	
Clínicas							
Cicatiz Vacinal	87	68	56	64	0,5200	1,20(0,64-2,22)	
Tosse Sim/Não	118	92	66	76	**0,0004**	4,173(1,7-10,9)	
Tosse Mediana	77	61	46	53	0,2500	1,37(0,76-2,47	
Produção de Escarro	117	93	60	69	**0,0001**	5,85(2,46-14-95)	4,55(1,28-12,13)
Escarro Purulento	102	81	46	53	**0,0001**	3,78(1,97-7,33)	
Hemoptise	41	33	18	21	**0,0570**	1,85(0,94-3,73)	
Febre	97	77	51	59	**0,0040**	2,36(1,25-4,47)	
Sudorese	83	65	40	46	**0,0050**	2,22(1,22-4,02)	
Perda de Apetite	83	75	32	37	**0,0001**	3,24(1,77-5,96)	
Perda de Peso	110	87	58	67	**0,0003**	3,44(1,64-7,33)	
Dor no Peito	86	67	52	60	0,2300	1,41(0,77-2,59)	
Dispnéia	75	60	29	35	**0,0003**	2,84(1,54-5,27)	
Fraqueza	79	62	32	37	**0,0003**	2,83(1,55-5,18)	
Diarréia	12	9	3	3	**0,007***	2,92(0,75-16,55)	
Mialgia	8	6	1	1	**0,061***	5,78(0,75-259)	
Contato TB	55	43	42	48	0,4700	0,81(0,46-1,47)	
Tabagismo - Fumante	32	33	34	40	0,3000	0,74(0,40-1,37)	
Tabagismo - Ex-Fumante	80	63	50	57	0,4200	1,26(0.69-2,28)	
Alcoolismo	24	19	11	13	0,2100	2,64(0,72-3,94)	
Baciloscopia positiva	119	94	52	60	**0,0001**	11,44(4,57-32,15)	5,96(2,59-13,73)

[a] OR = Odds Ratio
[b] IC = Intervalo de Confiança
* teste exato de Fisher
NA = Não se Aplica

Embora os resultados mostrem associação estatisticamente significativa entre as variáveis presença de tosse, produção de escarro, escarro purulento, hemoptise, febre, sudorese, perda de apetite, perda de peso, dispnéia, fraqueza, diarréia, mialgia e baciloscopia positiva, quando realizada a regressão logística, as variáveis que mais contribuíram no modelo explicativo da doença foram baciloscopia (OR_{ajust} = 5,96; IC= 2,58-13,73) e produção de escarro (OR_{ajust} = 4,55; IC= 1,28-16,12). Não houve associação estatisticamente significante com o restante das variáveis.

7.3 Identificação Molecular

7.3.1 Spoligotyping

Para a amplificação do *lócus* DR, necessária para tipagem molecular pela técnica de *spoligotyping*, foram utilizados DNAs brutos e purificados de 214 isolados previamente selecionados.

Os espoligotipos obtidos nesta análise, foram digitalizados (Figura 4), transformados para formato binário em tabela do Microsoft Excel e comparados aos padrões no banco de dados SITVITWEB (DEMAY *et al.*, 2012) que podem se verificado no endereço eletrônico: http//:www.pasteur- guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/, para identificar o *Shared International Type* (SIT).

Na figura 8, estão representados os 43 isolados na vertical e na horizontal os 43 espaçadores imobilizados na membrana. Nela, observam-se sequências com ausência (regiões em branco) e presença de sinal (regiões em preto). Como exemplo de classificação, tem-se a subfamília LAM9 que possui como característica a ausência dos espaçadores 21 ao 24, como pode ser visto na coluna 32 (seta alaranjada) e as cepas controles H37Rv e *M. bovis* BCG nas colunas 19 (seta vermelha) e 20 (seta azul) respectivamente.

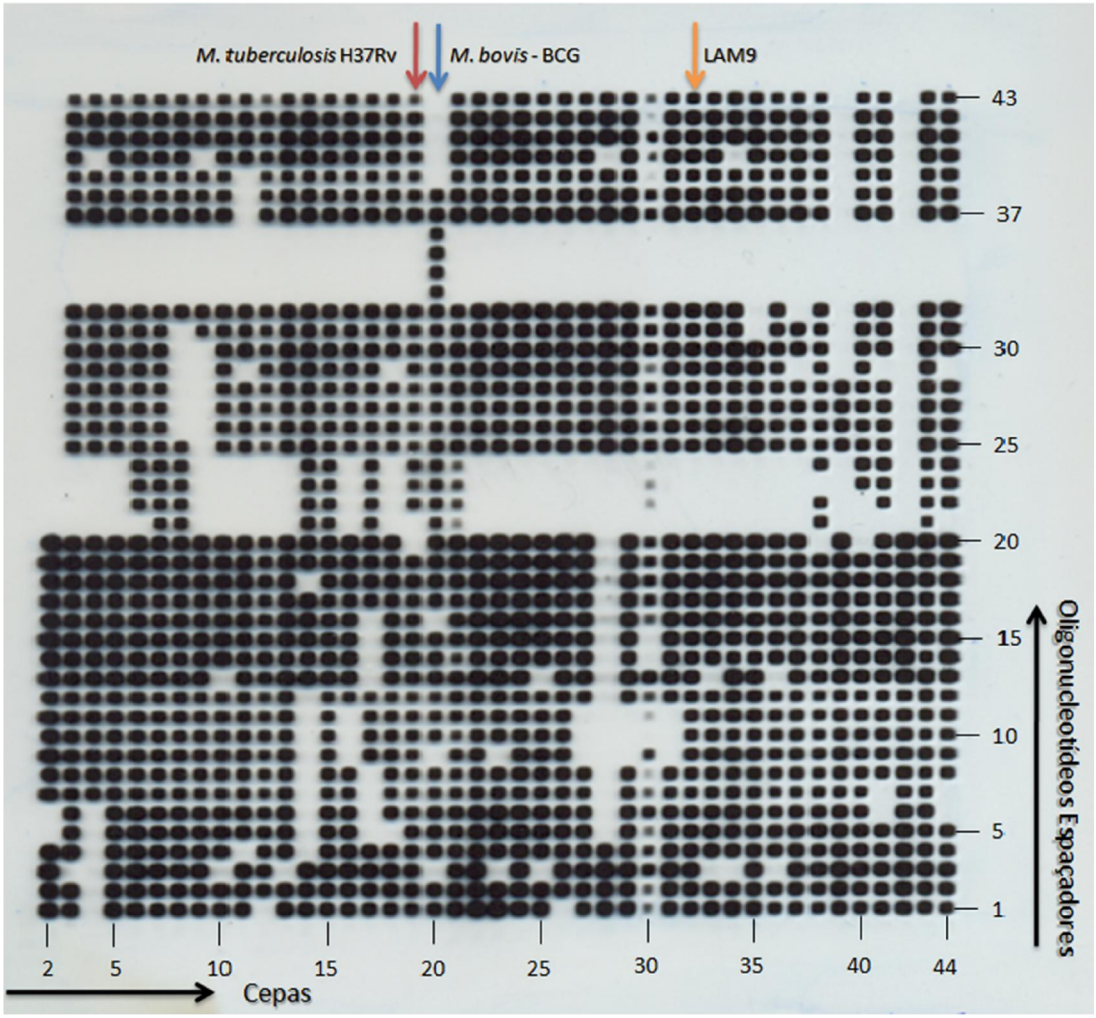


Figura 8: Imagem dos espoligotipos de 43 dos isolados testados.

Dos 87 isolados do grupo não cavitário, foi possível a identificação dos spoligotipos presentes no SpolDB4 para 75 isolados (86%) e dos 127 isolados do grupo cavitário foi possível a identificação dos spoligotipos presentes no SpolDB4 para 107 (84%). Entretanto, para 12 (14%) isolados do grupo não cavitário e para 20 (15%) isolados do grupo cavitário não foi possível esta identificação, sendo estes identificados como perfil Novo como apresentado na Figura 9.

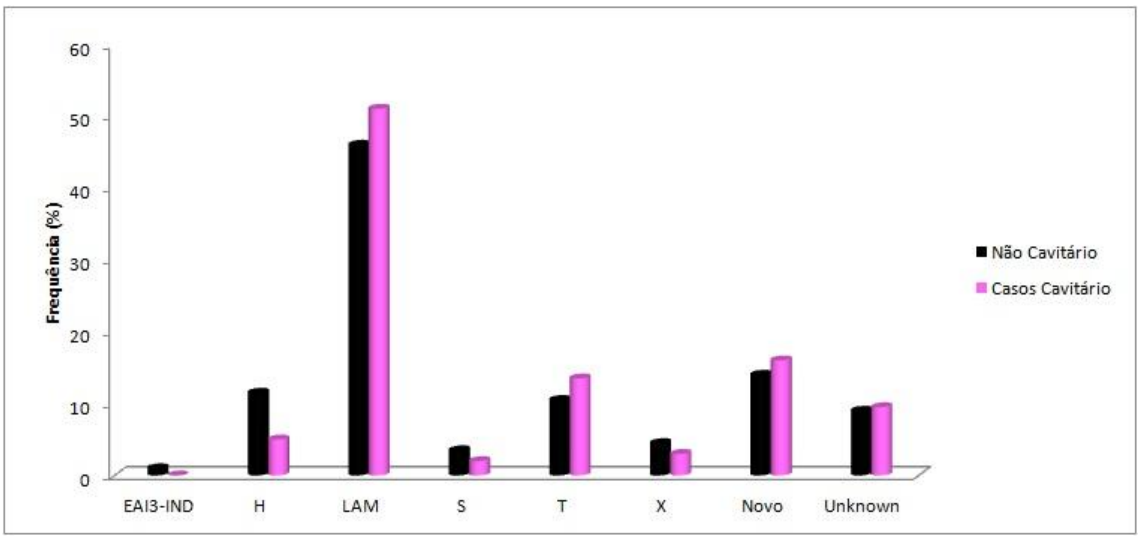


Figura 9: Distribuição das diferentes famílias de "Spoligotyping" pela análise no *SITVITWEB*.

A família LAM foi a mais frequente entre as amostras dos dois grupos analisados, representando 65 (51%) dos isolados no grupo cavitário, dos quais 24 (37%) foram da subfamília LAM9, seguido das subfamílias LAM3 com 13 (20%), LAM2 com 8 (12%) isolados, LAM4 com 3 (4,5%) isolados, LAM1 com 7 (3%) isolados, LAM6 com 6 (9%) isolados, LAM5 com 2 isolados (3,0%), LAM11-ZWE com 1 (1,5%), ambíguos LAM1-LAM4 e LAM com 1 (1,5%) isolado em cada família. Enquanto que no grupo não cavitário, 13 isolados (32,5%) foram da subfamília LAM9, seguido das subfamílias LAM4 com 8 (20%) LAM2 e LAM3 com 5 (12,5%), LAM1 e LAM6 com 3 (7,5%), LAM5 com 2 (5%) isolados e LAM11-ZWE com 1 isolado (2,5%).

A família Haarlem (H) foi representada por 10 isolados (11,5%) no grupo não cavitário e 6 (4%) no grupo cavitário. Nove isolados (7,0%) foram identificados como pertencentes à família T no grupo não cavitário e 17 (13%) no grupo cavitário. As outras famílias identificadas foram: família X com 4 (4,5%) isolados no grupo não cavitário e 4 (3%) no grupo cavitário, família S com 3 (3,5%) isolados no grupo não cavitário e 3 (2,5%) no grupo cavitário e família EAI com 1 isolado (1%) apenas no grupo não cavitário.

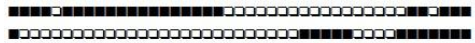
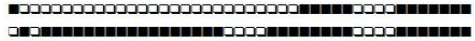
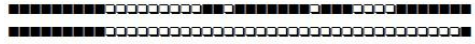
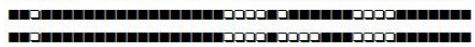
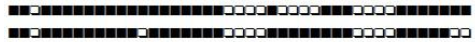
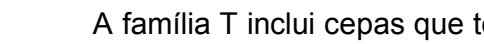
Quando comparadas as proporções de pertencer à família LAM ou pertencer a outras famílias não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,17). A tabela 5 mostra os espoligotipos, a frequência de cada subfamília e os SITs encontrados para 182 isolados analisados neste estudo.

Tabela 5: Frequência de cada *Shared International Type* (SIT), subfamílias e perfis de *Spoligotyping* pelo *SITVITWEB*.

SIT	FAMÍLIA	PERFIL	Frequência (%)
42	LAM9	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	12,5
33	LAM3	■■■■■■■■■□□□■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	7,5
17	LAM2	■■□■■■■■■■■■□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	6,0
20	LAM1	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	4,0
50	H3	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■■	3,5
60	LAM4	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■■	3,0
53	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	2,8
34	S	■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	2,8
828	LAM4	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■■	2,0
64	LAM6	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■□□□□■■■■■■■■	2,0
47	H1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□■□□□□■■■■■■■■	2,0
2449	Unknown	■■■■■□□■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	1,5
230	LAM9	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,5
228	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■□□□□■■■■■■■■	1,5
137	X2	■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■□□□□■	1,5
124	Unknown	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,5
95	LAM6	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■□□□□■■■■□■■■■	1,5
2110	LAM	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■□□□□□□□□■■■■■■■■	1,0
2066	Unknown	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□■■□□□□■■■■■■■■	1,0
1051	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,0
866	LAM9	■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,0
741	H3	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■■	1,0
402	Unknown	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	1,0
291	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,0
238	Unknown	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□■■■■■	1,0
216	LAM5	■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,0
177	LAM9	□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,0
167	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■■	1,0
119	X1	■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,0
93	LAM5	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,0
92	X3	■■■□□□□□□□□□■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	1,0
59	LAM11_ZWE	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■□□□□■■□□□□■■■■■■■■	1,0
51	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■□□□□	1,0
2535	LAM	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■□□□□□□□□■■□■■■■	0,5
1983	EAI3-IND_variant	■■□□■■■■■□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■□□□□■□■■□□□□■■■■	0,5
1905	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■□□□□■■■■■■■■	0,5
1841	LAM3	■■■■■■■■■□□□■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	0,5
1758	LAM9	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■□■■■■■□□□□■■■■■■■■	0,5
1660	T2	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■□■■□□□□■■■■■■■■	0,5
1610	LAM6	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□■■□□□□■■■■□■■■■	0,5
1491	T2	■■■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■■	0,5
1321	Ambiguos LAM1 LAM4	■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■■	0,5
1284	T1	■■■■■□□□□■■■■■□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	0,5
1241	LAM9	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□□□■■■■■■■■	0,5
1227	T5_Madrid2	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■□■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	0,5
1202	Unknown	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	0,5
439	X2	■■■■■■■■■□■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■□□□□■	0,5
237	Unknown	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□□□□□□□□	0,5
218	H1	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■□□□□□■□□□□■■■■■■■■	0,5
211	LAM3	■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	0,5
175	T2	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■■	0,5
162	LAM9	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■□□□□■■■□□■■■■	0,5
122	T1	■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■■□□□□■■■■■■■■	0,5
105	Unknown	■■■■■■■■■□□□■■■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■	0,5
102	T	■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■	0,5
73	Ambiguos T2 T3	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■□■■■■	0,5
36	H3	■■■■■■■■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■□□□□■■■■■■■■	0,5

Em uma tentativa de otimizar a classificação dos espoligotipos identificados como perfil novo, foi realizada uma análise utilizando-se o algorítimo *Spotclust*, encontrado no site (http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_spotclust.html) que informa a probabilidade de um espoligotipo pertencer a uma determinada família ou subfamília, baseando-se no banco de dados SpolDB3. A Tabela 6 mostra a frequência dos padrões novos encontrados e a probabilidade de pertencerem a uma subfamília.

