

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

TERESA GOMES

**TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR: UMA ABORDAGEM
EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR**

VITÓRIA

2013

TERESA GOMES

**TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR: UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA E
MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do Título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Profa. Dra. Ethel Leonor Noia Maciel

Co-orientadora: Profa. Ms. Solange Alves Vinhas

VITÓRIA

2013

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

G633t Gomes, Teresa, 1988-
Tuberculose extrapulmonar : uma abordagem
epidemiológica e molecular / Teresa Gomes. – 2013.
117 f. : il.

Orientadora: Ethel Leonor Noia Maciel.
Coorientadora: Solange Alves Vinhas.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Tuberculose. 2. Análise espacial (estatística). 3. Vigilância
epidemiológica. 4. Epidemiologia molecular. 5. Epidemiologia. I.
Maciel, Ethel Leonor Nóia. II. Vinhas, Solange Alves. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61



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

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda TERESA GOMES apresentou a dissertação intitulada “TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR: UMA ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR” em sessão pública, no dia 22 de março de 2013, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a enfermeira TERESA GOMES a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 22 de março de 2013

Prof. Dr. Adelmo Inácio Bertolde
(Membro Externo)

Prof. Dra. Angelica Espinosa Barbosa Miranda
(Membro Interno)

Prof. Dra. Ethel Leonor Noia Maciel
(Orientadora)

Prof. Msc. Solange Alves Vinhas
(Coorientadora)

A todos que acreditam em mim,
em especial à minha mãe,
meu maior exemplo de força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor, que vem conduzindo meu caminho até este momento e nunca me desamparou, e à minha mãe, Dinha, que em mim deposita seus sonhos, espero retribuir a cada dia todo esse amor. Obrigada, pai, que, mesmo com seu jeito tímido, sempre demonstrou seu orgulho por mim.

Obrigada, meus irmãos, Edinho e Zezé, verdadeiros parceiros em todas as jornadas da minha vida, sempre compartilhando junto as alegrias das vitórias alcançadas.

A toda minha família em São Gabriel, desculpe por ter ido visitá-los menos frequentemente, Madrinha, Padrinho e Tio Paulo, meus maiores “fãs”, saibam que também são meus “ídolos”.

Amigos do Lab-epi Ufes e amigos do Mestrado NDI, vocês foram muito importantes nesta caminhada, em especial para Mariela, “mona”, com quem compartilhei tantos momentos nesses dois anos, sejam eles bons ou ruins, cheios de “purpurina” ou análises complicadas, sempre estavam ali.

Agradeço de coração à Bárbara, minha dupla “TB”, que além de amiga foi minha “co-orientadora”, confidente, e que sei que gostaria muito de estar na apresentação me apoiando e me ajudando, mas já está trilhando o caminho do sucesso no doutorado em Pelotas, mas a distância não atrapalha uma grande amizade, ainda mais em tempos de Facebook® e Skype®.

Agradeço aos colegas do Laboratório do NDI (Paola, Hebert, Fabiola, Renata), que realizaram as análises moleculares, fundamentais para esta dissertação, e em especial à Solange, minha co-orientadora, que sempre teve muita paciência e disposição para me ensinar e ajudar. Obrigada, Adelmo, pelo interesse nesta pesquisa, colaboração e ensinamento passados.

Amigos de sempre, obrigada por entenderem minha certa ausência nesse período, pelo apoio incondicional e palavras de incentivo.

Ao meu namorado, Luiz, e seus familiares, por serem uma verdadeira família pra mim em Vitória, me acolhendo e ajudando em todos os momentos. E um agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Ethel, pelas oportunidades e por ter me conduzido na realização deste sonho, com seu grande coração sempre disposto a ajudar quem demonstra boa-vontade em aprender e crescer.

RESUMO

Introdução: A tuberculose extrapulmonar (TBEP) é menos frequente e menos abordada por programas de controle da tuberculose (TB), além de ter seus fatores determinantes não totalmente elucidados na literatura. **Objetivo:** Este estudo se propôs a analisar as características epidemiológicas (sociodemográficas e clínicas), moleculares e espaciais da TBEP no Brasil, no estado do Espírito Santo (ES) e na cidade de Vitória, respectivamente, tendo como fonte de dados registros laboratoriais e o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). **Resultados:** Em um estudo transversal descritivo e comparativo [TBEP comparado à TB pulmonar (TBP)] entre 2007 e 2011, foram notificados no Brasil 53.853 (12,60% IC95% 12,49% - 12,69%) casos de TBEP; os principais sítios acometidos foram o pleural (42%) e o ganglionar (21%). Quando comparada à TBP, a TBEP estava mais associada à idade inferior a 7 anos, cor branca, maior grau de escolaridade e coinfeção com o HIV. Já o uso de álcool, diabetes e doença mental foram principalmente associados à TBP. O desfecho mais presente foi a cura (73%), havendo um maior número de transferências e menor número de TBMDR (TB multidroga-resistente) comparado à TBP. No Espírito Santo, 612 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) foram genotipados pelas técnicas de *spoligo*typing e Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição – RFLP do elemento de inserção IS6110. Dos 606 pacientes incluídos, 79 (13,0% IC95% 10,4% - 15,9%) possuíam TBEP. Dentre as formas extrapulmonares, 42% eram TB ganglionar e 27% TB pleural. A análise por RFLP IS6110 demonstrou que 250 (41%) isolados de MTB pertenciam a 73 clusters, que sugerem transmissão recente, sendo 27 (11%) em isolados de TBEP. Na análise por *spoligo*typing, 506 (83%) isolados possuíam padrões conhecidos e 106 (17%) desconhecidos, e pertenciam predominantemente à família LAM - 297 (48%). Na regressão logística, as variáveis escolaridade (inferior a 7 anos de estudo), cor branca e infecção pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) foram associadas à TBEP, porém linhagem específica de cepa de MTB, presença da sublinhagem RdRio ou porcentagem de cluster não foram associados com o sítio extrapulmonar da doença. Por último, realizou-se uma análise especial em Vitória dos casos de TBEP com RFLP IS6110 realizado, sendo estes divididos em dois grupos: “TBEP em cluster” e “TBEP não-cluster”; foram identificados 58 casos totais, 19 em cluster e 39 não-cluster. Os casos de TBEP em

cluster tiveram predomínio na Região Administrativa Centro, com um agrupamento espacial de 900 metros pela função K, ou seja, possível concentração espacial de cepas sugestivas de transmissão recente. **Conclusões:** Nossos estudos apontaram fatores relacionados à TBEP no Brasil, no ES e em sua capital, Vitória. Nota-se que características relacionadas à TBEP muitas vezes diferem daquelas relacionadas à TBP e àquelas relatadas em países com baixa carga da TB, além disso, por meio de um estudo de base laboratorial no estado, não se pôde demonstrar relação da TBEP com linhagem específica de MTB ou percentual de cluster. Por último, através da análise espacial integrada com a biologia molecular, pôde destacar áreas com TBEP sugestivas de transmissão recente em Vitória. Esses resultados apresentados são relevantes para o entendimento da magnitude da TBEP no ES e no Brasil.

