

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE
NA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE**

LIA GONÇALVES POSSUELO

Porto Alegre, fevereiro de 2004.

UFRGS
Inst. de Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE
NA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE**

LIA GONÇALVES POSSUELO

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Co-Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Porto Alegre, fevereiro de 2004.

Aos meus pais, Danilo e Suzana pelo incentivo, amor e dedicação durante todos esses anos, por abdicarem de seus próprios desejos para poder me dar a melhor educação.

Ao Dani por todo amor, paciência, companheirismo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Lucia Rossetti pela oportunidade e confiança desde a iniciação científica, pela determinação e pelo grande exemplo de pessoa que és.

Ao Dr. Arnaldo Zaha pela oportunidade de realização do curso de Mestrado sob sua orientação, por ser um grande exemplo de pesquisador, sempre realizando trabalhos com seriedade.

Um agradecimento especial para as amigas e colegas do grupo de Epidemiologia Molecular: Andréia, Michele e Patrícia. À Andréia por todos os ensinamentos, pelos conselhos, pela paciência, amizade e carinho durante esses anos. À Michele pela amizade, apoio e dedicação. À Patrícia, agradeço às críticas (que me fizeram aprender muito!!!), o bom humor, e a amizade.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia da tuberculose do IPB-LACEN: Fábio, Dona Geci e Marta Osório pelos grandes ensinamentos nas etapas iniciais e também pelo apoio nas etapas subseqüentes do trabalho.

Às colegas do CDCT pela amizade, pelas conversas na sala do café, pelo agradável ambiente de trabalho. Em especial à Ludi, por estar sempre disposta a ajudar seja quando for, por ser tão detalhista e tão perfeccionista, e pelo grande apoio que me deu, principalmente agora no final.

Às enfermeiras dos postos de saúde e hospitais pela gentileza de colaborarem com a realização deste trabalho disponibilizando as informações epidemiológicas necessárias e também por serem um exemplo de dedicação à saúde pública.

Ao grupo de trabalho do Programa de Controle da Tuberculose da Secretaria Estadual de Saúde por disponibilizarem os dados epidemiológicos do SINAN e também pelos conhecimentos em relação as atividades do programa .

Ao pessoal da Seção de Virologia do IPB-LACEN pela gentileza de disponibilizar os livros de registro de HIV para revisão.

À Cléia e a Regina pelo auxílio no decorrer do curso.

Agradeço ao CNPq, à FAPERGS e ao Ministério da Saúde pelo apoio financeiro. À todas as pessoas que de uma forma ou de outra auxiliaram na minha formação e na realização deste trabalho. Obrigada!!!

RESUMO

No Estado do Rio grande do Sul, 6.152 novos casos de TB foram reportados no ano de 2000 e mais de 65% destes foram notificados na região metropolitana de Porto Alegre, onde a incidência é de aproximadamente 80/100.000 habitantes. O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade genética dos padrões de *fingerprint* em isolados da região metropolitana de Porto alegre através da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), determinar o nível de resistência à drogas em isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes suspeitos de resistência e identificar fatores de risco para transmissão recente por epidemiologia clássica e molecular. Cento e setenta e um isolados foram incluídos no estudo. O número de cópias de IS6110 variou de 2 a 18 com um número médio de 10 cópias por isolado, sendo que 9,9% dos isolados apresentaram 6 ou menos cópias de IS6110. A análise por RFLP revelou 129 padrões de bandas, 112 (65,5%) dos quais apresentaram padrão único de *fingerprinting* e 59 (34,5%) foram incluídos em 17 clusters consistindo de 2 a 9 pacientes cada. Na análise epidemiológica observamos que não houve diferença estatística entre *cluster* e não *cluster* para as características analisadas, porém nós observamos que pacientes infectados com cepas resistentes, pacientes que nunca trataram TB e diabéticos demonstraram uma tendência a desenvolver TB devido à transmissão recente. 109 (63,8%) isolados eram resistentes e destes, 45 (41,3%) eram MDR. Analisando os dados clínicos dos pacientes observamos que a maioria deles tiveram tratamento prévio, o que explica esta alta taxa de resistência encontrada. Assim, nós concluímos que a infecção recente não é o único fator responsável pela manutenção da incidência da doença em áreas onde esta é endêmica.

ABSTRACT

In Rio Grande do Sul State, 6,152 new cases of TB have been reported in 2000 and more than 65% of these cases were notified in the Metropolitan Region of Porto Alegre, where the incidence is around 80/100,000 inhabitants. The aim of this study was to determine the diversity of DNA fingerprint patterns in isolates from the metropolitan region of Porto Alegre by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), to determine the extent of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients suspected of resistance and identify risk factors for the recent transmission by molecular and classical epidemiology. One hundred seventy one isolates were included in this study. The copy number of IS6110 ranged from 2 to 18 with a mean number of 10 copies per isolate, 9.9% of the isolates having 6 or less copies of IS6110. RFLP analysis revealed 129 band patterns, 112 (65.5%) of which had unique fingerprinting patterns and 59 (34.5%) were included in 17 clusters consisting of 2 to 9 patients each. The epidemiological analysis showed that there was no statistical difference between cluster and non-cluster for the characteristics analyzed. However, we observed that patient infected by resistant strain, patient that never treated TB and diabetics presented a tendency to develop TB due to recent transmission. 109 (63.8%) isolates were resistant and 45 (41,3%) presented multidrug-resistance. Analyzing the patient's data we observed that many of them presented a history of previous treatment, suggesting that the strains infecting those patients have developed resistance. Thus we could conclude that recent transmission is not the unique factor responsible for the maintenance of disease incidence in areas where it is endemic.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	7
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A DOENÇA	9
1.2. AGENTE ETIOLÓGICO	9
1.3. TRANSMISSÃO E INFECÇÃO.....	11
1.4. PATOGÊNESE E IMUNIDADE.....	12
1.5. TUBERCULOSE E HIV	13
1.6. DIAGNÓSTICO	14
1.7. TRATAMENTO	16
1.7.1. Esquemas de tratamento	16
1.7.1.1. Tratamento em Casos de Resistência	17
1.8. MEDIDAS DE CONTROLE	18
1.9. EPIDEMIOLOGIA.....	20
1.9.1. Epidemiologia da Tuberculose no Rio Grande do Sul.....	22
1.10. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	24
1.10.1. Aplicação das metodologias de genotipagem.....	25
1.10.2. Sequências de DNA polimórfico em <i>M. tuberculosis</i>	28
1.10.2.1. Sequências de Inserção (ISs).....	28
1.10.2.2. Sequências curtas e repetitivas de DNA.....	29

1.10.3. Técnicas de tipificação molecular.....	30
1.10.3.1. RFLP- IS6110	31
1.10.3.2. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	33
1.10.3.3. Técnicas baseadas na PCR.....	34
1.10.3.3.1. Spoligotyping.....	34
1.10.3.3.2. Outras técnicas baseadas na PCR	35
1.11. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE NO BRASIL	36
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. OBJETIVO GERAL	39
2.2. Objetivos específicos	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. AMOSTRAGEM	40
3.2. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO E DAS UNIDADES DE SAÚDE	40
3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	42
3.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	42
3.5. CULTURA DO MICRORGANISMO	42
3.6. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE	43
3.7. BANCO DE ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i>.....	43
3.8. EXTRAÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL	44
3.9. TÉCNICA DE RFLP	44
3.9.1. Clivagem	44
3.9.2. Eletroforese em Gel de Agarose	45
3.9.3. <i>Southern Blotting</i>	45
3.9.4. Hibridização e Detecção	46

3.10. ANÁLISE DOS RESULTADOS	47
3.10.1. RFLP	47
3.10.2. Análise dos dados clínicos e epidemiológicos	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DAS METODOLOGIAS CONVENCIONAIS.....	49
4.2. DADOS DOS TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE.....	50
4.3. OBTENÇÃO DA CULTURA PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	51
4.4. DADOS DA GENOTIPAGEM	52
4.4.1. ANÁLISE POR IS6110- RFLP.....	52
4.5. ANÁLISE DA RELAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA ENTRE OS ISOLADOS <i>CLUSTER</i>	55
4.6. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	56
4.6.1. Análise Geral	58
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÃO	75
7. PERSPECTIVAS.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
9. ANEXOS.....	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Nº ABSOLUTO DE CASOS E INCIDÊNCIA DOS 22 PAÍSES QUE CONTRIBUEM COM 80% DA TB MUNDIAL.	21
TABELA 2: INCIDÊNCIA DE TUBERCULOSE NAS GRANDES REGIÕES DO BRASIL EM 1999.	22
TABELA 3: CARACTERÍSTICAS DE ALGUNS SISTEMAS DE TIPIFICAÇÃO UTILIZADOS PARA DIFERENCIAR CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i>	31
TABELA 4: DESCRIÇÃO DE ESTUDOS DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DESENVOLVIDOS NO BRASIL.....	37
TABELA 5: NÚMERO DE ISOLADOS ANALISADOS POR UNIDADE DE SAÚDE.	40
TABELA 6: NÚMERO DE CASOS DE TB NO RS E DADOS SOBRE CULTURA.....	49
TABELA 7: NÚMERO DE ISOLADOS RESISTENTES ESTUDADOS NO PERÍODO.....	51
TABELA 8: NÚMERO DE ISOLADOS DA REGIÃO METROPOLITANA COM TS, Nº DE ISOLADOS ANALISADOS POR RFLP, PERCENTUAL DE ISOLADOS COM TESTE ANALISADOS POR RFLP.....	51
TABELA 9: RELAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA ENCONTRADA ENTRE OS PACIENTES QUE FORMARAM <i>CLUSTER</i>	55
TABELA 10: MÉDIA DE IDADE DOS PACIENTES EM GERAL E POR SEXO, EM RELAÇÃO A TRANSMISSÃO RECENTE E REATIVAÇÃO.....	59
TABELA 11: PERFIL DE RESISTÊNCIA ENTRE OS ISOLADOS <i>CLUSTER</i> E NÃO <i>CLUSTER</i> DE PACIENTES COM E SEM RATAMENTO PRÉVIO.....	61
TABELA 12: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES ANALISADOS NO ESTUDO.....	62
TABELA 13: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES ESTRATIFICADOS POR PROCEDÊNCIA DO PACIENTE.....	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MAPA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL INDICANDO O NÚMERO DE CASOS POR 100.000 HABITANTES DO ANO DE 2000.	23
FIGURA 2: CASOS DE TUBERCULOSE, TODAS AS FORMAS, RIO GRANDE DO SUL, 1980-2000.....	24
FIGURA 3: MAPA FÍSICO DA SEQÜÊNCIA DE INSERÇÃO 6110 DE <i>M. tuberculosis</i>	31
FIGURA 4: MAPA DA GRANDE PORTO ALEGRE MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS CIDADES DE ONDE PROVINHAM A MAIORIA ISOLADOS DE PACIENTES ANALISADOS NO ESTUDO.....	41
FIGURA 5: FREQUÊNCIA DO NÚMERO DE FRAGMENTOS DE IS6110 ENCONTRADA NA ANÁLISE PELA TÉCNICA DE RFLP.....	52
FIGURA 6: AUTO-RADIOGRAFIA DE RFLP COM DNAs EXTRAÍDOS DE ISOLADOS DE DIFERENTES PACIENTES PROVENIENTES DE POSTOS E HOSPITAIS DA REDE DE SAÚDE PÚBLICA DA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE OBTIDA APÓS HIBRIDIZAÇÃO COM A SONDA IS6110.	53
FIGURA 7: DENDROGRAMA OBTIDO ATRAVÉS DO SOFTWARE GELCOMPARE REPRESENTANDO OS ISOLADOS <i>CLUSTERS</i> ENCONTRADOS NO ESTUDO.	54
FIGURA 8: MAPA DA CIDADE DE PORTO ALEGRE INDICANDO OS BAIRROS DE ONDE PROVINHAM 40% DOS PACIENTES DO ESTUDO.	57
FIGURA 9: ANÁLISE DO GÊNERO DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO COM RELAÇÃO À TRANSMISSÃO RECENTE E REATIVAÇÃO.	58
FIGURA 10: ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA ENTRE ISOLADOS EM <i>CLUSTER</i> E NÃO <i>CLUSTER</i>	59
FIGURA 11: ANÁLISE DO TRATAMENTO PRÉVIO EM RELAÇÃO AOS PACIENTES <i>CLUSTER</i> E NÃO <i>CLUSTER</i>	60
FIGURA 12: ANÁLISE DO GRAU DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES ENVOLVIDOS NO ESTUDO <i>VERSUS</i> TRANSMISSÃO RECENTE E REATIVAÇÃO.	63

FIGURA 13: ANÁLISE DAS DIFERENTES ETNIAS *VERSUS* TRANSMISSÃO RECENTE E REATIVAÇÃO..... 63

FIGURA 14: ANÁLISE DAS CO-MORBIDADES *VERSUS* REATIVAÇÃO E TRANSMISSÃO RECENTE..... 64

FIGURA 15: ANÁLISE DOS DADOS DE VACINAÇÃO COM BCG *VERSUS* REATIVAÇÃO E TRANSMISSÃO RECENTE. 65

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
CS1	Centro de Saúde Navegantes
CS2	Centro de Saúde Modelo
CTAB	Brometo de cetil-trimetil-amônio
DATASUS	Dados epidemiológicos do Sistema Único de Saúde
dNTP	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNPS/ MS	Divisão Nacional de Programa de Saúde/ Ministério da Saúde
DOTS	Tratamento Diretamente Supervisionado
DR	<i>Direct Repeat</i>
DRE-PCR	<i>Double-Repetitive-Element PCR</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal sódico
EMB	Etambutol
EtBr	Brometo de etídio
ETH	Etionamida
ETR	<i>Exact Tandem Repeat</i>
HCL	Ácido Clorídrico
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSP	Hospital Sanatório Partenon
kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
INH	Isoniazida
IS	<i>Insertion Sequence</i>
IUATLD	International Union Against Tubercle and Lung Disease
LACEN	Laboratório Central
LJ	Löwenstein-Jensen
MDR	Multi-Droga Resistente
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed repetitive units</i>
MPTR	<i>Major Polymorphic Tandem Repeat</i>
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

PAM3	Centro de Saúde Vila dos Comerciários
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCT	Programa de Controle da Tuberculose
PE	Pernambuco
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
PGRS	<i>Polymorphic GC-Rich Sequence</i>
PNB	Ácido paranitrobenzóico
PPD	<i>Purified Protein Derived</i>
PZA	Pirazinamida
REDE-TB	Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RJ	Rio de Janeiro
RM	Região Metropolitana
RMP	Rifampicina
rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SINAN	Sistema Nacional de Agravos Notificados
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SM	Estreptomicina
SP	São Paulo
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multidroga resistente
TCH	Hidrazida de ácido tiofeno
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroxi-metil) aminometano
TS	Teste de susceptibilidade
U	Unidade (atividade enzimática)
UPGMA	<i>Unweighted pair groups</i>
UV	Ultravioleta
V	Volts
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
ZN	Ziehl- Neelsen

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A DOENÇA

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que tem acometido pessoas e animais desde há muito tempo, tendo demonstrado um largo espectro de severidade que varia de indivíduo para indivíduo. Estudos moleculares recentes indicam que o agente causal da TB, o *Mycobacterium tuberculosis*, vem infectando o organismo humano há aproximadamente 10.000 anos, quando se começou a domesticar o gado (Young *et al.*, 1998). Mesmo hoje, mais de cem anos após Robert Koch (1882) ter identificado o agente causador desta enfermidade, ela ainda se mantém como uma das infecções crônicas de maior índice de morbidade e mortalidade.

Em aproximadamente 85% dos casos de TB o sítio envolvido é o pulmão e nos demais 15%, a TB pode estar localizada em outro órgão (TB extrapulmonar) ou envolvendo ambos os sítios, pulmonar e não pulmonar (Farer *et al.* 1979). Os sítios mais comumente propensos a desenvolver TB são aqueles com melhor vascularização como os rins, meninges e pleura. Essa distribuição é alterada em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

A TB pulmonar se caracteriza por uma tosse inicialmente seca que persiste por mais de três semanas e leva à formação de uma secreção purulenta. Ocorre perda de apetite e conseqüente emagrecimento; além de cansaço, febre baixa no final da tarde e sudorese noturna (Kritski *et al.*, 2000).

Tuberculose miliar é a forma mais séria da doença e caracteriza-se por disseminação hematogênica de um grande número de bacilos resultando em lesões granulomatosas por todo o organismo, podendo ser fatal se não tratada adequadamente (Bloom, 1994).

1.2. AGENTE ETIOLÓGICO

A TB é uma doença bacteriana causada mais freqüentemente pelo *M. tuberculosis*, também chamado bacilo de Koch ou bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Este microrganismo é a espécie-tipo do único gênero da família *Mycobacteriaceae* - ordem *Actinomycetales* (Jewetz, 1995). O complexo *M. tuberculosis* inclui as espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis*- BCG,

Mycobacterium microtii e *Mycobacterium africanum*, que são identificadas com base em características de crescimento, fisiológicas e bioquímicas.

Os bacilos da tuberculose caracterizam-se por apresentarem a forma de bastonetes, medindo de 2 a 5 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de espessura (Brólio & Filho, 1996). É um bacilo imóvel que não forma esporos e não produz toxinas, é uma forma de transição entre as eubactérias e os actinomicetos.

A parede celular desta bactéria é hidrofóbica devido ao alto conteúdo lipídico (60%), responsável por profundos efeitos biológicos no hospedeiro, como indução da formação de granulomas e antigenicidade.

Por ser aeróbio estrito, tem no pulmão o seu órgão preferencial de localização e infecção. A presença de oxigênio favorece sua multiplicação e a ligação com o meio externo facilita sua transmissão. Consegue sobreviver apenas por algumas horas fora do organismo, mas aí não consegue se multiplicar, a não ser em meios de cultura (Kritski *et al.*, 2000).

O complexo *M. tuberculosis* é um grupo de bactérias geneticamente muito relacionadas, o que dificulta a sua diferenciação por métodos convencionais. Esta relação taxonômica muito próxima é também refletida no seu alto grau de conservação evolutiva, sendo que a homologia em suas seqüências de DNA é de quase 100% (van Embden *et al.*, 1992; Small & van Embden, 1994; Kremer *et al.*, 1999).

O tamanho do genoma é variável conforme a espécie. O genoma completo da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* foi seqüenciado pela primeira vez por Cole e colaboradores no ano de 1998. No ano de 2002 foi publicada uma reavaliação do genoma da mesma cepa (Camus *et al.*, 2002). O genoma deste microrganismo é composto por 4.411.529 pares de bases (pb), contendo 3995 genes, dos quais 52% possuem funções conhecidas, e um conteúdo de guanina (G) + citosina (C) de 65,5% (Cole *et al.*, 1998; Camus *et al.*, 2002). É rico em seqüências de DNA repetitivo, particularmente seqüências de inserção (ISs) e seqüências repetitivas polimórficas ricas em GC (PGRSs) (Cole *et al.*, 1998). Em estudo realizado por Fleischmann *et al.* (2002) foi realizado o sequenciamento completo da cepa clínica CDC1551 e comparado com o genoma da cepa laboratorial H37Rv para identificar seqüências polimórficas que pudessem ter um potencial relevante na patogênese, imunidade e evolução da doença. Os resultados desse estudo demonstraram a presença de muitos polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) em inúmeros genes, muitos deles sabidamente envolvidos na virulência e na resposta imune do hospedeiro. Essas seqüências polimórficas são particularmente úteis para estudos de evolução, patogênese, epidemiologia e clínica da TB (Alland *et al.*, 2003).

Até o momento já foram identificados mais de 14 tipos diferentes de seqüências de inserção (ISs) no genoma de *M. tuberculosis*. Segundo Mostrom *et al.* (2002) estas seqüências de inserção são geradoras de polimorfismo genético e, portanto, são freqüentemente utilizadas para discriminar cepas.

1.3. TRANSMISSÃO E INFECÇÃO

Em geral, a TB é uma doença transmitida por via aérea, por meio de gotículas contendo os bacilos expelidos por um doente com tuberculose (TB) pulmonar ao tossir, espirrar ou falar (contágio direto). Entretanto, ocasionalmente também pode ser transmitida por contágio indireto através da ingestão de alimentos contaminados por pessoas doentes ou do leite *in natura* e por via cutânea (Sepkowitz *et al.*, 1995).

Em 1948, um trabalho realizado por Wells, Ratcliffe e Crumbs demonstrou a importância do tamanho das partículas contagiantes. Somente as partículas menores, com 1 a 2 bacilos em suspensão no ar, produto do ressecamento de grandes partículas (núcleos de Wells), alcançam os alvéolos e bronquíolos onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares, iniciando sua multiplicação (Fiúza de Melo, 1985).

Um paciente bacilífero consegue eliminar 250 núcleos de Wells por hora e calcula-se que sejam necessários 25.000 núcleos para haver contágio. O núcleo que possuir mais bacilos é mais pesado indo ao solo e, portanto menos infectante. O fator ambiental que mais protege é a ventilação local, isto é, um alto número de trocas de ar e também a luz no ambiente, pois o raio ultravioleta destrói o bacilo (Brólio & Filho, 1996).

As características dos focos (doentes pulmonares bacilíferos) e dos comunicantes (pessoas que coabitam com o doente), bem como as suas relações, interfere favorável ou desfavoravelmente na transmissão da TB. Pacientes com tuberculose pulmonar constituem a principal fonte de disseminação da doença, assim como a proximidade (mesma cama, mesmo quarto ou mesma casa) e o parentesco (mãe, pai, filho e outros parentes) guardam relação direta e estatisticamente significativa com a infecção e doença entre os comunicantes (Morrone & Solha, 1983). Hospitais que internam pacientes com TB constituem ambientes de risco para outros doentes, especialmente imunodeprimidos, bem como para os profissionais que trabalham nestes locais (Kristski *et al.*, 1993). Além destes fatores, a probabilidade da tuberculose ser transmitida depende da duração da exposição (Fiúza de Melo *et al.*, 1993).

1.4. PATOGÊNESE E IMUNIDADE

Os mecanismos de resposta imunológica que protegem o indivíduo contra a tuberculose são extremamente complexos e ainda não completamente entendidos. No entanto, tem sido demonstrado que a imunidade na TB é basicamente gerada pelo sistema imunológico celular do hospedeiro (Kritski *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2002).

Assim que o bacilo aspirado se aloja no alvéolo pulmonar, sofre a ação dos macrófagos aí localizados, que os fagocitam. Embora a fagocitose aconteça sem maiores problemas, alguns bacilos permanecem vivos e se multiplicam dentro da célula de defesa ou livres na cavidade alveolar (Trujillo & Kristski, 2000). As micobactérias que permanecem dentro dos chamados fagossomos micobacterianos, impedem a fusão do lisossomo com o fagossomo, favorecendo a sobrevivência da micobactéria. Após análise de diferentes proteínas presentes nos fagossomos que continham micobactérias viáveis, observou-se a presença de uma molécula denominada TACO (*tryptophan-aspartate containing coat protein*), a qual estava ausente na análise de fagossomos não infectados e ausente também em fagossomos com micobactérias mortas. Sugere-se que a presença dessa molécula retida por bactérias vivas no fagossomo bacteriano impeça a fusão do fagossomo com o lisossomo, permitindo dessa forma que a bactéria sobreviva dentro do fagossomo (Pieters & Gatfield, 2002).

O *M. tuberculosis* divide-se a cada 25 a 32 horas dentro do macrófago. Não são conhecidas endotoxinas ou exotoxinas, e, não há desenvolvimento de resposta imunológica imediata. A multiplicação ocorre por 2 a 12 semanas, até atingir uma quantidade bacilar de 10^3 a 10^4 , que então é suficiente para desencadear uma resposta imune celular, que é capaz de limitar esta multiplicação e de ser detectada pelo teste da tuberculina. Os linfócitos T-CD4 são responsáveis pela formação do granuloma, morte dos bacilos e contenção da lesão, produção de lisozima, necrose tecidual e disseminação da lesão. Os linfócitos T-CD8 participam na limitação do processo inflamatório (Trujillo & Kristski, 2000; ATS, 2000).

Antes do desencadeamento da imunidade celular, os bacilos se disseminam através do sistema linfático aos linfonodos (complexo primário) e então, atingindo a corrente sanguínea, chegam a sítios mais distantes. Em 95% dos casos a primoinfecção é detida com a imunidade celular, os bacilos permanecem inativos metabolicamente, uma condição chamada de TB quiescente ou latente (Hopewell *et al.*, 1994; Kritski *et al.*, 2000).

Caso o processo não seja impedido ocorrerá a tuberculose primária, resultante da evolução do complexo pulmonar primário, até 5 anos após a primoinfecção. As formas

extrapulmonares são consideradas tuberculoses primárias, pois ocorrem, quase na sua maioria, a partir da disseminação hematogênica do bacilo do complexo pulmonar primário. As formas serosas (pleura, pericárdio, peritônio e meninges) ocorrem precocemente e as formas tardias mais freqüentes são a ganglionar e a do sistema genitourinário. Havendo a quebra do equilíbrio entre o indivíduo e o bacilo durante o período de latência, ocorrerá a TB pós-primária com redução da resposta imune local ou sistêmica, ocorrendo a reativação endógena. Poderá também ocorrer nova inalação de grande quantidade de bacilos, associada ou não à imunodeficiência, instalando-se a reinfeção exógena (Smith & Moss, 1994; Kritski *et al.*, 2000).

1.5.TUBERCULOSE E HIV

Estudos demonstram que o indivíduo HIV positivo, uma vez infectado pelo *M. tuberculosis*, tem risco de adoecimento muito maior que a população em geral (Lima *et al.*, 1997). O risco de um co-infectado desenvolver tuberculose ativa é de 5% a 10% ao ano, sendo muito maior do que o risco ao qual está exposto um paciente HIV negativo, que é de 5 % a 10% durante toda a vida (Lucas & Nelson, 1994).

Segundo dados apresentados no Workshop on TB/HIV co-infection (Honduras, 2003), estima-se que 40 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo HIV e que 13 milhões destas estejam co-infectadas com TB/HIV.

Embora novas e eficientes terapias antiretrovirais estejam protegendo os pacientes de infecções oportunistas, a tuberculose permanece como um significativo problema em pacientes infectados pelo HIV (Mayaud & Cadranel, 1999).

O aumento da incidência da comorbidade TB/HIV ocorre devido à reativação de tuberculose latente na presença do HIV, rápida progressão de infecção adquirida e também devido a um aumento da chance de re-infeção exógena (Mayaud & Cadranel, 1999). O risco de reativação de uma infecção latente aumenta de aproximadamente 0,07 a 0,1 casos por 100 pacientes em indivíduos soronegativos para 9,7 a 10,4 casos por 100 pacientes soropositivos (Rose *et al.*, 1998).

A presença do HIV/AIDS tem impactado o manejo da TB nos seguintes aspectos: alta incidência de TB pulmonar com baciloscopia negativa e conseqüente diminuição de diagnósticos de TB pulmonar com baciloscopia positiva; supervisão inadequada da quimioterapia contra TB, tendo assim baixos índices de cura; altos índices de mortalidade durante o tratamento e altos índices de abandono devido a reações adversas decorrentes

dos medicamentos contra a TB e maior incidência de resistência aos medicamentos (PAHO, 2003; Song *et al.*, 2003).

Entre 1988 e 1996, a TB pulmonar foi associada com AIDS em 10% dos pacientes no momento do diagnóstico (Brasil, 1996). As proporções poderiam ser bem maiores se os testes sorológicos anti-HIV fossem realizados rotineiramente em todos os pacientes com diagnóstico de tuberculose confirmado. A solicitação do teste anti-HIV para pacientes com TB não é normatizada em nosso país e o exame é realizado de acordo com o critério do médico e somente com a autorização do paciente. Segundo normas do Ministério da Saúde (MS), no Brasil, o teste anti-HIV deveria ser oferecido para todos os pacientes com TB (Brasil, 2002a).

O profissional de saúde deveria conversar com o doente sobre a possibilidade de associação das duas infecções, sobre os benefícios do diagnóstico precoce e tratamento da infecção pelo HIV, ficando dessa forma a critério do paciente assinar ou não o termo de consentimento para realização do exame.

Em Porto Alegre foi notificado que 32,2% dos pacientes com TB eram HIV positivos, que 36,2% eram HIV negativos e que 31,6% não tinham realizado o teste (SES, 2003). De acordo com estes dados pode-se observar que a proporção de pacientes que não realizam teste anti-HIV ainda é muito alta, o que dificulta o conhecimento sobre a real magnitude da prevalência da co-infecção.

1.6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tuberculose ainda se baseia nos métodos clássicos da visualização do bacilo através de colorações (baciloscopia) e do cultivo em meios seletivos para micobactérias.