Tabela 6: Frequência de padrões novos encontrados e probabilidades pelo *Spotclust*

Perfil	Família e Probabilidade pelo SPOTCLUST	Frequência (%)
	M. tuberculosis família LAM1 com probabilidade 0.689	2,0
	*M. tuberculosis* família LAM8 com probabilidade 0.999	1,4
	*M. tuberculosis* família 36 com probabilidade 0.999	1,0
	M. tuberculosis família LAM1 com probabilidade 0.663	1,0
	M. tuberculosis família T1 com probabilidade 0.999	0,5
	M. tuberculosis família LAM9 com probabilidade 0.999	0,5
	M. tuberculosis família LAM9 com probabilidade0.999	0,5
	M. tuberculosis família LAM9 com probabilidade 0.999	0,5
	M. tuberculosis família Haarlem3 com probabilidade 0.768	0,5
	*M. tuberculosis* família LAM9 com probabilidade 0.989	0,5
	M. tuberculosis família T3 com probabilidade 0.999	0,5
	M. tuberculosis família 35 com probabilidade 0.999	0,5
	M. tuberculosis família S com probabilidade 0.811	0,5
	M. tuberculosis família LAM3 com probabilidade 0.996	0,5
	M. tuberculosis família LAM8 com probabilidade 0.999	0,5
	M. tuberculosis família T1com probabilidade 0.999	0,5
	*M. tuberculosis* família EAI1 com probabilidade 0.996	0,5
	*M. tuberculosis* família T1 com probabilidade 0.999	0,5
	M. tuberculosis família LAM1 com probabilidade 0.509	0,5
	M. tuberculosis família LAM1 com probabilidade 0.663	0,5
	M. tuberculosis família LAM1 com probabilidade 0.509	0,5
	M. tuberculosis família LAM2 com probabilidade 0.817	0,5
	M. tuberculosis família LAM2 com probabilidade 0.817	0,5
	M. tuberculosis família LAM8 com probabilidade 0.993	0,5
	M. tuberculosis família T1 com probabilidade 0.999	0,5
	M. tuberculosis família EAI1 com probabilidade 0.936	0,5
	*M. tuberculosis* família 36 com probabilidade 0.991	0,5

A família T inclui cepas que tem ausência dos espaçadores 33-36 e é uma família que não é bem definida levando a convergência, e a uma classificação não real dos isolados. Baseado nessa idéia e para esclarecer a tipagem dos isolados que a priori foram classificados como pertencentes à família T, submetemos os resultados de *Spoligotyping* a uma análise no banco *MIRU-VNTR plus* e a uma comparação com os resultados de SNPs. A Figura 10 apresenta os resultados de *Spoligotyping* analisados pelos banco de dados *MIRU VNTR plus* e em comparação com os resultados dos SNPs.

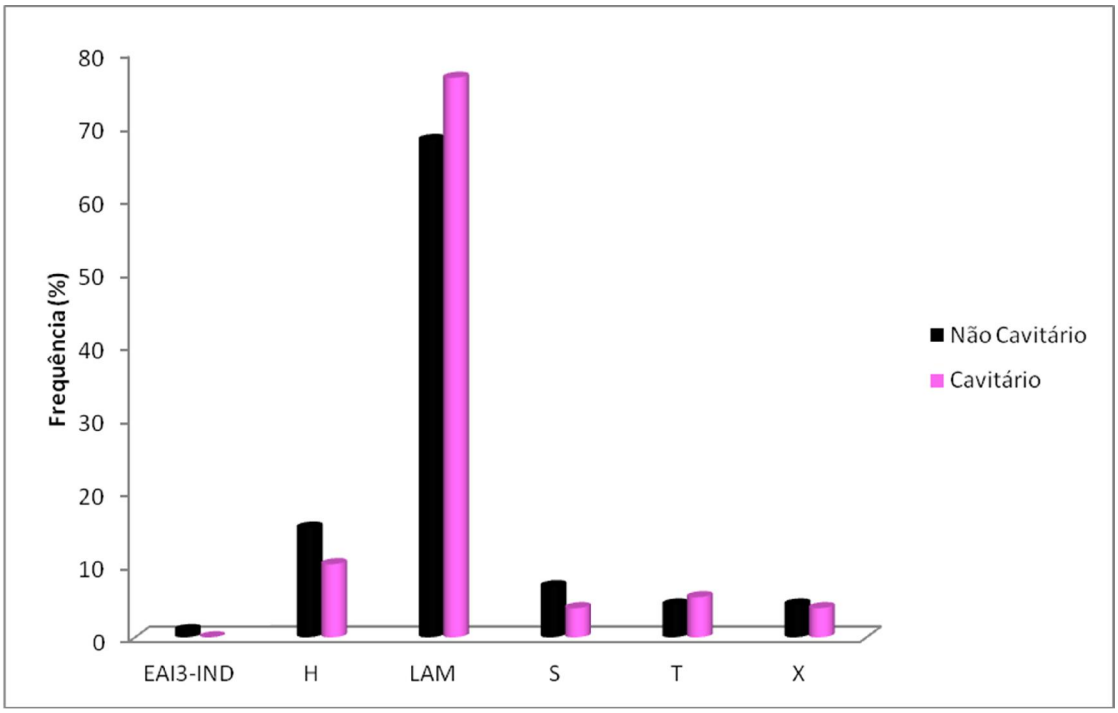


Figura 10: Distribuição das diferentes famílias de "Spoligotyping" pela análise no banco de dados *MIRU VNTR plus* e em comparação com os resultados dos SNPs.

Com a comparação dos resultados de *Spoligotyping* analisados pelos banco de dados *MIRU-VNTR plus* com os resultados dos SNPs e deleções associadas à família LAM foi possível esclarecer os resultados dos isolados classificados como pertencentes à família T. Esses resultados então apresentados na tabela 7.

Esses resultados de *Spoligotyping* foram utilizados em todas as comparações realizadas nesse trabalho.

Tabela 7: Análise dos resultados de *Spoligotyping* pelo banco MIRU-VNTR plus em comparação com os resultados de SNPs e deleções.

Key	SIT	Família MIRU-VNTR plus	Família (Filliol et al., 2006)	SNP	RDRio	RD174	Ag85C[103]
EM-0024	1983	EAI3-IND	EAI	I	0	0	0
EM-0040	47	H1	H	3b	0	0	0
EM-0030		Orphan	H	3b	0	0	0
EM-0081	47	H1	H1	3b	0	0	0
EM-0029	47	H1	H1	3b	0	0	0
EM-0037	47	H1	H3	3b	0	0	0
EM-0041	238	Unknown	H3	3b	0	0	0
EM-0087	50	H3	H3	3b	0	0	0
EM-0053	50	H3	H3	3b	0	0	0
EM-0083	50	H3	H3	3b	0	0	0
EM-0049	1284	T1	S	5	0	0	0
EM-0076	34	S	S	5	0	0	0
EM-0073	34	S	S	5	0	0	0
EM-0013	53	T1	T1	6a	0	0	0
EM-0001	1051	T1	T1	6a	0	0	0
EM-0036	51	T1	T1	6a	0	0	0
EM-0059		Orphan	T1	6a	0	0	0
EM-0061	119	X1	X	3c	0	0	0
EM-0046	137	X2	X2	3c	0	0	0
EM-0056	137	X2	X2	3c	0	0	0
EM-0032	60	LAM4	LAM	5	0	0	1
EM-0043	1241	LAM9	LAM	5	0	0	1
EM-0028	42	LAM9	LAM	5	0	0	1
EM-0084	291	T1	LAM	5	0	0	1
EM-0044	291	T1	LAM	5	0	0	1
EM-0027	53	T1	LAM	5	0	0	1
EM-0069		Orphan	LAM	5	0	0	1
EM-0034		Orphan	LAM	5	0	0	1
EM-0025	2449	Unknown	LAM	5	0	0	1
EM-0074	828	LAM4	LAM	5	1	1	1
EM-0035	59	LAM11_ZWE	LAM	5	1	1	1
EM-0017	42	LAM9	LAM	5	1	1	1
EM-0089		Orphan	LAM	5	1	1	1
EM-0022	828	LAM4	LAM	5	1	1	1
EM-0064	42	LAM9	LAM	5	1	1	1
EM-0009	42	LAM9	LAM	5	1	1	1
EM-0002	177	LAM9	LAM	5	1	1	1
EM-0004	216	LAM5	LAM	5	1	1	1
EM-0051	216	LAM5	LAM	5	1	1	1
EM-0038	60	LAM4	LAM	5	1	1	1
EM-0082	60	LAM4	LAM	5	1	1	1
EM-0003	60	LAM4	LAM	5	1	1	1
EM-0019	60	LAM4	LAM	5	1	1	1
EM-0080	2110	Unknown	LAM	5	1	1	1
EM-0015	42	LAM9	LAM	5	1	1	1
EM-0072		Orphan	LAM	5	1	1	1
EM-0075	2066	Unknown	LAM	5	1	1	1
EM-0033	866	LAM9	LAM	5	1	1	1
EM-0010	20	LAM1	LAM1	5	1	1	1
EM-0305	20	LAM1	LAM1	5	1	1	1
EM-0014	17	LAM2	LAM2	5	1	1	1
EM-0005		Orphan	LAM2	5	1	1	1
EM-0007	2536	LAM1	LAM2	5	1	1	1
EM-0077	42	LAM9	LAM2	5	1	1	1
EM-0055	17	LAM2	LAM2	5	1	1	1
EM-0047	17	LAM2	LAM2	5	1	1	1
EM-0052	33	LAM3	LAM3	5	0	0	1
EM-0021	33	LAM3	LAM3	5	0	0	1
EM-0058	64	LAM6	LAM6	5	0	0	1
EM-0088		Orphan	LAM6	5	0	0	1
EM-0048		Orphan	LAM6	5	0	0	1
EM-0085	50	H3	H3	3b	0	0	0
EM-0042	741	H3	H3	3b	0	0	0
EM-0079	50	H3	H3	3b	0	0	0
EM-0016	167	T1	T1	6a	0	0	0
EM-0045	167	T1	T1	6a	0	0	0
EM-0026	2449	Unknown	LAM	5	0	0	1
EM-0006	828	LAM4	LAM	5	1	1	1
EM-0063		Orphan	LAM	5	1	1	1
EM-0020	42	LAM9	LAM	5	1	1	1
EM-0031	42	LAM9	LAM	5	1	1	1
EM-0054		Orphan	LAM	5	1	1	1
EM-0018	20	LAM1	LAM1	5	1	1	1
EM-0067	17	LAM2	LAM2	5	1	1	1
EM-0066	20	LAM1	LAM2	5	1	1	1
EM-0039	95	LAM6	LAM6	5	0	0	1
EM-0068	95	LAM6	LAM6	5	0	0	1

0 = ausência da deleção

1 = presença da deleção

Baseado nessa análise a família LAM foi a mais frequente entre as amostras dos dois grupos analisados, representando 59 (68,0%) dos isolados do grupo não cavitário e 97 (76,5%) dos isolados do grupo cavitário.

A família Haarlem (H) foi representada por 13 isolados (10,0%) no grupo não cavitário e 13 (15%) no grupo cavitário. Seis isolados (7,0%) foram identificados como pertencentes à família S no grupo não cavitário e 5 (4,0%) no grupo cavitário. As outras famílias identificadas foram: família T com 4 (4,5%) isolados no grupo não cavitário e 7 (5,5%) no grupo cavitário, família X com 4 (4,5%) isolados no grupo não cavitário e 5 (4,0%) isolados no grupo não cavitário e família EAI com 1 isolado (1%) apenas no grupo não cavitário.

A análise dos dados mostrou que não houve associação entre pertencer à famíla LAM (p= 0,2) ou pertencer à família Haarlem (p= 0,3) com a presença de cavidade.

Quando comparados os percentuais das famílias obtidas nos dois grupos, cavitário e não cavitário, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa encontradas entre os dois grupos (p=0,53). Houve uma distribuição relativamente homogênea das famílias dentro dos dois grupos.

7.3.2 Detecção da deleção RD^{Rio}

Dos 214 isolados submetidos à PCR-multiplex, para a verificação da presença ou ausência da deleção RD^{Rio}, 52 (60%) isolados do grupo não cavitário e 72 (57%) isolados do grupo cavitário apresentaram um fragmento de 530 pb e foram agrupados como non-RD^{Rio}. Trinta e cinco (40%) do grupo não cavitário e 55 (43%) isolados do grupo cavitário apresentaram um fragmento de 1175 pb e foram agrupados como RD^{Rio}. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à deleção RD^{Rio} (p=0,65). Um gel representativo desta PCR-multiplex está apresentado na figura 11.

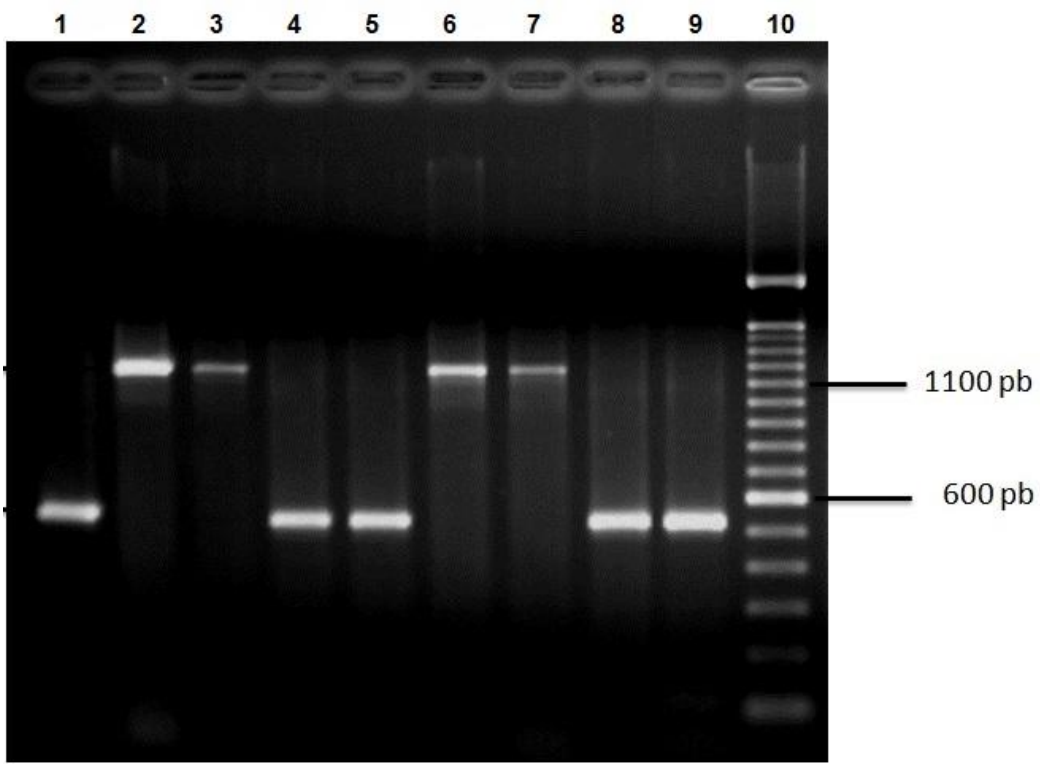


Figura 11:PCR-Multiplex RD^{Rio} de isolados de *M. tuberculosis* em gel de agarose 1,5%. Nos poços 2, 3, 6 e 7 - fragmento de 1175 pb, correspondente à região flanqueadora de RD^{Rio}. Nos poços 1, 4, 5, 8 e 9 - fragmento de 530 pb, correspondente à região flanqueadora de *IS1561* (WT). No poço 10 - marcador de peso molecular de 100pb.