Palavras-chave: Tuberculose extrapulmonar. Tuberculose. Epidemiologia Molecular. Análise espacial. Vigilância epidemiológica.

ABSTRACT

Introduction: Extrapulmonary tuberculosis (EPTB) is less frequent and less addressed by control programs of tuberculosis (TB), besides having its determinants not fully elucidated in the literature. **Objective:** This study aimed to analyse the epidemiological (sociodemographic and clinical), molecular and spatial characteristics of EPTB in Brazil, in Espírito Santo, state (ES) and in Vitória, city, respectively. Data were extracted of laboratory records and SINAN (Information System for Notifiable Diseases). **Results:** It's a cross-sectional descriptive and comparative study [EPTB compared to pulmonary TB (PTB)] between 2007 and 2011. It were reported in Brazil 53 853 (12.60% 95% 12.49% - 12.69%) cases of EPTB, the main sites affected were pleural (42%) and lymph node (21%). When compared with PTB, the EPTB was associated with less than 7 years old, white skin, higher educational level, and co-infection with HIV. Since alcohol use, diabetes and mental illness were mainly associated with TBP. The outcome was present more healing (73%), having a greater number of transfers and fewer MDRTB (multi-drug resistant TB) compared to PTB. In ES, state 612 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) were genotyped by technique of *spoligotyping* and restriction fragment length polymorphism - RFLP of the insertion element IS6110. Of the 606 patients included, 79 (13.0% 95% 10.4% - 15.9%) had EPTB. Among the extrapulmonary sites, 42% were lymph node TB and 27% pleural TB. IS6110 RFLP analysis showed that 250 (41%) MTB isolates belonged to 73 clusters, suggesting recent transmission, 27 (11%) of them were isolates of EPTB. The *spoligotyping* analysis demonstrated 506 (83%) isolates with known patterns and 106 (17%) with unknown patterns. They belonged predominantly to LAM family - 297 (48%). In logistic regression, the variables education (less than 7 years), white skin and HIV (Human Immunodeficiency Virus) infection were associated with EPTB, but the lineage-specific strain of MTB, the presence of RdRio sublineage and the percentage of cluster were not associated with EPTB. Finally there was a spatial analysis in Vitória, city with EPTB cases that had IS6110 RFLP performed. They were divided into two groups: "EPTB- clustered" and "EPTB non-clustered ". 58 cases were identified, 19 in cluster and 39 non-cluster. EPTB cases were predominantly clustered in the Centre Administrative Region, with a spatial grouping of 900 meters, by the graph of K function, which was suggestive of a spatial

concentration of strains by recent transmission. **Conclusions:** Our study showed factors associated with EPTB in Brazil, ES, state and its capital Vitoria. It was noted that characteristics related to EPTB often differ from those related to PTB, and those reported in low TB burden countries further by a laboratory-based study in the ES, state wasn't possible to demonstrate relationship of MTB lineage or percentage of cluster and EPTB. Finally, the spatial analysis integrated with molecular biology could highlight areas with EPTB suggestive of recent transmission in Vitória. These results are relevant to understanding the magnitude of EPTB in ES and Brazil.

Keywords: Extrapulmonary tuberculosis. Tuberculosis. Molecular Epidemiology. Spatial Analysis. Epidemiological surveillance.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Características de Pacientes com Tuberculose Extrapulmonar (TBEP), comparado com Tuberculose Pulmonar (TBP), Brasil, 2007 a 2011 (N=410.194)	51
Tabela 2 – Regressão Logística Hierárquica da associação entre as formas clínicas de TB e características relacionadas, Brasil, 2007 a 2011	53

ARTIGO 2

Tabela 1 – Características sociodemográficas, clínicas e moleculares por forma de TB: Extrapulmonar (TBEP), pulmonar (TBP) e concomitante (TBP+TBEP), Espírito Santo, 1998 a 2007	80
Tabela 2 – Associação entre as características sociodemográficas, clínicas e moleculares e a forma de TB, Espírito Santo, 1998 a 2007	82

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Fingerprints do DNA cromossômico de 22 isolados diferentes34
Figura 2 – Spoligotipos de isolados de amostras clínicas35

ARTIGO 1

- Figura 1** – Sítios clínicos de acometimento extrapulmonar da Tuberculose no Brasil, 2007 a 201148
Figura 2 – Tendências da TBP e da TBEP no Brasil, 2007 a 2011. As linhas representam a regressão linear49

ARTIGO 2

- Figura 1** – Sítios clínicos dos 130 pacientes com TBEP e TBP+TBEP, diagnosticados entre 1998 e 2007 no Espírito Santo73
Figura 2 – Análise do RFLP IS6110 demonstrou 73 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* em cluster, Espírito Santo, Brasil, 1998 a 200775
Figura 3 – Frequência de SIT – *Spoligotyping* em 612 isolados de *Mycobacterium tuberculosis*, Espírito Santo, Brasil, 1998-200778

ARTIGO 3

- Figura 1** – Densidade populacional de Vitória por bairros e suas 8 Regiões Administrativas: São Pedro, Santo Antônio, Centro, Bento Ferreira, Maruípe, Praia do Canto, Continental, e Jardim Camburi97
Figura 2 – Os 58 casos de TBEP em Vitória, diagnosticados entre 2001 e 200798
Figura 3 – Estimativa Kernel dos casos de TBEP em cluster em Vitória, diagnosticados entre 2001 e 200799
Figura 4 – Estimativa Kernel dos casos de TBEP não cluster em Vitória, diagnosticados entre 2001 e 200799
Figura 5 – Gráfico da função K. O 1º referente aos casos de TBEP em cluster e os 2º referente aos casos de TB não cluster100

LISTA DE SIGLAS

2RHZE	Rifampicina, Isoniazida, Etambutol e Pirazinamida por 2 meses
4RH	Rifampicina e Isoniazida por 4 meses
7RH	Rifampicina e Isoniazida por 7 meses
AC	Antes de Cristo
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATA	<i>American Thoracic Association</i>
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BK	Baciloscopia
CAS	<i>Central Asian</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOTS	<i>Directly Observed Treatment Short-course</i>
DR	<i>Direct Repeat</i>
EAI	<i>East African Indian</i>
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
H	<i>Haarlem</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
IS 6110	Elemento de Inserção 6110
IUATLD	<i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i>
LAM	<i>Latin American Mediterranean</i>
LPS	<i>Large sequence Polymorphisms</i>
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i>
MS	Ministério da Saúde
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose

PPD	Teste Tuberculínico (do inglês, <i>purified protein derivative</i>)
RA	Região Administrativa
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RM	Ressonância Magnética
RNTA	<i>Royal Netherlands Tuberculosis Association</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIT	<i>Shared International Tipe</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorphisms</i>
SpolDB4	<i>Spoligotyping database 4</i>
<i>Spoligotyping</i>	<i>Spacer Oligonucleotide Typing</i>
ST	<i>Shared Tipe</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TBEP	Tuberculose pulmonar
TB-HIV	Coinfecção da TB e HIV
TB-MDR	Tuberculose multidroga resistente
TBP	Tuberculose extrapulmonar
TBP+TBEP	Tuberculose concomitantemente pulmonar e extrapulmonar
TC	Tomografia Computadorizada
TDO	Tratamento Diretamente Observado
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultravioleta
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	15
CAPÍTULO 1	17
1.1 INTRODUÇÃO	18
CAPÍTULO 2	20
2.1 OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 3	22
3.1 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1.1 Tuberculose: a doença e seus desafios	23
3.1.2 Tuberculose: epidemiologia	25
3.1.3 Tuberculose extrapulmonar	26
3.1.4 Tuberculose e epidemiologia molecular	32
CAPÍTULO 4	39
4.1 Artigo 1	40
4.2 Artigo 2	64
4.3 Artigo 3	90
CAPÍTULO 5	107
5.1 CONCLUSÕES	108
5.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
REFERÊNCIAS	111
ANEXO A	116

APRESENTAÇÃO

A ideia desta dissertação surgiu a partir de indagações a mim feitas no final da graduação em enfermagem ao apresentar meu trabalho de iniciação científica (IC) em uma jornada na Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes) em 2010, o qual recebeu menção honrosa. Nesse IC, analisei espacialmente os casos de tuberculose pulmonar (TBP) e tuberculose extrapulmonar (TBEP) no município de Vitória e foram encontradas diferenças significativas nos agrupamentos espaciais das duas formas clínicas da tuberculose (TB). Surgiram então os questionamentos: por que isso ocorre? Há determinantes diferentes entre as duas formas da doença? Poderia haver cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) predominantes de uma forma clínica circulando em determinadas regiões geográficas que explicariam essas localizações espaciais distintas?

Assim, comecei minha pesquisa de mestrado com foco na TBEP para tentar entender todas essas questões. Primeiro foram realizadas análises em nível local, uma vez que dispomos de um laboratório de referência em cultura e genotipagem do MTB no estado do Espírito Santo. Em um segundo momento, dada a pouca literatura no Brasil, expandiu-se o estudo para uma análise nacional por meio do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN).

Assim, este trabalho foi estruturado em 5 capítulos da seguinte forma: 1º capítulo – introdução; 2º capítulo – objetivos; 3º capítulo – revisão de literatura; 4º capítulo – Artigos; 5º capítulo – conclusões, perspectivas e considerações finais.

No 4º capítulo, encontramos 3 artigos. O primeiro trata da tendência e características da TBEP comparada à TBP no Brasil, apresentando as principais características da TBEP e mostrando que estas muito diferem daquelas da TBP. O segundo artigo foi realizado em nível estadual, procedeu-se comparação entre as formas clínicas da TB, com o diferencial de possuir análise molecular, com 2 métodos de genotipagem distintos [*Spoligotyping* e Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição (RFLP IS6110)]; nele, o principal fator associado à TBEP foi a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), não sendo relacionado a essa forma nenhuma família de *Spoligotyping* ou percentual de cluster por RFLP IS6110. Por último, a

análise espacial integrada à epidemiologia molecular mostrou-se útil para predizer áreas sugestivas de transmissão recente de TBEP em Vitória.

Portanto, pretende-se que esta dissertação auxilie no entendimento da magnitude da TBEP no Brasil, no ES e em Vitória, bem como seus fatores relacionados e aplicabilidade da epidemiologia molecular em pesquisas. Espera-se também que possa servir de alerta aos profissionais de saúde e programas de controle da TB sobre a importância da forma extrapulmonar na epidemiologia da TB.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca a Tuberculose (TB) como uma importante doença infecciosa entre adultos ao redor do mundo. Em 2011, 5,8 milhões de casos de TB foram notificados mundialmente nos programas nacionais de controle da TB (PNCT), sendo para este ano estimado um total de 8,7 milhões de pessoas acometidas pela doença, já a taxa de coinfeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) foi de 13% (WHO, 2012).

O Brasil está em 17º lugar entre os 22 países que concentram 82% dos casos de TB no mundo, sendo ela a principal causa de óbitos em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, sigla do inglês, *Acquired Inmodificiency Sindrome*) no país (Brasil, 2012).

A TB afeta principalmente o parênquima pulmonar, sendo definida como TB pulmonar (TBP), podendo também ser transmitida para outras partes do corpo, inclusive as meninges, rins, ossos e linfonodos, sendo então classificada como TB extrapulmonar (TBEP) (Smaltzer, 2005). A proporção de casos com a forma extrapulmonar varia bastante de um país para outro, sendo que na América essa variação é de 4,7% a 35% (OPAS, 2011). No Brasil, foram notificados 10.067 casos novos de TBEP em 2011, uma proporção considerável de 14% entre todas as formas de TB (WHO, 2012).

A TBEP é menos contagiosa, menos frequente que a TPB e, assim, menos tratada por programas em países em desenvolvimento (Pefura Yone, Kengne et al., 2013). Além disso, a TBEP enfrenta certos desafios como a baixa suspeição clínica, sintomas atípicos e dificuldade diagnóstica, uma vez que o número de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) presentes nos tecidos em locais da doença é muitas vezes baixo e espécimes clínicos de certos órgãos podem ser difíceis de obtenção (Lawn and Zumla, 2012).

Fatores que determinam a TBEP permanecem não totalmente elucidados. Sabe-se que há relação da sua ocorrência com pacientes com imunidade prejudicada, o que favorece a disseminação do bacilo, e o aumento da infecção por MTB em pacientes com AIDS é consistente com essa hipótese (Garcia de Viedma, Lorenzo et al., 2005).

Outros fatores de risco para TBEP reportados incluem infecção pelo HIV, menor idade, sexo feminino e raça não branca. Autores também relatam que tais fatores de risco podem diferir daqueles presentes na TBP (Yang, Kong et al., 2004; Peto, Pratt et al., 2009; Fiske, Griffin et al., 2010).