A baciloscopia direta do escarro é o método básico para o diagnóstico da TB na forma pulmonar. No Brasil é realizada de acordo com as recomendações do MS. A coloração é realizada através do método de Ziehl-Neelsen (ZN), onde as bactérias apresentam-se como bastonetes, corados em vermelho com fundo azul (Brasil, 1994). A análise através de baciloscopia é rápida, de fácil execução e de baixo custo, porém é pouco sensível. Para se observar um resultado positivo na baciloscopia é necessária a presença de mais de 5.000 organismos por mL de amostra clínica (Rouillon *et al.*, 1976).

O isolamento de micobactérias em meio de cultura é um método bacteriológico mais sensível e específico que a baciloscopia para o diagnóstico da tuberculose, sendo por isso considerado padrão-ouro. A cultura pode detectar a partir de 10 a 100 células

viáveis por amostra, permitindo também identificar o microrganismo em nível de espécie e informar quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento. A cultura é indicada para os suspeitos de TB pulmonar persistentemente negativos ao exame direto, para o diagnóstico de formas extrapulmonares e para os casos de suspeita de resistência bacteriana às drogas, quando deve ser realizado o teste de susceptibilidade (TS) aos fármacos. Nos casos de suspeita de infecção por micobactérias não tuberculosas, notadamente nos pacientes HIV positivos, a identificação da espécie deverá ser realizada (Brasil, 2002a).

Na década de 80, foi validado e comercializado o primeiro método radiométrico para diagnóstico de TB, o sistema BACTEC-460 (Becton Dickinson Instruments System). Este método baseia-se na detecção de gás carbônico (CO₂) radioativo liberado pela micobactéria quando da utilização de ácido palmítico marcado com carbono 14 (C¹⁴), presente no meio de cultura. Essa metodologia é mais sensível e permite detecção de uma cultura de *M. tuberculosis* em 14 dias, ao passo que o método convencional levaria em média 30 dias.

O teste tuberculínico ou teste de Mantoux é indicado como auxiliar no diagnóstico da tuberculose, sendo que a prova tuberculínica positiva, isoladamente, indica apenas infecção e não é suficiente para o diagnóstico da doença (Brasil, 2002b).

O teste de Mantoux é baseado na resposta imune celular desenvolvida pelo indivíduo exposto ao bacilo da TB. Por outro lado, a reação negativa do PPD (*Protein Purified Derived*) não afasta a possibilidade de infecção pelo *M. tuberculosis* (Afiune *et al.*, 1993). Por exemplo, pessoas vacinadas com BCG (Bacilo Calmette Guérin) podem desenvolver reações fortes, assim como indivíduos severamente debilitados, desnutridos, imunosuprimidos podem não apresentar reação devido ao seu comprometimento imunológico (Kritski *et al.*, 1998).

A partir da década de noventa, técnicas de biologia molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) passaram a ser utilizadas para o diagnóstico de diversas doenças, inclusive a tuberculose. A vantagem destes testes é a alta sensibilidade e especificidade, além de poder oferecer o resultado num curto espaço de tempo. A PCR permite a detecção de quantidades mínimas de material genético dependendo dos métodos utilizados para a extração da amostra e detecção do produto amplificado (Rossetti *et al.*, 1997). Este método é o precursor dos métodos baseados em biologia molecular (Brasil, 2002a).

1.7. TRATAMENTO

A TB é uma doença curável em praticamente 100% dos casos novos, desde que obedecidos os princípios da quimioterapia moderna (Brasil, 2002a). São considerados “casos novos” os doentes com tuberculose que nunca foram tratados, trataram por menos de um mês ou ainda fizeram tratamento anterior há 5 ou mais anos (Brasil, 2002b).

A estratégia de controle da TB tem sido elaborada por programas governamentais. Eles consistem, basicamente, em diagnosticar e tratar os casos de TB o mais rapidamente possível, a fim de interromper a transmissão e evitar a disseminação da doença.

Estabelecido o diagnóstico e realizada a notificação da doença, o controle do tratamento deverá ser mensal, com fornecimento de drogas e exames de avaliação. Deve-se dar uma atenção adequada para a consulta do início do tratamento, fundamental para que o paciente entenda a sua doença, o tratamento proposto, a forma de desenvolvê-lo e as possibilidades de cura (Fiúza de Melo & Afiune, 1993b).

O tratamento normalmente constitui-se numa associação medicamentosa de uso regular e por tempo suficiente para evitar a resistência e a persistência bacteriana (Brasil, 1994; Atlas, 1995). Os esquemas terapêuticos anti-tuberculose recomendados pelo MS são direcionados de acordo com o estado clínico do paciente.

O tratamento dos pacientes bacilíferos é atividade prioritária de controle da tuberculose, uma vez que permite anular rapidamente as maiores fontes de infecção.

1.7.1. Esquemas de tratamento

Atualmente existem vários fármacos que podem ser utilizados no tratamento da TB, sendo que os primeiros a serem introduzidos foram a isoniazida (INH) e a estreptomicina (SM). Em 1952 estes fármacos foram reconhecidos como potentes agentes com ação comprovada. Após a introdução destes medicamentos, a taxa de mortalidade por TB reduziu drasticamente (Fiúza de Melo & Afiune, 1993b). Em 1965, a rifampicina (RMP) foi reconhecida como outro potente fármaco anti-TB.

Em 1979 a Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária/Ministério da Saúde (DNPS/MS) normatizou para todo o país um Programa de Controle da Tuberculose (PCT) tendo como base fundamental o tratamento quimioterápico, com um esquema de primeira linha, chamado Esquema 1 (E-1) ou RHZ de curta duração: rifampicina (RMP), isoniazida

(INH) e pirazinamida (PZA) por 2 meses, seguidos de RMP e INH por 4 meses. O E-1 é indicado para todos as formas de tuberculose sem uso prévio de medicação e, para o retratamento, nos casos de recidiva depois de curados, desde que estes pacientes tenham tido alta por cura há mais de cinco anos (Brasil, 2002b). Para pacientes que retornarem positivos após abandonarem o tratamento inicial com E-1 ou apresentarem recidiva após cura (período menor que 5 anos) com E-1, utiliza-se esquema 1 reforçado com etambutol (EMB) (Brasil, 2002b).

Para TB extrapulmonar, na forma meningoencefálica, é recomendada uma terapia mais prolongada, esquema 2 (E-2), o qual é constituído pelo uso de RMP, INH e PZA por dois meses, seguidos de RMP e INH por sete meses (Brasil, 2002b).

1.7.1.1. Tratamento em Casos de Resistência

A resistência aos antimicrobianos em organismos previamente sensíveis ocorre sempre que os antibióticos são usados para o tratamento de doenças infecciosas em humanos e animais. Com o aumento do uso de antibióticos, incluindo o mau uso, a resistência tem surgido em todos os tipos de microrganismos, incluindo o *M. tuberculosis*, criando novos desafios para o controle das doenças infecciosas.

Os pacientes que não se curam após tratamento com os esquemas padronizados pelo MS, portadores, em geral de bacilos resistentes a mais de dois fármacos, incluindo INH e RMP, constituem um grupo de doentes classificados no Conselho Brasileiro de Tuberculose, em 1997, como portadores de tuberculose multidroga resistente (MDR) (Fiuza de Melo *et al.*, 1997). Segundo consenso da OMS são considerados portadores de tuberculose MDR aqueles pacientes que possuem bacilos resistentes a INH e RMP independente de resistência a outro fármaco.

Esquemas alternativos, com regime de quatro ou cinco drogas e com tempo de duração de tratamento de 6 a 24 meses podem ser sugeridos dependendo do perfil de resistência apresentado (Brasil, 2002a).

A resistência aos fármacos é uma potente ameaça para os programas de controle de tuberculose em todo o mundo. Pacientes infectados com cepas MDR estão menos propensos a curar a doença, particularmente se eles estão infectados com HIV, sendo ainda o tratamento desses pacientes mais tóxico e mais caro que o tratamento de pacientes infectados com cepas sensíveis.

1.8. MEDIDAS DE CONTROLE

Esforços para controlar a TB tiveram início por volta de 1900, antes mesmo da existência de tratamentos adequados para esta doença (Bates, 1982). Os avanços no seu conhecimento e na tecnologia disponível para seu controle não tem sido suficientes para impactar significativamente em sua morbi-mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento.

Atualmente, entre as medidas recomendadas pelo MS, destacam-se a descoberta e tratamento de casos, o controle dos contatos, a vacinação com BCG e a quimioprofilaxia.

A descoberta e o tratamento dos casos de tuberculose permitem anular a fonte de infecção, rompendo a cadeia epidemiológica de transmissão da doença.

Todos os contatos dos doentes de tuberculose, prioritariamente dos pacientes com baciloscopia positiva, devem comparecer à unidade de saúde para exame. Após serem examinados e não sendo constatada tuberculose-doença, deve-se orientá-los a procurarem a unidade de saúde, em caso de aparecimento de sintomatologia respiratória. Quando diagnosticada em crianças, a equipe de saúde deverá examinar os contatos adultos para busca do possível caso fonte (Brasil, 2002a).

A vacinação com BCG é uma medida operacional de alto valor na profilaxia da TB, especialmente nos países em desenvolvimento. Ela tem por objetivo desenvolver a imunidade nos indivíduos ainda não-infectados. O fundamento científico da vacinação baseia-se na produção de uma infecção benigna, capaz de defender o organismo do risco de adquirir uma infecção por microrganismos virulentos. Exerce notável poder protetor contra as manifestações graves da primo-infecção pelo *M. tuberculosis*, assim como as disseminações hematogênicas e a meningoencefalite, mas não evita a infecção tuberculosa. A proteção se mantém por 10 a 15 anos. No Brasil, a vacina BCG é prioritariamente indicada para crianças de zero a quatro anos de idade, sendo obrigatória para menores de um ano (Brasil, 2002b).

Novas estratégias para obtenção de vacinas mais efetivas para TB têm sido estabelecidas por diversos grupos. Vacinas recombinantes, utilizando BCG como vetor e DNA clonado em plasmídios foram descritas com resultados promissores (Murray *et al.*, 1996; Hyugen *et al.*, 1996; Tascon *et al.*, 1996). No Brasil está sendo desenvolvida uma vacina de DNA por pesquisadores da Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB), ela tem demonstrado ser eficaz em animais de laboratório não só prevenindo a infecção, como também mostrando clara atividade terapêutica sobre o bacilo da tuberculose, incluindo as formas multirresistentes (Lowrie *et al.*, 1999).

A quimioprofilaxia consiste na administração isolada de INH a pessoas recentemente infectadas pelo bacilo da tuberculose, na ausência de sintomas clínicos e radiológicos, com o teste tuberculínico positivo. É comprovado que a profilaxia com INH reduz entre 40% a 80% o risco de os indivíduos infectados com *M. tuberculosis* e tuberculina-positivos desenvolverem tuberculose (Brólio & Filho, 1996).

A INH é a droga de eleição para a quimioprofilaxia porque, após três horas de sua administração, a concentração inibitória mínima no sangue, para os bacilos tuberculosos, é de 50 a 90 vezes maior que a necessária para matá-los. Além disso, é a droga com menos efeitos colaterais indesejáveis e a de menor custo dentre as utilizadas no tratamento da TB (Brasil, 2002b).

Na atualidade, há consenso de que a quimioprofilaxia deve ser dirigida aos grupos de alto risco de tuberculose, entre estes, especialmente, os co-infectados pelo HIV/TB (Brasil, 2002a).

Outra medida de controle da tuberculose a qual tem sido aplicada em muitos países é o DOTS, tratamento diretamente observado de curta duração. Parte da estratégia do DOTS caracteriza-se pela observação e monitorização da administração diária dos medicamentos. Esta atividade é realizada, geralmente, por um profissional da saúde que observa e registra a ingestão de cada dose da medicação. Este procedimento pode realizar-se na unidade de saúde, no domicílio, no hospital ou no local de trabalho (Muniz *et al.*, 1999).

A estratégia DOTS tem sido desenvolvida com o intuito de aumentar os índices de cura, na tentativa de modificar o perfil epidemiológico da tuberculose. Além disso, a estratégia DOTS apresenta outras vantagens. Sua eficiência sem hospitalização torna o tratamento disponível e de baixo custo (Kochi, 1997). De igual importância é o fato da estratégia DOTS fornecer a defesa mais importante contra o desenvolvimento de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes resultantes de repetidas terapias, tratamentos incompletos ou sem sucesso, possibilitando o aparecimento de casos de tratamento difícil e caro (Muniz *et al.*, 1999).

No Brasil, uma das maiores dificuldades para a implantação do DOTS tem sido em relação à impossibilidade de o doente comparecer na unidade de saúde diariamente ou de técnicos do programa realizarem visitas freqüentes (Reigota *et al.*, 2002). Segundo dados da OMS, no Brasil, no ano de 2000 apenas 7% da população doente recebia cobertura pelo DOTS, número este que aumentou para 32% no ano de 2001 (WHO, 2003).

1.9. EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose não apresenta variações cíclicas ou sazonais de importância prática. A sua magnitude está ligada às condições sócio-econômicas e sanitárias de uma região ou país. Assim, é uma enfermidade em que múltiplos fatores causais estão relacionados, ao lado do bacilo, para a determinação da doença (Filho & Hajar, 1993).

Com a introdução dos primeiros fármacos anti-TB nas décadas de 40 e 50 vislumbrou-se o controle da doença e até mesmo sua erradicação. Houve um declínio nas taxas de prevalência da TB, porém em 1985, estas taxas voltaram a aumentar em praticamente todo o mundo (Sepkowitz, *et al.*, 1995). O aumento global das taxas de incidência da TB tem ocorrido por diversas razões, dentre elas: (a) empobrecimento, (b) desmantelamento dos sistemas de saúde pública, (c) surgimento de cepas resistentes e (d) coinfeção pelo HIV (Raviglione *et al.*, 1995; Suffys *et al.*, 1997; Dalcolmo *et al.*, 1999; Conde, Muzy de Souza & Kritski, 2002; Kanduma *et al.*, 2003).

Segundo Hajar *et al* (2001), se o controle da tuberculose não se efetivar de forma satisfatória, teme-se que até 2020 um bilhão de pessoas sejam infectadas pelo bacilo, 200 milhões adoeçam e 35 milhões possam morrer.

Estima-se que no mundo existam dois bilhões de indivíduos infectados, a grande maioria, vivendo em países em desenvolvimento. Em países desenvolvidos, há uma tendência decrescente da morbidade e mortalidade pela TB. Na Tabela 1 podemos observar os principais países que albergam 80% da tuberculose mundial com seus respectivos números absolutos e incidências da doença (WHO, 2003).

Tabela 1: Nº absoluto de casos e incidência dos 22 países que contribuem com 80% da TB mundial, 2001.

País	Nº absoluto de casos	Incidência
1. Índia	1.820.000	178/100.000
2. China	1.448.000	113/100.000
3. Indonésia	582.000	271/100.000
4. Bangladesh	328.000	233/100.000
5. Nigéria	275.000	235/100.000
6. Paquistão	247.000	171/100.000
7. África do Sul	243.000	556/100.000
8. Filipinas	229.000	297/100.000
9. Rússia	193.000	134/100.000
10. Etiópia	188.000	292/100.000
11. Kenia	161.000	515/100.000
12. Congo	159.000	302/100.000
13. Vietnam	141.000	179/100.000
14. Tanzânia	124.000	344/100.000
15. Brasil	111.000	64/100.000
16. Tailândia	86.000	135/100.000
17. Zimbábue	81.000	628/100.000
18. Cambodia	79.000	585/100.000
19. Mianmar	78.000	162/100.000
20. Uganda	78.000	324/100.000
21. Afeganistão	71.000	314/100.000
22. Moçambique	49.000	265/100.000

Fonte: WHO, 2003

O desemprego e a baixa remuneração da mão-de-obra não especializada criaram bolsões de pobreza nas áreas urbanas. Na sociedade brasileira ocorre desemprego elevado, sub-emprego e baixos níveis salariais, aliados à má-condição de transporte, de habitação, de desnutrição e fome endêmica em níveis elevados. Nesta situação a TB tem condições muito favoráveis, permitindo seu agravamento (Filho & Hajar, 1993).

O Ministério da Saúde considera a tuberculose um problema prioritário no Brasil. Atualmente, entre os 22 países que albergam 80% dos casos mundiais da doença, o Brasil ocupa o 15º lugar com 111.000 casos novos anuais (WHO, 2003). A incidência média da doença no País em 2001 foi de 64/100.000 (WHO, 2003). No ano de 1999 foram notificados 78.870 novos casos de tuberculose em suas diversas formas inclusive com a co-infecção pelo vírus HIV, porém estes números não representam a realidade do

país, já que parte dos doentes não são diagnosticados nem registrados oficialmente. As maiores incidências da doença encontram-se na região sudeste, principalmente em grandes centros urbanos (Tabela 2).

Tabela 2: Incidência de tuberculose nas grandes regiões do Brasil em 1999.

Região	Taxa de Incidência (em 100.000 habitantes)
Norte	52,2
Nordeste	55,5
Centro-Oeste	35
Sudeste	55,3
Sul	39,7

Fonte: www.datasus.com.br, 11/05/2004.

Em 1998, o coeficiente de mortalidade por TB foi de 3,5 por 100.000 com 5.879 óbitos (Brasil, 2002a). Atualmente, 72% dos casos notificados são curados e 12,2% (em média) abandonam o tratamento, sendo que em alguns Estados o abandono chega a 30% (Brasil, 2000a). Como citado anteriormente, o índice de cura atingido no Brasil é de aproximadamente 75% dos casos tratados, mas poderia chegar a 95% se não fossem as deficiências do sistema de assistência e controle da doença (Muniz & Villa, 2002).

1.9.1. Epidemiologia da Tuberculose no Rio Grande do Sul

No Rio Grande do Sul (RS), a incidência da doença varia conforme a região geográfica. As taxas de TB registradas nas regiões norte e sul do Estado são muito diferentes e estão, provavelmente, correlacionadas com a situação socio-econômica da população (Ott & Gutierrez, 1993).

No ano de 2000, a taxa de incidência de TB no Estado foi de 55,7/ 100.000 habitantes, e foram notificados 6.152 casos da doença (SES-RS, 2003). Mais de 65% dos casos de TB ocorrem na região metropolitana (RM) de Porto Alegre, onde a incidência é de aproximadamente 80/100.000 habitantes. Segundo dados fornecidos pelo DATASUS (2000), a RM de Porto Alegre possui a 5ª maior incidência de tuberculose entre as RMs do Brasil. Na região sul do Estado, as taxas variam entre 18 e 31/100.000 habitantes; na região central, entre 9,2 e 20,2/100.000 habitantes e; na região norte, entre 6 e 17/100.000 habitantes (SES-RS, 2001). Como podemos observar, as regiões sul e metropolitana apresentam índices muito elevados em comparação com os baixos índices da região norte e central (Figura 1). As taxas de TB registradas na região sul do Estado e

metropolitana são superiores e provavelmente estão associadas a diversos fatores, entre eles a situação socio-econômica da população. A densidade populacional e o número de casos de TB não apresentam correlação, com exceção da região metropolitana, onde há maior densidade populacional e o número de casos é o mais elevado do Estado.

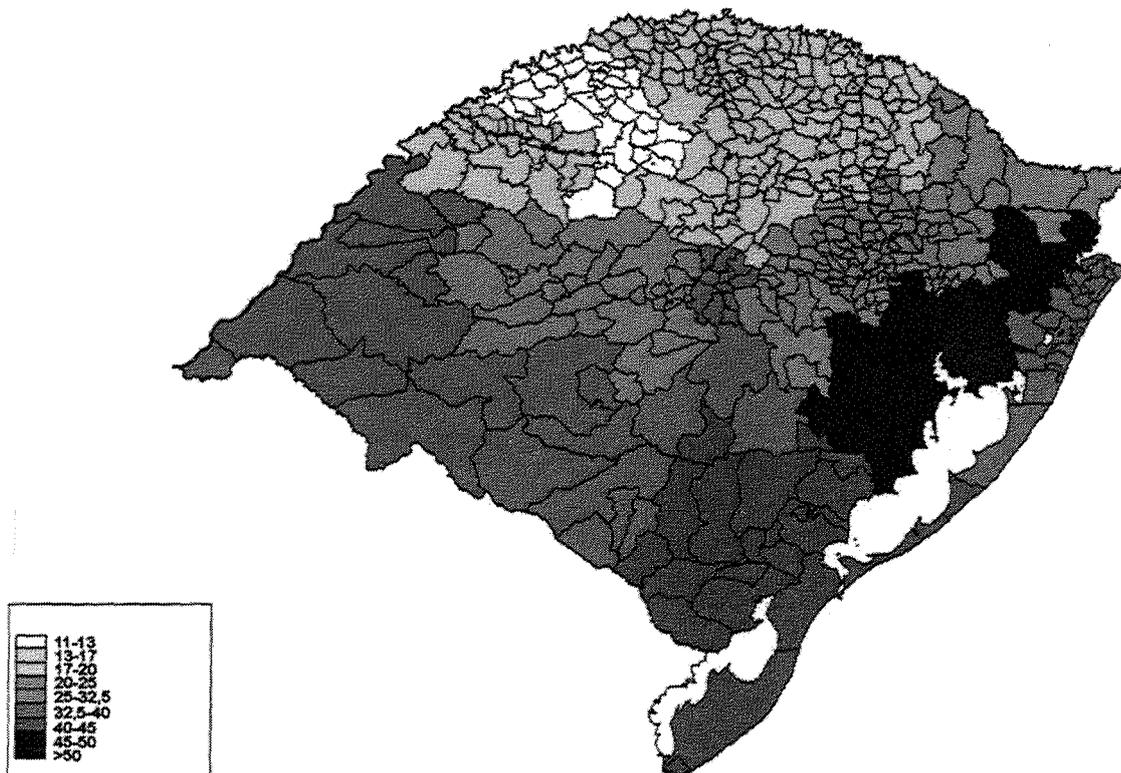


Figura 1: Mapa do Estado do Rio Grande do Sul indicando o número de casos por 100.000 habitantes do ano de 2000.

O número de casos de tuberculose registrados no RS está próximo de 5.500 ao ano. Desde 1980, o número máximo de casos registrados foi de 6.285 em 1980, e o menor foi 4.191 casos em 1991 (Figura 2). Na década de 80 pode-se observar um leve declínio da incidência anual da doença, não sendo este número significativo. De uma maneira geral, pode-se dizer que nos últimos 20 anos, a incidência de tuberculose no Estado tem-se mantido constante, independente da associação com a AIDS.

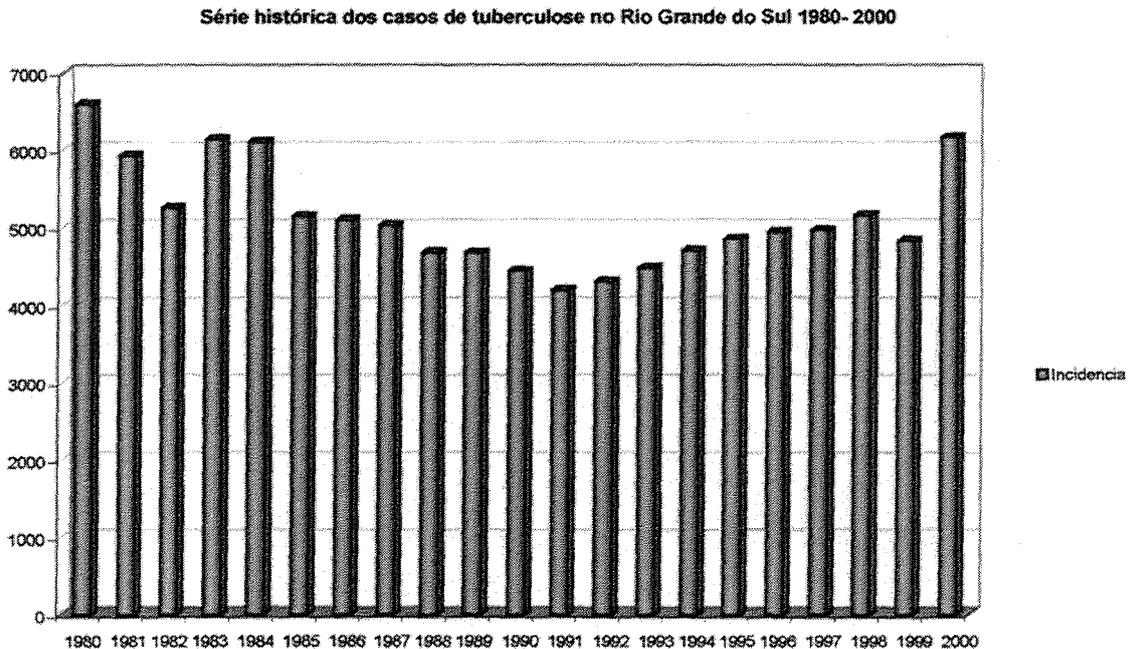


Figura 2: Casos de tuberculose, todas as formas, Rio Grande do Sul, 1980-2000. (Fonte: www.datasus.com.br, 20/11/ 2002).

1.10. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

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

A premissa básica inerente a qualquer sistema de tipagem é que isolados epidemiologicamente relacionados são derivados da expansão clonal de um precursor comum e, conseqüentemente, compartilham características que diferem dos isolados não

epidemiologicamente relacionados. A utilidade de uma característica particular para tipagem está relacionada à estabilidade da mesma dentro da cepa e esta diversidade dentro da espécie (Maslow *et al.*, 1993).

No passado, estudos epidemiológicos moleculares da TB estavam primariamente enfocados na análise da disseminação da doença em pequenas áreas, onde dados moleculares eram usados para confirmar a ligação epidemiológica ou para testar hipóteses (Small *et al.*, 1994; Alland *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1995; Frieden *et al.*, 1996). Atualmente, alguns centros de saúde pública têm feito análises moleculares combinado-as com dados da vigilância epidemiológica, tendo como objetivo principal o desenvolvimento de estratégias de saúde pública e protocolos de controle da TB que integrem informações moleculares e dados de vigilância na população em observação.

1.10.1. Aplicação das metodologias de genotipagem

Muitos estudos mostram que técnicas de tipificação molecular podem ser utilizadas como ferramentas epidemiológicas adicionais para um melhor entendimento dos fatores que influenciam a transmissão da TB, para avaliar os programas de controle regionais permitindo desenhos mais racionais de medidas de controle mais adequadas, monitorar surtos, discriminar reativação endógena de reinfecção exógena, rastrear clones de importância em saúde pública, avaliar contaminação cruzada em laboratórios, transmissão nosocomial além de identificar fatores de risco para a transmissão recente (Kruuner *et al.*, 2002; McNabb *et al.*, 2002; Kanduma *et al.*, 2003).

O valor do *fingerprinting* de DNA é demonstrado claramente durante investigações de surtos (Daley *et al.*, 1992; Jereb *et al.*, 1993). As técnicas de genotipagem ajudam a determinar se pacientes são realmente relacionados com o surto e assim focar a investigação epidemiológica, descartando os casos esporádicos (McNabb *et al.*, 2002). *

A genotipagem facilita a identificação e caracterização de cepas associadas com transmissão nosocomial em hospitais (Bifani *et al.*, 1996; Frieden *et al.*, 1996; Moss *et al.*, 1997; French *et al.*, 1998), fontes de infecção em bares e discotecas (van Embden *et al.*, 1993), surtos causados por cepas resistentes (Dahle *et al.*, 2003; Kubin *et al.*, 1999; Jereb *et al.*, 1995) e vários trabalhos demonstram a ocorrência de surtos de TB em abrigos para sem-teto (Dweyer *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1997). Nestes estudos, marcadores moleculares são usados para confirmar surtos e elucidar a história de aquisição seqüencial de resistência a múltiplas drogas (Bifani *et al.*, 1996). Além disso, a genotipagem ainda é muito importante para identificar o caso índice do surto. Para que as

técnicas moleculares sejam realmente efetivas, é necessário combinar dados da epidemiologia convencional com os dados obtidos pela epidemiologia molecular.*

Daley e colaboradores (1992) verificaram que havia um surto de TB em uma instituição para pacientes HIV positivos, mesmo antes de utilizar técnicas de biologia molecular. Após a genotipagem dos isolados, foi observado que todos os pacientes envolvidos no surto apresentaram padrões similares, enquanto aqueles não relacionados ao surto apresentaram padrões diferentes. Surtos ou microepidemias fornecem o cenário ideal para validação de uma técnica de genotipagem, que uma vez validada pode ser utilizada em outras investigações epidemiológicas (Foxman & Riley, 2001).

Os resultados da genotipagem podem ser utilizados para confirmar a ocorrência de contaminação cruzada no laboratório (Small *et al.* 1993; Carricajo *et al.* 1999; Filho *et al.*, 2002).