Na Tabela 8 estão apresentados os isolados com deleção RD^{Rio} e as respectivas subfamílias obtidas por *Spoligotyping*. Como pode ser observado, a subfamília LAM9 foi a de maior frequência (37%).

Tabela 8: Frequência dos SIT e subfamílias associados aos Isolados RD^{Rio}.

SIT	Subfamília	Nº de Isolados RDRio
42	LAM9	24
Novo	LAM	13
17	LAM2	13
20	LAM1	9
60	LAM4	5
828	LAM4	4
93	LAM5	4
230	LAM9	3
866	LAM9	2
177	LAM9	2
59	LAM11_ZWE	2
2066	LAM	2
2110	LAM	2
2536	LAM1	1
1321	Ambiguous LAM1-LAM4	1
175	T1	1
124	LAM	1
2535	LAM	1
Total		**90**

7.3.3 Detecção de deleção na região RD174

A presença da deleção RD174 avaliou se esta deleção, nos isolados avaliados, era marcador dos genótipos LAM e/ou RD^{Rio}.

Dos 214 isolados avaliados, 52 (60%) isolados do grupo não cavitário e 72 (57%) isolados do grupo cavitário apresentaram um fragmento de 500 pb e foram agrupados como RD174^{-}. Trinta e cinco (40%) do grupo não cavitário e 55 (43%) isolados do grupo cavitário apresentaram um fragmento de 300 pb e foram agrupados como RD174^{+}. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,65) com relação à deleção RD174.

Notadamente, o LSP RD174 estava presente em todos os isolados do genótipo RD^{Rio} (n = 90) nos dois grupos, mas estava intacto nos isolados de genótipo non-RD^{Rio} (n = 124), incluindo os isolados non-RD^{Rio} LAM.

7.3.4 Identificação e avaliação do $Ag85C^{103}$

Dos 214 isolados avaliados, 59 (27,5%) isolados do grupo não cavitário e 96 (45,0%) do grupo cavitário continham o SNP $Ag85C^{103}$. Dos isolados que não continham o SNP $Ag85C^{103}$, 28 (13%) pertenciam ao grupo não cavitário e 31 (14,5%) pertenciam ao grupo cavitário. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao SNP $Ag85C^{103}$ (p=0,21).

Todos os isolados com genótipo RD^{Rio} analisados (n=90), 35 pertencentes ao grupo não cavitário e 55 pertencentes ao grupo cavitário, continham o SNP $Ag85C^{103}$. No entanto, 13 isolados non-RD^{Rio} pertencentes ao grupo não cavitário e 41 isolados non-RD^{Rio} pertencentes ao grupo cavitário, também continham o SNP $Ag85C^{103}$($p<0,0001$).

Quando esses resultados foram comparados com os resultados de *Spoligotyping* foi possível verificar que todos os isolados classificados como LAM (n=156), 59 isolados pertencentes ao grupo não cavitário e 97 isolados pertencentes ao grupo cavitário, continham o SNP $Ag85C^{103}$, enquanto que a maioria dos isolados não LAM (n=58), 28 isolados pertencentes ao grupo não cavitário e 30 isolados pertencentes ao grupo cavitário, não continham o SNP.

7.3.5 RFLP- IS*6110*

Duzentos e quatorze isolados foram submetidos à técnica de RFLP-IS*6110* e de acordo com a análise de similaridade e do respectivo dendograma, o número de cópias de IS*6110* por genoma variou de 01 a 18 cópias, com mediana de dez cópias. Um total de 205 isolados foram considerados para análise de cluster, pois nove (4,0%) isolados apresentaram quatro ou menos cópias de IS*6110* e foram excluídos da análise.

No total dos isolados avaliados, foram encontrados 162 genótipos diferentes. Nesta análise foram identificados 25 *clusters* diferentes e o número de isolados por *cluster* variou de 2 a 10, sendo 1**7** deles *clusters* pequenos, isto é, compostos por dois isolados;

7 deles *clusters* médios, compostos por três até nove isolados e 1 *cluster* grande, composto por dez ou mais isolados.

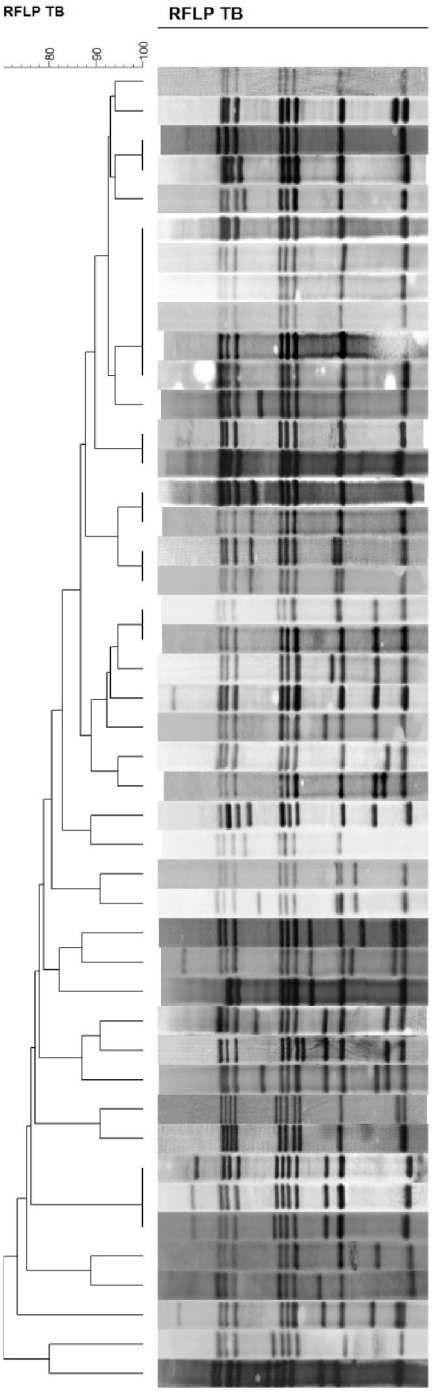
A taxa de agrupamento (CR) do total de isolados avaliados pelo RFLP foi de 0,20.

Dentre os 205 isolados analisados, 25 (12%) isolados pertencentes ao grupo não cavitário e 43 (21%) pertencentes ao grupo cavitário, apresentaram-se agrupados em *clusters*. Do grupo não cavitário, 57 (28%) isolados apresentaram perfis distintos, enquanto do grupo cavitário, 80 (39%) isolados apresentaram perfis distintos.

Na análise de similaridade entre os isolados em estudo foram obtidas 11 famílias diferentes, quando se considerou até 65% de similaridade. Entre elas pode se destacar a família 14 com 45 isolados, estando 20 deles distribuídos em cinco *clusters* e 25 em padrões únicos. Desta família, 10 isolados apresentaram similaridade de 100% compondo o *cluster* designado ES14, correspondendo ao *cluster* com o maior número de isolados encontrado, como mostra a Figura 12.

Em relação aos isolados pertencentes à família 14, não foi possível observar associação desses isolados e a presença de cavidade (p= 0,4).

(45 entries)



Key	SIT	SPOFAMILIA	Clusters_SAV	Labcluster_SAV	Cavidade
EM-0074	828	LAM4	0	ES14~	0
EM-0573	828	LAM4	0	ES14~	1
EM-0035	59	LAM11_ZWE	1	ES14	0
EM-0447	42	LAM9	1	ES14	1
EM-0462	42	LAM9	0	ES14~	1
EM-0006	828	LAM4	1	ES14	1
EM-0017	42	LAM9	1	ES14	0
EM-0089		Orphan	1	ES14	0
EM-0327		Orphan	1	ES14	0
EM-0562	42	LAM9	1	ES14	0
EM-0567	17	LAM2	1	ES14	0
EM-0480	230	LAM9	1	ES14f	1
EM-0022	828	LAM4	1	ES14	0
EM-0557	42	LAM9	1	ES14	1
EM-0064	42	LAM9	1	ES14f	0
EM-0551	42	LAM9	1	ES14f	1
EM-0063		Orphan	1	ES14q	1
EM-0531		Orphan	1	ES14q	1
EM-0508	42	LAM9	1	ES14h	1
EM-0550	42	LAM9	1	ES14h	1
EM-0009	42	LAM9	0	ES14~	0
EM-0528	124	Unknown	0	ES14h	1
EM-0533	42	LAM9	0	ES14~	1
EM-0002	177	LAM9	0	ES14~	0
EM-0552	177	LAM9	0	ES14~	1
EM-0443	59	LAM11-ZWE	0	ES14~	1
EM-0513	42	LAM9	0	ES14~	1
EM-0484	93	LAM5	0	ES14~	1
EM-0680	42	LAM9	0	ES14~	1
EM-0033	866	LAM9	0	ES14~	0
EM-0481	230	LAM9	0	ES14~	1
EM-0482	2535	Unknown	0	ES14~	1
EM-0004	216	LAM5	0	ES14~	0
EM-0051	216	LAM5	0	ES14~	0
EM-0472	60	LAM4	0	ES14~	1
EM-0038	60	LAM4	0	ES14~	0
EM-0082	60	LAM4	0	ES14~	0
EM-0020	42	LAM9	1	ES14r	1
EM-0445	42	LAM9	1	ES14r	1
EM-0505	42	LAM9	1	ES14r	1
EM-0516	42	LAM9	0	ES14~	1
EM-0524	42	LAM9	0	ES14~	1
EM-0558	42	LAM9	0	ES14~	1
EM-0015	42	LAM9	0	ES14~	0
EM-0555	866	LAM9	0	ES14~	1

Não cavitário = 0 Cavitário =1 Agrupado em *cluster* = 1 Padrão Único = 0

Figura 12:Dendograma e perfil de RFLP-IS*6110* dos isolados que compõem a família 14 pelo BioNumerics.

A análise estatística da associação da ocorrência de *clusters* com a presença de cavidade não mostrou diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de *clusters* e os grupos analisados (*p*= 0,4).

7.3.6 MIRU-VNTR

Do total de 214 isolados submetidos à técnica de genotipagem por MIRU-VNTR 24 loci, nove (4%) isolados apresentaram alelos duplos em apenas um dos 24 loci. Estes isolados foram analisados como 2 alelos e genótipos separados. Dos nove isolados 4 deles foram agrupados em *clusters* e 5 apresentaram perfis únicos.

Os 214 isolados estavam distribuídos em 171 genótipos distintos, sendo que 87 (51%) deles apresentaram-se como perfis únicos e os 84 (49%) restantes agruparam-se nos 32 *clusters* obtidos. Desses 32 *clusters*, 19 eram compostos por dois isolados, nove eram compostos por três isolados, dois por quatro isolados, um composto por cinco isolados e um composto por seis isolados.

A taxa de agrupamento (CR) do total de isolados testados pelo MIRU-VNTR 24 loci foi de 0,23.

Na análise dos resultados do MIRU-VNTR dos 214 isolados, 84 (39%) estavam agrupados em *clusters* e 130 (61%) eram perfis únicos. Do total de isolados agrupados em *cluster*, 33 (15,5%) pertenciam ao grupo não cavitário e 51 (24,0%) pertenciam ao grupo cavitário. Por outro lado, do total de isolados em perfis únicos, 54 (25,0%) pertenciam ao grupo não cavitário e 76 (35,5%) pertenciam ao grupo cavitário.

Os valores da diversidade alélica foram calculados para cada lócus e estão apresentados na tabela 9 onde pode-se observar que os loci QUB 26, Mtub 04, MIRU 40, QUB 11b e MIRU 26 apresentaram alto poder discriminatório, dentre eles o QUB 26 foi o mais polimórfico. Todos os demais *loci* apresentaram poder discriminatório moderado e baixo.

Tabela 9: Diversidade alélica de cada *lócus* e número de ocorrência de cada alelo.

Locus	Número de Alelos													Diversidade Alélica	Discriminação[a]
	0	1	2	3	3s	4	5	6	7	8	8s	9	10	11	(h)	
QUB 26			1	14		46	18	40	62	30	1	8	2	1	0,82	Alta
Mtub 04	4	3	193	22											0,75	Alta
MIRU 40		11	54	63		72	17	6							0,72	Alta
QUB 11b		98	23	56		21	5	3	6	11					0,71	Alta
MIRU 26		4	79	66		61	9	4							0,62	Alta
MIRU 16	2	1	206	11	2		1								0,59	Moderada
MIRU 10			4	28		34	125	29	3						0,56	Moderada
Mtub 39		45	50	126		2									0,55	Moderada
MIRU 23		2	9	47		139	25			1					0,55	Moderada
Mtub 30			4	21		7	49	141		1					0,54	Moderada
Mtub 21		24	137	54		3	1	3		1					0,53	Moderada
Mtub 34		15	46	143		18			1						0,48	Moderada
ETR C	1	220	2												0,44	Moderada
ETR A		141	47	1		34									0,44	Moderada
MIRU 31		23	7	155		10	26	2							0,42	Moderada
ETR B			18	36		161	7	1							0,41	Moderada
MIRU 27		6	162	44		8		1							0,33	Moderada
Mtub 29		1	55	160		5	2								0,30	Moderada
MIRU 20		61	160	2											0,29	Baixa
MIRU 02			220	2	1										0,27	Baixa
QUB 4156		1	40	177			3	2							0,25	Baixa
MIRU 04			21	3		185	11	2							0,14	Baixa
MIRU 39		40	183												0,02	Baixa
MIRU 24		32	186	5											0,02	Baixa

a. A discriminação é definida de acordo com a diversidade alélica (h) como: com 221 isolados, Mtub29 e QUB 4156 com 222 isolados. Alta (h > 0,6), Moderada (0,3 ≤ h ≤ 0,6) e Baixa (h < 0,3), (Sola et al. 2003). Todos os cálculos foram realizados com 223 isolados, exceto ETR A.

Segundo Lazzarini (2007) as cepas RD^{Rio} apresentam duas cópias no MIRU 02 e uma no MIRU 40, o que tornou uma assinatura das cepas da sublinhagem RD^{Rio}.

Para confirmar a assinatura RD^{Rio} em nossos isolados verificamos o número de cópias para os MIRU 02 e MIRU 40 nos isolados segregados como RD^{Rio} versus non-RD^{Rio}. Os resultados dessa análise estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Número de cópias dos MIRU 02 e MIRU 40 dos isolados RD^{Rio} e non-R^{Rio}

		Nº de Cópias								
		1	2	3	4	5	6	7	8	Total
RD^{Rio}	MIRU 02	1	89	-	-	-	-	-	-	90
	MIRU40	-	90	-	-	-	-	-	-	
Non-RD^{Rio}	MIRU02	28	91	5	-	-	-	-	-	124
	MIRU40	4	23	54	20	4	3	6	10	
Total										214

7.3.7 Comparação entre a técnica MIRU-VNTR 24 *loci* e a técnica RFLP-IS*6110*

Para esta análise foram considerados todos os *clusters* e padrões únicos de RFLP, incluindo aqueles isolados cujos perfis eram de poucas bandas.

A análise da comparação entre as duas metodologias foi realizada com 214 isolados genotipados pela técnica de MIRU-VNTR 24 *loci* e pela técnica de RFLP-IS*6110*. Para o total de 214 isolados foram obtidos 162 genótipos distintos pela técnica MIRU-VNTR comparados com 167 genótipos diferentes pela técnica de RFLP-IS*6110*. Neste cenário, 39% (n=84) pertenciam a um dos 32 *clusters* identificados por MIRU-VNTR e 35% (n=75) pertenciam a um dos 28 *clusters* identificados por RFLP.

A distribuição do tamanho dos clusters nas duas técnicas de tipagem foi muito similar (figura 13).