Pesquisas no campo da biologia molecular também vêm ganhando destaque no entendimento de fatores determinantes da TBEP. A identificação de linhagens da bactéria MTB constitui um método adicional útil em investigações epidemiológicas, por ser um meio para se entenderem melhor os mecanismos que influenciam a dinâmica de transmissão e a identificação dos fatores de risco em uma comunidade. Essa identificação permite a elaboração de um modelo adequado de medidas de controle, além de poder ser usada para investigar propriedades biológicas das linhagens, como virulência e patogenicidade (van Embden, Cave et al., 1993; Kato-Maeda, Bifani et al., 2001).

Sabendo que a TBEP tem se tornado mais comum desde o advento do HIV (Rieder, Snider et al., 1990), das graves consequências que incluem, por exemplo, doença disseminada e meningite, na qual a mortalidade pode ser 3 vezes maior que a da TBP (Kingkaew, Sangtong et al., 2009), da dificuldade diagnóstica (Lawn and Zumla, 2012) e tendo seus fatores determinantes ainda não totalmente elucidados (Garcia de Viedma, Lorenzo et al., 2005), vê-se a necessidade de abordagens inovadoras como estudos moleculares para melhor entendimento do problema e seu combate.

É essa a proposta deste trabalho, que ao interligar métodos de epidemiologia convencional e epidemiologia molecular irá permitir a identificação e a caracterização de fatores relacionados à TBEP que possam colaborar com estratégias de controle da doença.

CAPÍTULO 2

2.1 OBJETIVOS

- Identificar as características sociodemográficas, clínicas e comorbidades relacionadas à TBEP de indivíduos diagnosticados com TB no Brasil entre os anos de 2007 e 2011.
- Descrever a tendência da distribuição de casos de TBEP e TBP em indivíduos diagnosticados com TB no Brasil entre os anos de 2007 e 2011.
- Identificar os principais sítios envolvidos da TBEP em indivíduos diagnosticados com TB no Brasil entre os anos de 2007 e 2011.
- Comparar características sociodemográficas, clínicas e moleculares de indivíduos com TBEP e de indivíduos com TBP do estado do Espírito Santo diagnosticados entre os anos de 1998 e 2007.
- Realizar análise espacial dos casos de TBEP levando em consideração dados moleculares de indivíduos diagnosticados com TB entre 2001 e 2007 em Vitória.

CAPÍTULO 3

3.1 REVISÃO DE LITERATURA

3.1.1 TUBERCULOSE: A DOENÇA E SEUS DESAFIOS

A TB é uma doença milenar que continua a constituir um grave problema de saúde pública, sendo classificada como a segunda principal causa de morte por doenças infecciosas em todo o mundo, perdendo somente para o HIV (WHO, 2012).

É transmitida pessoa a pessoa por meio de contato com gotículas dispersas no ar durante a fala, espirro e tosse de indivíduos com doença pulmonar ou laríngea, denominados bacilíferos, sendo aumentada a chance de infecção quando o contato com o indivíduo bacilífero é permanente, em ambiente fechado, com pouca ventilação e na ausência de luz solar (FOCACCIA, 2004; TB, 2013).

Existem relatos da evidência de TB em ossos humanos pré-históricos e datados de 8000 antes de Cristo (AC), porém somente em 1882 a bactéria responsável pela doença, o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), foi isolada pelo cientista alemão Robert Koch, sendo por isso o bacilo causador chamado por bacilo de Koch (Conde MB, 2002).

Em 1895, Roentgen traz grandes progressos para o diagnóstico e acompanhamento da TB através da descoberta da radiografia, época essa também marcada pela revolução industrial, aglomerações, pobreza e por grande adoecimento. É a partir de 1940 que começam a surgir os antibióticos e quimioterápicos que finalmente trariam a cura da TB nos anos seguintes, como a estreptomicina e a isoniazida (Conde MB, 2002).

Entretanto, mesmo com os avanços diagnósticos e terapêuticos com o decorrer dos anos, a almejada erradicação da TB mostrou-se difícil de alcançar. Há inúmeros fatores que vêm contribuindo para a manutenção da doença, como os movimentos migratórios, os bolsões de pobreza, as iniquidades sociais, a fragilidade dos serviços de saúde, o envelhecimento da população e o crucial advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Ruffino-Netto and de Souza, 2001; Ruffino-Netto, 2002).

Vista a dificuldade no enfrentamento dessa pandemia, em 1993, a OMS declarou a TB como uma emergência mundial, em 1995, lançou a estratégia de tratamento supervisionado – DOTS, sigla inglesa de Directly Observed Treatment Short-course – como sua estratégia oficial para controle da TB e, em 1998, estabelece a iniciativa “STOP TB”, que reúne instituições de alto nível científico e/ou poder econômico, tais como: a OMS, o Banco Mundial, o Centers for Disease Control (CDC), International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Royal Netherlands Tuberculosis Association (RNTA) e American Thoracic Association (ATA) (Ruffino-Netto, 2002; Giovanni Sotgiu, 2013).

A estratégia DOTS envolve 05 componentes: compromisso político, diagnóstico de qualidade, um fornecimento regular das drogas antituberculosas, tratamento com supervisão e permanência do paciente e um sistema padrão para notificação e monitoração dos casos detectados (WHO, 2012). Em 2006, a parceria “STOP TB” lançou o Plano Global “*Stop TB 2006-2015*”, que atualmente foi reavaliado e expandido com o plano “*Stop TB 2011-2015*” e tem no seu escopo atingir a meta de desenvolvimento do milênio número 6, estabelecida pela Organização das Nações Unidas (ONU): Combater HIV, Malária e Outras Doenças Infecciosas, além disso, atingir as próprias metas da parceria Stop TB.

- Até 2015: reduzir a prevalência e as taxas de mortalidade em 50%, em comparação com os níveis de 1990.
- Até 2050: eliminar a TB como problema de saúde pública definida como uma incidência global de TB de menos de um caso por 1 milhão de habitantes por ano (Partnership, 2011).

A estratégia DOTS é uma das estratégias do (PNCT) do Brasil. O programa também privilegia a descentralização das medidas de controle para a Atenção básica, buscando ampliar o acesso em geral e das populações mais vulneráveis como em situação de rua, pessoas privadas de liberdade e a população indígena (Brasil, 2013).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) promove o suporte necessário para o paciente com TB. O controle da TB é baseado na busca de casos, diagnóstico precoce e adequado, seu tratamento até a cura com o objetivo de interromper a cadeia de transmissão e evitar possíveis adoecimentos (Brasil, 2013).