Aproximadamente entre 0,9% e 3,5% dos pacientes dos quais o *M. tuberculosis* é aparentemente isolado em laboratórios clínicos não têm tuberculose, as culturas positivas são devido à contaminação cruzada. A ocorrência de contaminação cruzada é mais propensa a ocorrer quando a baciloscopia é negativa e somente a cultura é positiva ou quando o *M.tuberculosis* é isolado a partir de uma amostra, mas os achados clínicos não sugerem a presença de tuberculose. Nestes casos a genotipagem do isolado do paciente e de outros isolados processados ao mesmo tempo no laboratório, podem esclarecer a ocorrência de contaminação cruzada prevenindo o tratamento desnecessário (McNabb *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Kanduma *et al.*, 2003). Jasmer e colaboradores (2002), realizaram um estudo para avaliar contaminação cruzada em três grandes laboratórios da Califórnia. Foram analisados 296 isolados, dentre eles foram identificadas 6 (2%) culturas positivas provenientes de contaminação cruzada. Se esta contaminação fosse identificada previamente, teria sido evitado o tratamento caro, desnecessário e potencialmente prejudicial ao qual 5 destes 6 pacientes foram submetidos.

Muitos estudos populacionais de larga escala são realizados para investigar a transmissão e disseminação de cepas particulares ou grupos específicos de importância em saúde pública em diferentes áreas geográficas.

O uso de múltiplas ferramentas moleculares em conjunto tem demonstrado a relação filogenética das cepas de diversas épocas e áreas geográficas que possuem marcadores genéticos similares ao das cepas MDR W. Elas são agrupadas a cepas da família W, tem um genótipo comum como descrito para clones como o Beijing, que são cepas predominantes na China e na Ásia (Torrea *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996; Bifani *et al.*, 2002). São também encontrados na Europa, África do Sul e Sul e Norte da América. A prevalência destas cepas nestas regiões é provavelmente resultante de uma grande

migração no século 20 e reativação da TB ao passar do tempo (Bifani *et al.*, 2002). Juntas, as famílias Beijing e W compartilham distintos marcadores cromossomais: pertencem ao grupo genético 1, isto é, eles tem uma cópia de IS na origem de replicação (inserção A1) e tem o mesmo padrão de Spoligotyping S00034 (Plikatys, 1994; Kurepina, 1998; Bifani *et al.*, 2002). Os mecanismos que levam ao sucesso da disseminação das cepas desta família, não são bem entendidos, entretanto, análises de virulência e patogenicidade destas cepas devem ser realizados em estudos futuros (Bifani *et al.*, 2002).

Outro estudo realizado na cidade de Nova York demonstrou que entre os casos de TB sensíveis aos fármacos usados no tratamento, 10% foram causados por um único clone de *M. tuberculosis* denominado “cepa C” (Friedman *et al.*, 1997). A cepa C foi isolada em pacientes HIV positivos e negativos, e causou mais de 400 casos de TB, permanecendo desconhecida como uma epidemia por mais de 3 anos. Esta cepa foi associada aos usuários de drogas. A prevenção da transmissão deste clone poderia ter levado um dramático efeito no controle da TB daquela cidade.

Vários estudos demonstram a utilidade das técnicas de tipificação molecular para avaliar programas de controle da tuberculose (Munsiff *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2002). Um dos indicadores de sucesso dos programas de controle da TB é o declínio da taxa de incidência no decorrer do tempo. Os casos de tuberculose incluem aqueles recentemente infectados que progridem rapidamente para doença ativa e aqueles com infecção remota que progridem depois de anos de latência para doença ativa, sendo os primeiros, responsáveis por um grande número de casos. Entretanto, o declínio na incidência de *clusters* pode indicar o impacto das intervenções para reduzir a transmissão recente (McNabb *et al.*, 2002). Kong e colaboradores (2002), demonstraram o papel da utilização da técnica de *fingerprinting* para medir a eficácia do teste tuberculínico entre pessoas desabrigadas. Eles demonstraram a redução do grau de *cluster* de 49% durante o período de 7 anos antes da implementação do programa para 14% em um período de 4 anos após a implementação do programa (realização de teste tuberculínico).

As investigações microbiológicas, clínicas, sociais e fatores demográficos associados com os casos relacionados epidemiologicamente são de grande importância para definir os fatores de risco que contribuem para os pacientes tomarem-se parte da cadeia de transmissão da TB. O uso de técnicas de *fingerprinting* ajudam a identificar fatores de risco para transmissão da TB dentro de certas comunidades. Estudos mostram que resistência aos fármacos, etnia, idade, status social, ser imigrante, uso de drogas dentre outros, são muitas vezes fatores de risco para a transmissão da tuberculose

(Small *et al.*, 1994; Gutierrez *et al.*, 1998; Fandinho *et al.*, 2000; Ferdinand *et al.*, 2003; Vukovic *et al.*, 2003; Blackwood *et al.*, 2003).

1.10.2. Seqüências de DNA polimórfico em *M. tuberculosis*

Elementos repetitivos e seqüências de inserção são freqüentemente usados como alvos genéticos para diferenciação entre cepas bacterianas. Diversos desses elementos têm sido caracterizados no complexo *M. tuberculosis* e alguns deles são considerados como elementos genéticos móveis (Dale, 1995).

As principais seqüências de DNA polimórfico de *M. tuberculosis* são: IS6110, IS1081, DR (*Direct Repeat*), VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) e PGRS (*Polymorphic GC-rich Repetitive Sequence*).

1.10.2.1. Seqüências de Inserção (ISs)

As seqüências de inserção (ISs) carregam única e exclusivamente informações necessárias para codificar transposases, que catalisam a inserção de uma nova cópia do elemento em um outro local do genoma (Hermans *et al.*, 1991; Regner & Loreto, 2003).

O elemento de inserção IS6110 pertence à família dos elementos de inserção IS3, inicialmente descrita em bactérias Gram-negativas (McAdam *et al.*, 1990). Esta seqüência possui 1.355 pb e apresenta repetições invertidas de 28 pb em ambas extremidades. O IS6110 foi encontrado primeiramente em *M. tuberculosis* (Thierry *et al.*, 1990) e a seguir encontrado em todo o complexo *M. tuberculosis*, mas não foi observado em outras espécies de micobactérias (Cave *et al.*, 1991; van Soolingen *et al.*, 1991). Apesar de já terem sido descritas cepas de *M. tuberculosis* que não continham nenhuma cópia do elemento, a grande maioria delas apresenta um número de cópias que pode variar entre 1 e 20 (van Soolingen *et al.*, 1993; Goguet de la Salmoniere *et al.*, 1997; Lok *et al.*, 2002), as quais estão localizadas em várias posições no genoma de isolados clínicos. O elemento de inserção 1081 possui 1.324 pb e pertence à família dos IS256 originalmente encontrado em *Staphylococcus aureus*. O IS1081 é também encontrado em todo o complexo *M. tuberculosis* e *M. xenopi* (Collins & Stephens, 1991). Normalmente, este elemento é encontrado em um número de cópias que pode variar de 5 a 7 e sua localização no genoma varia muito pouco nas cepas de *M. tuberculosis*, tornando difícil distinguir isolados utilizando esse elemento como marcador. Entretanto, é um bom marcador genético para diferenciação de *M. bovis* de *M. bovis* BCG. Este elemento está presente no genoma de *M. bovis* BCG em um fragmento característico

gerado pela clivagem do genoma com a endonuclease de restrição *PvuII*. Esta diferenciação pode ser útil frente à possibilidade de reativação em pacientes que foram vacinados por esta *cepa* atenuada devido à imunodepressão causada pela AIDS (van Embden *et al.*, 1993).

1.10.2.2. Seqüências curtas e repetitivas de DNA

Três tipos dessas seqüências repetitivas foram encontradas no genoma de espécies do gênero *Mycobacterium*. As seqüências de DNA denominadas PGRS são seqüências curtas repetitivas, presentes em múltiplos *loci* no cromossomo (26-30 cópias). Estas seqüências estão presentes em várias espécies de micobactérias além das pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, incluindo *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gastri* e *Mycobacterium szulgai* (Ross *et al.*, 1992; Dweyer *et al.*, 1993). Aparentemente o PGRS é uma seqüência que apresenta grande estabilidade genética, possivelmente apresentando um “relógio molecular” mais lento do que o IS6110 (Chaves *et al.*, 1996; Yeh *et al.*, 1998).

O segundo tipo de seqüências curtas repetitivas de DNA são as DRs, identificadas primeiramente em *M. bovis* BCG, que apresenta caracteristicamente 49 DRs (Hermans *et al.*, 1991). Esta seqüência possui 36 pb sendo intercalada por segmentos de DNA não repetitivo de 36 a 41 pb. O número de cópias de DRs para as espécies do complexo *M. tuberculosis* pode variar de 10 a 50. A função da região DR ainda não é conhecida. Observações indicam que muitas das DRs não são essenciais para *M. tuberculosis*.

Existem ainda dois tipos de VNTRs. As MPTRs (*Major Polymorphic Tandem Repeats*) são seqüências repetitivas de 10 pb separadas por seqüências únicas de 5 pb. Foram identificadas no complexo *M. tuberculosis* e em muitas outras micobactérias (Hermans *et al.*, 1992). Devido ao elevado número de cópias deste elemento, podendo atingir mais de 100 cópias em *M. tuberculosis*, não tem sido utilizado como único marcador para diferenciação de cepas (van Soolingen *et al.*, 1993). O segundo tipo de VNTR, denominado ETR (*Exact Tandem Repeats*), são grandes seqüências repetitivas em *tandem* que variam de 53 pb a 79 pb e foram identificadas no genoma da *cepa* de *M. tuberculosis* H37Rv (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998). Observou-se que o locus ETR-A a -E são variáveis e podem ser utilizados na diferenciação de cepas (Moström *et al.*, 2002). VNTRs são equivalentes a algumas MIRUs (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) descritas por Supply e colaboradores (1997). MIRUs freqüentemente ocorrem como repetições em *tandem*, sendo que estas repetições têm o

potencial de exibir polimorfismos podendo ser utilizadas como marcadores moleculares para técnicas de tipagem (Supply *et al.*, 1997).

Diversos estudos indicam que o IS6110, a seqüência DR e o PGRS são excelentes marcadores genéticos para a caracterização de cepas de *M. tuberculosis* (van Soolingen *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1996; Montoro *et al.*, 1998; Sola *et al.*, 1998; Githui *et al.*, 1999; Kremer *et al.*, 1999; Narayanan *et al.*, 2002).

1.10.3. Técnicas de tipificação molecular

A transmissão global da tuberculose pode ser estudada pelo uso de métodos moleculares padronizados, os quais podem ser utilizados para comparar cepas entre laboratórios, regiões, países e continentes. Com o advento das técnicas moleculares, os pesquisadores possuem novas e poderosas ferramentas que podem ser utilizadas para um melhor entendimento da transmissão e das propriedades filogenéticas do *M. tuberculosis* (Kanduma *et al.*, 2003).

Diversos critérios são considerados para avaliar um sistema de tipagem. São eles: a *capacidade de tipificação*, a qual refere-se à habilidade de obter um resultado positivo para cada isolado analisado; a *reprodutibilidade* a qual refere-se à habilidade da técnica produzir o mesmo resultado quando a mesma *cepa* é testada repetidamente; o *poder discriminatório*, habilidade de diferenciação entre cepas não relacionadas; a *facilidade de realização da técnica*, a qual reflete o custo de equipamentos e reagentes especializados, e complexidade técnica do método; *facilidade de interpretação dos resultados* critério este que se refere ao esforço e experiência necessários para obter informações úteis e confiáveis resultantes dos sistemas de tipificação (Tenover, 1997).

Atualmente, diversas técnicas moleculares estão sendo utilizadas na genotipagem de *M. tuberculosis*, e, quando avaliadas em relação aos termos supra citados, cada técnica apresenta características particulares, apresentando vantagens e desvantagens em cada quesito (Tabela 3). Dessa forma, é importante selecionar a(s) técnica(s) adequada(s) para cada questão epidemiológica a ser abordada para a obtenção de melhores resultados (Kremer *et al.*, 1999; Moström *et al.*, 2002).

Tabela 3: Características de alguns sistemas de tipificação utilizados para diferenciar cepas de *M. tuberculosis*.

Sistema de tipagem	Reprodutibilidade	Poder discriminatório	Facilidade de interpretação	Facilidade de realização
RFLP	Excelente	Moderado a Excelente	Moderado	Difícil
Spoligotyping	Excelente	Moderado	Moderado	Moderado
PFGE	Excelente	Moderado	Moderado	Moderado
MIRU-VNTR	Moderado	Moderado a Excelente	Moderado	Moderado
DRE-PCR	Baixa	Moderado	Moderado	Fácil

* modificado de Tenover, 1997

1.10.3.1. RFLP- IS6110

van Embden *et al.* (1993), padronizaram um protocolo da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) baseado na seqüência de inserção 6110. Esta metodologia consiste em extração do DNA cromossomal de *M. tuberculosis* para posterior digestão com enzima de restrição *PvuII* e hibridização por *Southern blotting* utilizando como sonda um fragmento de 245 pb, contendo parte do IS6110, situado à direita do sítio de clivagem da enzima (Figura 3).

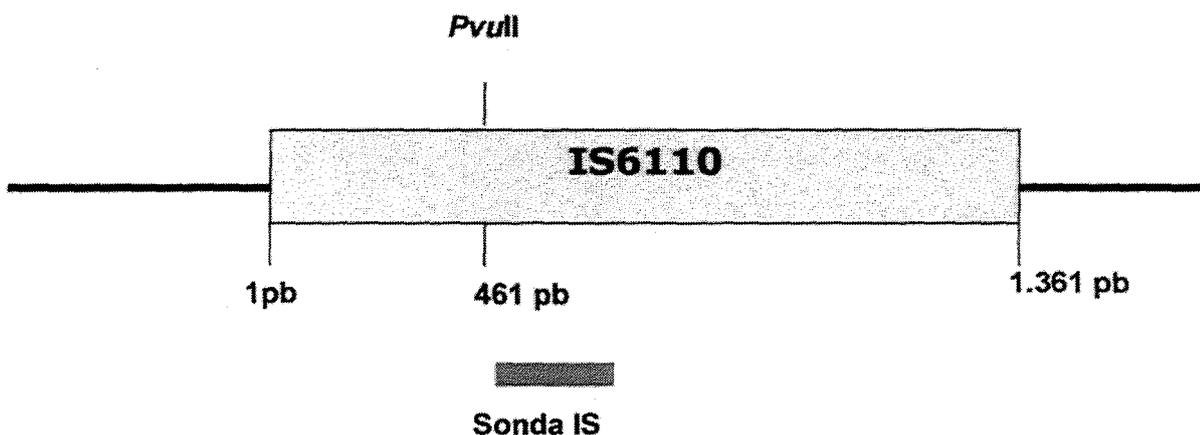


Figura 3: Mapa físico da seqüência de inserção 6110 de *M. tuberculosis*. Sonda IS de 245 pb, à direita do sítio de clivagem da enzima *PvuII*. As linhas à direita e à esquerda representam o DNA cromossomal (van Embden *et al.*, 1992).

A técnica de RFLP-IS6110 é considerada padrão para diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*. Os resultados obtidos por diversos laboratórios de diferentes regiões do mundo podem ser comparados, desde que o mesmo protocolo padrão seja utilizado (Suffys *et al.*, 1997; Heersma *et al.*, 1998). Atualmente, mais de 50.000 isolados mundiais de *M. tuberculosis* (dados publicados) já foram genotipados utilizando esta metodologia (Bifani *et al.*, 2002).

O IS6110 é encontrado no complexo *M. tuberculosis* em um número variável de cópias inseridas aleatoriamente no cromossomo, e o RFLP explora esta variabilidade em número e posição genômica deste elemento para gerar padrões específicos de cada cepa (van Embden *et al.*, 1993; van Soolingen *et al.*, 1994a).

O polimorfismo gerado pelo IS6110 ocorre devido à sua capacidade de transposição (Mendiola *et al.*, 1992). Entretanto, estudos demonstraram que este é um evento raro (Hermans *et al.*, 1991). De Boer e colaboradores (1999) analisaram a taxa de mudança dos padrões de RFLP-IS6110 de *M. tuberculosis* em isolados seriais de 544 pacientes e verificaram que a taxa de mudança encontrada suporta a utilização deste marcador molecular para estudos epidemiológicos da transmissão recente da tuberculose.

A discriminação de cepas de *M. tuberculosis* de acordo com o número de cópias e posição no cromossomo do elemento repetitivo IS6110 fornece possível caracterização do tempo de infecção dos novos pacientes de TB. Quando são encontrados indivíduos infectados com cepas que apresentam um mesmo padrão de RFLP, sugere-se que este grupo esteja epidemiologicamente relacionado, tendo ocorrido transmissão entre eles ou tendo sido infectados por uma fonte comum (Chevrel-Delagi *et al.*, 1993; van Soolingen *et al.*, 1993; Tenover *et al.*, 1997; Foxman & Riley, 2001; Kanduma *et al.*, 2003).

Em estudos realizados com cepas de *M. tuberculosis* resistentes, não se observa a mudança no perfil de RFLP-IS6110 (Otal *et al.*, 1991; Strassle *et al.*, 1997; de Boer *et al.*, 1999). Através da análise de diversos isolados de um mesmo paciente foi demonstrado que os padrões de RFLP observados permanecem os mesmos por um período de mais de um ano, apesar de seu perfil de resistência ter se alterado (Niemann *et al.*, 1997).

Uma das limitações para a utilização da técnica de RFLP, é que em isolados com 6 ou menos cópias do IS6110, as cepas podem apresentar o mesmo perfil de RFLP mesmo não estando epidemiologicamente relacionadas (van Soolingen *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1996; Goulding *et al.*, 2000; Maguirre *et al.*, 2002). Isto ocorre devido a existência de pontos preferenciais de integração do IS6110 no genoma de *M. tuberculosis*, sendo

um desses pontos na região DR, na posição da DR 30 (Fomukong *et al.*, 1998; Filiol *et al.*, 2000). Também foram identificadas cepas que não possuem nenhuma cópia de IS6110 em algumas regiões geográficas, principalmente na Ásia, tornando estas cepas não tipáveis pelo RFLP-IS6110 (Narayanan *et al.*, 2002). Dessa forma, é necessária a utilização de outros marcadores moleculares para diferenciação destas cepas (Yang *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000; Kwara *et al.*, 2003).

Outra limitação desta metodologia é a grande demanda técnica e de tempo para sua realização. A realização da mesma leva em torno de 4 a 5 semanas pois existe a necessidade de uma grande quantidade de DNA extraído de cultura, de ótima qualidade, para posterior digestão.

Apesar de todas as limitações desta metodologia, dados referentes aos padrões de RFLP encontrados em todo o mundo estão disponíveis em bancos mundiais de padrões onde regularmente são inseridos novos perfis de RFLP encontrados. Estes bancos são muito úteis para realização de estudos comparativos para avaliar a disseminação global de cepas de *M. tuberculosis* (Suffys *et al.*, 2000; Calusni *et al.*, 2003).

1.10.3.2. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Esta técnica consiste em clivar o DNA cromossomal da bactéria com uma enzima que contém poucos sítios de reconhecimento gerando aproximadamente de 10 a 30 fragmentos os quais variam de 10 a 800 kb (Tenover *et al.*, 1997). O DNA bacteriano clivado é colocado em gel de agarose o qual é submetido a uma eletroforese de campo pulsado. O gel de agarose é colocado em uma cuba eletroforética a qual possui três grupos de eletrodos que formam um hexágono ao redor do gel. A corrente elétrica é aplicada em direção a um grupo de eletrodos de cada vez, por curtos espaços de tempo (pulsos) (Tenover *et al.*, 1997; Olive & Bean, 1999).

Em geral, PFGE é uma das técnicas de tipagem mais reprodutíveis e com mais alto poder discriminatório dentre as técnicas disponíveis. As maiores dificuldades da realização do PFGE são a demanda técnica do procedimento, o alto custo inicial do equipamento e o tempo de realização da técnica. PFGE é uma técnica amplamente utilizada para genotipar microrganismos envolvidos em surtos e também para estudos populacionais, além de estar disponível em muitos laboratórios clínicos (Singh, *et al.*, 1999). Entretanto, PFGE não é comumente utilizado para investigações epidemiológicas

de *M. tuberculosis*, pois, para este microrganismo, tem um baixo poder discriminatório (Kanduma *et al.*, 2003).

1.10.3.3. Técnicas baseadas na PCR

Técnicas mais rápidas de tipagem têm sido desenvolvidas, a maioria delas depende de métodos de amplificação baseados na PCR. Métodos baseados na PCR têm a vantagem de poder utilizar amostras clínicas, aumentando assim a velocidade de identificação do microrganismo (Kanduma *et al.*, 2003). Alguns destes métodos, entretanto, tem baixa reprodutibilidade ou tem um menor poder discriminatório que o RFLP-IS6110 (Kremer *et al.*, 1999). Algumas metodologias que utilizam a PCR são o *mixed-linker* PCR, o IS6110 *ampliprinting*, VNTR-PCR, VNTR-MIRU, o *double-repetitive-element* PCR (DRE-PCR), dentre outras.

1.10.3.3.1. Spoligotyping

O *spacer oligotyping* (*Spoligotyping*) é uma técnica baseada no polimorfismo existente na região DR. Através da utilização de *primers* que tem como alvo a seqüência DR na reação de PCR, os espaçadores entre as DRs são amplificados. Os produtos da PCR são hibridizados com uma membrana que contém 43 oligonucleotídios fixados, correspondentes a 43 distintos espaçadores. Os resultados podem ser apresentados como um código binário, positivo quando determinado espaçador está presente e negativo quando está ausente (Moström *et al.*, 2002).

Esta metodologia é rápida, de simples realização e produz padrões de fácil análise através de programas de computador (Goyal *et al.*, 1997; Kanduma *et al.*, 2003). O *spoligotyping* apresenta um poder discriminatório menor do que o RFLP-IS6110, especialmente quando cepas com alto número de cópias de IS6110 estão sendo analisadas. Quando utilizado como única técnica de genotipagem, tende a superestimar o número de isolados em *clusters* (Kamerbeek *et al.*, 1997; Goguet De La Salmoniere *et al.*, 1997; Sola *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1999, Kanduma *et al.*, 2003). A técnica de *spoligotyping*, quando utilizada para diferenciar cepas com 6 ou menos cópias do IS6110 apresenta uma melhor eficiência que a metodologia padrão (Goyal *et al.*, 1997, Bonora *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 1999; Soini *et al.*, 2001; Kanduma *et al.*, 2003; Kwara *et al.*, 2003). Por este motivo, o *spoligotyping* é a técnica preferencial para tipagem de cepas de *M. bovis*, as quais usualmente contêm uma ou duas cópias de IS6110.

A reprodutibilidade é uma das mais altas entre as técnicas rápidas, baseadas na PCR, característica que permite a realização de estudos com grande número de amostras (Kremer *et al.*, 1999). Além de ser um método simples e rápido, é capaz de detectar e tipificar isolados do complexo *M. tuberculosis* simultaneamente com quantidades muito pequenas de DNA, as quais podem ser provenientes de amostras clínicas (Kamerbeek *et al.*, 1997).

A alta reprodutibilidade da técnica e a viabilidade de compilação dos dados referentes aos padrões encontrados possibilitam a organização de um banco de dados de *spoligotipos* de todo o mundo onde regularmente são inseridos novos padrões encontrados ou realizadas comparações entre os padrões existentes, permitindo a realização de estudos para avaliar a distribuição biogeográfica dos *spoligotipos* mais freqüentes (Sola *et al.*, 2001; Filiol *et al.*, 2002).

1.10.3.3.2. Outras técnicas baseadas na PCR

A técnica de VNTR é uma ferramenta para genotipagem, a qual fornece dados em um formato simples baseado no número de seqüências repetitivas, também chamadas regiões polimórficas microsátélites ou minisátélites. Frothingham & Meeker-O'Connell (1998) identificaram 5 loci em *M. tuberculosis*, os quais estão sendo testados recentemente para fins epidemiológicos. No VNTR-PCR, para revelar o número de repetições em *tandem* em uma única *cepa*, é realizada a PCR com *primers* designados para amplificar os *loci* com repetições em *tandem* selecionadas (Kremer *et al.*, 1999; Moström *et al.*, 2002).

O poder discriminatório desta técnica pode ser substancialmente melhorado desde que sejam analisados um maior número de loci. Supply e colaboradores (2000) identificaram 41 loci no genoma de *M. tuberculosis*, os quais foram denominados MIRUs. Recente avaliação do genoma do *M. tuberculosis* revelou que 12 dos 41 loci que estão presentes no genoma da *cepa* de *M. tuberculosis* H37RV são mais indicados para genotipagem, pois são capazes de conferir um maior poder discriminatório que os demais loci. MIRU-VNTR tem poder discriminatório similar ao RFLP-IS6110 para cepas de alto número de cópias de IS6110 e melhor para cepas de baixo número de cópias (Lee *et al.*, 2002). Este método é reprodutível, sensível e específico para isolados do complexo *M. tuberculosis*.

É um método altamente adequado para vigilância epidemiológica da tuberculose e pode ser usado também para análises de diversidade genética de cepas do complexo *M.*

tuberculosis em diferentes níveis de divergência evolucionária (Supply *et al.*, 2001; Kanduma *et al.*, 2003).

Hawkey e colaboradores (2003) realizaram estudo demonstrando que a combinação da tipagem por VNTR-PCR e MIRU-VNTR é tão válida quanto tipagem por RFLP-IS6110 em investigação de suspeitas de surtos por *M. tuberculosis*.

O *Double-Repetitive-Element* PCR (DRE-PCR) foi proposto por Friedman *et al.*, (1995a), como uma técnica mais simples e rápida de subtipificação de cepas de *M. tuberculosis*. Em estudos comparativos entre diversas metodologias, tem-se observado que o DRE-PCR pode ter um poder discriminatório até mesmo maior que do *spoligotyping*, porém sua reprodutibilidade é muito baixa (Wilson *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1999; Cafrune, 2000). Por outro lado, é possível obter bons resultados quando um número pequeno de isolados é analisado, preferencialmente em uma mesma reação e mesma corrida eletroforética, não sendo indicadas para estudos populacionais (Moström *et al.*, 2002; Viedma *et al.*, 2002).

1.11. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE NO BRASIL

Alguns grupos de pesquisa no Brasil têm desenvolvido estudos sobre a epidemiologia molecular da tuberculose. Estes estudos estão sendo realizados utilizando a técnica de RFLP, muitas vezes associada a um segundo marcador molecular para suprir as limitações desta metodologia.

Fingerprints de isolados brasileiros, como na maior parte do mundo, caracteristicamente apresentam entre 5 e 15 cópias do IS6110 e são altamente polimórficas (Suffys *et al.*, 1997).

De acordo com os dados observados em uma breve revisão dos estudos brasileiros de epidemiologia molecular da tuberculose, podemos observar que estes estudos estão sendo realizados com diversos objetivos, dentre eles a identificação de fatores de risco, identificação de transmissão nosocomial, diferenciação entre reativação e reinfeção, dentre outros. Verificamos também que praticamente 100% destes estudos estão sendo realizados no Rio Grande do Sul (RS), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ). O padrão de cepas encontradas em outras regiões do país até o momento é pouco conhecido ou completamente desconhecido.

Na Tabela 4 podemos observar a descrição de estudos de epidemiologia molecular da tuberculose realizados no Brasil.

Tabela 4: Descrição de estudos de epidemiologia molecular desenvolvidos no Brasil.