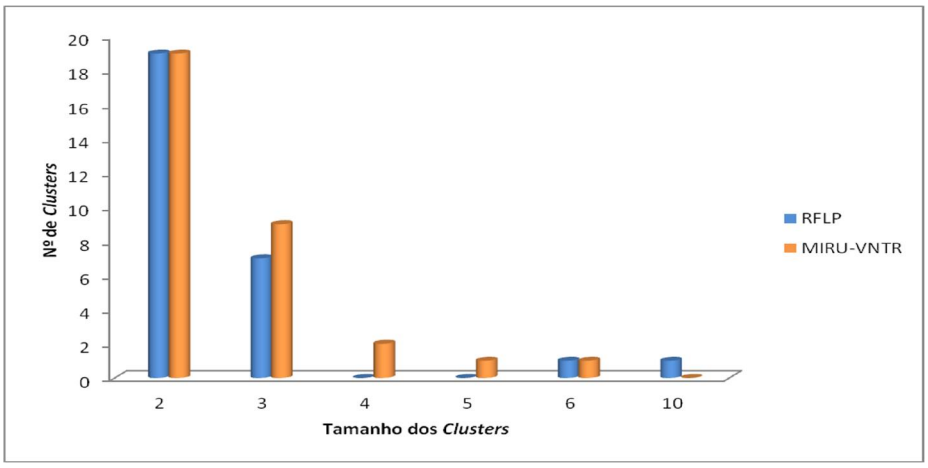


Figura 13:Distribuição dos tamanhos de *Clusters* obtidos com base no RFLP-IS*6110* e MIRU-VNTR 24 *loci*.

A análise molecular das amostras pelas duas técnicas demonstrou que a técnica de MIRU-VNTR 24 *loci* a técnica de RFLP-IS6110 tiveram o mesmo poder discriminatório (Tabela 11), embora a análise de cluster com base na técnica de RFLP comparada com os perfis obtidos pela técnica de MIRU-VNTR permitiu verificar que dos 25 clusters obtidos pela técnica de RFLP apenas 12 (48%) concordavam 100%.

Tabela 11: Número de perfis encontrados, agrupamentos e poder discriminatório do RFLP e MIRU-VNTR 24 loci.

Método	Total de perfis	Nº Isolados PU	Nº Isolados Agrupados	Nº *Clusters*	CR*	HGDI[a]
RFLP-IS*6110*	167	139	75	28	0,22	0,996
MIRU-VNTR 24 loci	162	130	84	32	0,23	0,996

a - índice de diversidade de Hunter &Gaston *CR - taxa de agrupamento (Clustering rate)

7.3.8 Análise da sequência de fragmento do gene *pks15/1*

A sequência do lócus *pks 15/1* foi avaliada em todas as 214 amostras. Apenas uma (0,40%) das amostras do grupo não cavitário, apresentou a inserção de 7 pb. Para as 213 amostras restantes, a análise dos eletroferogramas mostrou a deleção característica de 7 pares de base (GCCGCGG). A comparação entre o lócus *pks 15/1*$^{+}$ e o resultado do *spoligotyping* para esta amostra foi EAI3-IND. O lócus *pks15/1* apresentou-se rompido, pela deleção dos 7 pb, no restante das 213 (99,60%), incluindo a cepa referência H37Rv, como apresentado na figura 14.

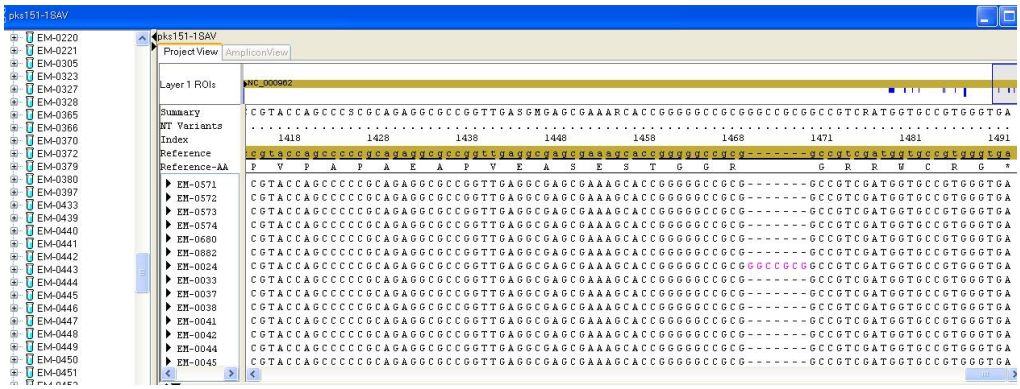


Figura 14: Alinhamento da sequência do fragmento do gene *pks*15/1 dos isolados avaliados com a sequência de MTB H37RV.

Discussão

8. Discussão

Ao longo das duas últimas décadas estudos epidemiológicos da tuberculose foram facilitados graças a aplicação de marcadores moleculares linhagem-específicos que permitiram aos Programas de Controle da Tuberculose adequarem políticas mais eficientes para o controle desta enfermidade (TESSEMA *et al.*, 2013). Quando duas ou mais linhagens de MTB apresentam o perfil de *fingerprint* idêntico ou muito similar, infere-se que elas pertençam a um mesmo grupo. Com isso, linhagens isoladas de diferentes pacientes mas pertencentes a um mesmo grupo podem ter elevada probabilidade de serem epidemiologicamente associadas, isto é, podem refletir transmissão recente entre os pacientes. Uma alta prevalência de TB causada por linhagens de MTB idênticas ou relacionadas em uma comunidade poderia representar uma maior virulência, ou estar relacionados a fatores epidemiológicos que facilitem sua transmissão. Muitas vezes é difícil avaliar se a constituição genética das cepas de MTB é fator determinante da transmissão ou gravidade da doença devido à falta de dados clínicos (COSCOLLA e GAGNEUX, 2010; VINHAS *et al.*, 2013).

Nesse contexto este estudo caracterizou o perfil genotípico de isolados de MTB provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar não cavitária e cavitária por três métodos de genotipagem, para investigar uma possível associação entres os perfis genotípicos, dados demográficos e clínico dos pacientes incluídos e a gravidade da doença representada pela presença ou não de cavidades.

Nosso estudo apresenta algumas limitações que precisam ser consideradas. Primeiramente, o tamanho amostral pode não ter sido suficiente para avaliar diferenças entre os grupos. Como o tamanho amostral calculado previa uma diferença de pelo menos 20% entre os grupos, diferenças menores como as que foram encontradas nesse estudo podem ter levado ao erro tipo II, ou seja, não encontramos diferenças estatísticas quando elas de fato existem. Outro ponto foi o tempo decorrido entre o diagnóstico dos pacientes e a realização das técnicas de genotipagem molecular. Algumas amostras não puderam ser recuperadas.

No entanto, é importante ressaltar que nossos dados apresentam também vantagens em relação a outros estudos. Primeiramente, as condições de avaliação dos dados clínicos e demográficos foram realizadas em um ensaio clínico onde havia

reprodutibilidade da avaliação de todos os médicos participantes. Os padrões radiográficos foram avaliados de forma cega por avaliadores independentes e finalmente, a perda de cepas foi muito pequena.

Inicialmente, avaliamos a associação das características demográficas e clínicas dos pacientes com a presença de cavidade. Após a regressão logística verificamos que apenas as variáveis produção de escarro e baciloscopia positiva estavam associadas à presença de cavidade. Corroborando com estes resultados, em 2007, nosso grupo já havia demonstrado que há uma clara associação entre doença cavitária, carga bacilar e maior gravidade da doença (PALACI *et al.*, 2007).

Estudos que correlacionam cepas específicas de *M. tuberculosis* a padrões clínicos diferenciais de TB são escassos e frequentemente apresentam resultados conflitantes (VAN CREVEL *et al.*, 2001; GAGNEUX *et al.*, 2006; THWAITES *et al.*, 2008; CARDOSO OELEMANN *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012; WEISENBERG *et al.*, 2012). Van Crevel e colaboradores (2001) observaram que pacientes indonésios com TB pulmonar causada por cepas Beijing tinham febre mais alta que aqueles infectados com outras cepas, enquanto o oposto foi reportado por Drobniewski e colaboradores (2005) na Rússia. Segundo esses últimos autores, existem diferenças na apresentação clínica da doença para pacientes infectados por cepas Beijing em relação a pacientes infectados por cepas não Beijing. Maree e colaboradores (2007) não encontraram relação entre genótipo e sinais clínicos para 59 crianças com meningite tuberculosa na África do Sul.

Em nosso estudo a técnica de *Spoligotyping* foi utilizada para caracterizar isolados do estado do Espírito Santo. As principais famílias encontradas neste estudo foram LAM (51% no grupo cavitário e 32,5% no grupo não cavitário), Haarlem (4% no grupo cavitário e 11,5% no grupo não cavitário) e T (13% no grupo cavitário e 7% no grupo não cavitário). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo realizado por Silva e colaboradores (2009) no Rio Grande do Sul, Noguti e colaboradores (2010) no Paraná e por David e colaboradores (2004) em Portugal.

Por meio dessa técnica verificamos que a família LAM foi a mais frequente entre as amostras dos dois grupos analisados, representando 68,0% dos isolados do grupo não cavitário e 76,5% dos isolados do grupo cavitário. A família LAM é prevalente em todas as Américas , Caribe, Europa e partes da África (LAZZARINI *et al.*, 2008). Estudo realizado com isolados coletados em três cidades brasileiras (Rio de Janeiro, Porto

Alegre e Belém) confirmaram a predominância da família LAM no Brasil (CARDOSO OELEMANN *et al.*, 2011). Segundo esses autores a supremacia da família LAM provavelmente espelha influência persistente da imigração prolongada de população do Sul da Europa e África para o Brasil.

Lazzarini e colaboradores (2007) descreveram que o *Micobcterium tuberculosis* sublinhagem RD^{Rio}, caracterizada pela deleção de uma região de 26,3-kb que inclui 10 genes, pertencente à família LAM. Esta sublinhagem é a causa mais prevalente de TB no Rio de Janeiro, também presente em outras regiões brasileiras e em outras partes do mundo (GIBSON *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2012; DAVID *et al.*, 2012; WEISENBERG *et al.*, 2012).

Em nosso estudo ao compararmos a presença da sublinhagem RD^{Rio} foi possível verificar que 40% dos isolados do grupo não cavitário e 43% dos isolados do grupo cavitário apresentaram a LSP que os classificaram como RD^{Rio}. Concordando com resultados prévios (LAZZARINI *et al.*, 2007; GIBSON *et al.*, 2008; WEISENBERG *et al.*, 2012) o presente trabalho confirmou a sublinhagem RD^{Rio} exclusivamente como LAM. De fato esta corresponde a mais da metade (58%) dos isolados LAM. A maioria dos isolados com perfil LAM9 (86%) eram do genótipo RD^{Rio} bem como todos com perfil LAM1 e LAM2. Por outro lado LAM3 era exclusivamente do genótipo non- RD^{Rio}, corroborando os dados da literatura (LAZZARINI *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2012).

Cepas RD^{Rio} e non- RD^{Rio} LAM podem ser diferenciadas pelo MIRU 02 e MIRU 40 segundo Lazzarini e colaboradores (2007). Esses autores demonstraram que o MRU 40 foi altamente discriminatório para cepas isoladas de pacientes, sendo que 100% das cepas RD^{Rio} e apenas 2% das cepas non- RD^{Rio} LAM apresentaram uma única cópia neste locus. O número de cópias do MIRU 02 foi altamente indicativo de *M. tuberculosis* RD^{Rio} pois 98% dessas cepas apresentaram duas cópia neste lócus. Nossos dados concordam com as afirmações de Lazzarini em relação ao número de cópias dos MIRU 02 e MIRU 40, pois 99% dos isolados do genótipo RD^{Rio} avaliados em nosso estudo apresentaram duas cópia no locus MIRU 02 e 100% desses isolados apresentaram apenas uma cópia no lócus MIRU 40.

Embora Lazzarini e colaboradores em 2008 tenham afirmado que a alta prevalência no Rio de Janeiro da sublinhagem RD^{Rio} está associada com uma doença cavitária mais grave, sugerindo um aumento da virulência de cepas pertencentes a essa

sublinhagem, nosso estudo não encontrou nenhuma associação entre os isolados genotipados como RD^{Rio} e a presença de cavidades (VINHAS *et al.*, 2013).

Nossos dados concordam com dados publicados por Barbosa e colaboradores que demonstraram que TB pulmonar causada por *M. tuberculosis* sublinhagem RD^{Rio} no Rio de janeiro não foi clinicamente diferente ou mais grave que a TB pulmonar causada por cepas de *M. tuberculosis* non-RD^{Rio} (2012).

A análise do SNP do $Ag85C^{103}$ detecta uma mutação silenciosa (GAG para GAA) no codon 103 do gene do Ag85C (MUSSER *et al.*, 2000). Gibson e colaboradores em 2008, propuseram a utilização da análise do SNP para identificação de cepas da família LAM. A análise deste SNP é útil no caso de amostras cujos perfis de *Spoligotyping* são indefiníveis, não permitindo a classificação da cepa como LAM ou não-LAM. Nestes casos a verificação da presença do SNP $Ag85C^{103}$ permitiu a classificação das cepas em LAM e não-LAM, provando que o *Spoligotyping* como único método de classificação das cepas em famílias nem sempre é o melhor método para a definição cepas LAM (GIBSON *et al.*, 2008). Em nosso trabalho a análise do SNP $Ag85C^{103}$ permitiu definir como cepas da família LAM as cepas que não foram classificadas adequadamente pelo *Spoligotyping*, como por exemplo, as cepas com perfil novo e que foram classificadas pelo *TB Insight* como da família T. Nossos resultados concordaram com o dados publicados por David e colaboradores (2012) e Gibson e colaboradores (2008).

Com base no estudo realizado por Gagneux e colaboradores (2006), que construíram uma árvore filogenética baseada na presença ou ausência de LSPs comumente encontrados em MTB, o LSP RD174 foi testado como marcador para cepas LAM e/ou RD^{Rio}. A análise do RD174 em nosso estudo mostrou que os isolados RD^{Rio} possuem uma deleção coincidente, o RD174, concordando com estudos realizados Weisenberg e colaboradores (2012) e Gibson e colaboradores (2008).

Posteriormente foi realizada a genotipagem dos isolados utilizando RFLP-*IS6110* *e* MIRU-VNTR 24 *loci*.

Dos isolados submetidos ao RFLP-*IS6110* em nosso estudo, os *clusters* foram na sua maioria *clusters* pequenos, aproximadamente um quarto dos isolados estavam distribuídos em *clusters* pequenos e médios, tendo sido encontrado apenas um *cluster* grande. Estes resultados concordam com o estudo com base no RFLP-IS*6110* realizado em Barcelona - Espanha (SOLSONA *et al.*, 2001) onde aproximadamente dois terços dos pacientes de um estudo, estavam distribuídos em *clusters* pequenos e médios e

apenas um *cluster* de 10 pacientes foi encontrado. Embora, a análise dos dados tenha demonstrado que 11,0% dos isolados pertencentes ao grupo não cavitário e 20,5% pertencentes ao grupo cavitário, tenham se apresentado agrupados em *clusters,* não houve associação entre agrupamento em *cluster* e presença de cavidade.

Por meio da comparação das duas técnicas de genotipagem observamos que ambos MIRU-VNTR 24 loci e RFLP-IS*6110* apresentaram um alto índice discriminatório (HGDI), com números relativamente próximos de padrões únicos (130 vs. 139 respectivamente), isolados agrupados em *cluster* (84 vs. 75) e no tamanho dos clusters. Embora tenhamos obtido o mesmo índice discriminatório para ambas as técnicas, aparentemente o poder discriminatório do RFLP foi maior comparado ao MIRU-VNTR, isto é, obtivemos mais genótipos distintos na tipagem por RFLP e consequentemente mais clusters foram identificados pela tipagem por MIRU-VNTR concordando com dados publicados por Beer e colaboradores (2013).