Mesmo com todas essas estratégias, a epidemiologia da TB nos mostra que ela ainda está longe do controle. Muitos ainda são os desafios no combate à TB, desafios antigos como o rompimento da cadeia de transmissão através de melhores condições sociais e ambientais das populações mais pobres e melhoria nos métodos diagnósticos e novos desafios como a multirresistência a drogas e a coinfeção com o HIV (Sepkowitz, Raffalli et al., 1995; Ruffino-Netto, 2002).

3.1.2 TUBERCULOSE: EPIDEMIOLOGIA

Apesar de o tratamento capaz de curar 90% dos casos estar disponível desde 1980, o controle da TB mostra-se desafiador. De acordo com as últimas estimativas incluídas no relatório da OMS, em 2011, havia quase 9 milhões de novos casos e 1,4 milhões de mortes por TB [990 mil entre as pessoas HIV negativas e 430 mil mortes associadas ao HIV (TB-HIV)]. A maior carga da doença está na Ásia e na África, assim, Índia e China juntas têm 40% dos casos de TB do mundo e o continente africano tem um quarto dos casos mundiais e as mais altas taxas de mortalidade (WHO, 2012).

No entanto, mesmo sendo um problema em âmbito mundial, principalmente na África, esforços no combate à TB têm sido primordiais e algumas vitórias têm sido alcançadas, como a meta da parceria Stop TB para redução de mortalidade, que provavelmente alcançará a redução de 50% almejada, uma vez que dados de 2012 apontaram uma queda de 41% nas taxas de mortalidade mundialmente (excluindo mortes em pessoas HIV-positivas) desde 1990 (WHO, 2012).

Embora ocupe a 17ª colocação entre os 22 países que concentram 82% dos casos da doença, o fortalecimento do PNCT e do SUS junto com a estratégia DOTS no Brasil trouxe reduções nas taxas que avaliam a carga da doença na população; em cerca de 20 anos, a taxa de incidência teve uma queda de 26% (taxa de incidência de 51,7 por 100 mil habitantes em 1990 para 37,8 em 2009); a taxa de mortalidade, de 3,6 por 100 mil habitantes em 1990 caiu para 2,4 por 100 mil habitantes em 2010, embora haja controvérsia quanto à taxa de mortalidade de TB no Brasil, que, de

acordo com a OMS, foi de 2.9 por 100 mil habitantes em 2011 (Brasil, 2010; Brasil, 2012; OPAS, 2012; WHO, 2012).

Dos casos notificados no país, 86,5% são novos, 6,7% são recidiva, 6,6% são reingressos após abandono e 0,2% fracasso (OPAS, 2012). Em 2010, houve aumento na taxa de detecção para 88% dos casos e de cura de 73,6%, uma vez que 62% dos municípios estão aptos para realizar ações de diagnóstico e 75,2% realizaram Tratamento Diretamente Observado (TDO). Também foram diagnosticados e iniciado o tratamento de 660 casos confirmados de TB multidroga resistente (TB- MDR) (OPAS, 2012).

O estado do Espírito Santo (ES) localiza-se na região sudeste do Brasil juntamente com Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo. Essa região é a que concentra o maior número de casos de TB do país, embora a maior incidência esteja na região Amazônica (Brasil, 2012). Em 2011, o ES teve 1.254 casos novos de TB, perfazendo uma incidência de 35,4 por 100 mil hab. Já a mortalidade vem seguindo a tendência de queda vista no país e atualmente está em 1,7 por 100 mil habitantes, abaixo da média nacional. Porém, em populações vulneráveis, ainda se encontra grandes desafios, como a incidência em população privada de liberdade de 1466,1 por 100 mil hab., sendo maior que a média nacional (1037,7 por 100 mil habitantes) e longe da taxa de almejada (Brasil, 2012).

3.1.3 TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR

A TB apresenta-se em duas formas clínicas: a pulmonar e a extrapulmonar, sendo a TBP subdivida em primária (mais comum em crianças), pós-primária (mais comum no adolescente e adulto jovem) e miliar (Brasil, 2011). Destas, a TB miliar merece atenção neste tópico, uma vez que devido a seu aspecto disseminado é considerada por muitos autores como um tipo de TBEP (Golden and Vikram, 2005; WHO, 2007).

A TB miliar, cujo nome deriva do aspecto disseminado dos granulomas no pulmão, é uma forma grave de doença e ocorre em 1% dos casos de TB em pacientes HIV soronegativos, e em até 10% dos casos em pacientes HIV soropositivos em fase

avançada de imunossupressão. A apresentação clínica clássica é a aguda, mais comum em crianças e adultos jovens. O exame físico mostra hepatomegalia (35% dos casos), alterações do sistema nervoso central (30% dos casos) e alterações cutâneas do tipo eritemato-máculo-pápulo-vesiculosas (Brasil, 2011).

As apresentações extrapulmonares da TB têm seus sinais e sintomas dependentes dos órgãos e/ou sistemas acometidos. De acordo com o manual de controle da TB do Ministério da Saúde, os principais sítios da TBEP diagnosticados são (Brasil, 2011):

- TB pleural – É a mais comum forma de TB extrapulmonar em indivíduos HIV soronegativos. Ocorre mais em jovens, cursa com dor torácica do tipo pleurítica. A tríade astenia, emagrecimento e anorexia ocorre em 70% dos pacientes e febre com tosse seca, em 60%. A cultura, associada ao exame histopatológico do fragmento pleural, permite o diagnóstico em até 90% casos. Os rendimentos da baciloscopia e da cultura do líquido pleural são respectivamente menores que 5% e 40% (Brasil, 2011).
- TB ganglionar periférica – É a forma mais frequente de TB extrapulmonar em pacientes HIV soropositivos e crianças, sendo mais comum abaixo dos 40 anos. Cursa com aumento subagudo, indolor e assimétrico das cadeias ganglionares cervical anterior e posterior, além da supraclavicular. O diagnóstico é obtido por meio de aspirado por agulha e/ou biópsia ganglionar para realização de exames bacteriológicos e histopatológicos (Brasil, 2011).
- TB meningoencefálica – É responsável por 3% dos casos de TB em pacientes HIV soronegativos e por até 10% dos casos em pacientes HIV soropositivos. A meningite basal exsudativa é a apresentação clínica mais comum e é mais frequente em crianças abaixo dos 6 anos de idade. Na forma subaguda, cursa com cefaleia holocraniana, irritabilidade, alterações de comportamento, sonolência, anorexia, vômitos e dor abdominal associados à febre, fotofobia, vômitos e rigidez de nuca por tempo superior a duas semanas. Eventualmente, apresenta sinais focais e pode haver hipertensão intracraniana. Na forma crônica, o paciente evolui várias semanas com cefaleia, até que o acometimento de pares cranianos faz o médico suspeitar de meningite crônica. Ocorre doença pulmonar concomitante em até 59% dos casos. Outra forma de TB do sistema nervoso central é a forma localizada (tuberculomas).