Descrição do estudo	Origem dos isolados	Referência
19 isolados de 15 pacientes HIV-positivos de um hospital do RJ foram analisados pela técnica de RFLP e comparados com os resultados de RFLP de 38 isolados de pacientes HIV-negativos. Neste estudo observou-se que existe um alto risco de transmissão recente entre os pacientes HIV-positivos.	RJ	Ivens-de-Araújo <i>et al.</i> , 1998
91 isolados foram caracterizados por RFLP e <i>spoligotyping</i> com o objetivo de esclarecer uma possível contaminação cruzada laboratorial. Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes envolvidos foram analisados. Os resultados deste trabalho sugerem que o <i>spoligotyping</i> pode ser utilizado como um método de <i>screening</i> inicial para rapidamente identificar potenciais episódios de contaminação cruzada.	Campinas, SP	Ramos <i>et al.</i> , 1999
293 isolados provenientes de dois centros de saúde ambulatoriais, sendo um deles centro de referência em AIDS foram analisados. Dados clínicos e epidemiológicos de isolados de pacientes HIV-positivos e negativos foram comparados. Ser HIV-positivo, e estar infectado com cepa MDR foram identificados como fator de risco para transmissão recente.	SP	Ferrazoli <i>et al.</i> , 2000
120 isolados de pacientes atendidos em dois hospitais do RJ foram caracterizados por RFLP. Dados clínicos e epidemiológicos foram comparados com o objetivo de identificar fatores de risco. Infecção por cepas MDR foi encontrado como fator de risco para transmissão recente.	RJ	Fandinho <i>et al.</i> , 2000
219 isolados, sendo 115 RJ, 78 do RS e os demais 26 de 7 diferentes estados foram analisados por RFLP. Foram comparadas características dos padrões de RFLP das cepas obtidas no estudo com o padrão presente em base de dados internacional. 15% dos padrões das cepas brasileiras foram idênticos a padrões encontrados em cepas de outros países.	RJ, RS	Suffys <i>et al.</i> , 2000
32 isolados foram analisados pela técnica de DRE-PCR para determinar a variabilidade genotípica de <i>M. tuberculosis</i> em múltiplos isolados de um mesmo paciente e para diferenciar casos de reativação e reinfeção exógena em pacientes HIV-positivos.	RJ	Lourenço <i>et al.</i> , 2000
100 isolados, obtidos de 3 diferentes regiões do país, foram analisados pela técnica de RFLP para avaliar a presença de clones em isolados resistentes e sensíveis a rifampicina e a associação com tipo de mutação no gene <i>rpoB</i> . Os autores não encontraram associação entre os clones e o tipo de mutação.	RS, SP e RJ	Valim <i>et al.</i> , 2000
57 isolados de pacientes provenientes de um hospital e dois centros de saúde de Bauru (SP) foram analisados pelas técnicas de RFLP e DRE-PCR para identificar fatores de risco e verificar possível transmissão nosocomial de TB no hospital. Não foram encontrados fatores de risco para transmissão recente nesta população.	Bauru, SP	Baptista <i>et al.</i> , 2002
Este estudo foi realizado para avaliar uma suspeita de contaminação cruzada laboratorial utilizando as técnicas de DRE-PCR e RFLP. O DRE-PCR demonstrou que os 9 isolados tipados pertenciam a um <i>cluster</i> , o qual foi confirmado por RFLP, indicando que ocorreu contaminação cruzada.	RJ	Filho <i>et al.</i> , 2002
101 isolados provenientes dos centros de saúde de Recife foram analisados pela técnica de DRE-PCR, sendo o objetivo do estudo avaliar a distribuição e a frequência de cepas isoladas em Recife. Foram encontrados 12 <i>clusters</i> com 2 a 5 cepas cada.	PE	Queiroz <i>et al.</i> , 2003

78 isolados provenientes de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas de Campinas foram analisados por RFLP e comparados com uma base de dados internacional de cepas de *M. tuberculosis*. Os resultados mostraram que 6 padrões encontrados no Brasil já faziam parte da coleção de cepas da Houston Tuberculosis Initiative.

Campinas,
SP

Calusni *et al.*,
2003

195 isolados foram analisados por RFLP, *spoligotyping* e DRE-PCR com o objetivo de identificar fatores de risco para transmissão recente e identificar características de distribuição de *clusters* entre as regiões do estado com diferentes incidências. Foi observado que há uma tendência maior dos pacientes negros desenvolverem TB devido a transmissão recente e que a transmissão recente não é o único fator responsável pela manutenção da incidência da TB no RS.

RS

Cafrune, 2003

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Sabendo-se da necessidade de um maior conhecimento sobre a transmissão da tuberculose na região metropolitana de Porto Alegre, este trabalho teve como objetivo geral ampliar conhecimentos sobre a epidemiologia da tuberculose utilizando técnicas de biologia molecular associadas aos dados gerados a partir da epidemiologia convencional.

2.2. Objetivos específicos

- Organizar um banco de isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes atendidos na rede de saúde pública da RM de Porto Alegre durante os anos de 1999 e 2000.
- Fazer uma análise do perfil de susceptibilidade aos fármacos utilizados no tratamento da TB dos isolados incluídos no estudo.
- Analisar os isolados de *M. tuberculosis* pela técnica de RFLP.
- Fazer análise *in silico* dos resultados obtidos por RFLP através do software GelCompar.
- Fazer busca ativa de prontuários nas respectivas unidades de saúde para obtenção de dados clínicos e epidemiológicos de cada paciente incluído no estudo.
- Construir um banco de dados em EpiInfo 6.04 para armazenar e analisar as informações clínicas de cada paciente.
- Identificar fatores de risco para transmissão recente de tuberculose na RM de Porto Alegre.
- Identificar possíveis relações epidemiológicas entre os pacientes em *cluster*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAGEM

Foi utilizada uma amostragem de conveniência, retrospectiva, proveniente da rotina do Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN/RS) recebida de 1º janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2000. O LACEN recebe amostras clínicas de pacientes atendidos nas unidades de saúde do interior do Estado, Hospital Sanatório Partenon (HSP), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Centros de Saúde da RM de Porto Alegre, entre outros para que sejam realizados o cultivo do microrganismo além da determinação da susceptibilidade aos fármacos e identificação de espécie. A Tabela 5 mostra o número e isolados de *M. tuberculosis* analisados de cada unidade de saúde e Hospitais da Região Metropolitana de Porto Alegre.

Tabela 5: Número de isolados analisados por unidade de saúde.

Unidades de Saúde	Nº de isolados analisados
Centro de Saúde Navegantes (CS1)	58
Centro de Saúde Modelo (CS2)	14
Centro de Saúde Vila dos Comerciantes (PAM3)	12
Unidade Sanitária Restinga Velha	05
Hospital Sanatório Partenon (HSP)	71
Outros unidades*	08
Santa Casa	03
Total	171

*Hospital Getúlio Vargas, Hospital Mãe de Deus, Hospital Presidente Vargas (HPV), Unidades Sanitárias (US) de: Guaíba, Portão, Vicente Dutra e Alvorada.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO E DAS UNIDADES DE SAÚDE

A RM de Porto Alegre é composta por 24 municípios sendo a população desta região em torno de 3.330.000 habitantes de acordo com dados do censo 2000. O mapa a seguir apresenta as principais cidades da RM onde residiam a maioria dos pacientes incluídos no estudo (Figura 4). Foram obtidos dados referentes a moradia de 115

chegam nestas unidades são atendidos, porém estes podem ser transferidos para outras unidades de saúde, caso facilite o acesso para os pacientes.

O Hospital Sanatório Partenon (HSP) é uma instituição especializada no tratamento de pacientes com tuberculose, os quais não respondem corretamente ao tratamento. Atende pacientes provenientes de todo o Estado. Este hospital também conta com equipes multidisciplinares, incluindo um grupo de pesquisa que trabalha dentro do hospital, para um melhor atendimento à população.

3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo todos os isolados clínicos que:

- Foram encaminhados ao LACEN/RS para realização de cultura e teste de susceptibilidade aos fármacos durante os anos de 1999 e 2000; tendo sido isolados de pacientes residentes na RM de Porto Alegre;
- Foram identificados como *M. tuberculosis* após realização dos testes bioquímicos de identificação;
- Apresentavam resultado de teste de susceptibilidade realizado no período do estudo;
- Apresentaram viabilidade suficiente para a realização das técnicas de biologia molecular em meio de cultura sólido após o período de manutenção em meio líquido a -20°C.

3.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo todos os isolados que não se encaixaram nos critérios de inclusão.

3.5. CULTURA DO MICROORGANISMO

As amostras clínicas foram descontaminadas com NaOH 4%, semeadas em meio de cultura Ogawa, colocadas em estufa a 37° C, onde cresceram por um período de 4 a 8

semanas (Kudoh & Kudoh, 1974). Foram realizados os seguintes testes bioquímicos para diferenciação de espécies: teste da niacina, redução de nitrato, crescimento em presença de PNB (ácido paranitrobenzóico, 500 µg/mL) e TCH (hidrazida do ácido tiofeno- 2 carboxílico, 2µg/mL) (Brasil, 1994). Somente as amostras identificadas como *M. tuberculosis* foram incluídas neste estudo.

3.6. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE

O teste de susceptibilidade aos fármacos foi realizado em meio Löwestein-Jensen (LJ), segundo o método das proporções descrito por Canetti *et al.*, (1963). Para este teste foram utilizados os seguintes fármacos: RMP (40µg/mL), INH (0,2µg/ml), SM (4µg/mL), EMB (2µg/mL), PZA (100µg/mL) e ETH (20µg/mL).

3.7. BANCO DE ISOLADOS DE *M. tuberculosis*

Após o cultivo primário em meio sólido, identificação de espécie e realização do teste de susceptibilidade, os microrganismos foram semeados em meio líquido Sauton (Brasil, 1994), onde se multiplicaram por um período de 30 a 60 dias a temperatura de 37°C. Quando as culturas apresentavam crescimento visível, as bactérias eram transferidas para microtubos, os quais foram estocados a -20°C por períodos que variaram 3 a 36 meses.

3.8. EXTRAÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL

A extração do DNA dos isolados de *M. tuberculosis* foi realizada conforme protocolo elaborado por van Soolingen *et al.* (1994b). Algumas colônias de *M. tuberculosis* foram suspensas em 500µL de TE 1X (tris -EDTA, pH 8,0) e inativadas por 20 min em banho-maria a 80° C. A quebra da parede celular foi realizada com 50µL de lisozima (10mg/mL). A seguir o tubo foi incubado a 37°C por pelo menos 1 hora. Após esta etapa, foi adicionado ao tubo uma mistura de 70µL de SDS (10%) e 5µL de Proteinase K (10mg/mL), seguido de incubação a 65°C por 10 min. Foram adicionados 100µL de NaCl 5M e 100µL de uma mistura CTAB /NaCl ao tubo para a complexação de proteínas e lipídeos. Um volume de 750µL de clorofórmio/álcool-isoamílico (24:1) foi adicionado e após foi realizada centrifugação de 15 min a 12000 rpm onde ocorreu a separação de fases. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde o DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol seguido de resfriamento a -20° C por 30 min e centrifugação por 15 min a 12000 rpm. O DNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70% e secado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 40µL de TE 1X. Os DNAs extraídos foram visualizados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, sob iluminação ultravioleta e estocados em freezer -20° C. Após foram utilizados para a realização da técnica de RFLP.

3.9. TÉCNICA DE RFLP

A técnica de RFLP foi realizada conforme protocolo elaborado por van Soolingen *et al.* (1994b) e está descrita nas etapas a seguir:

3.9.1. Clivagem

O DNA extraído de *M. tuberculosis* foi quantificado no espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia Biotech) através da medida de absorbância a 260 nm. Aproximadamente 4,5µg de DNA foram clivados com 10 unidades da endonuclease de restrição *PvuII*, em banho-maria a 37° C por uma hora.

Cerca de 20% do volume de cada amostra de DNA clivada foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (EtBr), e visualizado sob iluminação ultravioleta (UV) para análise da viabilidade.

3.9.2. Eletroforese em Gel de Agarose

As amostras de DNA clivadas foram aplicadas em um gel de agarose 0,8%, medindo 20X25 cm, e submetidas a uma corrente inicial de 100 V (10 min), seguido de uma corrente de 25V durante um período de 16 a 18 horas para a separação dos fragmentos de DNA. O DNA de λ (lambda) clivado com a enzima *Hind*III foi utilizado para monitorar a distância dos fragmentos desde o ponto de aplicação, visando uma padronização entre os diferentes géis.

3.9.3. Southern Blotting

Os fragmentos de DNA, contidos no gel de agarose, foram transferidos para uma membrana de náilon (HybondTMN+, Amersham, Life Science, Inglaterra), pelo sistema de transferência a vácuo VacuGeneTMXL (Pharmacia Biotech), conforme as instruções do fabricante. O sistema foi estabilizado em uma pressão de 50 mBar, enquanto o gel sofria despurinação com HCl 0,25M, por 7 min. Depois foi desnaturado com NaCl 1,5M e NaOH 0,5M, por 15 min e neutralizado com Tris 1,0M e NaCl 1,5M (pH 7,5), por mais 15 min. A transferência foi realizada com SSC 20X (NaCl 3M, Na-citrato 0,3M - pH 7,0), durante 40 min. Após a transferência os fragmentos de DNA foram fixados à membrana em forno a 80° C durante 2 horas.

3.9.4. Hibridização e Detecção

A membrana contendo os fragmentos de DNA foi hibridizada com 600 ng sonda específica em forno giratório (Hybaid Instruments, Holbrook, NY) a 42° C por um período de 16-18 horas.

A sonda foi obtida pela amplificação pela PCR de um fragmento de 245 pb, situado à direita do sítio de clivagem da enzima *PvuII*, presente no IS6110, utilizando os seguintes *primers*:

INS-1	5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC	Hermans <i>et al.</i> , 1990
INS-2	5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA	Hermans <i>et al.</i> , 1990

A amplificação do DNA pela PCR foi realizada em um termociclador (Mini Cycler - MJ Research) sob as seguintes condições: 30 ciclos de 2 min a 94° C, 2 min a 68° C, e 2 min a 72° C.

O fragmento amplificado foi purificado com colunas MicroSpin™ S-300 (Pharmacia Biotech) e marcado enzimaticamente utilizando-se o kit ECL™ (Amersham).

O sistema envolve a marcação direta da sonda de DNA com a enzima peroxidase de raiz-forte (HRP-*Horseradish Peroxidase*). A sonda é desnaturada completamente de forma que o DNA fique simples fita e, portanto, carregado negativamente. A HRP, que foi complexada com um polímero carregado positivamente, é adicionada e forma uma fraca ligação com o DNA por atração de cargas. A adição do glutaraldeído causa a formação de ligações químicas de forma que a sonda é covalentemente marcada com a enzima. Uma vez marcada, a sonda é utilizada na hibridização com o DNA-alvo imobilizado na membrana.

A detecção foi realizada pela sensibilização de um filme autoradiográfico através de uma reação de quimioluminescência. A HRP catalisa a oxidação do substrato luminol, o qual, na presença de um estimulador (*enhancer*) químico, resulta em uma grande emissão de luz, que é prontamente detectada em um filme autoradiográfico.

3.10. ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.10.1. RFLP

Os resultados obtidos por RFLP foram analisados visualmente e pelo software GelCompar, versão 4.2 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Este programa fornece uma análise dos *clusters* utilizando o método *unweighted pair groups* através das médias aritméticas (UPGMA) baseado no coeficiente de Dice para o pareamento, com uma tolerância de posição selecionada de 1,5% e a otimização de 1,0%.

Para análise dos resultados foram seguidas as recomendações de Tenover *et al.* (1997) e Heersma *et al.* (1998). Dois ou mais isolados foram considerados pertencentes a um *cluster* quando seus padrões de RFLP eram indistinguíveis, isto é, apresentaram o mesmo número e posição de fragmentos. Aqueles isolados ou *clusters* que apresentaram diferenças de um até três fragmentos foram considerados membros de uma mesma família. Os isolados que tiveram padrões de RFLP totalmente distintos dos demais isolados foram considerados não *cluster*.

3.10.2. Análise dos dados clínicos e epidemiológicos

Para realização deste estudo, os dados clínico-demográficos foram obtidos através dos questionários epidemiológicos fornecidos ao LACEN/RS, da análise dos prontuários médicos e do banco de dados digitalizado do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) disponibilizado pelo Programa Estadual de Controle da Tuberculose. Estas informações foram analisadas pelo programa EpiInfo 6.04 (Center for Disease Control & Prevention, Atlanta, GA, EUA). A associação de significância foi avaliada pelo teste do YATES-corrected, X^2 , ou teste de Fischer two-tail. Um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) foi utilizado. As estatísticas descritivas e comparações univariadas foram realizadas.

Dados como: idade, gênero, etnia, profissão, escolaridade, estado civil, informações laboratoriais (perfil de susceptibilidade, data de semeadura, resultados de baciloscopia) e possíveis fatores de risco como HIV, uso de drogas, etilismo foram analisados.

4. RESULTADOS

4.1. DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DAS METODOLOGIAS CONVENCIONAIS

No ano de 1999 foram notificados 4.815 casos de TB no Estado do RS e em 2000 foram notificados 6.152 casos novos, perfazendo um total de 10.967 casos de TB no período do estudo (Tabela 6).

No mesmo período foram realizadas no LACEN/RS 1.994 culturas para a identificação micobacteriana. Em 1999 foram cultivados 913 isolados e no ano seguinte 1.081. Destas culturas foram identificadas 820 *M. tuberculosis* de aproximadamente 400 pacientes e 23 micobactérias atípicas. Duzentos e dezoito isolados eram provenientes de postos e hospitais da RM de Porto Alegre os quais foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos fármacos. Os isolados foram armazenados em freezer -20°C por períodos que variaram de 3 meses a 3 anos. Destes 218 isolados, 171 permaneceram viáveis para realização do RFLP, representando 78,4% dos isolados com TS no período do estudo.

Além dos resultados de cultura, os resultados de baciloscopia também foram analisados para o grupo de pacientes que tiveram isolados viáveis para realização de RFLP. Dos pacientes que tiveram baciloscopia positiva no início do tratamento (78,2%; n=134), 37,3% (n=50) apresentavam mais de 10 bacilos por campo em 20 campos observados (caracterizados como +++). Dezenove pacientes (11,2%) apresentaram resultado negativo. Para os demais isolados o resultado da baciloscopia era desconhecido (n=18).

Tabela 6: Número de casos de TB no RS e dados sobre cultura.

Ano	Nº de casos de TB notificados pelo SINAN	Nº de culturas realizadas no LACEN (%)	Nº de culturas positivas (%)*	Nº de isolados com teste de susceptibilidade (%)**
1999	4815	913 (19)	337(36,9)	159(47,2)
2000	6152	1081 (17,6)	483(44,6)	128(26,5)

*Percentuais calculados sobre o número total de culturas realizadas no LACEN.

**Percentuais calculados sobre o número total de culturas positivas

4.2. DADOS DOS TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE

Dentre as culturas do período do estudo, o TS foi realizado em 171 isolados de *M. tuberculosis*. Sessenta e dois isolados (36,2%) eram susceptíveis a todos os seis fármacos testados e os demais 109 (63,8%) apresentavam diferentes perfis de resistência. Sessenta e quatro isolados (58,7% dos resistentes) eram resistentes a uma ou mais drogas, mas não eram classificados como MDR. O percentual de isolados MDR, isto é, resistente pelo menos a INH e RMP, foi de 41,3% (45 isolados). Dentre os pacientes com isolados resistentes, 6 pacientes (3,5%) apresentavam resistência primária, dos quais 3 (50%) eram MDR, sendo um destes isolado de um paciente HIV positivo.

Dos 109 isolados resistentes, 49 (44,9%) eram provenientes de pacientes atendidos no HSP e os demais 60 pacientes (55,1%) eram provenientes dos Centros de Saúde da RM de Porto Alegre. Não foi observada diferença significativa entre os níveis de resistência dos pacientes atendidos em hospital em comparação com os pacientes atendidos em unidades ambulatoriais ($p=0,29$). A média de idade entre os pacientes com isolados resistentes foi de 41 anos, variando de 17 a 70 anos. Entre os sensíveis, a média de idade dos pacientes também foi de 41 anos, mas variou de 17 a 62 anos. A falência terapêutica e a realização de tratamento prévio foram significativamente associadas com um nível maior de resistência ($p<0,05$). Surpreendentemente, o abandono do tratamento não foi associado com resistência ($p=0,72$). Isto pode ter ocorrido devido ao grande número de isolados com esta informação desconhecida (21,1%). Também foi observado que pacientes soropositivos e alcoolistas estão mais propensos à infecção por cepas resistentes, porém este dado não foi significativo.

A Tabela 7 apresenta os dados do TS dos 109 isolados que apresentaram diferentes perfis de resistência.

Tabela 7: Número de isolados resistentes estudados no período.

Fármaco	Nº de isolados	Percentual
INH		
Resistente	103	60,2
Sensível	68	39,8
RMP		
Resistente	49	28,7
Sensível	122	71,3
EMB		
Resistente	6	3,5
Sensível	165	96,5
SM		
Resistente	17	10
Sensível	150	87,7
Desconhecido	4	2,3
PZA		
Resistente	8	4,7
Sensível	142	83
Desconhecido	21	12,3
ETH		
Resistente	2	1,2
Sensível	153	89,5
Desconhecido	16	9,3
MDR*	45	26,3

*Resistente pelo menos a isoniazida e rifampicina

4.3. OBTENÇÃO DA CULTURA PARA EXTRAÇÃO DE DNA

Todos os isolados de *M. tuberculosis*, provenientes de pacientes atendidos em postos e hospitais da RM de Porto Alegre, que apresentavam TS realizado foram localizados na coleção de isolados de *M. tuberculosis* do LACEN, perfazendo um total de 218 isolados.

Entre os isolados que apresentavam TS realizado no ano de 1999, foram identificados 90, dos quais em 80 isolados foi possível obter-se crescimento bacteriano e extrair-se o DNA. Dos 128 isolados testados no ano 2000, foi possível obter-se crescimento e DNA de 91 deles (Tabela 8).

Tabela 8: Número de isolados da Região Metropolitana com TS, nº de isolados analisados por RFLP, percentual de isolados com teste analisados por RFLP.

	Nº de isolados com TS 1999/2000	Nº de isolados com RFLP 1999/2000	% 1999/2000
Postos de Saúde	40/83	40/54	100/65
Hospitais	50/45	40/37	80/82,2
Total	90/ 128	80/ 91	88,8/ 71

4.4. DADOS DA GENOTIPAGEM

No presente estudo, foram genotipados 185 isolados de *M. tuberculosis* provenientes de 171 pacientes. Quatorze pacientes tiveram 2 isolados analisados por RFLP que apresentaram o mesmo perfil, portanto um isolado de cada um desses pacientes foi excluído do estudo. Dessa forma, a análise final incluiu um total de 171 isolados de 171 pacientes.

4.4.1. Análise por IS6110- RFLP

Cada fragmento (banda) identificada no padrão de RFLP representa uma cópia da seqüência de inserção IS6110. Os isolados que apresentaram 6 ou menos cópias de IS6110 representam 9,9% (n=17) do total de amostras analisadas, os demais 90,1% apresentaram um número de 7 ou mais cópias deste elemento. Dos 17 isolados com 6 ou menos cópias de IS6110, 13 (76,4 %) pertenciam a 2 clusters. O número de cópias variou de 2 a 18, sendo que a média foi 10 cópias e a moda foi 9 cópias de IS6110 por isolado. A Figura 5 apresenta a freqüência do número de cópias do IS6110.

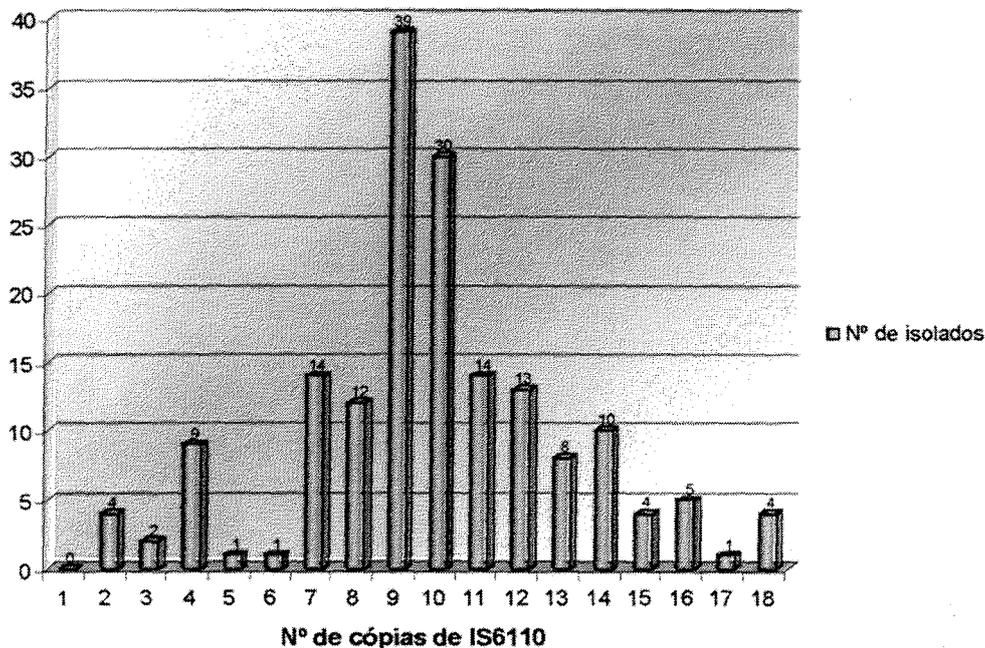


Figura 5: Freqüência do número de fragmentos de IS6110 encontrada na análise pela técnica de RFLP.

Entre os 171 isolados analisados pela técnica de RFLP, foram encontrados 129 padrões distintos de bandas. Foram encontrados 64 isolados (37,4%) com padrão único, isto é, cada um apresentou um padrão de bandas bastante distinto dos demais 107 isolados (62,5%) que apresentavam padrões agrupáveis (Figura 6).

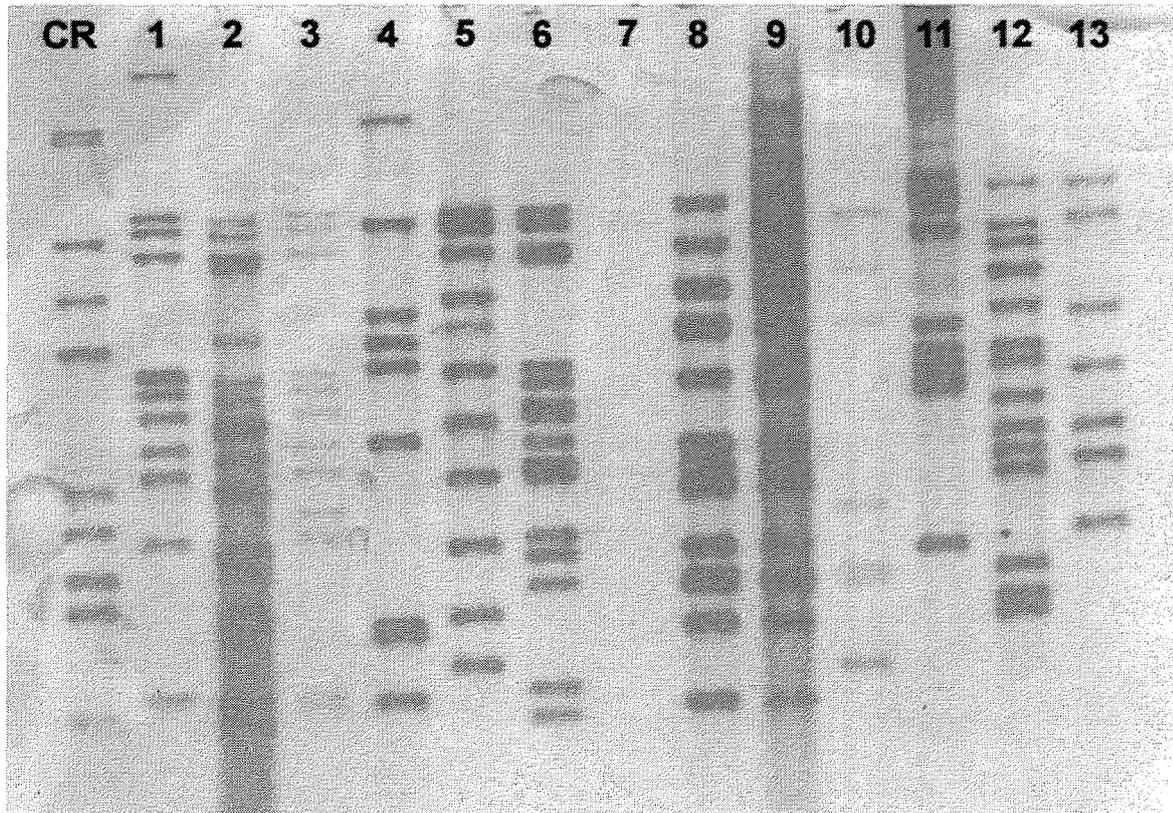


Figura 6: Auto-radiografia de RFLP com DNAs extraídos de isolados de diferentes pacientes provenientes de Postos e Hospitais da rede de saúde pública da Região metropolitana de Porto Alegre obtida após hibridização com a sonda IS6110. Linhas 1-13, DNA de *M. tuberculosis* extraídos de isolados de diferentes pacientes. CR: DNA de *M. tuberculosis* cepa referência 14323.

Dentre os 107 isolados com padrões agrupáveis, 59 (34,5%) isolados formaram 17 *clusters*, isto é, apresentaram 100% de similaridade entre eles. Cada *cluster* consistiu de 2 a 9 isolados cada. O número médio de cópias de IS6110 entre os *clusters* foi 8,1 variando de 2 a 14. Na Figura 7 é possível observar o perfil dos *clusters* encontrados e a relação de similaridade entre eles.