Uma avaliação de qual método de tipagem é mais eficiente tem que ser baseada em um número de fatores: capacidade de tipificação, reprodutibilidade e discriminação. Destas características, a capacidade de tipificação e a reprodutibilidade são relativamente fáceis de quantificar e são frequentemente expressas como porcentagem simples. Assim, a capacidade de tipificação de um método é a porcentagem de distinguir as amostras bacterianas que podem ser identificadas como positivas e a reprodutibilidade é a porcentagem de amostras que tem o mesmo resultado em repetidos testes. O poder discriminatório de um método de tipagem é sua habilidade de distinção entre amostras não relacionadas e isto é determinado pelo número de tipos definidos por um método e as frequências relativas destes tipos (HUNTER e GASTON, 1988).

Hunter e Gaston (1988) sugeriram o uso de um índice numérico de discriminação, baseado na probabilidade de duas amostras, não correlacionadas de uma população teste, serem identificadas como pertencentes a diferentes grupos. Esta probabilidade é calculada pelo Índice de Discriminação de Hunter e Gaston, que foi desenvolvido a partir do Índice de Diversidade de Simpson (SIMPSON, 1949) para a descrição de diversidade de espécies em um determinado habitat ecológico. Segundo os autores, um teste para estudos epidemiológicos é considerado eficiente quando possuir um índice de discriminação de pelo menos 90%. Em nosso estudo obtivemos HGDI de 99% para ambos os testes realizados.

O lócus *pks15/1* é envolvido na biossíntese de PGL (CONSTANT *et al.*, 2002) e é polimórfico entre os membros do MTBC (GAGNEUX e SMALL, 2007). Nas cepas W-Beijing, Asian (non-Beijing) e Indo-Oceanic esta região do gene tem quadro de leitura aberto, enquanto cepas da linhagem Euro-Americam apresentam uma deleção de 7 pares de base (CONSTANT *et al.*, 2002; REED *et al.*, 2004; GAGNEUX e SMALL, 2007).

A análise de fragmento do gene *pks15/1* em nosso estudo demonstrou que em 99,5% dos isolados avaliados este gene estava rompido por uma deleção de sete pares de base. Em apenas uma dos isolados estudados o referido gene possui a inserção dos sete pares de base. Quando comparamos este resultado com o resultados de *Spoligotyping*, este isolado foi classificado como família EAI, que pertence à linhagem Indo-Oceanic, corrobando dados de outros autores (MARTINEZ-GAMBOA *et al.*, 2008; ZENTENO-CUEVAS *et al.*, 2013).

A deleção de 7 pb no gene *pks15* é descrito como polimórfico entre os membros do MTBC permitindo a identificação das linhagens Euro-American, Indo-Oceanic e East-Asian (ZENTENO-CUEVAS *et al.*, 2013).

Cepas com fenótipo hipervirulento são observados na família Beijing, esta virulência foi associada com a produção de glicolipídio fenólico (PGL) que reduz a produção das citocinas Th1 (TNF-alfa e interleucinas 6 e 12) em modelos *in vitro* e *in vivo* (REED *et al.*, 2004). Na linhagem Euro-American, que inclui cepas bem caracterizadas como a H37Rv, tem sido encontrado que o *pks15/1* é rompido pela deleção de 7pb o que as torna incapazes de produzir PGL. Tem sido sugerido na literatura que a presença ou ausência do gene *pks15/1* pode contribuir para diferenças no comportamento biológico observado entre isolados clínicos diferentes (MARTINEZ-GAMBOA *et al.*, 2008).

Com relação à utilização de genótipos, quer seja por RFLP quer seja por MIRU-VNTR e sua associação com a diversidade da TB, após revisão realizada por Coscolla e Gagneux em 2010 de aproximadamente 100 artigos científicos, a única mensagem clara advinda desta metanálise é que as cepas de MTBC diferem na virulência, imunogenicidade e susceptibilidade ao estresse oxidativo em modelos de infecção. Entretanto ensaios clínicos não têm conseguido detectar padrões comuns no efeito da variabilidade de cepas no desenvolvimento da doença. As inconsistências em estudos clínicos podem ser devido a vários fatores como fatores ambientais e do hospedeiro tais

como a natureza e qualidade do programa de controle da TB, aspectos nutricionais, bem como a extensão de comorbidades como diabetes (COSCOLLA e GAGNEUX, 2010).

Conclusões

9. Conclusões

1- A caracterização do perfil clínico e demográfico não demonstrou diferença entre os grupos exceto em relação as variáveis: tosse produtiva e baciloscopia positiva, que permaneceram estatisticamente significativas no modelo final de regressão logística.

2- Foi possível, por meio das metodologias moleculares realizadas, caracterizar o perfil genotípico dos isolados provenientes de pacientes com doença cavitária e doença não cavitária. Esses genótipos não se diferenciam entre os dois grupos em relação a proporção de *clusters*, famílias de *Spoligotyping* ou genótipo RD^{Rio}.

3- Não houve associação entre os perfis genotípicos com a presença de cavidades.

4- Foi verificado a presença da deleções RD^{Rio} e RD174 entre os isolados avaliados, entretanto não houve associação do genótipo RD^{Rio} e da presença da deleção RD174 com a presença de cavidades.
A presença da inserção de 7 pb. foi verificada em apenas um dos isolados testados, não permitindo fazer análise de associação com a presença de cavidades.

5- Ambas as metodologias moleculares, RFLP-IS*6110* e MIRU-VNTR 24 *loci* apresentaram um alto índice discriminatório. Embora tenhamos obtido o mesmo índice discriminatório para ambas as técnicas, aparentemente o poder discriminatório do RFLP foi maior.

Comentários

10. Comentários

Em nosso estudo, embora os pacientes com tuberculose tenham sido criteriosamente selecionados e definidos clinicamente, e seus isolados caracterizados geneticamente, não obtivemos evidências de que variações na gravidade da doença (lesões cavitárias) pudessem estar associadas a fatores genéticos ou sublinhagens destes microrganismos. Ao final deste estudo sentimos que muito pouco ainda sabemos a respeito dos mecanismos moleculares e dos elementos estruturais que regulam e direcionam o desenvolvimento das diferentes formas clínicas e/ou gravidade da doença. Para compreender melhor essas questões da relação patógeno-hospedeiro, acreditamos que seja necessário aprofundar mais sobre a biologia do bacilo, os seus componentes e principalmente o seu papel na resposta imune do hospedeiro.

Referências

11. Referências

AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. **Clin Dev Immunol**, v.2011, p.814943. 2011.

ALEXANDER, K. A., LAVER, P. N., MICHEL, A. L., WILLIAMS, M., VAN HELDEN, P. D., WARREN, R. M. e GEY VAN PITTIUS, N. C. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. mungi. **Emerg Infect Dis**, v.16, n.8, p.1296-1299. 2010.

ALLAND, D., LACHER, D. W., HAZBON, M. H., MOTIWALA, A. S., QI, W., FLEISCHMANN, R. D. e WHITTAM, T. S. Role of large sequence polymorphisms (LSPs) in generating genomic diversity among clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and the utility of LSPs in phylogenetic analysis. **J Clin Microbiol**, v.45, n.1, p.39-46. 2007.

ALLIX-BEGUEC, C., HARMSEN, D., WENIGER, T., SUPPLY, P. e NIEMANN, S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. **J Clin Microbiol**, v.46, n.8, p.2692-2699. 2008.

ALONSO, M., BORRELL, S., LIROLA, M. M., MADRID, T. B. MOLECULAR EPIDEMIOLOGY STUDY GROUP OF, MYCOBACTERIUM STUDY GROUP OF, BARCELONA, GROUP, INDAL-TB, BOUZA, E. e GARCIA DE VIEDMA, D. A proposal for applying molecular markers as an aid to identifying potential cases of imported tuberculosis in immigrants. **Tuberculosis (Edinb)**, v.88, n.6, p.641-647. 2008.

ANES, E., PEYRON, P., STAALI, L., JORDAO, L., GUTIERREZ, M. G., KRESS, H., HAGEDORN, M., MARIDONNEAU-PARINI, I., SKINNER, M. A., WILDEMAN, A. G., KALAMIDAS, S. A., KUEHNEL, M. e GRIFFITHS, G. Dynamic life and death interactions between Mycobacterium smegmatis and J774 macrophages. **Cell Microbiol**, v.8, n.6, p.939-960. 2006.

ASTARIE-DEQUEKER, C., NIGOU, J., PASSEMAR, C. e GILHOT, C. The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. **Discovery Today: Disease Mechanisms**, v.7, p.9. 2010.

BARBOSA C. DE, B., LAZZARINI, L. C., ELIAS, A. R., LEUNG, J. A., RIBEIRO, S. B., DA SILVA, M. G., DUARTE, R. S., SUFFYS, P., GOMES, H. M., KRITSKI, A. L., LAPA, E. SILVA J. R., HO, J. L. e BOECHAT, N. Tuberculosis caused by RDRio Mycobacterium tuberculosis is not associated with differential clinical features. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.16, n.10, p.1377-1382. 2012.

BARNES, P. F. e CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis. **N Engl J Med**, v.349, n.12, p.1149-1156. 2003.

BEHR, M. A., WARREN, S. A., SALAMON, H., HOPEWELL, P. C., PONCE DE LEON, A., DALEY, C. L. e SMALL, P. M. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. **Lancet**, v.353, n.9151, p.444-449. 1999.

BERMUDEZ, L. E. e GOODMAN, J. Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells. **Infect Immun**, v.64, n.4, p.1400-1406. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epdemiológica. 2013. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/arquivos/pdf/incidencia. Acesso em 15 ago de 2013.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v.83, n.1-3, p.91-97. 2003.

BRITTON, W. J., FERNANDO, S. L., SAUNDERS, B. M., SLUYTER, R. e WILEY, J. S. The genetic control of susceptibility to Mycobacterium tuberculosis. **Novartis Found Symp**, v.281, p.79-89; discussion 89-92, 208-209. 2007.

BRUDEY, K., DRISCOLL, J. R., RIGOUTS, L., PRODINGER, W. M., GORI, A., AL-HAJOJ, S. A., ALLIX, C., ARISTIMUNO, L., ARORA, J., BAUMANIS, V., BINDER, L.,

CAFRUNE, P., CATALDI, A., CHEONG, S., DIEL, R., ELLERMEIER, C., EVANS, J. T., FAUVILLE-DUFAUX, M., FERDINAND, S., GARCIA DE VIEDMA, D., GARZELLI, C., GAZZOLA, L., GOMES, H. M., GUTTIEREZ, M. C., HAWKEY, P. M., VAN HELDEN, P. D., KADIVAL, G. V., KREISWIRTH, B. N., KREMER, K., KUBIN, M., KULKARNI, S. P., LIENS, B., LILLEBAEK, T., HO, M. L., MARTIN, C., MOKROUSOV, I., NARVSKAIA, O., NGEOW, Y. F., NAUMANN, L., NIEMANN, S., PARWATI, I., RAHIM, Z., RASOLOFO-RAZANAMPARANY, V., RASOLONAVALONA, T., ROSSETTI, M. L., RUSCH-GERDES, S., SAJDUDA, A., SAMPER, S., SHEMYAKIN, I. G., SINGH, U. B., SOMOSKOVI, A., SKUCE, R. A., VAN SOOLINGEN, D., STREICHER, E. M., SUFFYS, P. N., TORTOLI, E., TRACEVSKA, T., VINCENT, V., VICTOR, T. C., WARREN, R. M., YAP, S. F., ZAMAN, K., PORTAELS, F., RASTOGI, N. e SOLA, C. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol**, v.6, p.23. 2006.

CAMPOS, R. e PIANTA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunlogia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul - Brasil. **Bol da Saúde**, v.15, n.1, p.61-71. 2001.

CARDOSO OELEMANN, M., GOMES, H. M., WILLERY, E., POSSUELO, L., BATISTA LIMA, K. V., ALLIX-BEGUEC, C., LOCHT, C., GOGUET DE LA SALMONIERE, Y. O., GUTIERREZ, M. C., SUFFYS, P. e SUPPLY, P. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant Mycobacterium tuberculosis strain lineage from a high tuberculosis burden country. **PLoS One**, v.6, n.3, p.e18256. 2011.

CASTRO, A. F. P. e TRABULSI, L. R. Mycobacterias e Nocardias. In: Trabulsi, L. R. (Ed). Microbiologia. Atheneu. Rio de Janeiro. p. 1991. 187-97.

COLE, S. T., BROSCH, R., PARKHILL, J., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., GORDON, S. V., EIGLMEIER, K., GAS, S., BARRY, C. E., 3RD, 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, M. A., RAJANDREAM, M. A., ROGERS, J., RUTTER, S., SEEGER, K., SKELTON, J., SQUARES, R., SQUARES, S., SULSTON, J. E., TAYLOR, K., WHITEHEAD, S. e BARRELL, B. G. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v.393, n.6685, p.537-544. 1998.

COMAS, I., HOMOLKA, S., NIEMANN, S. e GAGNEUX, S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in Mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies. **PLoS One**, v.4, n.11, p.e7815. 2009.

CONSTANT, P., PEREZ, E., MALAGA, W., LANEELLE, M. A., SAUREL, O., DAFFE, M. e GUILHOT, C. Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the Mycobacterium tuberculosis complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene. **J Biol Chem**, v.277, n.41, p.38148-38158. 2002.

COSCOLLA, M. e GAGNEUX, S. Does M. tuberculosis genomic diversity explain disease diversity? **Drug Discov Today Dis Mech**, v.7, n.1, p.e43-e59. 2010.

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

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respir Med**, v.100, n.11, p.1862-1870. 2006.

DANIEL, T. M. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.9, n.11, p.1181-1182. 2005.

DAVID, S., DUARTE, E. L., LEITE, C. Q., RIBEIRO, J. N., MAIO, J. N., PAIXAO, E., PORTUGAL, C., SANCHO, L. e GERMANO DE SOUSA, J. Implication of the RD(Rio)

Mycobacterium tuberculosis sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal. **Infect Genet Evol**, v.12, n.7, p.1362-1367. 2012.

DAVID, S., PORTUGAL, C., ANTUNES, A., CARDOSO, A., CALADO, A., BARROS, V. e SANCHO, L. [Molecular identification using Spoligotyping of strains from the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from the Hospital Fernando Fonseca]. **Rev Port Pneumol**, v.10, n.3, p.195-204. 2004.

DE BEER, J. L., VAN INGEN, J., DE VRIES, G., ERKENS, C., SEBEK, M., MULDER, A., SLOOT, R., VAN DEN BRANDT, A. M., ENAIMI, M., KREMER, K., SUPPLY, P. e VAN SOOLINGEN, D. Comparative study of IS6110 restriction fragment length polymorphism and variable-number tandem-repeat typing of Mycobacterium tuberculosis isolates in the Netherlands, based on a 5-year nationwide survey. **J Clin Microbiol**, v.51, n.4, p.1193-1198. 2013.

DEMAY, C., LIENS, B., BURGUIERE, T., HILL, V., COUVIN, D., MILLET, J., MOKROUSOV, I., SOLA, C., ZOZIO, T. e RASTOGI, N. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology. **Infect Genet Evol**, v.12, n.4, p.755-766. 2012.

DIETZE, R., HADAD, D. J., PEREIRA, F. E. L. e RODRIGUES, R. R. Tuberculose. In: Rocha, M.O.C.; Pedroso, E.R.P. (Eds). Fundamentos em Infectologia. Ltd, Editora Rubio. Rio de Janeiro, Brasil. p. 2009. 703-38.