Nessa apresentação, o quadro clínico é o de um processo expansivo intracraniano de crescimento lento, com sinais e sintomas de hipertensão intracraniana. A febre pode não estar presente (Brasil, 2011).

- TB pericárdica – Tem apresentação clínica subaguda e geralmente não se associa à TB pulmonar. Os principais sintomas são dor torácica, tosse seca e dispneia. Muitas vezes, a dor não se manifesta como a dor pericárdica clássica. Pode haver febre, emagrecimento, astenia, tonteira, edema de membros inferiores, dor no hipocôndrio direito (congestão hepática) e aumento do volume abdominal (ascite). Raramente provoca sinal clínico de tamponamento cardíaco (Brasil, 2011).
- TB óssea – É mais comum em crianças (10% a 20% das lesões extrapulmonares na infância) ou em pessoas entre as quarta e quinta décadas. Atinge mais a coluna vertebral e as articulações coxofemoral e do joelho, embora possa ocorrer em outros locais. A TB de coluna (mal de Pott) é responsável por cerca de 1% de todos os casos de TB e por até 50% de todos os casos de TB óssea. O quadro clínico é a tríade dor lombar, dor à palpação e sudorese noturna (Brasil, 2011).
- Outras formas existentes são: TB laríngea, TB ocular e TB abdominal, que pode envolver o trato gastrointestinal, o peritônio, linfonodos mesentéricos ou o trato genito-urinário. Outros órgãos (por exemplo, fígado, baço, glândulas adrenais) são afetados geralmente como consequência de TB miliar (Golden and Vikram, 2005).
- Além disso, a TB pode afetar no mesmo paciente o pulmão e sítios extrapulmonares, sendo chamada TB concomitantemente pulmonar e extrapulmonar (TBP+TBEP) (Brasil, 2011).

Para o diagnóstico da TBEP, são empregados os métodos tradicionais de baciloscopia (BK) e cultura, este de maior especificidade e sensibilidade. A baciloscopia se dá pela pesquisa do MTB, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pelo método de Ziehl-Nielsen em materiais de prováveis sítios da doença, e a cultura pela semeadura da amostra em meios de cultura sólidos ou líquidos, sendo o meio sólido o método clássico que tem a vantagem de apresentar menor custo e um menor índice de contaminação e a desvantagem do tempo de detecção do crescimento bacteriano variar de 14 a 30 dias, podendo se estender por até oito semanas (Brasil, 2011).

O diagnóstico histopatológico também é comumente usado para a TBEP. Nos pacientes não imunossuprimidos, a baciloscopia do tecido usualmente é negativa e a presença de um granuloma, com necrose de caseificação, é compatível com o diagnóstico de TB. Nos pacientes imunossuprimidos, é menos frequente a presença de granuloma com necrose caseosa, mas é mais frequente a positividade da baciloscopia no material de biópsia. No entanto, o único método diagnóstico de certeza de TB é a cultura seguida da confirmação do MTB por testes bioquímicos ou moleculares (Brasil, 2011).

Além desses, exames de imagens diversos podem ser utilizados dependendo do sítio afetado, como, por exemplo, tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) de Sistema Nervoso Central (SNC); exames de imagem de estruturas ósseas como Radiografia, Ultrassonografia e TC em estruturas ósseas e a RM pra avaliar acometimento medular e de tecidos moles (Brasil, 2011).

Além dessas dificuldades imbricadas no diagnóstico da TBEP, um dos grandes problemas dos testes de laboratório em TB é a espera para receber os resultados. Nos Estados Unidos (EUA), 28% dos casos de TB com baciloscopia negativa e cultura positiva não iniciam o tratamento até que os resultados da cultura estejam disponíveis, o que leva cerca de 21 dias em cerca de 72% dos laboratórios de saúde pública dos EUA que utilizam culturas líquidas. Ou seja, existe uma necessidade de testes diagnósticos rápidos, particularmente para BK casos negativos como comumente se enquadram os indivíduos com TBEP (OPAS, 2012).

Vistos os empecilhos no diagnóstico da TB, em tempos recentes, atenção tem sido dedicada à amplificação de ácidos nucleicos como ferramenta diagnóstica devido à sua rapidez, sensibilidade e especificidade. Um dos mais recentes, o GeneXpert, utiliza um real-time semi-nested PCR (Reação em cadeia da Polimerase) para sequenciar o gene *rpoB* do MTB e, juntamente, determinar resistência à Rifampicina, feito de forma automatizada com resultado em 02 horas. Em um estudo recente, em 521 amostras de sítios extrapulmonares, o GeneXpert mostrou uma sensibilidade de 77,3% e uma especificidade 98,2% (Hillemann, Rusch-Gerdes et al., 2011; OPAS, 2012).

Mesmo assim, essa ainda é uma solução custosa para países em desenvolvimento, que por enquanto usam majoritariamente as técnicas anteriormente citadas para diagnosticar os casos de TBEP. Além disso, há dificuldade em se detectar o caso

como suspeito de portador da forma extrapulmonar, necessitando de um alto índice de suspeita clínica por parte dos médicos (Golden and Vikram, 2005).

A terapia antituberculosa pode minimizar a morbidade e a mortalidade, mas pode ser necessário ser iniciada empiricamente. Um resultado de BK negativo, a falta de granulomas na histopatologia e falta de cultura de MTB não excluem o diagnóstico (Golden and Vikram, 2005).

No que diz respeito ao tratamento, o esquema terapêutico para a TBEP segue o mesmo que o da TBP, com exceção dos casos de TB meningoencefálica. Ou seja, para maiores de 10 anos, é utilizado o esquema básico preconizado em 2009 pelo PNCT: comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol (RHZE), nas seguintes dosagens: R 150mg, H 75mg, Z 400mg e E 275mg. O Tratamento tem um seguimento de 06 meses, sendo os 02 primeiros meses a fase intensiva com as 04 drogas (2RHZE), seguido por 04 meses de manutenção com as duas drogas: R e H (4RH) (Brasil, 2011).

O esquema para o tratamento da TB meningoencefálica em adultos e adolescentes se dá com 02 meses de RHZE seguidos de 07 meses de RH (02 RHZE+ 07RH), sendo que na meningoencefalite tuberculosa deve ser associado corticosteroide ao esquema anti-TB (Brasil, 2011).

Quanto à transmissibilidade, somente a TBEP laríngea tem esse potencial, juntamente com a TBP, e requerem medidas administrativas, ambientais e de proteção individual que diminuam o risco de transmissão da doença. Dentre essas medidas, podemos citar a adequação física da unidade de saúde às normas de controle de infecção, a educação permanente dos profissionais de saúde para diminuir o retardo no diagnóstico de TB pulmonar e promover o adequado tratamento antiTB e o uso de máscaras tipo N95 para profissionais de saúde ou visitantes ao entrarem em áreas de alto risco de transmissão (como quartos de isolamento respiratório) (Brasil, 2011).