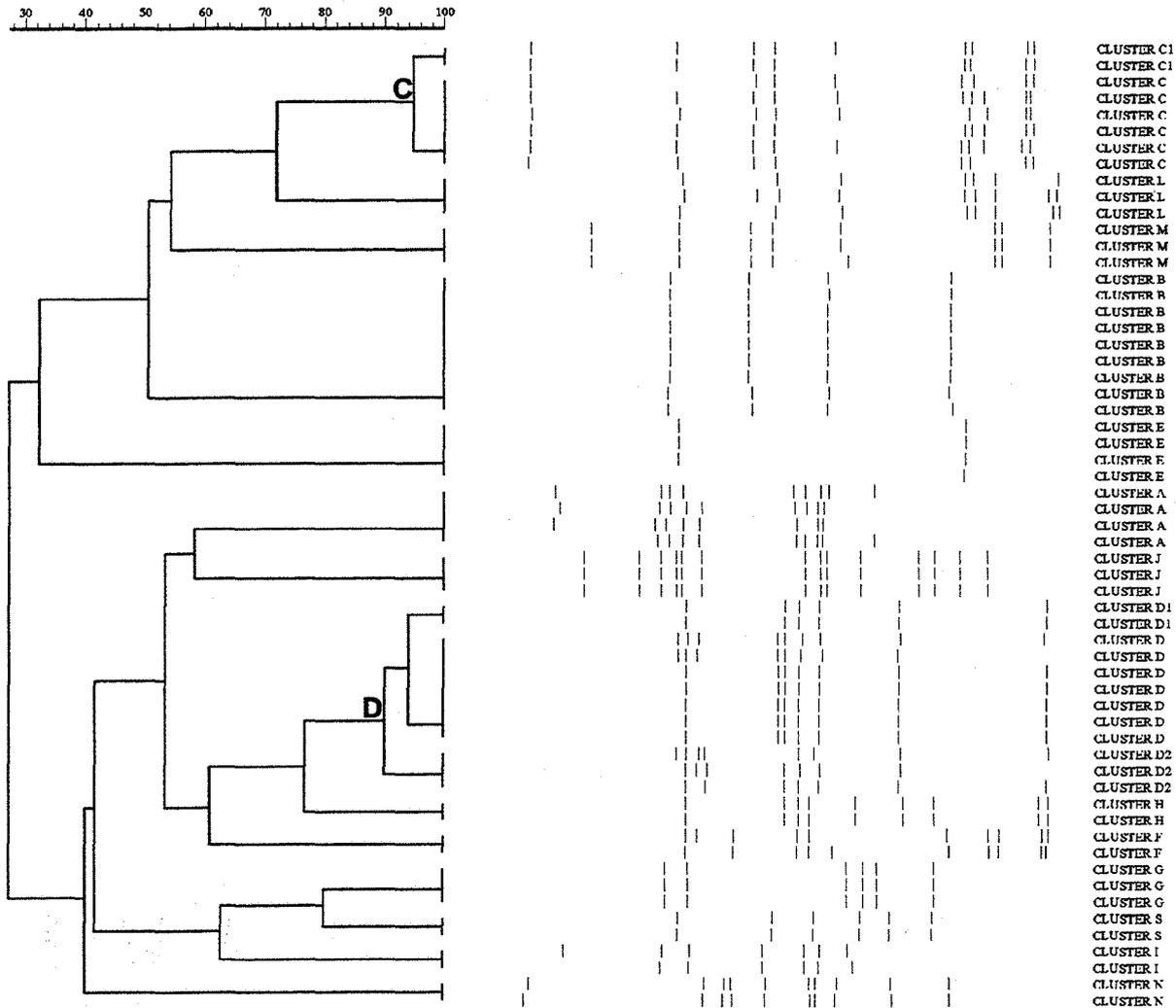


Figura 7: Dendrograma obtido através do software GelCompar representando os isolados *clusters* encontrados no estudo.

Foram agrupados em famílias, os isolados que apresentaram pelo menos 80% de similaridade (1-3 cópias de diferença). Dos 107 isolados que apresentaram padrões agrupáveis, 48, além dos *clusters*, formaram 30 famílias. Algumas famílias não apresentaram *clusters*, enquanto, 11 famílias foram compostas por até 3 *clusters* (Anexo 3). O número de isolados em cada família variou de 2 a 15 isolados. Os *clusters* D, D1, D2, C e C1 apresentaram mais de 89% de similaridade, formando duas famílias, denominadas C e D (Figura 7) sendo que os *clusters* C, C1, D e D1 são altamente relacionados apresentando apenas 1 cópia de IS6110 de diferença, demonstrando mais de 95% de similaridade. Os isolados incluídos em uma mesma família indicam a existência de um ancestral comum recente.

4.5. ANÁLISE DA RELAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA ENTRE OS ISOLADOS *CLUSTER*

Em nosso estudo consideramos ligação epidemiológica definida, quando os pacientes em *cluster* compartilhavam a mesma residência, o mesmo local de trabalho ou apresentavam alguma relação de parentesco. Provável ligação epidemiológica foi considerada quando o paciente em *cluster* vivia no mesmo conjunto residencial ou morava no mesmo bairro. Neste trabalho, encontramos ligação epidemiológica entre 13 pacientes (22%) de 4 diferentes *clusters*, sendo 5 (8,5%) pacientes com provável relação epidemiológica e 8 (13,5%) com relação epidemiológica definida (Tabela 9).

Tabela 9: Relação epidemiológica encontrada entre os pacientes que formaram *cluster*.

<i>Cluster</i>	Número de isolados com relação epidemiológica provável ou definida	Tratamento prévio	Perfil de susceptibilidade	Tipo de relação epidemiológica
B	2	Sim	EMB and INH	Relação de parentesco
D	6	Sim	Diferentes	Mesmo bairro, 2 deles morando na mesma casa
G	2	Sim	Diferentes	Relação de parentesco
M	3	Sim	Diferentes	Mesmo conjunto residencial, 2 deles com relação de parentesco

O *cluster* B foi formado por 9 isolados de 4 cópias de IS6110. Este foi o maior *cluster* encontrado no estudo, correspondendo a 15,3% das linhagens em *cluster*. De acordo com o gênero foram encontrados 6 homens e 3 mulheres, todas as mulheres eram donas de casa. A média de idade entre os pacientes deste *cluster* foi 35 anos. Quanto ao perfil de susceptibilidade, 2 isolados eram MDR, 5 sensíveis e 2 resistentes a INH e EMB. Seis pacientes deste *cluster* estavam morando na região norte de Porto Alegre quando apresentaram este episódio de tuberculose. Entre estes isolados, 1 era MDR, sendo que o paciente do qual provinha este isolado nunca foi tratado previamente. Outros dois pacientes moravam em São Sebastião do Caí, RM de Porto Alegre, na mesma rua e eram parentes. Os dois pacientes possuíam isolados resistentes a INH e EMB, e tiveram tuberculose duas vezes no passado .

O *Cluster* D foi composto por 7 isolados com 9 cópias de IS6110. Entre estes, 5 isolados eram MDR, 1 sensível a todos os fármacos e 1 isolado resistente a INH. A média de idade dos pacientes relacionados neste *cluster* foi estatisticamente mais baixa que a

média de idade geral do estudo ($p < 0,05$), 29 anos. Três pacientes deste *cluster* viviam no mesmo conjunto residencial em Porto Alegre, seus isolados possuíam perfil de susceptibilidade distintos. Dois destes isolados eram provenientes de mãe e filho, ambos realizaram tratamento prévio mais de uma vez e o desfecho destes tratamentos prévios foi sempre abandono ou falência. Outros 3 pacientes, viviam em um município da RM de Porto Alegre no mesmo bairro, os três foram hospitalizados no mesmo período para tratamento da TB, tinham aproximadamente a mesma faixa etária, sendo um deles HIV-positivo. Os três isolados destes pacientes eram MDR.

O *cluster* G foi composto por isolados de 3 pacientes, sendo 2 homens e 1 mulher. Estes pacientes viviam em dois bairros próximos na cidade de Sapucaia do Sul (RM). Todos os pacientes deste *cluster* já haviam realizado tratamento prévio, sendo que dois deles tiveram como desfecho do tratamento a falência e o terceiro paciente obteve cura. Todos os isolados eram resistentes, cada isolado com um distinto perfil de resistência. O perfil de resistência destes isolados pode ter mudado após a transmissão não resultando da mudança do padrão de IS6110. Dois pacientes da etnia negra possuíam relação de parentesco, pois possuíam o mesmo sobrenome e moravam no mesmo bairro.

Três homens fizeram parte do *cluster* M. Todos eles viviam no mesmo conjunto habitacional da cidade de Gravataí, RM de Porto Alegre. Todos eram HIV negativos. Dois deles eram parentes.

Não foi possível encontrar relações epidemiológicas evidentes entre os isolados dos outros *clusters*, devido ao caráter retrospectivo do estudo, além disso, não haviam dados demográficos e epidemiológicos suficientes de todos os pacientes em *clusters*.

4.6. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados epidemiológicos dos pacientes foram analisados e comparados visando verificar se havia alguma diferença nas características dos pacientes entre os diferentes grupos (*cluster* e não *cluster*). Cabe salientar que estes dados clínico-epidemiológicos não foram obtidos para todos os pacientes do estudo, sendo a análise realizada a partir dos pacientes que apresentavam os dados disponíveis.

A partir da análise do prontuário dos pacientes envolvidos no estudo, observamos que 9% ($n=15$) dos pacientes com TB não foram notificados no SINAN. 6,6% ($n=4$) morreram por TB, sendo que destes, 3 (75%) não estavam registrados oficialmente no banco de dados do SINAN. Todos eles eram resistentes e faziam parte de *clusters*.

Em virtude do caráter retrospectivo do estudo, foi possível identificar o local de moradia de apenas 115 pacientes (67,3%), sendo que destes, 67 (58,3%) eram provenientes de Porto Alegre. No mapa a seguir (Figura 8) podemos visualizar os principais bairros de Porto Alegre onde residiam estes pacientes. Observou-se que o maior número de pacientes com tuberculose analisados no estudo residiam em bairros mais pobres e muitas vezes mais distantes dos postos de saúde. Dentre os pacientes moradores da cidade de Porto Alegre, 45,7% deles tiveram TB por infecção recente.

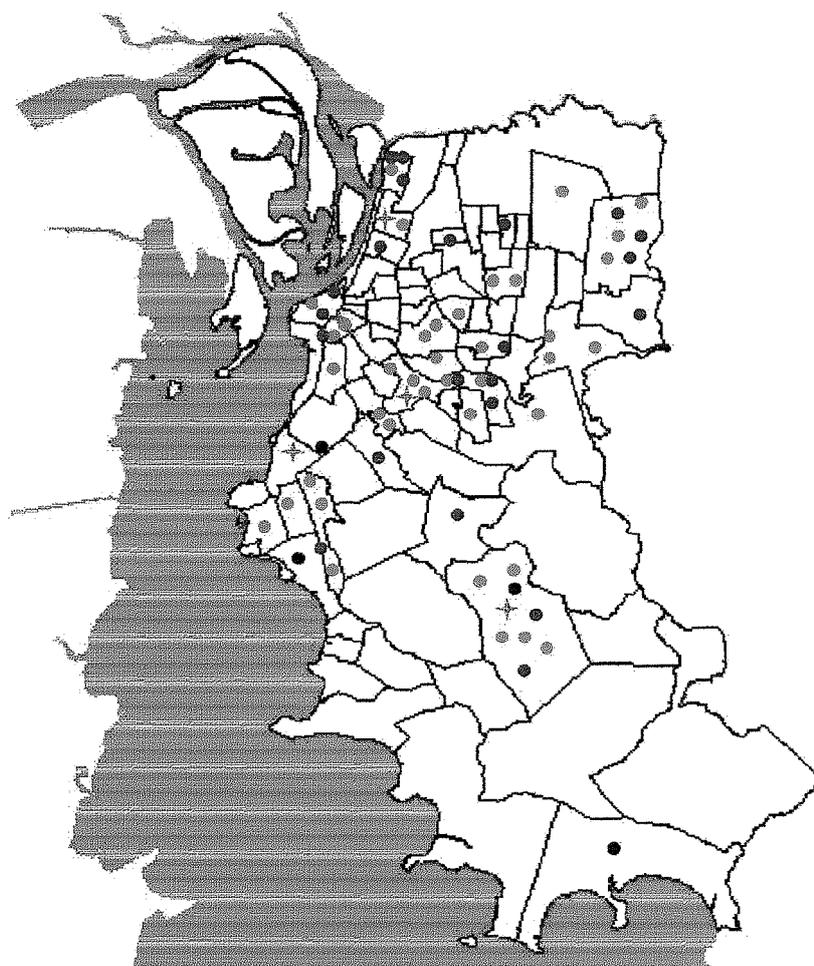


Figura 8: Mapa da cidade de Porto Alegre indicando os bairros de onde provinham 40% dos pacientes do estudo (Fonte: www.portoalegre.rs.gov.br, 20/11/2003).

- casos com padrão único de RFLP,
- isolados pertencentes a diferentes *clusters*
- + localização das principais unidades de saúde do município de Porto Alegre.

4.6.1. Análise Geral

A partir dos resultados obtidos pela técnica de RFLP dos 171 pacientes incluídos no estudo, 59 (34,5%) formaram *clusters*, isto é, foram considerados como tendo desenvolvido a doença por transmissão recente. Os demais 112 (65,5%) apresentaram padrões não *cluster*, indicando que estes pacientes desenvolveram a doença por reativação de uma infecção adquirida no passado.

O gênero masculino foi predominante, mais de 70% dos pacientes estudados eram homens, sendo que a taxa de transmissão recente entre esses pacientes foi de 36,8%, valor que não diferiu significativamente da taxa encontrada para as mulheres 28,3% (p=0,93). Estes valores também não foram diferentes dos encontrados para a população em geral, que foi de 34,5%. Então, podemos concluir que, ser do gênero masculino é um fator de risco para desenvolvimento de TB, mas não para transmissão recente (Figura 9).

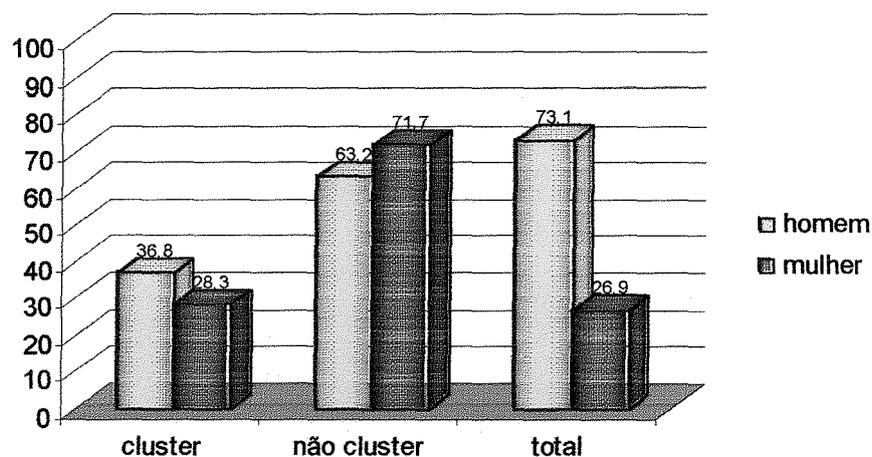


Figura 9: Análise do gênero dos pacientes incluídos no estudo com relação à transmissão recente e reativação.

A idade dos pacientes variou de 17 a 70 anos sendo a média geral 41 anos. A média de idade dos pacientes que desenvolveram TB devido à transmissão recente foi 42 anos e daqueles com doença devido à reativação foi de 40 anos (Tabela10).

Tabela 10: Média de idade dos pacientes em geral e por sexo, em relação à transmissão recente e reativação.

	<i>Cluster</i>	<i>Não cluster</i>	<i>P</i>
Idade média	42	40	0,54
Idade média Homens	42	42,5	0,61
Idade média Mulheres	35,9	38,8	0,5

As mulheres eram mais jovens que os homens, média de 38 e 42 anos, respectivamente ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as médias de idade dos pacientes do sexo feminino quando comparamos em relação à transmissão recente ou reativação. O mesmo ocorreu entre os pacientes no sexo masculino (Tabela 10).

Com relação ao perfil de resistência foi possível observar que 62 isolados eram sensíveis aos fármacos (36,3%) e os demais 109 isolados eram resistentes (63,7%). Entre os pacientes com isolados resistentes, 39,4% formaram *cluster* e, apesar de não diferir significativamente daqueles com isolados sensíveis, dos quais 25,8% estavam em *cluster*, é indicativo de uma maior propensão dos primeiros à associação com transmissão recente (Figura 10).

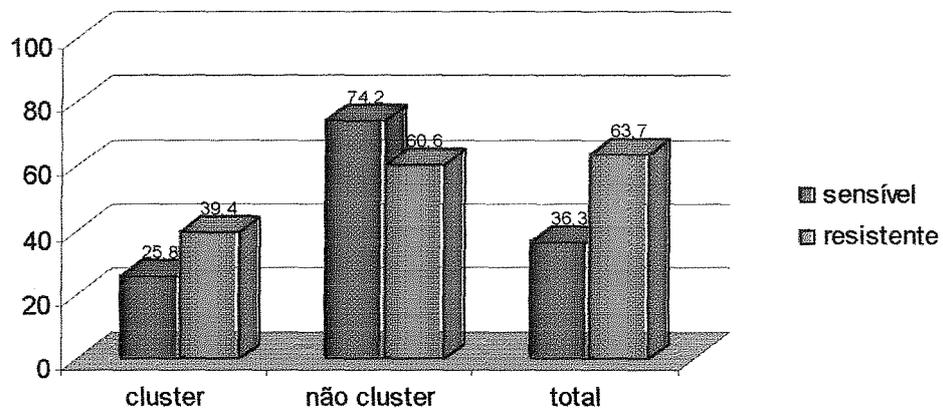


Figura 10: Análise do perfil de resistência entre isolados em *cluster* e não *cluster*.

Podemos observar na Figura 11, que nesta população, o número de pacientes com tratamento prévio é estatisticamente maior que o número de pacientes sem tratamento prévio ($p < 0,05$). Cento e quarenta e oito (86,5%) pacientes receberam tratamento prévio. Destes, 50 (33,8%) apresentaram isolados de *M. tuberculosis* em *cluster*, sendo sugestivo de transmissão recente, e 98 (66,2%) apresentaram isolados

com padrões únicos de RFLP (reativação da doença). Dentre os pacientes que nunca receberam tratamento prévio (n=23), a transmissão recente ocorreu em 39,1%, taxa que apesar de não diferir significativamente da média do estudo (34,5%) (p= 0,8), sugere a associação deste fator com a formação de *cluster*.

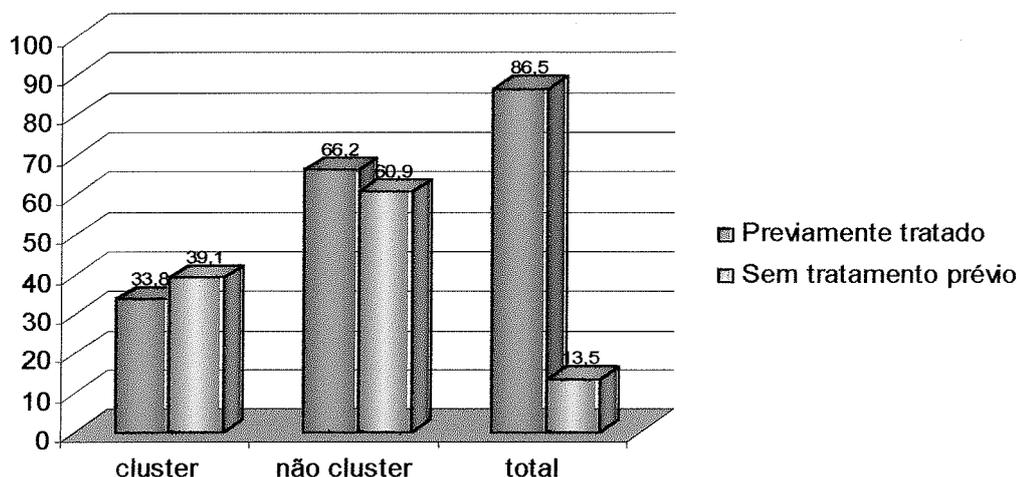


Figura 11: Análise do tratamento prévio em relação aos pacientes *cluster* e não *cluster*.

Cento e três (69,5%) dos 148 pacientes com tratamento prévio, estavam infectados com cepas resistentes, e 45 (30,5%) com cepas sensíveis (p<0,05). Dos 103 (69,5%) pacientes com isolados resistentes, 40 (38,8%) desenvolveram TB devido à transmissão recente e 63 (61,2%) devido à reativação. Entre os 45 (30,5%) isolados sensíveis aos fármacos testados, 10 pacientes (22,2%) desenvolveram TB devido à transmissão recente. Não houve diferença estatística entre os pacientes com isolados sensíveis e resistentes com relação à transmissão recente (p=0,4), porém, os pacientes previamente tratados e portadores de cepas resistentes parecem estar mais propensos a desenvolver TB devido à transmissão recente (Tabela 11).

Entre os isolados de pacientes sem tratamento prévio, não foi observada diferença significativa entre isolados sensíveis e resistentes. Muito provavelmente isto se deve ao baixo número de isolados de pacientes sem tratamento prévio analisados. Porém parece existir uma tendência destes pacientes estarem infectados por cepas sensíveis aos fármacos. Metade dos isolados resistentes eram MDR e os pacientes que estavam infectados por estas cepas desenvolveram TB devido à transmissão recente, isto é, adquiriram resistência primária, enquanto 65% (n=11) dos sensíveis desenvolveram TB devido à reativação de TB latente (Tabela 11).

Tabela 11: Perfil de resistência entre os isolados *cluster* e não *cluster* de pacientes com e sem tratamento prévio.

Grupo	Total	Isolados resistentes	Isolados sensíveis
		Não <i>cluster</i> / <i>Cluster</i>	Não <i>cluster</i> / <i>Cluster</i>
Previamente tratado	148	103 (69.5%) 63 (61%)/40 (39%)	45 (30.5%) 35(78%)/10(22%)
Sem tratamento prévio	23	06 (26.1%) 3(50%)/3(50%)	17(73.9%) 11 (65%)/6 (35%)

Foi encontrado um número de isolados resistentes significativamente maior entre os pacientes com tratamento prévio, que aquele encontrado dentre os pacientes sem tratamento prévio ($p < 0,05$). Isto pode estar ocorrendo, pois os pacientes que tiveram reingresso no programa após tratamento prévio podem não ter curado a doença, em decorrência do uso inadequado dos medicamentos ou por falência terapêutica, entre outras possibilidades. Em decorrência disso o nível de resistência tende a aumentar entre estes pacientes.

O índice de abandono, falência e cura são fatores muito importantes no estudo da tuberculose. No presente estudo, dos pacientes que abandonaram o tratamento alguma vez (não compareceram à unidade de saúde por mais de 30 dias consecutivos após a data prevista para seu retorno), dos que tiveram falência (persistência da positividade do escarro ao final do tratamento) e daqueles que tiveram alta por cura, 33,3%, 32,9% e 32%, respectivamente, formaram *cluster*. Estas taxas não diferiram entre si e nem da média do estudo (34,5%) (Tabela 12). Sendo assim, estes fatores não apresentaram associação com TB devido à transmissão recente.

Tabela 12: Características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos pacientes analisados no estudo.

Característica	Não cluster n=112 (%)	Cluster n=59 (%)	Total n= 171 (%)
Gênero			
Masculino	79 (63,2)	46 (36,8)	125 (73,1)
Feminino	33 (71,7)	13 (28,3)	46 (26,9)
Estado civil			
Solteiro	42 (68,9)	19 (31,1)	61 (35,7)
Casado	36 (72)	14 (28)	50 (29,2)
Separado	04 (50)	04 (50)	08 (4,7)
Viúvo	01 (50)	01 (50)	02 (1,2)
Desconhecido	29 (58)	21 (42)	50 (29,2)
Escolaridade			
Analfabeto	07 (77,7)	02 (22,3)	09 (5,4)
Ensino fundamental**	60 (69)	27 (31)	87 (50,8)
Ensino médio**	12 (63,2)	07 (36,8)	19 (11,1)
Desconhecido	33 (58,9)	23 (41,1)	56 (32,7)
Etnia			
Branca	74 (64,9)	40 (35,1)	114 (66,7)
Negra	12 (70,6)	05 (29,4)	17 (9,9)
Mista	15 (62,5)	09 (37,5)	24 (14)
Desconhecido	11 (64,7)	05 (35,3)	16 (9,4)
Tratamento prévio para TB			
Sim	98 (66,2)	50(33,8)	148 (86,5)
Não	14 (60,9)	09 (39,1)	23 (13,5)
Desfecho do tratamento**			
Falência	47 (67,1)	23 (32,9)	70 (33,3)
Cura	34 (68)	16 (32)	50 (23,8)
Abandono	28 (66,6)	14 (33,3)	42 (20,1)
Desconhecido	31 (64,6)	17 (35,4)	48 (22,8)
Perfil de resistência			
Sensível	46 (74,2)	16 (25,8)	62 (36,3)
Resistente a uma ou mais drogas****	39 (60,9)	25 (39,1)	64 (37,4)
MDR	27 (60)	18 (40)	45 (26,3)
HIV			
Positivo	18 (66,7)	09 (33,3)	27 (15,8)
Negativo	54 (62,1)	33 (37,9)	87(50,9)
Não realizado	40 (70,1)	17 (29,9)	57 (33,3)
Comorbidades ***			
Desnutrição	14 (66,6)	07 (33,4)	21 (42,8)
Diabetes	05 (41,7)	07 (58,3)	12 (24,5)
Hepatites	10 (62,5)	06 (37,5)	16 (32,7)
Alcoolismo			
Sim	34 (63)	20 (37)	54 (31,6)
Não	42 (70)	18 (30)	60 (35,1)
Desconhecido	36 (63,2)	21 (36,8)	57 (33,3)

muitos dos pacientes incluídos no estudo reportaram mais de um tratamento prévio, conseqüentemente com mais de um desfecho. *Outros pacientes não reportaram comorbidades ou a informação é desconhecida. ****Resistente a uma ou mais drogas, não MDR.

Com relação ao grau de escolaridade, verificou-se que 51% (n=87) dos pacientes incluídos no estudo possuíam ensino fundamental completo ou incompleto, 11% (n=19) dos pacientes possuíam ensino médio completo ou incompleto e 5,4% (n=09) eram analfabetos. Com relação à transmissão recente, 36,8% (n=07) dos pacientes com mais alta escolaridade tiveram TB por infecção recente, enquanto àqueles com menor escolaridade apresentaram taxas menores de TB por transmissão recente (Figura 12).

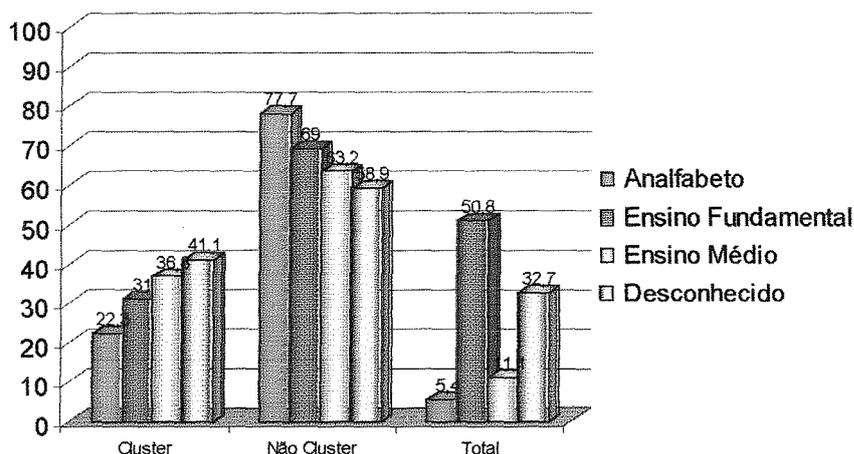


Figura 12: Análise do grau de escolaridade dos pacientes envolvidos no estudo *versus* transmissão recente e reativação.

Pacientes brancos apresentaram uma taxa de transmissão recente de 35,1% (n=40), negros 29,4% (n=05) e mistos apresentaram 37,5% (n=09) de *cluster*. Não houve diferença significativa em relação às diferentes etnias analisadas, porém, neste estudo foi observado que os negros estão menos propensos a formar *cluster* que brancos e mistos (Figura 13).