DONOGHUE, H. D. Paleomicrobiology of Tuberculosis. In: Raoult, D. & Drancourt, M. (Eds). Paleomicrobiology: Past Humam Infactions. Berlin, Springer Verlag. Heidelberg. p. 2008. 75 - 97.

DONOGHUE, H. D., SPIGELMAN, M., GREENBLATT, C. L., LEV-MAOR, G., BAR-GAL, G. K., MATHESON, C., VERNON, K., NERLICH, A. G. e ZINK, A. R. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. **Lancet Infect Dis**, v.4, n.9, p.584-592. 2004.

DROBNIEWSKI, F., BALABANOVA, Y., NIKOLAYEVSKY, V., RUDDY, M., KUZNETZOV, S., ZAKHAROVA, S., MELENTYEV, A. e FEDORIN, I. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. **JAMA**, v.293, n.22, p.2726-2731. 2005.

DUCATI, R. G., RUFFINO-NETTO, A., BASSO, L. A. e SANTOS, D. S. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, n.7, p.697-714. 2006.

EISENACH, K. D., CRAWFORD, J. T. e BATES J.H. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v.26, n.11, p.2240-2245.1988.

FALK, A, O`CONNOR, J. B. e PRATT, P. C. Classification of pulmonary tuberculosis. In: Falk, A. O`Connor, J. B., Pratt, P. C. Webb, J. A., Wier, J. A., Wolinsky, E. (Eds). Diagnosis standards and classification of tuberculosis. Association, National Tuberculosis and Respiratory Disease. New York. p. 1969. 68 - 76.

FILLIOL, I., DRISCOLL, J. R., VAN SOOLINGEN, D., KREISWIRTH, B. N., KREMER, K., VALÉTUDIE, G., DANG, D. A., BARLOW, R., BANERJEE, D., BIFANI, P. J., BRUDEY, K., CATALDI, A., COOKSEY, R. C., COUSINS, D. V., DALE, J. W., DELLAGOSTIN, O. A., DROBNIEWSKI, F., ENGELMANN, G., FERDINAND, S., GASCOYNE-BINZI, D., GORDON, M., GUTIERREZ, M. C., HAAS, W. H., HEERSMA, H., KASSA-KELEMBHO, E., HO, M.L., MAKRISTATHIS, A. , MAMMINA, C., MARTIN, G., MOSTRTÖM, P., MOKROUSOV, I., NARBONNE, V., NARVSKAYA, O., NASTASI, A., NIOBE-EYANGOH, S. N., PAPE, J. W., RASOLOFO-RAZANAMPARANY, V., RIDELL, M., ROSSETTI, M. L., STAUFFER, F., SUFFYS, P. N., TAKIFF, H., TEXIER-MAUGEIN, J., VINCENT, V., DE WAARD, J. H., SOLA, C., RASTOGI, N. Snapshot of moving and expanding clones of Mycobacteriun tuberculosis and their global distribution assessed by spoligotyping in a international stydy. **J Clin Microbiol**, v.41, n.5, p.1963-1970. 2003.

FILLIOL, I., MOTIWALA, A. S., CAVATORE, M., QI, W., HAZBON, M. H., BOBADILLA DEL VALLE, M., FYFE, J., GARCIA-GARCIA, L., RASTOGI, N., SOLA, C., ZOZIO, T., GUERRERO, M. I., LEON, C. I., CRABTREE, J., ANGIUOLI, S., EISENACH, K. D., DURMAZ, R., JOLOBA, M. L., RENDON, A., SIFUENTES-OSORNIO, J., PONCE DE

LEON, A., CAVE, M. D., FLEISCHMANN, R., WHITTAM, T. S. e ALLAND, D. Global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. **J Bacteriol**, v.188, n.2, p.759-772. 2006.

FRIEDMAN, C. R., QUINN, G. C., KREISWIRTH, B. N., PERLMAN, D. C., SALOMON, N., SCHLUGER, N., LUTFEY, M., BERGER, J., POLTORATSKAIA, N. e RILEY, L. W. Widespread dissemination of a drug-susceptible strain of Mycobacterium tuberculosis. **J Infect Dis**, v.176, n.2, p.478-484. 1997.

FROTHINGHAM, R. e MEEKER-O'CONNELL, W. A. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. **Microbiology**, v.144 (Pt 5), p.1189-1196. 1998.

GAGNEUX, S., DERIEMER, K., VAN, T., KATO-MAEDA, M., DE JONG, B. C., NARAYANAN, S., NICOL, M., NIEMANN, S., KREMER, K., GUTIERREZ, M. C., HILTY, M., HOPEWELL, P. C. e SMALL, P. M. Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.8, p.2869-2873. 2006.

GAGNEUX, S. e SMALL, P. M. Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. **Lancet Infect Dis**, v.7, n.5, p.328-337. 2007.

GENCER, B. e SHINNICK, T. M. Molecular Genotyping os Mycobacterium tuberculosis Isolates from Turkey. **Am. J. Infec. Dis**, v.1, n.1, p.7. 2005.

GIBSON, A. L., HUARD, R. C., GEY VAN PITTIUS, N. C., LAZZARINI, L. C., DRISCOLL, J., KUREPINA, N., ZOZIO, T., SOLA, C., SPINDOLA, S. M., KRITSKI, A. L., FITZGERALD, D., KREMER, K., MARDASSI, H., CHITALE, P., BRINKWORTH, J., GARCIA DE VIEDMA, D., GICQUEL, B., PAPE, J. W., VAN SOOLINGEN, D., KREISWIRTH, B. N., WARREN, R. M., VAN HELDEN, P. D., RASTOGI, N., SUFFYS, P. N., LAPA E SILVA, J. e HO, J. L. Application of sensitive and specific molecular methods

to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean Mycobacterium tuberculosis spoligotype family. **J Clin Microbiol**, v.46, n.4, p.1259-1267. 2008.

GUTACKER, M. M., MATHEMA, B., SOINI, H., SHASHKINA, E., KREISWIRTH, B. N., GRAVISS, E. A. e MUSSER, J. M. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of Mycobacterium tuberculosis strains from 4 geographic sites. **J Infect Dis**, v.193, n.1, p.121-128. 2006.

GUTIERREZ, M. C., BRISSE, S., BROSCH, R., FABRE, M., OMAIS, B., MARMIESSE, M., SUPPLY, P. e VINCENT, V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathog**, v.1, n.1, p.e5. 2005.

HAN, H., WANG, F., XIAO, Y., REN, Y., CHAO, Y., GUO, A. e YE, L. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating Mycobacterium tuberculosis isolates in Wuhan, China. **J Med Microbiol,** v.56 (Pt 9), p.1219-1223. 2007.

HENDERSON, R. A., WATKINS, S. C. e FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v.159, n.2, p.635-643. 1997.

HERMANS, P. W., VAN SOOLINGEN, D., DALE, J. W., SCHUITEMA, A. R., MCADAM, R. A., CATTY, D. e VAN EMBDEN, J. D. Insertion element IS986 from Mycobacterium tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v.28, n.9, p.2051-2058. 1990.

HESTVIK, A. L., HMAMA, Z. e AV-GAY, Y. Mycobacterial manipulation of the host cell. **FEMS Microbiol Rev**, v.29, n.5, p.1041-1050. 2005.

HOMOLKA, S., NIEMANN, S., RUSSELL, D. G. e ROHDE, K. H. Functional genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. **PLoS Pathog**, v.6, n.7, p.e1000988. 2010.

HOUBEN, E. N., NGUYEN, L. e PIETERS, J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. **Curr Opin Microbiol**, v.9, n.1, p.76-85. 2006.

HUARD, R. C., FABRE, M., DE HAAS, P., LAZZARINI, L. C., VAN SOOLINGEN, D., COUSINS, D. e HO, J. L. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the Mycobacterium tuberculosis complex. **J Bacteriol**, v.188, n.12, p.4271-4287. 2006.

HUNTER, P. R. e GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J Clin Microbiol**, v.26, n.11, p.2465-2466. 1988.

JOHNSON, J. L., HADAD, D. J., DIETZE, R., MACIEL, E. L., SEWALI, B., GITTA, P., OKWERA, A., MUGERWA, R. D., ALCANESES, M. R., QUELAPIO, M. I., TUPASI, T. E., HORTER, L., DEBANNE, S. M., EISENACH, K. D. e BOOM, W. H. Shortening treatment in adults with noncavitary tuberculosis and 2-month culture conversion. **Am J Respir Crit Care Med**, v.180, n.6, p.558-563. 2009.

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

KENT, P. T. e KUBICA, G. P. In: US Department of Health and Hulman Services, Public Health Services, CDC. A Guide for the Level III Laboratory. Public Health Microbiology. Atlanta, GA. p. 1985.

KLEINNIJENHUIS, J., OOSTING, M., JOOSTEN, L. A., NETEA, M. G. e VAN CREVEL, R. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clin Dev Immunol**, v.2011, p.405310. 2011.

KONOMI, N., LEBWOHL, E., MOWBRAY, K., TATTERSALL, I. e ZHANG, D. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. **J Clin Microbiol**, v.40, n.12, p.4738-4740. 2002.

KREMER, K., VAN SOOLINGEN, D., FROTHINGHAM, R., HAAS, W. H., HERMANS, P. W., MARTIN, C., PALITTAPONGARNPIM, P., PLIKAYTIS, B. B., RILEY, L. W., YAKRUS, M. A., MUSSER, J. M. e VAN EMBDEN, J. D. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **J Clin Microbiol**, v.37, n.8, p.2607-2618. 1999.

KREMER, K., ARNOLD, C., CATALDI, A., GUTIERREZ, M. C., HAAS, W. H., PANAIOTOV, S., SKUCE, R. A., SUPPLY, P., VAN DER ZANDEN, A.G.M. e VAN SOOLINGEN, D. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **J Clin Microbiol**, v.43, n.11, p.5628-5638. 2005.

LAZZARINI, L. C., HUARD, R. C., BOECHAT, N. L., GOMES, H. M., OELEMANN, M. C., KUREPINA, N., SHASHKINA, E., MELLO, F. C., GIBSON, A. L., VIRGINIO, M. J., MARSICO, A. G., BUTLER, W. R., KREISWIRTH, B. N., SUFFYS, P. N., LAPA, E. SILVA J. R. e HO, J. L. Discovery of a novel Mycobacterium tuberculosis lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, v.45, n.12, p.3891-3902. 2007.

LAZZARINI, L. C., SPINDOLA, S. M., BANG, H., GIBSON, A. L., WEISENBERG, S., DA SILVA CARVALHO, W., AUGUSTO, C. J., HUARD, R. C., KRITSKI, A. L. e HO, J. L. RDRio Mycobacterium tuberculosis infection is associated with a higher frequency of cavitary pulmonary disease. **J Clin Microbiol**, v.46, n.7, p.2175-2183. 2008.

LEÃO, S. C. e PORTAELS, F. History. In: Palomino, J. C.; Leão, S. C.; Ritacco, V. (Eds). Tuberculosis 2007. Bourcillierkamps. Belgium. p. 2007. 25-51.

MANCA, C., TSENOVA, L., BARRY, C. E., 3RD, BERGTOLD, A., FREEMAN, S., HASLETT, P. A., MUSSER, J. M., FREEDMAN, V. H. e KAPLAN, G. Mycobacterium tuberculosis CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. **J Immunol**, v.162, n.11, p.6740-6746. 1999.

MAREE, F., HESSELING, A. C., SCHAAF, H. S., MARAIS, B. J., BEYERS, N., VAN HELDEN, P., WARREN, R. M. e SCHOEMAN, J. F. Absence of an association between Mycobacterium tuberculosis genotype and clinical features in children with tuberculous meningitis. **Pediatr Infect Dis J**, v.26, n.1, p.13-18. 2007.

MARTINEZ-GAMBOA, A., PONCE-DE-LEON, A., GALINDO-FRAGA, A., BOBADILLA-DEL-VALLE, M., KATO-MAEDA, M., ROBERTSON, B. D., YOUNG, D. B., SMALL, P. M. e SIFUENTES-OSORNIO, J. Molecular analysis of Mycobacterium tuberculosis strains with an intact pks15/1 gene in a rural community of Mexico. **Arch Med Res**, v.39, n.8, p.809-814. 2008.

MATHEMA, B., KUREPINA, N. E., BIFANI, P. J. e KREISWIRTH, B. N. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.4, p.658-685. 2006.

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

MILBURN, H. J. Primary tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**, v.7, n.3, p.133-141. 2001.

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculosis: immunological aspects in the infection and in the disease. **Rev Med Minas Gerais**, v.21, n.1, p.7. 2011.

MUSSER, J. M., AMIN, A. e RAMASWAMY, S. Negligible genetic diversity of mycobacterium tuberculosis host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. **Genetics**, v.155, n.1, p.7-16. 2000.

NAVIN, T. R., MCNABB, S. J. e CRAWFORD, J. T. The continued threat of tuberculosis. **Emerg Infect Dis**, v.8, n.11, p.1187. 2002.

NEYROLLES, O., HERNANDEZ-PANDO, R., PIETRI-ROUXEL, F., FORNES, P., TAILLEUX, L., BARRIOS PAYAN, J. A., PIVERT, E., BORDAT, Y., AGUILAR, D., PREVOST, M. C., PETIT, C. e GICQUEL, B. Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence? **PLoS One**, v.1, p.e43. 2006.

NIEMANN, S., RUSCH-GERDES, S., RICHTER, E., THIELEN, H., HEYKES-UDEN, H. e DIEL, R. Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of Mycobacterium tuberculosis strains in actual chains of transmission. **J Clin Microbiol**, v.38, n.7, p.2563-2567. 2000.

NOGUTI, E. N., LEITE, C. Q., MALASPINA, A. C., SANTOS, A. C., HIRATA, R. D., HIRATA, M. H., MAMIZUKA, E. M. e CARDOSO, R. F. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Parana in Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.6, p.779-785. 2010.

PALACI, M., DIETZE, R., HADAD, D. J., RIBEIRO, F. K., PERES, R. L., VINHAS, S. A., MACIEL, E. L., DO VALLE DETTONI, V., HORTER, L., BOOM, W. H., JOHNSON, J. L. e EISENACH, K. D. Cavitary disease and quantitative sputum bacillary load in cases of pulmonary tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v.45, n.12, p.4064-4066. 2007.

RASTOGI, N. e SOLA, C. Molecular Evolution of the Mycobacterium tuberculosis Complex. In: Palomino, J. C.; Leão, S. C.; Ritacco, V. (Eds). Tuberculosis 2007. Bourcillierkamps. Belgium. p. 2007. 53-91.

REED, M. B., DOMENECH, P., MANCA, C., SU, H., BARCZAK, A. K., KREISWIRTH, B. N., KAPLAN, G. e BARRY, C. E., 3RD. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. **Nature**, v.431, n.7004, p.84-87. 2004.

RINDI, L., LARI, N. e GARZELLI, C. Large Sequence Polymorphisms of the Euro-American lineage of Mycobacterium tuberculosis: a phylogenetic reconstruction and evidence for convergent evolution in the DR locus. **Infect Genet Evol**, v.12, n.7, p.1551-1557. 2012.

ROSEMBERG, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Bol Pneumol Sanit**, v.7, n.2, p.25. 1999.

ROZO-ANAYA, J. C. e RIBON, W. Molecular tools for Mycobacterium tuberculosis genotyping. **Rev Salud Publica (Bogota)**, v.12, n.3, p.510-521. 2010.

RUFFINO-NETTO, A. [Tuberculosis: the negleted calamity]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.35, n.1, p.51-58. 2002.