Embora a maior parte dos programas de controle se concentre na TB pulmonar bacilífera, cerca de um em cada cinco casos de tuberculose em todo o mundo é considerado extrapulmonar (WHO, 2007).

O advento da AIDS foi de grande impacto para as taxas de TBEP. Nos últimos 20 anos, os países com epidemias de HIV têm vivenciado um aumento dramático no número de casos e óbitos por TBEP. Na Tailândia, um dos 22 países com elevada carga da doença, os casos de TBEP reportados de 2002 a 2005 chegaram a 12-13%, mas em províncias com alta prevalência de HIV esse percentual chegou a 33% (Kingkaew, Sangtong et al., 2009).

Em uma recente meta-análise, a análise agrupada demonstrou-se a relação entre HIV e TBEP (OR:1,3, IC 1,05-1,6) e, na análise de sub-grupos, a contagem de células CD4+ menor que 100 também foi relacionada à TBEP (OR:1,31 IC: 1,02 – 1,68) (Naing, Mak et al., 2013).

Vê-se a que a TBEP, embora geralmente não transmissível e fora do foco principal dos programas de controle, vem tendo destaque no cenário epidemiológico mundial da TB, principalmente com o surgimento do HIV e a proeminência das doenças crônicas como diabetes e doença renal, que comprometem o sistema imune (Lawn and Zumla, 2011).

Porém, os fatores predisponentes ao desenvolvimento da TB e suas diferentes formas não foram totalmente elucidados, mas, de maneira geral, são atribuídos a uma combinação entre fatores sócio-ambientais, características do hospedeiro (indivíduo com TB) e da linhagem (variações dentro da espécie) do MTB (Santos, 2007).

Fatores sócio-ambientais típicos de nações em desenvolvimento, como pobreza, desnutrição, estresse, superpopulação e exposição a micobactérias ambientais, influenciam a susceptibilidade à TB (Santos, 2007).

Já os principais fatores do hospedeiro que levam à TBEP estão relacionados ao sistema imune, como em crianças jovens, cujo sistema imune está imaturo, em idosos, que pela idade apresentam disfunções na imunidade, além de doenças e situações que diminuem a resposta do organismo ao MTB, como HIV, doença renal, terapia imunossupressora pós-transplante e o uso de inibidores do TNF- α (Fator de necrose tumoral) (Rowinska-Zakrzewska, 2011).

No entanto, fatores relacionados à linhagem do MTB que levam à TBEP ainda são pouco entendidos e cada vez mais atenção vem sendo direcionada para a compreensão tanto do hospedeiro quanto do patógeno como determinantes da

apresentação clínica da TB. Um novo meio de entender essas interações se dá pela epidemiologia molecular.

3.1.4 TUBERCULOSE E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Mesmo após 2 décadas da declaração da TB como uma emergência mundial pela OMS, ela continua sendo um grave problema de saúde pública (Ruffino-Netto, 2002).

Com isso, novos métodos têm sido pesquisados para ajudar a entender os aspectos inerentes à doença e sua transmissão. Assim, surge no início dos anos de 1990 a Epidemiologia molecular da TB como resultado do uso de técnicas de DNA (Ácido desoxirribonucleico) *fingerprinting* (“impressão digital” ou caracterização do DNA, em português), tais como o polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição da sequência de inserção (IS) 6110 (RFLP do inglês – *restriction fragment length polymorphism*) ou outros métodos genéticos no genoma do MTB (van Embden, Cave et al., 1993).

A Epidemiologia molecular pode ser definida como a integração de técnicas baseadas na caracterização de sequências em ácidos nucleicos ou de aminoácidos de um patógeno, com abordagens epidemiológicas convencionais, para identificar os determinantes da distribuição, transmissão e manifestação da doença na população, visando à possibilidade de intervenção e prevenção (Cafrune, 2009).

Com base em comparações de marcadores moleculares dos isolados de diferentes pacientes com TB, os fingerprints podem ser classificados como padrões em “cluster” (do inglês, significa padrões agrupados) ou como “não-clusters”. Indivíduos com fingerprints idênticos são considerados “em cluster” e indivíduos com perfis únicos não formam clusters – “não-clusters”. Acredita-se que pacientes com TB em clusters estejam envolvidos em cadeias de transmissão recente, enquanto os pacientes com isolados únicos são mais propensos a ter reativado TB adquirida no passado (Small, Hopewell et al., 1994).

Entre as técnicas de genotipagem de MTB se destacam o RFLP – IS 6110, o *Spoligotyping* e o MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*).

O RFLP do IS 6110 é considerado o padrão-ouro entre as técnicas de genotipagem para investigações epidemiológicas e diferenciação de cepas do MTB. A técnica de fingerprinting implica o crescimento de MTB, extração de DNA, digestão com endonucleases de restrição, Southern blotting, e sondagem para o elemento IS. Os padrões de fingerprints são gerados por variabilidades em ambos os números de cópias e as posições cromossômicas do elemento de inserção altamente conservado – IS6110 – entre os isolados clínicos de MTB. Pontos negativos são: técnica demorada e trabalhosa, requerendo cultivo de organismos para extração de DNA satisfatória; dificuldade na comparabilidade entre laboratórios e incapacidade de fazer associações epidemiológicas quando do número inferior de 06 cópias de IS 6110 (van Embden, Cave et al., 1993; Kremer, van Soolingen et al., 1999).

A Figura 1 demonstra o resultado de um RFLP IS 6110. Foi extraída do artigo de Van Embden (1993), que trouxe a padronização do método.