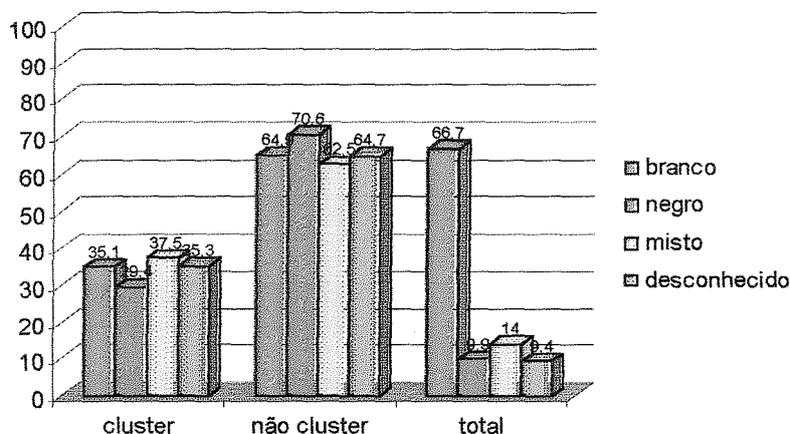


Figura 13: Análise das diferentes etnias *versus* transmissão recente e reativação.

Doenças associadas à TB podem, e muitas são fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Por este motivo analisamos o índice de positividade para HIV, presença de diabetes, hepatite e desnutrição entre os pacientes com tuberculose incluídos no estudo. A partir desta análise, observamos que na população estudada, nenhuma das co-morbidades citadas foram associadas com transmissão recente ($p=0,35$) (Figura 14).

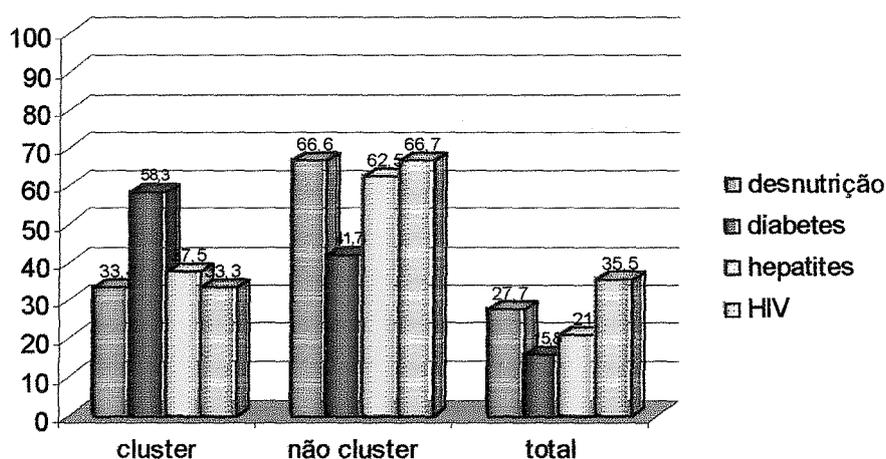


Figura 14: Análise das co-morbidades versus reativação e transmissão recente.

Dentre os pacientes que possuem co-morbidades, os diabéticos mostram uma tendência maior de formar *cluster* que os pacientes com hepatite ou HIV. 58,3% ($n=07$) dos diabéticos desenvolveram TB devido à infecção recente. Este dado não foi significativo, muito provavelmente em decorrência do baixo número de indivíduos portadores desta doença. Observamos que pacientes soropositivos, desnutridos e portadores de hepatite apresentaram a mesma taxa de transmissão recente que a média geral do estudo.

As profissões mais frequentes entre os pacientes deste estudo foram: dona de casa (14,2%), pedreiro (8%), doméstica (5,6%) e servente (4,9%). Não houve diferença nas taxas de transmissão recente entre as profissões citadas.

De acordo com o estado civil, verificou-se que 35,7% dos pacientes eram solteiros e 29,2% eram casados. Não observamos associação do estado civil com transmissão recente (Tabela 12).

Em relação ao alcoolismo, que em muitos trabalhos aparece como sendo um fator de risco para o desenvolvimento de TB por transmissão recente, neste estudo esta característica não foi correlacionada com transmissão recente (Tabela 12).

Na análise dos dados da vacinação com BCG, observamos que 45% (n=77) dos pacientes não foram vacinados e somente 22,8% (n=39) apresentavam cicatriz vacinal.

Dentre os pacientes vacinados a taxa de transmissão recente foi 38,5% (n=15), entre os não vacinados foi de 32,5% (n=25), taxas estas que não diferiram entre si nem da média geral do estudo (34,5%) (Figura 15).

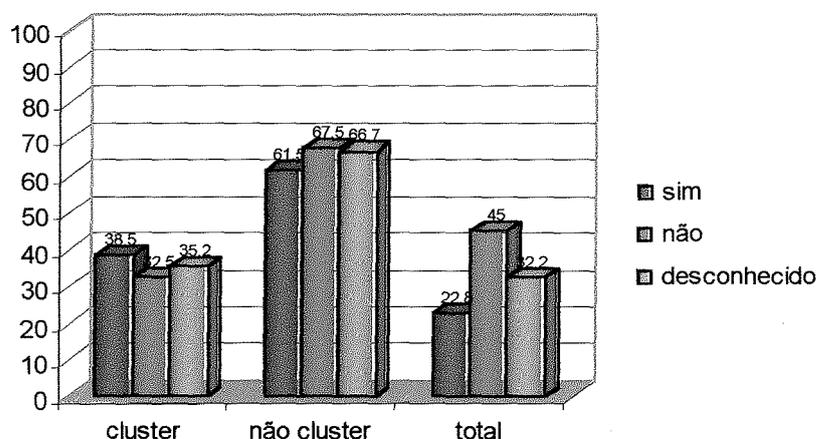


Figura 15: Análise dos dados de vacinação com BCG *versus* reativação e transmissão recente.

Os dados epidemiológicos foram estratificados para análise epidemiológica por procedência do paciente. Noventa e quatro pacientes eram provenientes de unidades de saúde ambulatorial e 77 provinham de hospitais, sendo que destes, 92,2% eram procedentes do Hospital Sanatório Partenon. Quando as características clínicas e demográficas foram analisadas dessa forma, não foi possível correlacionar transmissão recente com nenhuma delas. Após a estratificação dos dados o número de pacientes em cada categoria avaliada tornou-se pequeno, tornando difícil a associação entre as características, sendo agravados pela falta de dados disponíveis em decorrência do mau preenchimento das fichas epidemiológicas (Tabela 13). No entanto observamos que existe uma propensão dos pacientes HIV positivos e diabéticos a desenvolver TB por transmissão recente quando são provenientes de hospitais (Tabela 13). Foi observado também que pacientes provenientes de unidades ambulatoriais infectados com cepas MDR estão mais propensos a desenvolver TB por transmissão recente (43,5%) que

pacientes provenientes de hospitais (36,4%), apesar destas diferenças não serem significativas.

Tabela 13: Características epidemiológicas dos pacientes estratificados por procedência do paciente.

Característica	Unidades ambulatoriais		Hospitais	
	Cluster n(%) (35)	Não cluster n(%) (59)	Cluster n(%) (24)	Não cluster n(%) (53)
Gênero				
Masculino	29(38,2)	47(61,8)	17(34,6)	32(65,4)
Feminino	06(33,3)	12(66,7)	07(25)	21(75)
Idade (anos)				
Média	41	42	40	41
Estado civil				
Solteiro	06(26,1)	17(73,9)	13(34,2)	25(65,8)
Casado	10(30,3)	23(69,7)	04(23,5)	13(76,4)
Separado	04(80)	01(20)	—	03(100)
Viúvo	—	—	01(50)	01(50)
Desconhecido	15(45,5)	18(54,5)	06(35,3)	11(64,7)
Escolaridade				
Analfabeto	02(33,3)	04(66,7)	—	03(100)
Ensino fundamental*	11(28,2)	28(71,8)	16(33,3)	32(66,7)
Ensino médio*	04(50)	04(50)	03(27,3)	08(72,7)
Desconhecido	18(44)	23(56)	05(33,3)	10(66,7)
Etnia				
Branca	24(36,6)	43(64)	16(34)	31(66)
Negra	03(42,9)	04(57,1)	02(20)	08(80)
Mista	03(37,5)	05(32,5)	06(37,5)	10(62,5)
Desconhecido	05(41,7)	07(58,3)	—	04(100)
Tratamento prévio				
Sim	28(34,6)	48(65,4)	22(32,8)	45(67,2)
Não	07(53,8)	06(46,2)	02(20)	08(80)
Desfecho de tratamento prévio				
Falência	10(29,4)	24(70,6)	13(36,1)	23(63,9)
Cura	09(29)	22(71)	07(36,8)	12(63,2)
Abandono	08(34,8)	15(65,2)	06(31,6)	13(68,4)
Perfil de resistência				
Sensível	11(32,4)	23(67,6)	05(17,8)	23(82,2)
Resistente	24(40)	36(60)	19(38,8)	30(61,2)
MDR	10(43,5)	13(56,5)	08(36,4)	14(36,4)
HIV				
Positivo	05(33,3)	10(66,7)	08(66,7)	04(33,3)
Negativo	17(43,6)	22(56,4)	16(33,3)	32(66,7)
Não realizado	13(32,5)	27(67,5)	04(23,5)	13(76,5)
Comorbidades				
Desnutrição	—	03(100)	07(38,9)	11(61,1)
Diabetes	01(16,6)	05(83,4)	04(66,7)	02(33,3)
Hepatites	01(20)	04(80)	05(45,5)	06(54,5)

*Incluindo curso completo ou incompleto

A taxa de transmissão recente entre os pacientes provenientes de centros de saúde ambulatoriais foi de 37,2% e, entre os isolados de pacientes provenientes de hospitais foi de 31,1%, não havendo diferença significativa nestas proporções. Quando estas taxas individuais foram comparadas em relação àquela encontrada na população em geral, que foi de 34,5%, também não houve diferença significativa.

5. DISCUSSÃO

Porto Alegre é a capital do Estado do Rio Grande do Sul, localizada no sul do Brasil. A RM de Porto Alegre tem uma população de aproximadamente 3,5 milhões de habitantes e reporta mais de 4.000 casos de TB por ano. A incidência desta doença nesta região tem se mantido em torno de 80/100.000 hab. nos últimos anos. Através deste estudo foi possível apresentar uma visão geral da epidemiologia da tuberculose através do uso de técnicas de biologia molecular e também realizar uma avaliação do nível de resistência aos fármacos dos isolados de *M. tuberculosis* estudados.

No Brasil, como na maioria das regiões do mundo, culturas de *M. tuberculosis* não são realizadas para confirmar o diagnóstico individual de tuberculose e como resultado disso, o TS também não é realizado. Dados mundiais sobre resistência, publicados mais recentemente, são de um estudo realizado entre 1994 e 1997 pela OMS juntamente com a IUATLD (International Union Against Tubercle and Lung Disease). O objetivo deste estudo foi medir a prevalência da resistência aos fármacos em 35 países abrangendo os 5 continentes (Pablos-Mendez *et al.*, 1998). Em isolados brasileiros, a taxa de resistência encontrada foi de 8,6%, sendo que 5,4% dos casos possuíam resistência adquirida e 0,9% de resistência primária. O nível de resistência encontrado no presente estudo foi de 63,7%. Esta grande diferença nos índices de resistência se deve a um viés de seleção amostral. Os pacientes envolvidos em nosso estudo eram em sua maioria (85%) previamente tratados, com mais de um tratamento prévio, que fizeram uso irregular dos fármacos e/ou abandonaram o tratamento.

O tipo de resistência observada foi, predominantemente adquirida (71,9%), enquanto a taxa de resistência primária foi de 31,3%. Esse tipo de resistência foi a mesma observada em estudo realizado em pacientes com tuberculose tratados nos ambulatórios da rede pública do Estado do RS no período de 1995 a 1996 (Jardim *et al.*, 1998) e reforça os dados de outros estudos que indicam que este tipo de resistência é predominante no Brasil (WHO, 1997; Fiuza De Melo *et al.*, 1997). De acordo com outros autores (Girard *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998), a história prévia de tratamento está associada com um aumento significativo da prevalência de resistência aos fármacos. Estes resultados indicam que o principal fator de risco para o aparecimento de linhagens resistentes é o tratamento inadequado, bem como, um programa de tratamento supervisionado que atinge uma pequena parcela de doentes. O nível de resistência encontrado entre os pacientes atendidos nos hospitais (44,9%) foi mais baixo que o nível de resistência ambulatorial (55,1%).

Sabe-se que pacientes alcoolistas, soropositivos, desempregados entre outros grupos tem uma grande dificuldade para aderir ao tratamento da TB, o que os torna mais propensos a desenvolver resistência (Lima *et al.*, 2001). Observamos que pacientes soropositivos e pacientes com histórico de alcoolismo apresentaram aumento da taxa de resistência, porém este dado não foi significativo.

Alland *et al.* (1994) reportaram previamente que tuberculose resistente é observada mais freqüentemente entre pacientes cujos isolados pertencem a *clusters*. Na RM de Porto Alegre 39,4% dos isolados resistentes à pelo menos um fármaco estão em *clusters* enquanto 25,8% dos isolados sensíveis também formam *cluster*. Outros trabalhos descrevem uma taxa maior de transmissão recente entre as cepas resistentes quando comparadas com cepas sensíveis (Friedman *et al.*, 1995b; Frieden *et al.*, 1996; Torrea *et al.*, 1996; Fandinho *et al.*, 2000; Ferrazoli *et al.*, 2000).

Como citado anteriormente, o nível de *clustering* entre os isolados de *M. tuberculosis* provenientes de localidades onde a TB é endêmica é sugestivo de infecção devido à transmissão recente. Por outro lado, casos não-*cluster* são considerados indicativos de reativação de infecção latente. O número de casos de TB devido à reativação de uma infecção prévia (65,5%) é duas vezes maior que o número de casos ocorridos devido à transmissão recente. Em consequência disso, os esforços para o controle da TB devem estar voltados não somente para interromper a cadeia de transmissão, mas também para prevenir reativação. Este resultado é bastante semelhante àqueles descritos para países em desenvolvimento, onde a taxa de transmissão varia de 20% a 38% (Warren *et al.*, 1996; Ferrazoli *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Em países desenvolvidos esta taxa pode variar de 10% a 58% (Barnes *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 1997; Braden *et al.*, 1997). Cafrune (2003) analisou isolados do interior do Rio Grande do Sul e observou um percentual de 34,7% de isolados em *cluster*, enquanto Suffys *et al.* (2000) estudando isolados de diferentes regiões do Brasil, inclusive isolados do RS, encontraram 37% de *cluster* entre os isolados do RS. Narayanan *et al.* (2002), observaram que pacientes que estiveram internados em sanatórios estavam mais propensos a formar *clusters* que aqueles que não haviam sido internados. Em nosso estudo observamos que pacientes ambulatoriais estavam mais propensos a desenvolver TB por transmissão recente (37,2%) que os pacientes atendidos em hospitais ou que foram internados em sanatório (31,1%).

Através de diversos estudos, como estes citados acima, tem sido demonstrado que a incidência da TB não é o único fator que contribui para as proporções de linhagens *clusters*, e que a heterogeneidade da população, método de amostragem, período de estudo, e a inclusão de pacientes hospitalizados ou não tem grande influência nas

proporções de padrões *clusters* (Hermans *et al.*, 1995; Strassle *et al.*, 1997). Outro fator importante, é que em certos países onde a incidência de TB é muito baixa, muitas vezes são detectados surtos da doença, contribuindo para uma grande porcentagem de isolados em *cluster*, como o que foi descrito por Bauer *et al.* (1998) em isolados da Dinamarca, onde apenas 2 linhagens de *M. tuberculosis* representavam em torno de 40% de todos os isolados *cluster*.

Em nosso estudo foi observado que 17 (9.9%) cepas possuíam 6 ou menos cópias de IS6110. Cepas sem cópias de IS6110 não foram encontradas. Entre as cepas que formaram *cluster*, foram encontradas 13 (76.5%) com baixo número de cópias deste elemento de inserção. Ferrazoli *et al.* (2000), Suffys *et al.* (2000) e Baptista *et al.* (2002) reportaram respectivamente, 1.6%, 6.4% and 1.7% de linhagens com baixo número de cópias de IS6110. Cafrune (2003) encontrou 11,4% dos isolados carregando 6 ou menos cópias de IS6110, sendo que 83,8% destas eram *clusters*. De acordo com o presente trabalho e com o trabalho realizado por Cafrune (2003), observou-se que os isolados do RS parecem ter um percentual maior de cepas com poucas cópias de IS6110 tanto na população em geral quanto entre os *clusters*, quando estes resultados são comparados com aqueles obtidos em outros estudos que incluem cepas brasileiras (Suffys *et al.*, 1997; Fandinho *et al.*, 2000, Ferrazoli *et al.*, 2000). O número médio de cópias de IS6110 por isolado foi 10, variando de 2 a 18 cópias por isolado. Dados similares também foram encontrados em outros estudos brasileiros (Suffys *et al.*, 2000; Fandinho *et al.*, 2000; Baptista *et al.* 2002, Cafrune, 2003; Borges, 2003) e estudos realizados na Alemanha e França (Nienann *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 1998).

Tendo em vista que o LACEN/RS utiliza o IS6110 como alvo para amplificação pela PCR para o diagnóstico de TB (Rossetti *et al.*, 1997), é importante o monitoramento da frequência do número de cópias deste elemento em isolados do Rio Grande do Sul, pois já foram descritas cepas de *M. tuberculosis* que não possuem nenhuma cópia de IS6110 (van Soolingen *et al.*, 1993; Agasino *et al.*, 1998; Rasolof-Razanamparany *et al.*, 2001; Narayanan *et al.*, 2002). No entanto, no Estado do Rio Grande do Sul, mais de 600 isolados já foram analisados por RFLP e até o momento nenhuma cepa sem cópias de IS6110 foi encontrada, demonstrando que a estratégia de diagnóstico utilizada permanece válida (Cafrune, 2000; Suffys *et al.*, 2000; Valim, 2000; Cafrune, 2003).

Um dos *clusters* encontrados neste estudo (*cluster* D1), composto por 2 isolados de *M. tuberculosis* que apresenta um perfil com 8 cópias de IS6110, é aparentemente idêntico àquele recentemente descrito em estudos que avaliaram cepas brasileiras (Baptista *et al.* 2002; Ferrazoli *et al.*, 2000). Suffys *et al.* (2000) descreveram este padrão como o mais freqüente isolado no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, o qual é quase

idêntico ao padrão que parece estar sendo amplamente disseminado em São Paulo. Verificando-se padrões de IS6110 publicados em outros estudos, observou-se que este padrão está também presente em isolados de Guadalupe (Sola *et al.*, 1997), Guinéa-Bissau (Kallenius *et al.*, 1999) e África do Sul (Wilkinson *et al.*, 1998). De acordo com Suffys *et al.* (2000), este padrão é caracteristicamente de mais fácil disseminação ou mais estável. Em nosso estudo temos dois *clusters* com perfis muito próximos do perfil do *cluster* D1, que possivelmente são uma variação deste, sendo que um dos *clusters* possui uma cópia de IS6110 a mais e o outro apenas uma mudança de posição de uma das cópias. Segundo alguns autores esses *clusters* podem ser classificados como geneticamente relacionados por diferirem em apenas uma banda (Small *et al.*, 1994; Tenover *et al.*, 1997).

Após a realização de uma investigação epidemiológica mais detalhada entre os pacientes em *clusters*, observamos que 22% deles possuíam algum tipo de ligação epidemiológica. Este resultado é consistente com aqueles encontrados na literatura (van Soolingen *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995; Samper, 1998). Para 6 (46,1%) dos 13 isolados (22%) *cluster* com relação epidemiológica, a transmissão foi intra-domiciliar. Observou-se também que 45,7% dos pacientes que moravam no município de Porto Alegre desenvolveram TB devido à transmissão recente, porém foi encontrada somente 38,5% de relação epidemiológica entre estes pacientes, enquanto encontramos 61,5% de relação entre aqueles que residiam na RM de POA. A baixa taxa de ligação epidemiológica encontrada entre os *clusters*, pode ter ocorrido por diversos fatores: devido à impossibilidade de realização de uma entrevista com o paciente (em decorrência do caráter retrospectivo do estudo); contato casual com um paciente infectado, o que leva o indivíduo a apresentar o mesmo padrão de *fingerprint* de outros pacientes sem uma conexão definida; e por fim o paciente pode estar reativando a TB adquirida anteriormente ao invés de estar desenvolvendo a doença após infecção recente (Blackwood *et al.*, 2003; Weis *et al.*, 2002). Observamos também que a média de idade (29 anos) entre os pacientes incluídos no *cluster* D foi estatisticamente menor que a média de idade do estudo e também menor que a média de idade entre os pacientes em *cluster*. Este dado sugere que a transmissão entre estes pacientes possa ter ocorrido em um ambiente comum freqüentado por jovens desta faixa etária.

Em nosso estudo a média de idade para mulheres foi 38 anos e para homens foi de 42 anos ($p < 0.05$). O risco de doença é maior para mulheres em faixas etárias mais jovens que para homens mais jovens, sugerindo que fatores genéticos e maturacionais tenham papéis importantes na progressão e expressão da TB doença (Kumaresan, 2002).

Diferentes estudos mostram que pertencer ao gênero masculino é um fator de risco para o desenvolvimento de TB e/ou para transmissão recente (Dalcolmo *et al.*, 1999; Gutierrez *et al.*, 1998; Ferrazoli *et al.*, 2000, Kumaresan, 2002). Isto poderia ser possível devido ao tipo do trabalho ao que os homens estão submetidos, que muitas vezes exige exposição física constante às variações climáticas, com poucas condições de salubridade, além da baixa remuneração e exigência de força corporal (Gonçalves *et al.*, 1999). Isto vem a concordar com os principais tipos de trabalho realizado pelos homens descritos neste estudo. Foi observado que 73,1% dos pacientes eram homens ($p < 0.001$), mas esta característica não é um fator de risco para transmissão recente.

Nós analisamos 78,4% das cepas recebidas pelo IPB-LACEN/RS que foram submetidas ao teste de susceptibilidade no período do estudo, porém, isto não foi suficiente para associar transmissão recente com idade, gênero, tipo de emprego, estado civil, grau de escolaridade, tratamento prévio para TB, perfil de resistência, doenças associadas e outras. Diversos trabalhos têm demonstrado que estas características muitas vezes são fatores de risco para a transmissão recente (Chan-Yeung, *et al.*, 2003; McConkey *et al.*, 2002; Diel, *et al.*, 2002; Solsona *et al.*, 2001; Fandinho *et al.* 2000; Ferrazoli *et al.*, 2000; Edlin *et al.*, 1992; Small *et al.*, 1994). Yang *et al.* (2001) e Baptista *et al.* (2002) não encontraram fatores de risco para transmissão recente na população estudada (Brasil e México, respectivamente). O baixo número e viés amostral além da falta de dados epidemiológicos nos prontuários médicos, nas fichas epidemiológicas e no banco de dados do SINAN poderiam ter contribuído para a não associação significativa entre as características clínico-demográficas e a transmissão recente. Apesar disso, nossos dados demonstram que pacientes com determinadas características estão mais propensos a desenvolver TB devido à transmissão recente. Observamos que, pacientes com isolados resistentes, pacientes sem tratamento prévio e diabéticos estão mais propensos a desenvolver TB devido à transmissão recente, enquanto pacientes negros e pacientes previamente tratados tendem a reativar TB latente.

Small *et al.* (1994a) relataram que ser negro pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da TB e também pode estar associado à transmissão recente. Cafrune (2003) relatou que pacientes negros estariam mais propensos a desenvolver TB por transmissão recente. Neste estudo observamos que, na RM de Porto Alegre estes pacientes estão mais propensos a desenvolver TB por reativação.

Após estratificação dos dados por local de origem dos pacientes (ambulatório ou hospital), observamos que aqueles com TB MDR oriundos de unidades ambulatoriais estão mais propensos a desenvolver esta doença por transmissão recente que aqueles provenientes de hospital. Borges (2003) relatou que a presença de TB MDR foi fator de

risco para a transmissão recente onde foram analisados pacientes de um centro de saúde ambulatorial no município de Porto Alegre. Outros estudos demonstram que ser portador de TB MDR é fator de risco para transmissão recente quando isolados de pacientes atendidos em hospitais foram analisados (Fandinho *et al.*, 2000).

Apesar do RS ser o 3º estado do país com maior incidência de HIV, 20/100.000 habitantes (DATASUS, 2000), quando analisamos os 171 isolados sem estratificação observamos que a infecção por HIV não está associada com o desenvolvimento de TB nem com transmissão recente, concordando com outros estudos realizados na Europa (Holanda - van Soolingen *et al.*, 1997 e Paris - Gutierrez *et al.*, 1998), mas contrário aos resultados encontrados em trabalhos realizados nos Estados Unidos e na Alemanha, onde a presença do vírus HIV é um fator de risco para transmissão recente (Small *et al.*, 1994; Kamerbeek *et al.*, 1997; Jasmer *et al.*, 1999; Diel *et al.*, 2002). É importante salientar que 33,3% dos pacientes não realizaram o teste anti-HIV, isto pode ter grande influência nos resultados obtidos em relação à reativação e transmissão recente.

A diabetes é uma doença severa, considerada um fator de risco para desenvolvimento da TB. A incidência e a prevalência desta doença em diabéticos é de duas a quatro vezes maior que na população em geral (Opsahl *et al.*, 1961; Martins & Araújo, 1993). Foi observado que 24,5% dos pacientes eram diabéticos, dos quais 58,3% desenvolveram TB devido a transmissão recente. Yang *et al.* (2001) demonstraram que 26,4% dos pacientes estudados eram diabéticos, frequência semelhante à encontrada neste estudo, porém não observaram associação com transmissão recente. Nossos resultados são similares aqueles apresentados por Fitzgerald *et al.* (2003) que analisaram cepas do Canadá. Nossos dados sugerem que este grupo (diabéticos) conhecido por ter um alto risco de desenvolvimento de doença ativa, parece estar provavelmente relacionado com a transmissão recente.

A maioria das informações sobre morbidade e mortalidade é baseada em dados oficiais de qualidade variável (Kumaresan, 2002). A descrição precisa de dados epidemiológicos por tempo, local, idade, gênero entre outras informações podem ajudar a identificar grupos especiais e segmentos da população que estejam necessitando mais atenção, além de possibilitar um planejamento estratégico das medidas de controle priorizando os grupos com maior incidência de TB. Nós observamos que aproximadamente 9% dos casos com cultura positiva de nosso trabalho não foram notificados oficialmente, sendo que 20% destes pacientes morreram devido a TB. Isto mostra a grande falha existente nos cadastros dos sistemas oficiais de notificação da doença, o qual é descentralizado e a notificação é realizada muitas vezes por pessoas

sem treinamento adequado para esta tarefa. Dessa forma, os dados acabam sendo perdidos e a epidemiologia por sua vez não mostra a real magnitude da doença.

Em virtude da realização deste estudo com uma amostragem não-aleatória de conveniência, não é possível extrapolar nossos achados como uma descrição definitiva de qualquer aspecto da epidemiologia da tuberculose na RM de Porto Alegre. Entretanto, um estudo mais amplo que abranja uma população mais diversa e com amostragem prospectiva deve ser realizado para identificar fatores associados com o desenvolvimento de TB a partir da transmissão recente. Também seria necessário aprofundar a investigação epidemiológica de casos com padrões idênticos de RFLP, o que não foi possível devido ao caráter retrospectivo deste trabalho.

Estudos adicionais são necessários para caracterizar cepas com 6 ou menos cópias de IS6110 por outra técnica molecular (*spoligotyping*) já que a técnica de RFLP tem um baixo poder discriminatório quando analisadas cepas com baixo número de cópias de IS6110.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta uma visão geral da tuberculose na Região Metropolitana de Porto Alegre utilizando dados obtidos da epidemiologia clássica e molecular além de uma estimativa do nível de resistência na população estudada. Este estudo permitiu a organização de um banco de isolados de *M. tuberculosis* circulantes na RM de Porto Alegre. Este banco poderá servir como base para trabalhos futuros e permitirá o monitoramento da introdução de novos padrões de cepas na população. Os resultados mostraram que o índice de resistência entre os isolados dos pacientes estudados é muito elevado (63,8%), muito provavelmente devido ao uso inadequado dos fármacos ou por falência terapêutica. A partir dos dados disponíveis da técnica de RFLP, foi possível estimar a proporção de transmissão recente. A correlação dos dados clínicos e demográficos dos pacientes foi realizada a fim de encontrarmos fatores de risco para transmissão recente. Nenhuma das características analisadas foi associada significativamente com transmissão recente, porém foi possível observar que pacientes infectados por cepas resistentes, pacientes que nunca trataram TB anteriormente e diabéticos apresentam uma tendência a desenvolver TB devido à transmissão recente. Dessa forma, fica evidente que, na população selecionada, a transmissão recente não é o único fator responsável pela manutenção da incidência.

7. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para continuação do mesmo são:

- Realização da técnica de *spoligotyping* (*spacer oligotyping*) para todos os isolados em *cluster*;
- Análise de um número maior de isolados sem tratamento prévio;
- Identificar fatores de risco para transmissão recente após análise epidemiológica dos isolados sem tratamento prévio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afiune, J. B., and J. I. Neto.** 1993. Diagnóstico da tuberculose pulmonar escarro negativo. *J. Pneumol.* **19**:37-41.
- Agasino, C. B., A. Ponce de Leon, R. M. Jasmer, and P. M. Small.** 1998. Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains in San Francisco that do not contain IS6110. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2**: 518-520.
- Alland, D., T. S. Whittam, M. B. Murray, M. D. Cave, M. H. Hazbon, K. Dix, M. Kokoris, A. Duesterhoeft, J. A. Eisen, C. M. Fraser, and R. D. Fleischmann.** 2003. Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: Application to *Mycobacterium tuberculosis* evolution and pathogenesis. *J. Bacteriol.* **185**: 3392-3399.
- Alland, D., G. E. Kalkut, A.R. Moss, R. A. McAdam, J. A. Hahn, W. Bosworth, E. Drucker, and B. R. Bloom.** 1994. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N. Engl. J. Med.* **17**:1710-1716.
- American Thoracic Society (ATS).** 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. The official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention (CDC) and the Council of the Infectious Disease Society of America. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **161**:1376-1395.
- Atlas, R. M.** 1995. (Ed). *Microrganisms in our world.* St. Louis: Mosby-Year Book, Inc.
- Baptista, I. M. F. D., M. C. Oelemann, D. V. A. Opromolla, and P. N. Suffys.** 2002. Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virus- infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**: 1147-1152.
- Barnes, P. F. and M. D. Cave.** 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *New England J. Med.* **349**:1149-1156.
- Barnes, P. F , Z. h. Yang, S. Preston-Martin, J. M. Pagoda, B. E. Jones, M. Toalla, K. D. Eisenach, L. Knowles, S. Harvey, and M. D. Cave.** 1997. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *JAMA* **278**:1159-1163.
- Barnes, P. F., H. El-Hajj, S. Preston-Marin, M. D. Cave, B. E. Jones, M. Otaya.** 1996. Transmisión of tuberculosis among the urban homeless. *JAMA* **275**: 305-307.
- Bates, J. H.** 1982. Tuberculosis: susceptibility and resistance. *Am. Rev. Respir. Dis.* **125**: 20-24.
- Bauer, J., A. B. Andersen, K. Kremer, and H. Miörner.** 1999. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2602-2606.
- Bauer, J., Z. Yang, S. Poulsen, and A. b. Andersen.** 1998. Results from 5 years of nationwide DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a community with a low incidence of *M. tuberculosis* infection. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 305-308.

- Bifani, P. J., B. Mathema, N. E. Kurepina, and B. N. Kreiswirth.** 2002. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijin family strains. *TRENDS in Microbiol.* **10**:45-52.
- Bifani, P. J., B. B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M. Lutfey, S. L. Moghazeh, W. Eisner, T. M. Daniel, M. H. Kaplan, J.T . Crawford, J. M. Musser, and B. N. Kreiswirth.** 1996. Origin and interstate spread of a New York city multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA.* **275**: 452-457.
- Blackwood, K. S., A. Al-Azem, L. J. Elliott, E. S. Hershfield, and A. M. Kabani.** 2003. Conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in Manitoba. *BMC infect. Dis.* **3**: 18-24.
- Bloom, B. R.** 1994. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, DC.
- Bonora, S., M. C. Gutierrez, Di Perri, G., F. Brunello, B. Allegranzi, M. Ligozzi, R. Fontana, E. Concia, and V. Vincent.** 1999. Comparative evaluation of ligation-mediated PCR and spoligotyping as screening methods for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3118-3123.
- Borges, M.** 2003. Estudo da transmissão da tuberculose através da epidemiologia molecular no Centro de Saúde Navegantes em Porto Alegre. Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Luterana do Brasil para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.
- Braden, C. R., G. L. Templeton, M. D. Cave, S. Valway, I. M. Onorato, K. G. Castro, D. Moers, Z. Yang, W. W. Stead, and J. H. Bates.** 1997. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J. Infect. Dis.* **175**: 1446-1452.
- Brasil.** 1994. Ministério da Saúde. Fundação nacional de Saúde. Centro de referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2ª ed. Rio de Janeiro.
- Brasil.** 1996. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde: Coordenação de DST e AIDS. *Bol. Epidemiol.* **9** (4).
- Brasil.** 2002a. Ministério da Saúde. Manual técnico para o controle da Tuberculose: Cadernos de atenção básica- 6. ed. Rev. Ampl. Brasília.
- Brasil.** 2002b. Fundação Nacional de Saúde/FUNASA. Guia de Vigilância Epidemiológica. 1. ed. Brasília.
- Brolio R. and M. T. L. Filho.** 1996. Doenças infecciosas e Parasitárias. Tratado de Infectologia.
- Cafrune P. I.** 2003. Epidemiologia Molecular da tuberculose no interior do Rio Grande do Sul. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.
- Cafrune, P. I.** 2000. Comparação das Técnicas de RFLP e DRE-PCR para a Diferenciação de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis*. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ênfase em Biologia Celular, Molecular e Funcional.
- Calusni, A. L. R., G. N. Roscani, M. C. Villares, H. Soini, E. Graviss, and M. C. Ramos.** 2003. IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated

- from patients with pulmonary tuberculosis in Campinas, Brazil. Evidence of International Distribution of Strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**: 655-8.
- Camus, J. C., M. J. Pryor, C. Médigue, and S. T. Cole.** 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **148**:2967-2973.
- Canetti, G. W., N. Rist, and J. Groseet.** 1963. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétation. *Rev. Tuberculose Pneumol.* **27**: 217-272.
- Carricajo, A., V. Vincent, P. Bethlot, P. Gery, and G. Aubert.** 1999. Mycobacterial cross-contamination of broncoscope detected by molecular techniques. *J. Hosp. Infect.* **42**: 252-53.
- Cave, M. D., K. D. Eisenach, S. Jonckheere, L. Verbist, and J. van Eldere.** 1991. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol. Cell. Probes* **5**: 73-80.
- Chan-Yeung, M., C. Tam, H. Wong, C. Leung, J. Wang, W. Yew, C. Lam, and K. Kam.** 2003. Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in Hong- Kong: a population-based prospective study. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2706-2708.
- Chaves, F., Z. Yang, H. el Hajj, M. Alonso, W. J. Burman, K. D. Eisenach, F. Dronda, J. H. Bates, and M. D. Cave.** 1996. Usefulness of the secondary probe pTBN12 in DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 3572-3576.
- Chevrel-Dellagi, D., A. Abderrahman, R. Haltiti, H. Koubaji, B. Gicquel, and K. Dellagi.** 1993. Large-scale DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2446-2450.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmer, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**: 537-544.
- Collins, D.M., and D.M. Stephens.** 1991. Identification of insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **83**: 11-16.
- Conde, M. B.; G. M. Souza, and A. L. Kritski.** 2002. Tuberculose sem medo. São Paulo. Editora Atheneu.
- Dahle, U. R., P. Sandven, E. Heldal, T. Mannsaaker, and D. A. Caugant.** 2003. Deciphering an outbreak of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 67-72.
- Dalcolmo, M. P., A. Fortes, F. F. Melo, R. Motta, J. I. Netto, N. Cardoso, M. Andrade, A. W. Barreto, e G. Gerhardt.** 1999. Estudo da efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. *J. Pneumol.* **25**:70-77.
- Dale, J. W.** 1995. Mobile genetic elements in micobactéria. *Eur. Resp. J.* **8**:633-648.

- Daley, C.L., P. M. Small, G. F. Schecter, G. K. Schoolnik, R. A. McAdam, W. R. Jacobs Jr , and P. C. Hopewell. 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among person infected with thwe human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.* 326:231-235.
- de Boer, A. S., M. W. Borgdorff, P. E. de Haas, N. J. Nagelkerke, J. D. van Embden, and D. van Soolingen. 1999. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J. Infect. Dis.* 180: 1238-1244.
- Diel, R., S. Schneider, K. Meywald-Walter, C. M. Ruf, S. Rüsç-Gerdes, and S. Niemann. 2002. Epidemiology of tuberculosis in Hamburg: long-term population-based analysis alplying classical and molecular epidemiological techniques. *J. Clin. Microbiol.* 40: 532-539.
- Dweyer, B. K. Jacson, K. Raios, A. Sievers, E. Wilshire, and B. Ross. 1993. DNA restriction fragment analysis to define an extend *cluster* of tuberculosis in homeless men and their associates. *J. Infect. Dis.* 167: 490-494.
- Edlin, B. R., J. L. Tokars, M. H. Griego, J. T. Crawford, J. Willians, E. M. Sordillo, K. R. Ong, J. Q. Kiburn, S. W. Dooley, K. G. Castro, W. R. Jarvis, and S. D. Holmberg. 1992. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Eng. J. Med.* 326: 1514-1521.
- Ellis, B. A., J. T. Crawford, C.R. Braden, S. j. N. McNabb, m. Moore, S. Kammerer, and National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network Work Group. 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis in a sentinel surveillance population. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1197-1209.
- Fandinho, F. C. O., A. L. Kritski, C. Hofer, H. Conde Jr., R. M. C. Ferreira, M. H. F. Saad, M. G. Silva, L. W. Riley, and L. S. Fonseca. 2000. RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans.Royal Soc. Trop. Med. and Hygiene.* 94: 271-275.
- Farer, L. S., L. M. Lowell, and M. P. Meador. 1979. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 109: 205-217.
- Ferdinand, S., C. Sola, B. Verdol, E. Legrand, K. S. Goh, M. Berchel, A. Aubéry, M. Timothée, P. Joseph, J. W. Pape, and N. Rastogi. 2003. Molecular characterization and drug resistance patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in an AIDS counseling center in Port-au-Prince, Haiti: 1-year study. *J. Clin. Microbiol.* 41: 694-702.
- Ferrazoli, L., M. Palaci, L. R. M. Marques, L. F., Jamal, J. B. Afiune, E. Chimara, M. C. Martins, M. A. S. Telles, C. A. F. Oliveira, M. C. Palhares, D. T. A. Spada, and L. Riley. 2000. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 4: 1-8.
- Filho, G. G., and M. A. Hajar. 1993. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. *Jornal de Pneumologia* 19: 4-10.
- Filho, L.A., A.L. Kritski, C.L. Salles, I.G. Sardella, M.G. Silva, L.S. Fonseca and M. H. Saad. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* typing: usefulness of DRE-PCR to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory of a general reference hospital for AIDS. *Int J Tubercle Lung Dis.* 6:150-4.

- Filliol, I., J. R. Driscoll, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, D. D. Anh, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R. C. Cooksey, D. V. Cousins, J. W. Dale, O. A. Dellagostin, F. Drobniowski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, H. Heersma, G. Kallenius, E. Kassa-Kelembho, T. Koivula, H. M. Ly, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Mostrom, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S. N. Niobe-Eyangoh, J. W. Pape, V. Rasolofo-Razanamparany, M. Ridell, M. L. Rossetti, F. Stauffer, P. N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J. H. De Waard, C. Sola, N. Rastogi. 2002. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 1347-1349.
- Filliol, I., S. Ferdinand, L. Negroni, C. Sola, and N. Rastogi. 2000. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2520-2524.
- Fitzgerald, J. M., A. Fanning, V. Hoepfner, E. Hersfield, D. Kunimoto and the Canadian Molecular Epidemiology of TB Study Group. 2003. The molecular epidemiology of tuberculosis in Western Canada. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **7**: 132-138.
- Fiúza de Melo, F. A., M. P. Dalcolmo, and A. Rufino Neto. 1997. I Consenso Brasileiro de tuberculose- 1997. *Jornal de Pneumologia* **23**: 294-342.
- Fiúza de Melo, F. A., and J. B. Afiune. 1993b. Quimioterapia da tuberculose: bases, condutas e procedimentos. *J. Pneumol.* **19**: 42-49.
- Fiúza de Melo, F.A., and J.B. Afiune. 1993a. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. *J. Pneumol.* **19**: 19-24.
- Fiúza de Melo, F. A. 1985. A internação de pacientes tuberculosos e o problema da infecção hospitalar. *Pneum. Paulista (Bol. da SPPT)* **1**: 7-8.
- Fleishman, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikura, W. Bishai, W. R. Jr Jacobs, J. C. Venter, and C. M. Fraser. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* **184**: 5479-5490.
- Fomukong, N., M. Beggs, H. el Hajj., G. Templeton, K. Eisenach, and M. D. Cave. 1998. Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. *Tuberc. Lung Dis.* **78**: 109-116.
- Foxman, B., and L. Riley. 2001. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am. J. Epidemiol.* **153**: 7-13.
- French, A. L., S. F. Welbel, S. E. Dietrich, L. B. Mosher, P. S. Breall, W. S. Paul, F. E. Kocka, and R. A. Weinstein. 1998. Use of DNA fingerprinting to assess tuberculosis infection control. *Ann.Int. Med.* **129**: 856-861.
- Frieden, T. R., L. F. Sherman, K. L. Maw, P. I. Fujiwara, J. T. Crawford, B. Nivin, V. Sharp, D. Hewlett Jr, K. Brudney, D. Alland, B. N. Kreiswirth. 1996. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA* **276**:1229-1235.

- Friedman, C. R., M. Y. Stoeckle, B. N. Kreiswirth, W. D. Jonshon & L. W. Riley. 1997. Widespread dissemination of a single drug-susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* **176**: 478-484.
- Friedman, C. R., M. Y. Stoeckle, B. N. Kreiswirth, W. D. Johnson Jr., S. M. Manoach, J. Berger, K. Sathianathan, S. Hafner, and L. W. Riley. 1995b. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a large urban setting. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**: 355-359.
- Friedman, C. R., M. Y. Stoeckle, W. D. Johnson Jr., and L. W. Riley. 1995a. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *M. tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1383-1384.
- Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connel. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* **144**: 1189-1196.
- Fujiwara, P. P., S. V. Cook, C. M. Rutherford, J. T. Crawford, S. E. Glickman, B. N. Kreiswirth, P. S. Sachdev, S. S. Osahan, A. Ebrahimzadeh, and T. R. Frieden. 1997. A continuing survey of drug-resistant tuberculosis, New York City, April 1994. *Arch. Intern. Med.* **157**: 531-536.
- Gillespie, S. H., A. Dickens, and T. D. McHugh. 2000. False molecular clusters due to nonrandom association of IS6110 with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2081-2086.
- Girardi, E., G. Antonucci, M. Tronci, E. Bordi, and G. Hipolito. 1996. Drug resistance patterns among tuberculosis patients among tuberculosis patients in Rome, 1990-1992. *Scand. J. Infect. Dis.* **28**: 487-491.
- Githui, W.A., S.M. Wilson, and F.A. Drobniowski. 1999. Specificity of IS6110-based DNA fingerprinting and diagnostic techniques for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1224-1226.
- Goguet de la Salmonière Y. O., H. M. Li, G. Torrea, A. Bunschoten, J. van Embden, and B. Gicquel. 1997. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1921-1926.
- Gonçalves, J., S. D. Costa, A. F. Menezes, and A. F. Leal. 1999. Tuberculosis treatment adherence in Pelotas. *Cad. Saúde Públ.* **15**:777-787.
- Goulding, J. N., J. Stanley, N. Saunders, and C. Arnold. 2000. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1121-1126.
- Goyal, M., N. A. Saunders, J. D. A. van Embden, D. B. Young, and R. J. Shaw. 1997. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 647-651.
- Gutiérrez, M. C., V. Vincent, D. Aubert, J. Bizet, O. Gaillot, L. Lebrun, C. Le Pendeven, M. P. Le Pennec, D. Mathieu, C. Offredo, B. Pangon, and C. Pierre-Audigier. 1998. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 486-492.

- Hawkey, P.M., E.G. Smith, J. T. Evans, P. Monk, G. Bryan, H. H. Mohamed, M. Bardhan, and R. N. Pugh. 2003. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* **41**: 3514-3520.
- Heersma, H. F., K. Kremer, and J. D. A. van Embden in Parish, T. 1998. *Mycobacteria protocols*. Humana Press. Totowa, New Jersey. 395-422.
- Hermans, P. W. M., D. van Soolingen, E. M. Bik, P. E. W. de Haas, J. W. Dale, and J. D. A. Embden. 1991. The insertion element IS986 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* **59**: 2695-2705.
- Hermans, P. W. M., F. Messadi, H. Guebrexabher, D. van Soolingen, P. E. W. de Haas, H. Heersma, H. Neeling, A. Ayoub, F. Portaels, D. Frommel, M. Zribi, and J. D. A. van Embden. 1995. Analysis of population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J. Infect. Dis.* **171**: 1504-1513.
- Hermans, P. W., D. van Soolingen, and J. D. van Embden. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *M. tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J. Bacteriol.* **174**: 4157-4165.
- Hermans, P.W.M., A.R.J. Schuitema, D. van Soolingen, C.P.H.J. Versteijnen, E.M. Bik, J.E.R. Thole, A.H.J. Kolk, and J.D.A. van Embden 1990. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1204-1213.
- Hijjar, M. A., M. J. P. R. Oliveira, and G. M. Teixeira. 2001. A tuberculose no Brasil e no mundo. *Bol. Pneumol. San.* **9**: 9-16.
- Hopewell, P.C. in Bloom, B.R. 1994. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. ASM Press, Washington, DC. 25-46.
- Huygen, K., J. Content, O. Denis, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, R. R. Deck, C. M. DeWitt, I. M. Orme, S. Baldwin, C. D'Souza, A. Drowart, E. Lozes, P. Vandenbussche, J. P. Van Vooren, M. A. Liu, and J. B. Ulmer. 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat. Med* **2**: 893-898.
- Ivens-de-Araújo, M. E., F.C. Fandinho, A. M. Werneck-Barreto, V. Gonçalves-Veloso, B. Grinstejn, M. K. Lourenço, E. Werneck-Barroso, W.M. Degraive, and P.N. Suffys. 1998. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with and without AIDS in Rio de Janeiro. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **31**: 369-72.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2002. *Imunologia: O sistema imune na saúde e na doença*. 5ª ed. Porto alegre. Artmed,
- Jardim, S., M. O. Ribeiro, and R. M. Castro. Anti-tuberculosis drug resistance in Rio Grande do Sul State, Brazil. Poster sessions/Global Congress on Lung Health 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 1998 Nov 23-26; Bangkok, Thailand. Poster N. ° 680PD

- Jasmer, R. M., J. A. Hahn, P. M. Small, C. L. Daley, M. A. Behr, A. R. Moss, J. M. Creasman, G. F. Schecter, E. A. Paz, and P. C. Hopewell. 1999. A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco, 1991-1997. *Arch. Intern. Med.* **130**: 971-978.
- Jasmer, R. M., M. Roemer, J. Hamilton, J. Bunter, C. R. Braden, T. M. Shinnick, and E. P. Desmond. 2002. A prospective, multicenter study of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 1260-1263.
- Jereb, J. A., D.R. Berwin, S. W. Dooley, and W. H. Haas. 1993. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Infect Dis.* **168**: 1219-1224.
- Jereb, J. A., R. M. Klevens, T. D. Privett, P. J. Smith, J. T. Crawford, V. L. Sharp, B. J. Davis, W. R. Jarvis, and S. W. Dooley. 1995. Tuberculosis in health care workers at a hospital with an outbreak of multidrug-resistant *M. tuberculosis*. *Arch. Intern. Med.* **155**: 854-859.
- Jewwetz, E. 1995. Medical microbiology. 20th ed. Appleton & Lange. USA.
- Kallenius, G., T. Koivula, S. Ghebremichael, S. E. Hoffner, R. Norberg, E. Svensson, F. Dias, B. I. Marklund, and S. B. Svenson. 1999. Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Guinea-Bissau. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3872-3878.
- Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. D. A. van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 907-914.
- Kanduma, E.; McHgh, T. D. and S. H. Gillespie. 2003. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J. Applied Microbiol.* **94**:781-791.
- Kochi, A. 1997. Tuberculosis control: is DOTS the health breakthrough of the 1990s?. World Health Forum, Geneva, vol. 18.
- Kong, P. M., J. Tapy, P. Calixto, W. J. Burman, R. R. REves, Z. Yang, and M. D. Cave. 2002. Skin-test screening and tuberculosis transmission among homeless. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 1280-1284.
- Kremer, K., D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. M. Hermans, C. Martín, P. Palittapongarpim, B. B. Pliikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M. Musser, and J. D. A. van Embden. 1999. 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.* **37**: 2607-2618.
- Kritski, A. L., M. B. Conde, and L. Jamal. 1998. Tuberculose e infecção pelo HIV: aspectos atuais sobre diagnóstico, tratamento e prevenção. *Bol. Pneumol. San.* **6**: 53-61.
- Kritski, A. L., M. B. Conde, and G. R. M. Sousa. 2000. Tuberculose do Ambulatório à Enfermaria. 2^a ed. Editora Atheneu. São Paulo.

- Kritski, A. L., M. P. Dalcolmo, R. Bravo de Souza, T. Hollanda, P. P. Gontijo Filho and F. A. Fiuzza de Melo.** 1993. Tuberculose entre profissionais de saúde. Risco ocupacional? *J. Pneumol.* **19**: 113-121.
- Krüüner, A., L. Pehme, S. Ghebremichael, T. Koivula, S. E. Hoffner, and M. Mikelsaar.** 2002. Use of molecular techniques to distinguish between treatment failure and exogenous reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 146-155.
- Kubín, M., M. Havelková, I. Hynčicová, Z. Švecová, J. Kaustová, K. Kremer, and D. van Soolingen.** 1999. A multidrug-resistant tuberculosis microepidemic caused by genetically closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2715-2716.
- Kudoh, S., and T. A. Kudoh.** 1974. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bulletin of the WHO.* **51**:71-82.
- Kumaresan, J.** 2002. Epidemiology. In: Narain, J. P. *Tuberculosis: Epidemiology and Control.* World Health Organization. 1ed. P.16-30.
- Kurepina, N. E., S. SreeVatsan, B. B. Plikaytis, P. J. Bifani, N. D. Connell, R.J. Donnelly, D. van Sooligen, J.M. Musser, and B. N.Kreiswirth.** 1998. Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis*: non-random integration in the dnaA-dnaN region. *Tuber. Lung. Dis.* **79**: 31-42.
- Kwara, A., R. Schiro, L. S. Cowan, N. E. Hyslop, M. F. Wiser, S. R. Harrison, P. Kissinger, L. Diem, and J. T. Crawford.** 2003. Evaluation of the Epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2683-85.
- Lee, S. G., L.I.I Lynn, I.I.K. Irene, B. Richard, and S. Yew Wong.** 2002. Discrimination of single copy IS6110 DNA fingerprints of *M. tuberculosis* isolates by high resolution minisatélites based typing. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 657- 659.
- Lima, M. B., D. Mello, A. P. Moraes, W. C. Silva.** 2001. Estudo de casos sobre abandono do tratamento da tuberculose. *Cad. Saúde Pub.* **17**: 877-885.
- Lima, M. M., M. Belluomini, M. M. M Almeida, and G. R. Arantes.** 1997. Co-infecção HIV/tuberculose: necessidade de uma vigilância mais efetiva. *Rev. Saúde Pública* **31**: 217-220.
- Lin, R., E. M. Bernard, D. Armstrong, C. Chen, L. W. Riley.** 1996. Transmission patterns in Taiwan: analysis by restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Infect. Dis.* **1**:18-21.
- Liu, Z., K.L. Shilkret, L. Finelli.** 1998. Epidemiology of drug-resistant tuberculosis in New Jersey from 1991-1195. *Int. J. Epidemiol.* **17**: 121-126.
- Lok, K. H., W. H. Benjamim, M. E. Kimerling, V. Pruitt, M. Lathan, J. Razeq, N. Hooper, W. Cronin and N. E. Dunlap.** 2002. Molecular differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains without IS6110 insertions. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:1310-1313.
- Lourenço, M.C.S., B. Grinsztejn, F. C. O. Fandinho-Montes, M. G. Silva, M. H. F. Saad, and L. S. Fonseca.** 2000. Genotypic patterns of multiple isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from tuberculous HIV patients. *Trop. Med. Int. Health* **5**: 488-94.

- Lowrie, D. B., R. E. Tascon, V. L. D. Bonato, V. M. F. Lima, L. H. Faccioli, E. Stravropoulos, M. J. Colston, R. G. Hewinson, K. Moelling, and C. L. Silva.** 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* **400**: 269-271.
- Lucas, S. and A. M. Nelson.** 1994. Pathogenesis of tuberculosis in human immunodeficiency virus-infected people. In: Bloom, B. R.ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, control.* Washington, American Society of Microbiol. P. 503-513.
- Maguire, H. J. W. Dale, T. D. McHugh, P. D. butcher, S. H. Gillespie, A. Costetsos, H. Al-Ghuscin, R. Holland, A. Dickens, L. Marston, P. Wilson, R. Pitman, D. Strachan, F. A. Drobeniewski, and D. K. Banerjee.** 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis of tuberculosis in London 1995-1997 demonstrating low rate of active transmission. *Thorax* **57**: 617-622.
- Martins, A. C. P., and L. M. B. Araújo.** 1993. Tuberculose e diabetes mellitus. *J. Pneumol.* **19**:110-112.
- Maslow, J. N., M. E. Mulligan, and R. D. Arbeit.** 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* **17**: 153-164.
- Mayaud, C. and J. Cadranel.** 1999. Tuberculosis in AIDS: past or new problems? *Thorax* **54**: 567-71.
- McAdam, R. A., P. W. M. Hermans, D. van Soolingen, Z. F. Zainuddin, D. Catty, J. D. A. van Embden, and Dale, J. W.** 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol. Microbiol.* **4**: 1607-1613.
- McConkey, S. J., M. Willians, D. Weiss, H. Adams, M. D. Cave, Z. Yang, T. Lindner, and T. C. Bailey.** 2002. Prospective use of molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of restriction fragment-length polymorphism in a public tuberculosis-control program. *Clin. Infec. Dis.* **34**: 612-619.
- McNabb, S. J. N., C. R. Braden, and T. R. Navin.** 2002. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: lessons learned and implications for the future. *Emerg. Infec. Dis.* **8**: 1314-1318.
- Mendiola, M. V., C. Martín, I. Otal, and B. Gicquel.** 1992. Analysis of the regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Res. Microbiol.* **143**: 767-772.
- Montoro, E., J. Valdivia, and S. C. Leão.** 1998. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Havana, Cuba, by IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and by the double-repetitive-element PCR method. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3099-3102.
- Morrone, N., Solha, M. S. S.** 1983. Incidência de tuberculose-doença e do teste tuberculínico positivo em crianças expostas a pacientes com tuberculose. *Ver. Assoc. Med. Bras.* **29**: 182-188.
- Moss, A. R., D. Alland, E. Telzak, D. Hewlett, V. Sharp, P. Chillade, V. LaBombardi, D. Kabus, B. Hanna, L. Palumbo, K. Brudney, A. Weltman, K. Stoeckle, K. Chirgwin, M. Simberkoff, S. Moghazeh, W. Eisner, M. Lutfey, B. Kreiswirth.** 1997. A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. *Int. J. Tub. Lung Dis.* **1**: 115-121.