SAIGA, H., SHIMADA, Y. e TAKEDA, K. Innate immune effectors in mycobacterial infection. **Clin Dev Immunol**, v.2011, p.347594. 2011.

SALO, W. L., AUFDERHEIDE, A. C., BUIKSTRA, J. e HOLCOMB, T. A. Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.6, p.2091-2094. 1994.

SATO, K., SHIMIZU, T., SANO, C. e TOMIOKA, H. Effects of type II alveolar epithelial cells on T cell mitogenic responses to concanavalin A and purified protein derivatives. **Microbiol Immunol**, v.49, n.10, p.885-890. 2005.

SCHOLANTE SILVA, A. B., VON GROLL, A., FELIX, C., CONCEICAO, F. R., SPIES, F. S., SCAINI, C. J., ROSSETTI, M. L., BORSUK, S., DELLAGOSTIN, O. A. e ALMEIDA DA SILVA, P. E. Clonal diversity of M. tuberculosis isolated in a sea port city in Brazil. **Tuberculosis (Edinb)**, v.89, n.6, p.443-447. 2009.

SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N. e WHITTAM, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl Environ Microbiol**, v.51, n.5, p.873-884. 1986.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature (London)**, v.163. 1949.

SKUCE, R. A., MCCORRY, T. P., MCCARROLL, J. F., RORING, S. M., SCOTT, A. N., BRITTAIN, D., HUGHES, S. L., HEWINSON, R. G. e NEILL, S. D. Discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. **Microbiology**, v.148, n.Pt 2, p.519-528. 2002.

SOLA, C., FILLIOL, I., GUTIERREZ, M. C., MOKROUSOV, I., VINCENT, V. e RASTOGI, N. Spoligotype database of Mycobacterium tuberculosis: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. **Emerg Infect Dis**, v.7, n.3, p.390-396. 2001.

SOLA, C., FILLIOL, I., LEGRAND, E., LESJEAN, S., LOCHT, C., SUPPLY, P. e RASTOGI, N. Genotyping of the Mycobacterium tuberculosis complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infect Genet Evol**, v.3, n.2, p.125-133. 2003.

SOLSONA, J., CAYLA, J. A., VERDU, E., ESTRADA, M. P., GARCIA, S., ROCA, D., MIQUEL, B., COLL, P., MARCH, F. e COOPERATIVE GROUP FOR CONTACT STUDY OF TUBERCULOSIS PATIENTS IN CIUTAT, VELLA. Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.5, n.8, p.724-731. 2001.

SOTOMAYOR, H., BURGOS, J. e ARANGO, M. [Demonstration of tuberculosis by DNA ribotyping of Mycobacterium tuberculosis in a Colombian prehispanic mummy]. **Biomedica**, v.24 Supp 1, p.18-26. 2004.

SREEVATSAN, S., PAN, X., STOCKBAUER, K. E., CONNELL, N. D., KREISWIRTH, B. N., WHITTAM, T. S. e MUSSER, J. M. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.18, p.9869-9874. 1997.

STREICHER, E. M., VICTOR, T. C., VAN DER SPUY, G., SOLA, C., RASTOGI, N., VAN HELDEN, P. D. e WARREN, R. M. Spoligotype signatures in the Mycobacterium tuberculosis complex. **J Clin Microbiol**, v.45, n.1, p.237-240. 2007.

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

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

SUPPLY, P., MAGDALENA, J., HIMPENS, S. e LOCHT, C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. **Mol Microbiol**, v.26, n.5, p.991-1003. 1997.

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

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

TESSEMA, B., BEER, J., MERKER, M., EMMRICH, F., SACK, U., RODLOFF, A. C. e NIEMANN, S. Molecular epidemiology and transmission dynamics of Mycobacterium

tuberculosis in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. **BMC Infect Dis**, v.13, p.131. 2013.

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

TSENOVA, L., ELLISON, E., HARBACHEUSKI, R., MOREIRA, A. L., KUREPINA, N., REED, M. B., MATHEMA, B., BARRY, C. E., 3RD e KAPLAN, G. Virulence of selected Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. **J Infect Dis**, v.192, n.1, p.98-106. 2005.

TSOLAKI, A. G., GAGNEUX, S., PYM, A. S., GOGUET DE LA SALMONIERE, Y. O., KREISWIRTH, B. N., VAN SOOLINGEN, D. e SMALL, P. M. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of Mycobacterium tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v.43, n.7, p.3185-3191. 2005.

VALWAY, S. E., SANCHEZ, M. P., SHINNICK, T. F., ORME, I., AGERTON, T., HOY, D., JONES, J. S., WESTMORELAND, H. e ONORATO, I. M. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis. **N Engl J Med**, v.338, n.10, p.633-639. 1998.

VAN CREVEL, R., NELWAN, R. H., DE LENNE, W., VEERARAGU, Y., VAN DER ZANDEN, A. G., AMIN, Z., VAN DER MEER, J. W. e VAN SOOLINGEN, D. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. **Emerg Infect Dis**, v.7, n.5, p.880-883. 2001.

VAN CREVEL, R., OTTENHOFF, T. H. e VAN DER MEER, J. W. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Clin Microbiol Rev**, v.15, n.2, p.294-309. 2002.

VAN EMBDEN, J. D., CAVE, M. D., CRAWFORD, J. T., DALE, J. W., EISENACH, K. D., GICQUEL, B., HERMANS, P., MARTIN, C., MCADAM, R., SHINNICK, T. M. e ET AL. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J Clin Microbiol**, v.31, n.2, p.406-409. 1993.

VAN INGEN, J., RAHIM, Z., MULDER, A., BOEREE, M. J., SIMEONE, R., BROSCH, R. e VAN SOOLINGEN, D. Characterization of Mycobacterium orygis as M. tuberculosis complex subspecies. **Emerg Infect Dis**, v.18, n.4, p.653-655. 2012.

VAN RIE, A., WARREN, R., RICHARDSON, M., VICTOR, T. C., GIE, R. P., ENARSON, D. A., BEYERS, N. e VAN HELDEN, P. D. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. **N Engl J Med**, v.341, n.16, p.1174-1179. 1999.

VAN SOOLINGEN, D., HERMANS, P. W., DE HAAS, P. E., SOLL, D. R. e VAN EMBDEN, J. D. Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v.29, n.11, p.2578-2586. 1991.

VINHAS, S. A., PALACI, M., MARQUES, H. S., LOBO DE AGUIAR, P. P., RIBEIRO, F. K., PERES, R. L., DIETZE, R., GOMES, H. M., SUFFYS, P. N., GOLUB, J. E., RILEY, L. W. e MACIEL, E. L. Mycobacterium tuberculosis DNA fingerprint clusters and its relationship with RD(Rio) genotype in Brazil. **Tuberculosis (Edinb)**, v.93, n.2, p.207-212. 2013.

VITOL, I., DRISCOLL, J., KREISWIRTH, B., KUREPINA, N. e BENNETT, K. P. Identifying Mycobacterium tuberculosis complex strain families using spoligotypes. **Infect Genet Evol**, v.6, n.6, p.491-504. 2006.

WAYNE, L. G. e KUBICA, G. P. Genus Mycobacteria. In: Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharp, M. E.; Holt, J. E. (Eds). Bergey's Manual of Sytematic Bacteriology. Wilkins, Williams &. Baltimore. p. 1986. 1436 - 57.

WEISENBERG, S. A., GIBSON, A. L., HUARD, R. C., KUREPINA, N., BANG, H., LAZZARINI, L. C., CHIU, Y., LI, J., AHUJA, S., DRISCOLL, J., KREISWIRTH, B. N. e HO, J. L. Distinct clinical and epidemiological features of tuberculosis in New York City caused by the RD(Rio) Mycobacterium tuberculosis sublineage. **Infect Genet Evol**, v.12, n.4, p.664-670. 2012.

WENIGER, T., KRAWCZYK, J., SUPPLY, P., NIEMANN, S. e HARMSEN, D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. **Nucleic Acids Res**, v.38, n.Web Server issue, p.W326-331. 2010.

WHO. Global Tubeculosis Report 2012. 2012. Disponível em: http://www.who.inti/tb/publications/global_report/en/. Acesso em 04 de ago de 2013.

WHO. Global Tuberculosis Control - Epdemiology, Strategy, Financing. 2009. Disponível em: http://www.whqlibidoc.who.int/publications/2010/9789241564069 eng.pdf. Acesso em 03 de ago de 2010.

ZENTENO-CUEVAS, R., SILVA-HERNÁNDEZ, F. X., MENDOZA-DAMIÁN, F., RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, M. D., VÁZQUEZ-MEDINA, K., WIDROBO-GARCÍA, L., CUELLAR-SANCHEZ, A., MUÑIZ-SALAZAR, R., ENCISO-MORENO, L., PÉREZ-NAVARRO, L. M. e ENCISO-MORENO, J. A. Characterization os *pks15/1* in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from Mexico. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.108. 2013.

ZHANG, M., GONG, J., YANG, Z., SAMTEN, B., CAVE, M. D. e BARNES, P. F. Enhanced capacity of a widespread strain of Mycobacterium tuberculosis to grow in human macrophages. **J Infect Dis**, v.179, n.5, p.1213-1217. 1999.

ZINK, A. R., GRABNER, W., REISCHL, U., WOLF, H. e NERLICH, A. G. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. **Epidemiol Infect**, v.130, n.2, p.239-249. 2003.

Anexos

12. Anexos

12.1 Anexo 01: Parecer do CONEP para o Ensaio Clínico

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1135/2002

Registro CONEP = 3319 (Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Protocolo CEP = - **Processo nº 25000.141501/2001-65**

Projeto de Pesquisa: "*Estudo prospectivo, multicêntrico, randomizado, para avaliação de esquema encurtado do tratamento padrão da tuberculose de 6 meses para 4 meses, em pacientes HIV-negativos, Infectados com cepas sensíveis às drogas, sem doença cavitária e com cultura negativa no segundo mês de tratamento*".
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Reynaldo Dietze
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo / UFES
Área Temática Especial : Pesquisa com cooperação estrangeira

Ao se proceder à reanálise do protocolo acima e à avaliação das respostas do pesquisador ao parecer CONEP 863/2002 e considerando:

a) o posicionamento da área técnica da Pneumologia Sanitária/MS: " *Quanto aos pontos levantados pelos relatores, consideramos que a maioria deles é válida e pertinente. Também consideramos as respostas dos pesquisadores plenamente satisfatórias.* "

b) as respostas do pesquisador com os esclarecimentos aos pontos mais importantes;

c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada .

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa -CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 29 de julho de 2002

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS

12.2 Parecer do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. para o Projeto de Tese

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 31 de maio de 2011.

De: Prof. Dr. Adauto Emmerich Oliveira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof (a) Moisés Palaci
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **"Características Genéticas de Isolados de *Mycobacterium tuberculosis* associadas à gravidade da doença"**

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa **nº. 062/11** intitulado: **"Características Genéticas de Isolados de *Mycobacterium tuberculosis* associadas à gravidade da doença"** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 25 de maio de 2011.

Lembramos que, cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,

Coordenador do
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/UFES

Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.
Telefax: (27) 3335 7211

12.3 Formulário de Avaliação Inicial dos Pacientes

36016

TBRU CPC-CWRU Research Collaboration
Initial Tuberculosis Assessment Form

CONTROLE DE QUALIDADE

Checagem médica (Na hora da visita)	Revisão em 24 Horas do Coordenador Clínico	Revisão das Variáveis Chaves pelo Data Manager
Iniciais do Médico	Iniciais do C. Clínico	Iniciais do Data Manager
Data ___/___/20__	Data ___/___/20__	Data ___/___/20__

1. IDNO

2. IDNO do Programa de Controle de TB

Site B R

3. Data do Exame ___/___/20__ (Dia / Mês / Ano)

4.Iniciais do Paciente (Primeiro nome, Último nome)

5. Site de recrutamento

6. Queixas principais ☐ 0 = Nenhuma ☐ 1=Sepresente, _____

SINAIS VITAIS (A serem completados pela enfermeira):

7.Temperatura ___.___ nearest 1/10 °C

7a.Método
☐ 1 = Axilar
☐ 2 = TM (0)

8.Pressãosanguínea ___/___ mmHg (favor não arredondar)

9.Pulso ___ Batimentos/min

10. Freqüência respiratória ___ conte 30 segundos e multiplique por 2

11.Peso ___.___ kg (nearest 1/10 kg)

12.Altura ___ cm (nearest cm)

13. Escala de Karnofsky ___ % (Ver tabela abaixo)

14. Cicatriz de BCG presente?
☐ 1 = Sim
☐ 0 = Não
☐ 9 = Incerto

15. Iniciais da Enfermeira (Sinais Vitais) (Primeiro, último)

Escala de Karnofsky	Descrição
100	Normal, sem queixas
90	Apto a executar atividades normais; sinais ou sintomas mínimos da doença
80	Atividades normais com esforço; alguns sinais ou sintomas da doença
70	Cuida de si próprio; incapaz de executar atividades normais ou fazer um trabalho ativo; na cama< 50% do dia
60	Requer assistência ocasional mas está apto a cuidar de suas próprias necessidades; na cama > 50% do dia
50	Requer assistência considerável e cuidado médico freqüente; na cama > 50% do dia, mas não acamado
40	Inapto; requer cuidado e assistência especiais; na cama > 50% do dia, mas não acamado
30	Severamente inapto; hospitalização indicada mas morte não eminente, acamado
20	Muito doente, hospitalização necessária, tratamento de suporte ativo necessário, acamado

36016

IDNO _____

Dato do Exame ____/____/_____

DEMOGRÁFICOS

16. Data de Nascimento — Se DN desconhecida>> 17.Idade

Dia / Mês / Ano — Anos

18.Sexo
☐ 1 = Masculino ☐ 2 = Feminino

19.Estado Civil
☐ 1 = Nunca se casou ☐ 2 = Casado(a) ☐ 3 = Divorciado(a), separado(a), viúvo(a)

20. Principal Idioma Falado: N/A

21. Tribo (Se aplicável): N/A

22. Clan (Se aplicável): N/A

23.Educação
01 = Elementary
02 = Medium
03 = Superior
(Liste o mais alto nível completo entre 01-03. Se nenhuma educação escreva "00")

24. Freqüentou Universidade ou Instituto Técnico
☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não

25. O paciente está empregado
☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não
25a. Ocupação:

26.O paciente é estudante
☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não

27. Comunidade/Cidade Atual

28. Número de Km da Clínica: 9 9 9 (999=Not applicable)

HISTÓRICO DE TB

29. Você já foi tratado de TB?
☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não ☐ 9 = Desconhecido

29a. Se sim, ano do diagnóstico e tratamento

Confirme com o cartão do programa de controle de TB.

30. Você já teve uma terapia preventiva de TB (Além da vacina BCG)?
☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não ☐ 9 = Desconhecido

30a.Se sim, ano do tratamento com a terapia preventiva

SINTOMAS (Preenchido pelo Médico)

Quais dos seguintes você tem agora?

Sinal/Sintoma	Presente 1 = Sim, 0 = Não 9 = Desconhecido	Duração (Dias)	Sinal/Sintoma	Presente 1 = Sim, 0 = Não 9 = Desconhecido	Duração (Dias)
31. Febre			35. Dor no Peito		
32. Rigidez			36. Perda de apetite		
33. Suor			37. Diarréia		
34. Tosse > 3 semanas			38. Perda de Peso		

36016

IDNO _____

Data do Exame ____/____/_____

Sinal/Sintoma	Presente 1= Sim, 0=Não, 9=Desconhecido	Duração (Dias)	Sinal/Sintoma	Presente 1= Sim, 0=Não, 9=Desconhecido	Duração (Dias)
39. Produz escarro			43. Adenopatia		
40. Escarro purulento			44. Fraqueza		
41. Hemoptise			45. Artralgia		
42. Falta de ar no esforço			46. Problemas de visão		
47. Outros sintomas			47a. Descreva outros:		

Você já foi diagnosticado ou considerado sob alguma destas condições:

	1 = sim, 0 = não 9 = desconhecido		1 = sim, 0 = não 9 = desconhecido		1 = sim, 0 = não 9 = desconhecido
48. HIV		51. Hipertensão		54. Contato de perto com TB	
49. Artrite		52. Diabetes		55. Hepatite	
50. Cancer		53. Danos ao fígado por álcool.		56. Doença nos rins	

Se SIM, Decreva: _____

Somente para Mulheres

57. Data do fim da gravidez ☐☐ / ☐☐ / ☐☐
Incluindo parto e aborto (dia / mês / ano)

58. Data de início da última menstruação ☐☐ / ☐☐ / ☐☐
(dia / mês / ano)

59. Grávida agora?
☐ 1 = Sim
☐ 0 = Não
☐ 9 = Incerta

60. Método de controle de gravidez atual
☐ 0 = Nenhum
☐ 1 = Pílula
☐ 2 = Injeção
☐ 3 = DIU
☐ 4 = Camisinha
☐ 5 = Ligação de trompa
☐ 6 = Diafragma
☐ 9 = Incerta

REVISÃO DO HISTÓRICO MÉDICO

61. Foi administrada uma dose de antibiótico empírico nas últimas 2 semanas? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não ☐ 9 = Desconhecido

62. O paciente faz uso de medicamento para doenças crônicas por mais de 2 semanas (incluindo medicamentos tradicionais ou ervas)? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não

62a. Se SIM, então complete a seguinte tabela de medicamentos crônicos (Use o nome genérico ou do DEF sempre que possível):

	Nome da droga	Dose (unitária)	Via	Horário	Indicação
1.					
2.					
3.					
4.					

36016

IDNO _____

Exam Date ____/____/_____

62. Tem alguma alergia à medicamentos? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não

Se SIM, liste a droga e descreva (Ex. penicilina - anafilaxia - rash)

62a. Alergia 1: _____

62b. Alergia 2: _____

62c. Alergia 3: _____

COMPORTAMENTO DE RISCO

63. Já fumou? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não

Se SIM:

63a. Fuma agora? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não

63b. Anos de tabagismo ☐☐
Anos

63c. Número médio de cigarros/dia ☐☐

64. Consome álcool atualmente? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não

Se SIM:

64a. Freqüência de consumo
☐ 1 = Raramente (<1 drink por semana)
☐ 2 = Ocasionalmente (1-2 drinks 1-3 dias por semana)
☐ 3 = Frequentemente (4-6 dias/semana)
☐ 4 = Diariamente (2 ou mais drinks todos os dias)
☐ 99 = Se recusou a responder

64b. Onde geralmente bebe? ☐ 1 = bar ☐ 2 = em casa ☐ 3 = ambos ☐ 99 = se recusou a responder

64c. Tipo de bebida? ☐ 1 = cerveja/vinho ☐ 2 = cachaça/destilados ☐ 3 = ambos ☐ 99 = Se recusou a responder

NOTA: Favor completar as questões 65 e 66, somente para pacientes do classificados para o Treatment Shortening Study.

65. É profissional do sexo? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não ☐ 99 = Se recusou a responder

66. É usuário de drogas injetáveis? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não ☐ 99 = Se recusou a responder

36016

IDNO _____

Data do Exame ____/____/_____

EXAME FÍSICO

67. Execute o exame físico padrão e registre as seguintes conclusões como indicado:

Sistema	0=Normal 1=Anormal 9=Não examinado	Descreva brevemente a anormalidade
67a)Aparência Geral	☐	Se anormal, indique o seguinte (circule): Presente Ausente 1. Emagrecimento 1 0 2. Icterícia 1 0 3. Anemia 1 0 4. Aparência (circule) Severamente doente Moderadamente doente Mínimo
67b) Cabeça, Ouvido, Olhos, Nariz e Garganta (HEENT)	☐	Descreva:
67c) Coração	☐	Se anormal, indique o seguinte: Presente Ausente 1. Murmúrio 1 0 2. Atrito pericárdio 1 0 3. Arritmia 1 0 Descreva: _____
67d) Respiratório	☐	Se anormal, indique o seguinte: 1. Consolidação: (egofonia/sons branquiais/crepitações) ☐ 1=Presente, 0=Ausente Se presente indique local(is) (circule): RUL LUL RLL LLL 2. Sibilos/Ronco (Obstrução das vias aéreas) ☐ 1=Presente, 0=Ausente Se presente indique local(is) (circule): RUL LUL RLL LLL 3. Efusão pleural (Macissez / fremito diminuído) ☐ 1=Presente, 0=Ausente Se presente indique local(is) (circule): RUL LUL RLL LLL 4. Outros (descreva) _____
67e) Abdômen	☐	Se anormal, indique o seguinte: Presente Ausente 1. Hepatomegalia 1 0 2. Esplenomegalia 1 0 3. Ascites 1 0 4. Outros (descreva): _____
67f) Musculoesquelético	☐	Se anormal, indique o seguinte Presente Ausente 1. Escoliose 1 0 2. Cifose 1 0 3. Artrite 1 0 4. Artralgia 1 0

36016

IDNO _____

Data do Exame ____/____/_____

Sistema	0=Normal 1=Anormal 9=Não examinado	Descreva brevemente a anormalidade
67g) Extremidades (Edema)	☐	Se anormal, indique o seguinte: Presente / Ausente 1. Membro Inferior, unilateral 1 0 2. Membro Inferior, bilateral 1 0 3. Edema Sacral 1 0 4. Anasarca 1 0
67h) Neurológico	☐	Se anormal, indique o seguinte: Presente / Ausente 1. Parestesias 1 0 2. Anormalidades do nervo cranial 1 0 Especifique nervo(s): _____ 3.Outros (descreva):_____
67i) Pele e mucosa	☐	Se anormal, indique o seguinte: Presente / Ausente 1. Maculo-papular (eritema liso ou crescido, sem escama) 1 0 2. Papulo-escamoso (crescido com escamas) 1 0 3. Vesicular ou bolhoso 1 0 4. Úlceras 1 0 5. Moniliase 1 0 6. Herpes zoster 1 0 7. Herpes Simples 1 0 8. Outros (descreva): _____
67j) Linfanodos	☐	Se anormal, indique o seguinte: Presente / Ausente TIPO 1. Localizado 1 0 2. Geralizado 1 0 LOCAL (IS) 1. Cervical 1 0 2. Axilar 1 0 3. Supraclavicular 1 0 4. Epitroclear 1 0 5. Femural 1 0 6. Inguinal 1 0

36016

IDNO _____

Data do Exame ____/____/_____

Sistema	0=Normal 1=Anormal 9=Não examinado	Descreva brevemente a anormalidade
67k) Outros Achados	☐	Favor Indicar: 1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____

AVALIAÇÃO

68. O Paciente tem TB Clínica? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não ☐ 2 = Incerta: Requer mais trabalho

68a. Executar a avaliação diagnóstica de TB (ver SOP or o protocolo do estudo). ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não

68b. Favor indicar os planos para tratamento da TB (circule o número):

1	Iniciar o tratamento para a TB hoje. Completar a avaliação diagnóstica inicial.
2	Não iniciar o tratamento anti-TB hoje, ficando pendente o término da avaliação diagnóstica.
3	Não suspeito de TB, nenhum tratamento específico ou trabalho adicional necessário.

68c. Outros Planos de Diagnótico de TB:
Administrar antibiótico empírico e reavaliar para a TB dentro de 2 semanas.

☐ 1 = Sim antibiótico: _____

☐ 0 = Não

☐ Outros testes diagnósticos, descreva: _____

69. O paciente tem uma suspeita ou confirmação do comorbidade? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não

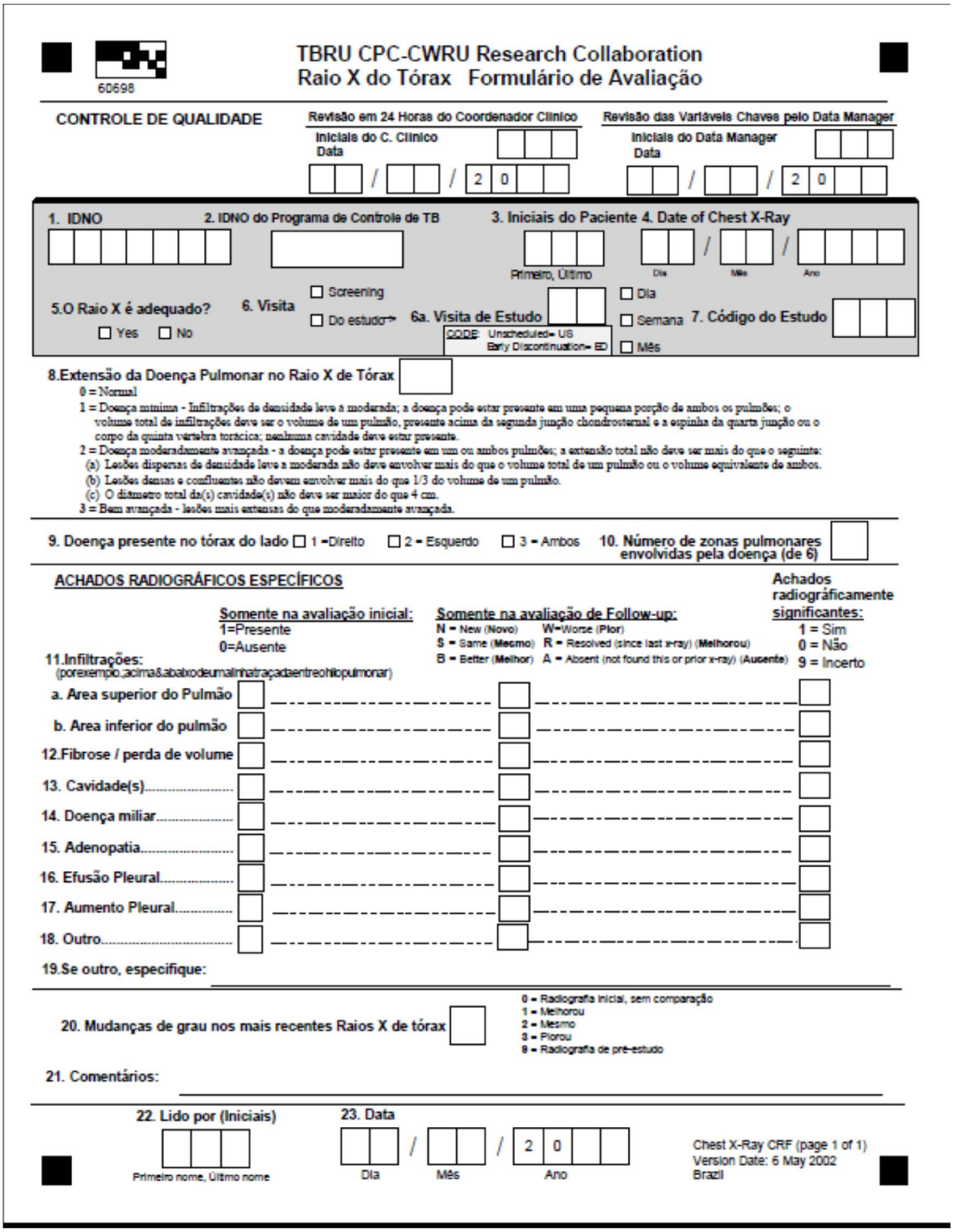
Se Sim: 69a. Favor listar diagnósticos e planos de gerenciamento do paciente

Diagnóstico1:	_____	Plano 1:	_____
Diagnóstico2:	_____	Plano 2:	_____
Diagnóstico3:		Plano 3:	

70. O paciente é elegível para o estudo clínico de TB dadas? ☐ 1 = Sim ☐ 0 = Não ☐ 9 = Não Aplicável

Iniciais do Médico ☐☐☐
(Primeira/Última)

12.4 Anexo 4: Formulário de Avaliação de Raio-X de Tórax



60698

TBRU CPC-CWRU Research Collaboration
Raio X do Tórax Formulário de Avaliação

CONTROLE DE QUALIDADE

Revisão em 24 Horas do Coordenador Clínico
Iniciais do C. Clínico
Data ___ / ___ / 20__

Revisão das Variáveis Chaves pelo Data Manager
Iniciais do Data Manager
Data ___ / ___ / 20__

1. IDNO

2. IDNO do Programa de Controle de TB

3. Iniciais do Paciente (Primeiro, Último)

4. Date of Chest X-Ray (Dia / Mês / Ano)

5.O Raio X é adequado? ☐ Yes ☐ No

6. Visita ☐ Screening ☐ Do estudo→

6a. Visita de Estudo
CODE: Unscheduled= US; Early Discontinuation= ED
☐ Dia ☐ Semana ☐ Mês

7. Código do Estudo

8.Extensão da Doença Pulmonar no Raio X de Tórax

0 = Normal

1 = Doença mínima - Infiltrações de densidade leve a moderada; a doença pode estar presente em uma pequena porção de ambos os pulmões; o volume total de infiltrações deve ser o volume de um pulmão, presente acima da segunda junção chondrosternal e a espinha da quarta junção ou o corpo da quinta vértebra torácica; nenhuma cavidade deve estar presente.

2 = Doença moderadamente avançada - a doença pode estar presente em um ou ambos pulmões; a extensão total não deve ser mais do que o seguinte:
(a) Lesões dispersas de densidade leve a moderada não deve envolver mais do que o volume total de um pulmão ou o volume equivalente de ambos.
(b) Lesões densas e confluentes não devem envolver mais do que 1/3 do volume de um pulmão.
(c) O diâmetro total da(s) cavidade(s) não deve ser maior do que 4 cm.

3 = Bem avançada - lesões mais extensas do que moderadamente avançada.

9. Doença presente no tórax do lado ☐ 1 =Direito ☐ 2 = Esquerdo ☐ 3 = Ambos

10. Número de zonas pulmonares envolvidas pela doença (de 6)

ACHADOS RADIOGRÁFICOS ESPECÍFICOS

Somente na avaliação inicial:
1=Presente
0=Ausente

Somente na avaliação de Follow-up:
N = New (Novo) W=Worse (Pior)
S = Same (Mesmo) R = Resolved (since last x-ray) (Melhorou)
B = Better (Melhor) A = Absent (not found this or prior x-ray) (Ausente)

Achados radiográficamente significantes:
1 = Sim
0 = Não
9 = Incerto

11.Infiltrações:
(porexemplo,acima&abaixodeumalinhatraçadaentreohiopulmonar)

a. Area superior do Pulmão	☐	☐	☐
b. Area inferior do pulmão	☐	☐	☐
12.Fibrose / perda de volume	☐	☐	☐
13. Cavidade(s)	☐	☐	☐
14. Doença miliar	☐	☐	☐
15. Adenopatia	☐	☐	☐
16. Efusão Pleural	☐	☐	☐
17. Aumento Pleural	☐	☐	☐
18. Outro	☐	☐	☐

19.Se outro, especifique: _____

20. Mudanças de grau nos mais recentes Raios X de tórax ☐

0 = Radiografia inicial, sem comparação
1 = Melhorou
2 = Mesmo
3 = Piorou
9 = Radiografia de pré-estudo

21. Comentários: _____

22. Lido por (Iniciais) ___ (Primeiro nome, Último nome)

23. Data ___ / ___ / 20__ (Dia / Mês / Ano)

Chest X-Ray CRF (page 1 of 1)
Version Date: 6 May 2002
Brazil