- Moström, P., M. Gordon, C. Sola, M. Ridell, and N. Rastogi.** 2002. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**: 694-704.
- Muniz, J. N., and T. C. S. Villa.** 2002. O impacto epidemiológico do tratamento supervisionado no controle da tuberculose em Ribeirão Preto 1998-2000. *Bol. Pneum. Sanit.* **10**: 49-54.
- Muniz, J. N., Villa, T.C.S. and C. E. Pedersolli.** 1999. Tratamento supervisionado co controle da tuberculose em Ribeirão Preto: Novo modo de agir em saúde. *Bol. Pneum. Sanit.* **7**: 33-42.
- Munsiff, S. S., T. Bassoff, B. Nivin, J. Li, A. Sharma, P. Bifani, B. Mathema, J. Driscoll, and B.N. Kreiswirth.** 2002. Molecular epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:1230-1238.
- Murray, P. J.; A. Aldovini, and R. A. Young.** 1996. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacilli Calmette-Guerin strain that secrete cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 934-939.
- Narayanan, S., S. Das, R. Garg, L. Hari, V. B. Rao, T. R. Frieden, and P. R. Narayanan.** 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in south India: implications for disease control and prevention. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4785-4788.
- Niemann, S., S. Rüsç-Gerdes, and E. Richter.** 1997. IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3015-3020.
- Olive, D. M., and P. Bean.** 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1661-1669.
- Opsahl, R., H. O. Riddervold, and T. Wessel.** 1961. Pulmonary tuberculosis in mitral stenosis and diabetes mellitus. *Acta Tuberc. Scand.* **40**:290-296.
- Otal, I., C. Martin, V. Vincent-Lévy-Frebault, D. Thierry, and B. Gicquel.** 1991. Restriction Fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1252-1254.
- Ott, W. P., and R. S. Gutierrez.** 1993. In: Ott, W. P. Tuberculose: Epidemiologia, diagnóstico, tratamento em clínica e saúde pública. Ed. Médica e Científica, Rio de Janeiro. P.159-224.
- Pablos-Mendez, A., M. C. Raviglione, A. Laszlo, N. Binkin, H. I. Rieder, F. Bustreo, D. L.Cohn, C. S. B. L. Weezenbeek, S. J. Kim, P. Chaulet, and P. Nunn.** 1998. Global surveillance for antituberculosis- drug resistance, 1994-1997. *New Eng. J. Med.* **338**: 1641-1649.
- PAHO.** 2003. Construyendo paso a paso: Guía sobre atención integral de personas que viven con la coinfección de TB/VIH en América Latina e el Caribe. Organización Panamericana de Salud.
- Park, Y. K., G. H. Bai, and S. J. Kim.** 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the Western Pacific Region. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 191-197.
- Pieters, J., J. Gatfield.** 2002. Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages. *TRENDS in Microbiol.* **10**: 142-146.
- Plikaytis, B. B., J. L. Marden, J. T. Crawford, C. L. Woodley, W. R. Butler, T. M. Shinnick.** 1994. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1542-1546.

- Queiroz, G. L., G. S. G. Magalhães, M. D. Baliza, A. Bach, M. Carneiro, R. Ximenes, M.F.M. Albuquerque and N. Lucena-Silva.** 2003. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients from Recife, Pernambuco. Livro de resumos da XXXII Reunião Anual da SBBQ. Pg.85 F-77.
- Ramos, M. C., H. Soini, G. C. Roscanni, M. Jaques, M. C. Villares, and J. M. Musser.** 1999. Extensive Cross-Contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a Reference Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **37**:916-9.
- Rasolofon-Razanamparany, V., H. Ramarokoto, G. Aurégan, B. Gicquel, and S. Chanteau.** 2001. A combination of two genetic markers is sufficient for restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex in areas with a high incidence of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1530-1535.
- Raviglione, M. C. D. E. Zinder, and A. Kochi.** 1995. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity of a world wide epidemic. *JAMA* **273**: 220-226.
- Regner, L., and L. Loreto.** 2003. Transposons. In: Zaha, A. *Biologia Molecular Básica*. 3ed. P. 202-227.
- Reigota, R. M. S. and L. Carandina.** 2002. Implantação do tratamento supervisionado no município de Bauru/SP-Avaliação da tuberculose pulmonar, 1999/2000. *Bol. Pneumol. Sanit.* Vol 10 nº1 – Jan/Jun.
- Rose, D. N., S. Vetter, and A. Gutman.** 1998. Diagnosis and management of tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Semin. Respir. Infect.*; **14**: 344-52.
- Ross, B. C., K. Raios, K. Jackson, and B. Dwyer.** 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 942-946.
- Rossetti, M. L. R., S. B. Jardim, V. F. S. Rodrigues, A. R. Moura, H. Oliveira, and A. Zaha.** 1997. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J. Microbiol. Met.* **28**: 139-146.
- Rouillon, A., S. Perdritz, and R. Parrot.** 1976. Transmission of tubercle bacilli: the effects of chemotherapy. *Tubercle.* **57**: 275-99.
- Samper, S., M. J. Iglesias, M. J. Rabanaque, M. A. Lezcano, L. A. Vitoria, M. C. Rubio, R. Gómez-Lus, L. I. Gómez. I. Otal, and C. Martín.** 1998. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2**: 281-287.
- Sepkowitz, K. A., J. Raffalli, L. Riley, T. E. Kiehn, and D. Armstrong.** 1995. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin. Microbiol.* **8**: 180-199.
- SES-RS.** 2001. Secretaria da Saúde do Estado do Rio grande do Sul. Programa de Controle da Tuberculose.
- SES-RS.** 2003. Secretaria da Saúde do Estado do Rio grande do Sul. Programa de Controle da Tuberculose.

- Singh, S. P., H. Salamon, C. J. Lahti, M. Farid-Moyer, and P. M. Small.** 1999. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1927-1931.
- Small, P. M., and A. Moss.** 1993. Molecular epidemiology and the new tuberculosis. *Infect. Agents Dis.* **2**: 132-138.
- Small, P. M., and J. D. A. van Embden.** In: Bloom, B. R. 1994. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, DC. 569-582.
- Small, P. M., P. C. Hopewell, S. P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D. C. Ruston, G. F. Schecter, C. L. Daley, and G. K. Schoolnik.** 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N. Engl. J. Med.* **330**: 1703-1709.
- Smith, P. G., and A. R. Moss.** In: Bloom, B. R. 1994. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, DC. 47-59.
- Soini, H., X. Pan, L. Teeter, J. M. Musser, and E. A. Graviss.** 2001. Transmission dynamics and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 217-221.
- Sola, C., I. Filliol, M. C. Gutierrez, I. Mokrousov, V. Vincent, and N. Rastogi.** 2001a. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis* : biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 390-396.
- Sola, C., L. Horgen, J. Maïsetti, A. Devallois, K. S. Goh, and N. Rastogi.** 1998. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1122-1124.
- Sola, C., L. Horgen, K. S. Goh, and N. Rastogi.** 1997. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* on a Caribbean island with IS6110 and DR probes. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 843-846.
- Solsona, J., J. A. Caylà, E. Verdú, M. P. Estrada, S. Garcia, D. Roca, B. Miguel, P. Coll, F. March, and the cooperative group for contact study of tuberculosis patients in Ciutat Vella.** 2001. Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **5**: 724-731.
- Song, A. T. W., D. Schout, M. D. Novaes, and M. Goldbaum.** 2003. Clinical and epidemiological features of AIDS/Tuberculosis comorbidity. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* **58**: 207-14.
- Strassle, A., J. Putnik, R. Weber, A. Fehr-Merhof, J. Wust, and G. E. Pfyffer.** 1997. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in a human immunodeficiency virus cohort in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 373-378.
- Suffys, P. N., M. E. Ivens de Araújo, and W. M. Degraeve.** 1997. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, RJ.* **92**: 297-316.
- Suffys, P. N., M. E. Ivens de Araújo, M. L. Rossetti, A. Zaha, E. W. Barroso, A. M. W. Barreto, E. Campos, D. V. Soolingen, K. Kremer, H. Heersna, and W. M. Degraeve.** 2000. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of

- Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. Res. Microbiol. **151**: 343-351.
- Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht.** 2000. Variable human minisatélites- like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol. Microbiol. **36**: 762-771.
- Supply, P., J. Magdalena, S. Himpens, and C. Locht.** 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Mol. Microbiol. **26**: 991-1003.
- Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht.** 2001. Automated high- throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J. Clin. Microbiol. **39**: 3563-3571.
- Tascon, R. E., M. J. Colston, S. Ragno, E. Stavropoulos, D. Gregory, and D. B. Lowrie.** 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. Nat. Med. **2**: 888-892.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, and R. V. Goering.** 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **18**: 426-439.
- Thierry, D., M. D. Cave, K. D. Eisenach, J. T. Crawford, J. H. Bates, B. Gicquel, and J. L. Guesdon.** 1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucl. Acids Res. **18**:188.
- Torrea, G., C. Offredo, M. Simonet, B. Gicquel, P. Berche, and C. Pierre-Audigier.** 1996. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J. Clin. Microbiol. **34**:1043-1049.
- Torrea, G., G. Levee, P. Grimont, C. Martin, S. Chanteau, and B. Gicquel.** 1995. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. J Clin Microbiol. **33**:1899-1904.
- Trujillo, W. F. C., and A. L. Kritski.** 2000. Tuberculose. Em Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Ed. Cultura Médica **62**: 594-610.
- Valim, A. R. M.** 2000. Alterações genéticas relacionadas com a resistência à rifampicina em *Mycobacterium tuberculosis*. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica.
- van Embden, J. D., D. van Soolingen, P. M. Small, and P. W. M. Hermans.** 1992. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. Res. Microbiol. **143**: 385-391.
- van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and P. M. Small.** 1993. Strain identification of *M. tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. **31**: 406-409.
- van Soolingen, D., L. Qian, P. E. W. de Haas, J. T. Douglas, H. Traore, F. Portels, h. Z. Qing, D. Enkisaikan, P. Nymadawa, and J. D. A. van Embden.** 1995. Predominance of a single

- genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countrie of East Asia. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3234-3238.
- van Soolingen, D., P. E. De Haas, P. W. M. Hermans, P. M. Groenen, and J. D. van Embden.** 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1987-1995.
- van Soolingen, D., P. E. W. De Haas, P. W. M. Hermans, and van D. A. Embden.** 1994a. DNA fingerprinting of *M. tuberculosis*. *Methods in enzymology.* **235**: 196-204.
- van Soolingen, D., P. E. W. De Haas, P. W. M. Hermans, and van D. A. Embden.** 1994b. RFLP analysis of mycobacteria. Manual for fingerprinting of *M. tuberculosis* strains. National Institute of Public Health and Enviromental Protection, Bilthoven, The Netherlands.
- van Soolingen, D., P. W. M. Hermans, P. E. W. De Hass, D. R. Soll, J. D. A. van Embden.** 1991. The ocurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of IS- dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2578-2586.
- Viedma, D. G., M. Marín, S. Hernangomez, M. Díaz, M. J. R. Serrano, L. Alcalá, and E. Bouza.** 2002. Tuberculosis recurrences. Reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection. *Arch. Intern. Med.* **162**: 1873-1879.
- Vukovic, D., S. Rüş-Gerdes, B.Savic, and S. Niemann.** 2003. Molecular epidemiology of pulmonary tubercuosis in Belgrade, Central Serbia. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4372-77.
- Warren, R., J. Animan, N. Beyers, M. Richardson, H. S. Schaaf, P. Donald, and P. van Helden.** 1996. Unexpectedly high strain diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. *S. Afr. Med. J.* **86**: 45-49.
- Weis, S. E., J. M. Pagoda, Z. Yang, M. D. Cave, C. Wallace, M. Kelley, and P. F. Barnes.** 2002. Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant county, Texas. *Am. Respir. Crit. Care Med.* **166**: 36-42.
- Wilkinson, D., M. Pillay, G. R. Davies, and A. W. Sturm.** 1996. Resistance to antituberculosis drugs in rural South Africa: rates, risks, and transmission dynamics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**: 692-695.
- Wilson, S. M., S. Goss, and F. Drobniowski.** 1998. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3385-3388.
- World Health Organization.** 2003. Tuberculosis program: framework for effective tuberculosis control. WHO Geneva, Switzerland. WHO/TB/94.179.
- World Health Organization.** 1997. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistant surveillance 1994-1997. WHO Geneva, Switzerland, 1997. WHO/TB/97.229.
- Yang, Z. H., P. E. de Haas, C. H. Washmann, D. van Soolingen, J. D. van Embden, and A. B. Andersen.** 1995. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2077-2081.

- Yang, Z. H., F. Chaves, P. F. Barnes, W. J. Burman, J. Koehler, K. D. Eisenach, J. H. Bates, and M. D. Cave. 1996. Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 3044-3048.
- Yang, Z. H., A. Rendon, A. Flores, R. Medina, K. Ijaz, J. Liaca, K. D. Eisenach, J. H. Bates, A. Villarreal, and M. D. Cave. 2001. A clinic-based molecular epidemiologic study of tuberculosis in Monterrey, Mexico. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **5**: 313-320.
- Yang, Z., P. F. Barnes, F. Chaves, K. D. Eisenach, S. E. Weis, J. H. Bates, and M. D. Cave. 1998. Diversity of DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1003-1007.
- Yeh, R. W., A. Ponce de Leon, C. B. Agasino, J. A. Hahn, C. L. Daley, P. C. Hopewell, P. M. Small. 1998. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J. Infect. Dis.* **177**: 1107-1111.
- Young, D. B. 1998. Blueprint for the white plague. *Nature* **393**:515-516.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Ficha epidemiológica do sistema Nacional de Agravos Notificados (SINAN)

SINAN
SISTEMA NACIONAL DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO

PREFEITURA MUNICIPAL DE PORTO ALEGRE
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE

NÚMERO

FICHA DE NOTIFICAÇÃO/INVESTIGAÇÃO - TUBERCULOSE

DADOS GERAIS	1 - TIPO DE NOTIFICAÇÃO 0 - PROVAJUAL		2 - DATA DA NOTIFICAÇÃO		
	3 - MUNICÍPIO DE NOTIFICAÇÃO			CÓDIGO BARRAS	
	4 - UNIDADE DE SAÚDE (OU OUTRA FONTE NOTIFICADORA)			CÓDIGO	
DADOS DO CASO	5 - AGRAVO TUBERCULOSE		6 - DATA DO DIAGNÓSTICO A 102		
	7 - NOME DO PACIENTE			8 - DATA DE NASCIMENTO	
	9 - IDADE 0 - IDADE 1 - MENORES DE 1 ANOS 2 - ANOS		10 - SEXO 1 - MASCULINO 2 - FEMININO 3 - IGNORADO		11 - RAÇA/COR 1 - BRANCA 2 - PRETA 3 - AMARELA 4 - PARDA 5 - INDIGENA 6 - IGNORADO
12 - ESCOLARIDADE (ANOS DE ESTUDO CONCLUÍDOS) 1 - NENHUMA 2 - DE 1 A 2 3 - DE 3 A 7 4 - DE 8 A 11 5 - DE 12 E MAIS 6 - NÃO SE APLICA 7 - IGNORADO		13 - NÚMERO DO CARTÃO SUS			
DADOS DE RESIDÊNCIA	14 - LOGRADOURO (RUA, AVENIDA...)		15 - NÚMERO		
	17 - COMPLEMENTO (APT., CASA...)			18 - PONTO DE REFERÊNCIA	
	20 - MUNICÍPIO DE RESIDÊNCIA		CÓDIGO (IBGE)		DISTRITO
	21 - BAIRRO		CÓDIGO (IBGE)		22 - CEP
	23 - CÓDIGO TELEFONE		24 - ZONA 1 - URBANA 2 - RURAL 3 - URBANO/RURAL 4 - IGNORADO		25 - PAÍS DE RESIDENTE FORA DO BRASIL
DADOS COMPLEMENTARES DO CASO					
HISTÓRICO EPIDEMIOLÓGICO	26 - NÚMERO DO PRIORITÁRIO		27 - OCUPAÇÃO/GRUPO DE ATIVIDADE ECONÔMICA		
	28 - TIPO DE ENTRADA 1 - CASO NOVO 2 - RECIDIVA 3 - REINGRESSO APÓS ABANDONO 4 - NÃO SABE 5 - TRANSFERÊNCIA				
DADOS CLÍNICOS	29 - RAIO X DO TÓRAX 1 - SUSPEITO 2 - NORMAL 3 - OUTRA PATOLOGIA 4 - NÃO REALIZADO				
	30 - TESTE TUBERCULÍNICO 1 - NÃO REATOR 2 - REATOR FRACO 3 - REATOR FORTE 4 - NÃO REALIZADO				
	31 - FONTE 1 - PULMONAR 2 - EXTRAPULMONAR 3 - PULMONAR-EXTRAPULMONAR 4 - NÃO REALIZADO				
DADOS DO LABORATÓRIO	32 - SE EXTRAPULMONAR 1 - PULMONAR 2 - MÊNINGES 3 - OUTRAS		33 - SE EXTRAPULMONAR 1 - PULMONAR 2 - MÊNINGES 3 - OUTRAS		
	34 - RACIÓSCÓPIA DE ESCARRO 1 - POSITIVA 2 - NEGATIVA 3 - NÃO REALIZADA		35 - RACIÓSCÓPIA DE OUTRO MATERIAL 1 - POSITIVA 2 - NEGATIVA 3 - NÃO REALIZADA		
	36 - CULTURA DE ESCARRO 1 - POSITIVA 2 - NEGATIVA 3 - EM ANDAMENTO 4 - NÃO REALIZADA		37 - CULTURA DE OUTRO MATERIAL 1 - POSITIVA 2 - NEGATIVA 3 - EM ANDAMENTO 4 - NÃO REALIZADA		
	38 - HST 1 - POSITIVA 2 - NEGATIVA 3 - NÃO REALIZADA		39 - HST/PTOLOGIA 1 - BAAR POSITIVO 2 - SUGESTIVO DE TB 3 - NÃO SUGESTIVO DE TB 4 - EM ANDAMENTO 5 - NÃO REALIZADO		
TRATAMENTO	40 - DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO ATUAL		41 - DROGAS 1 - SEM 2 - COM 3 - ISONAZIDA 4 - RIFAMPICINA 5 - ETAMBUTOL 6 - ESTREPTOMICINA 7 - CLOZANAMIDA 8 - OUTRAS		
	42 - TRATAMENTO SUPERVISIONADO 1 - SIM 2 - NÃO 3 - IGNORADO		43 - DOENÇA RELACIONADA AO TRABALHO 1 - SIM 2 - NÃO 3 - IGNORADO		
INVESTIGADOR	44 - MUNICÍPIO/UNIDADE DE SAÚDE		45 - CÓDIGO DA UNIDADE DE SAÚDE		
	46 - NOME		47 - FUNÇÃO		48 - ASSINATURA

"DIGA NÃO AS DROGAS"

(15 x 28) cm BR 1.50 ACOM ARQ 5-07c

Anexo 2 – Lista de soluções**- Clorofórmio/ álcool isoamílico**

clorofórmio 24 V

Álcool isoamílico 1V

- Lisozima

Solução a 50 mg/ml em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.

Estocada a -20°C.

- Proteinase K

Solução de Proteinase K a 10 mg/ml em água destilada.

Estocada a -20°C.

- RNase

Solução a 10mg/ml em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5/NaCl 15mM.

Estocada a -20°C.

- Solução de desnaturação

NaCl 1,5 M

NaOH 0,5M

- Solução de NaCl 5M**- Solução de Neutralização**

NaCl 1,5 M

Tris-HCl 1,0 M

pH 7,5

- Solução de SDS-Proteinase K (para cada amostra)

5µL de proteinase K 10 mg/ml

70µL de SDS 10%

- Solução de CTAB/NaCl

NaCl 4,1%

CTAB (brometo de N-cetil-N, N, N-trimetil amônio) 10%

- SSC 20X

NaCl 3M

Na-citrato 0,3M

pH 7,0

- Tampão de amostra 5X para DNA

Ficoll 400 15%

Xileno cianol FF 0,25%

Azul de bromofenol 0,25%

- Tampão de amostra com RNase

Glicerol 50%

Tris-HCl 50mM (pH 7,5)

EDTA 5mM

Azul de bromofenol 0,05%

RNase 30µg/mL

- Tampão de lavagem primária

Uréia 36%

SDS 4%

SSC 20X

- Tampão de lavagem secundária

SSC 2X

- Tampão 10X de reação de PCR

Tris-HCl 10mM (pH 8,3)

KCl 50 mM

MgCl₂ 30mM

Gelatina 0,1%(W/V)

- Tampão TE

Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)

EDTA 0,1mM (pH 8,0)

-Tampão TEB (Tris-borato-EDTA) 1X

Tris-HCl 890mM

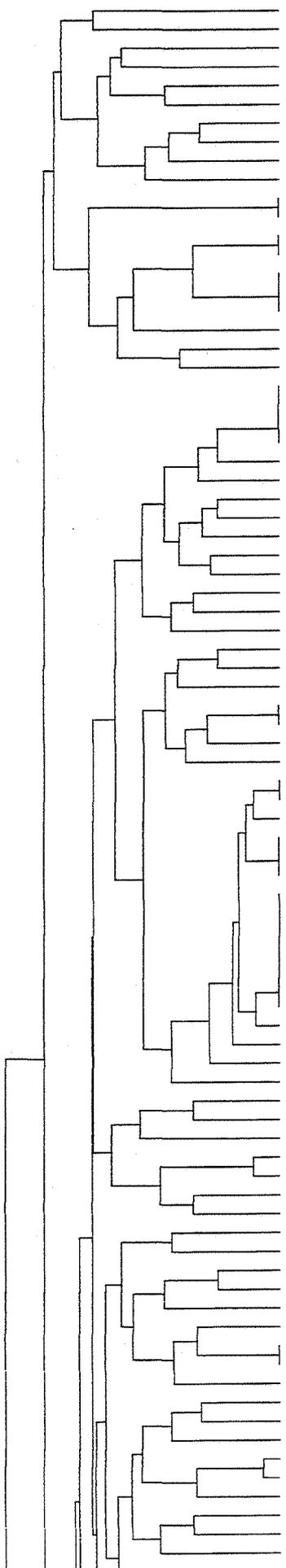
EDTA 2,5mM

Ácido bórico 890mM

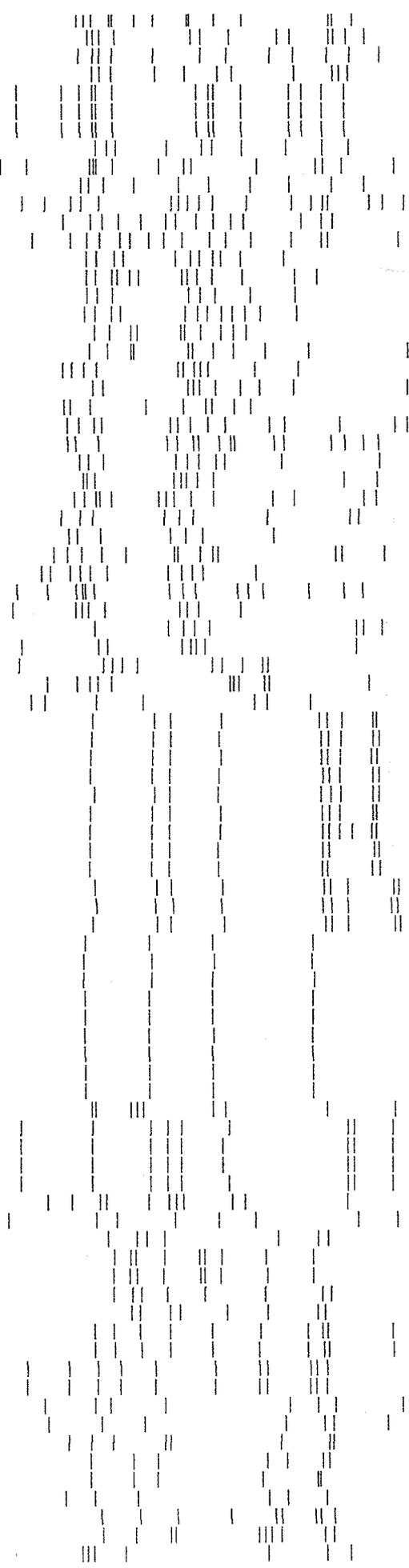
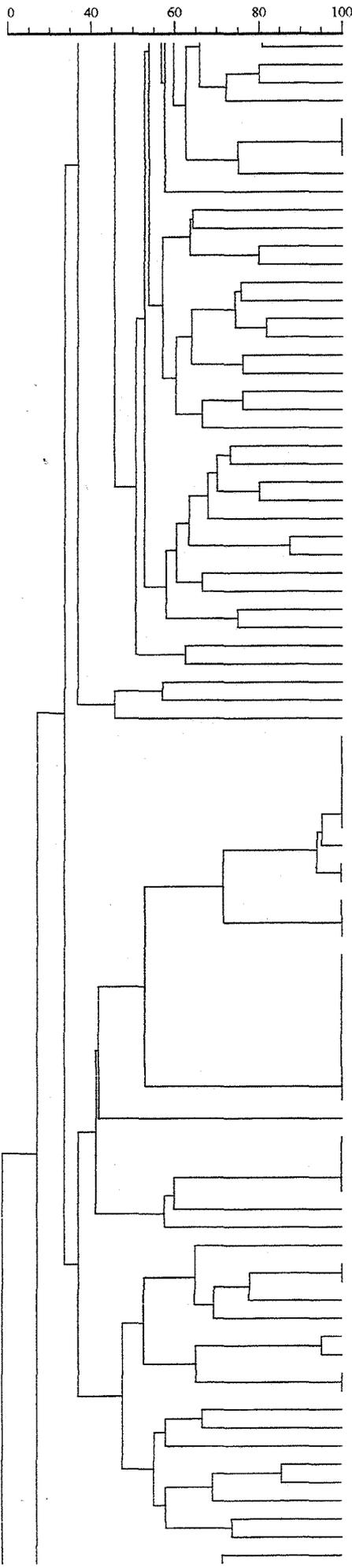
pH 8,2

Anexo 3 - Dendrograma representando todos os isolados analisados no estudo

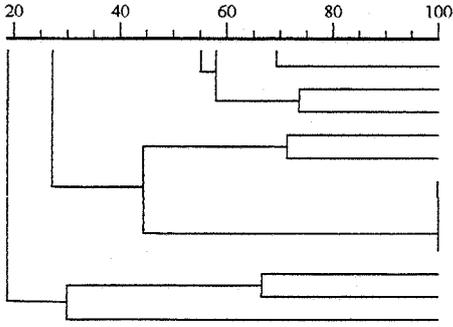
0 40 60 80 100



- 9500
- 9021SP
- 0576
- 9419
- 9098
- 0090
- 0479
- 9328
- 074SP
- 9372
- 9312
- 0580
- 0068-SP
- 9502
- 0351
- 9034SP
- 9031SP
- 072SP
- 9051
- 9003
- 0096
- 0044
- 9455
- 9083
- 047SP
- 9485
- 9030
- 0155
- 0522
- 9012-SP
- 050SP
- 9029SP
- 8399
- 0291
- 8311
- 0229
- 9369
- 0375
- 0162
- 0025
- 9473
- 9433
- 9016
- 069SP
- 0003SP
- 8625
- 9210
- 9059
- 0460
- 059SP
- 057SP
- 0059
- 8052SP
- 7010SP
- 8055SP
- 005
- 0330
- 0516
- 0043
- 9488
- 076SP
- 0502
- 9409
- 092SP
- 9276
- 0577
- 066SP
- 046SP
- 9181
- 8030SP
- 9003SP
- 0548
- 9004SP
- 9041SP
- 9173
- 8045SP
- 026SP
- 8511
- 8549
- 0257
- 8410
- 9037SP
- 9179
- 0000



- 0257
- 8410
- 9037SP
- 9179
- 0328
- 004SP
- 9241
- 063-SP
- 0010-SP
- 0484
- 8322
- 9145
- 0457
- 0060SP
- 0100SP
- 0034SP
- 0043SP
- 9349
- 0178SP
- 0602
- 0032-SP
- 0597
- 0439
- 053SP
- 9430
- 9035-SP
- 8044-SP
- 9131
- 045SP
- 8059SP
- 0489
- 0486
- 9033-SP
- 0251
- 061-SP
- 0623
- 0249
- 021
- 0609
- 0033
- 0429
- 8049SP
- 0358
- 0436
- 9026SP
- 9049SP
- 9512
- 0619
- 001-SP
- 0533
- 0243
- 052SP
- 9040SP
- 0336
- 8476
- 0606
- 0171
- 0135
- 0265
- 0143
- 8135-SP
- 0561
- 0462
- 9092
- 9039
- 075-SP
- 9448
- 8367
- 0123
- 9450
- 8600
- 9034
- 8475
- 094SP
- 9440
- 9043SP
- 8043-SP
- 0149
- 0214
- 011SP
- 9022SP
- 9082
- 9020-SP
- 0376



 9022SP
 9082
 9020-SP
 0376
 051-SP
 9159
 037SP
 9027-SP
 0208
 9441
 0297
 055SP

Anexo 4 – Pareceres da banca examinadora



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CB: BIOQUÍMICA
RUA RAMIRO BARCELOS, 2600 - ANEXO
FONE: 051 3316 5539 - FAX 051 3316 5540
CEP 90035-003 -PORTO ALEGRE-RS
ppgbioq@vortex.ufrgs.br

BANCA EXAMINADORA DE MESTRADO

Data: 20/02/2004

Aluno(a): LIA GONÇALVES POSSUELO

Orientador(a): DR. ARNALDO ZAHA

Título da Dissertação: *"Epidemiologia molecular da tuberculose na região metropolitana de Porto Alegre."*

Membros da Banca:

Nome	Deptº/Setor/Unidade	Conceito
DR. Philip Noel Suffys	DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR-INSTITUTO OSWALDO CRUZ/FIOCRUZ	A
Dra. Marilene Henning Vainstein	CENTRO DE BIOTECNOLOGIA/UFRGS	A
Dra. Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma.	DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA- ICBS/UFRGS	A

Conceito final: "A"