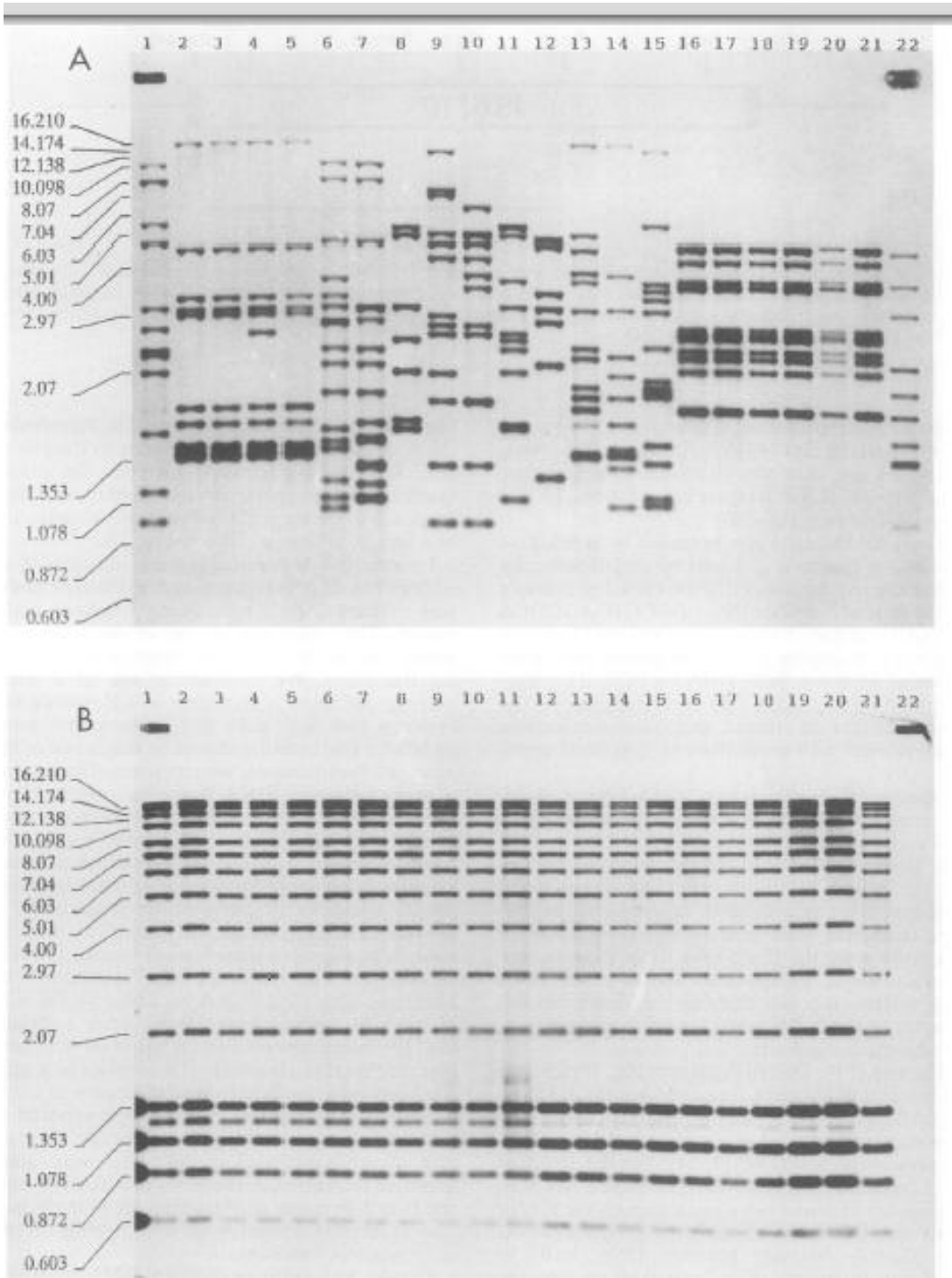


Figura 1 – Fingerprints do DNA cromossômico de 22 isolados diferentes foram digeridos com a enzima PvuII e, após a mistura com o DNA marcador, os fragmentos foram separados por eletroforese. Os fragmentos foram então transferidos para filtros e hibridados com DNA marcado com peroxidase de IS6110, podendo então serem visualizados e diferenciados (A) e marcada com peroxidase com marcador de DNA, onde nenhuma diferenciação entre os isolados pode ser visualizada (B). Fonte: (van Embden, Cave et al., 1993).

O *Spoligotyping* (*Spacer Oligonucleotide Typing*) baseia-se na amplificação enzimática do locus DR (*Direct Repeat*) do Complexo MTB, detectando a presença

ou ausência de espaçadores no locus DR, em um total de 43 espaçadores (Figura 2) (Kamerbeek, Schouls et al., 1997).

Tem como desvantagem ser menos discriminatório que o RFLP IS 6110, porém é mais rápido e, em recentes estudos, pôde ser aplicado diretamente em amostras clínicas. É um método para triagem em larga escala ou detecção rápida de casos suspeitos de transmissão recente e possui alta comparabilidade por possuir um banco de dados de abrangência mundial – SpolDB4 –, recentemente atualizado para SITVITWEB (S. Bonora 1999; Brudey, Driscoll et al. 2006; Demay, Liens et al., 2012).

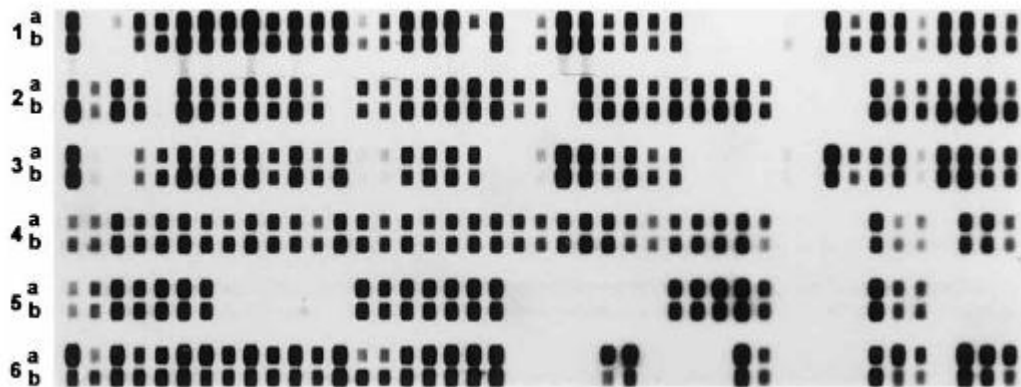


Figura 2 – Spoligotipos de isolados de amostras clínicas de sítios extrapulmonares (linhas 1a, 3a e 4a, contendo amostras de pacientes com abscessos na retrofaringe, cervical e peritoneal, respectivamente) e de pacientes com TB pulmonar (linhas 2a, 5a e 6a) e de culturas de bactérias dos respectivos pacientes (linhas b). Os espécimes clínicos foram pus (linhas 1a, 3a e 4a), escarro (linha 2a), lavado bronco-alveolar (linha 5a) e biópsia pulmonar (linha 6a). Fonte: (Kamerbeek, Schouls et al., 1997).

A técnica de MIRU utiliza os princípios da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para estudar VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), ou seja, minissatélites que contêm números variáveis de cópias em sequência no genoma da micobactéria, podendo repetir-se até centenas de vezes (Malaspina, 2009). Trata-se de um sistema altamente reprodutível e rápido, havendo geração de genótipos confiáveis e detalhados obtidos a partir de 12 *loci* contendo VNTRs do genoma do complexo MTB. Essa técnica possibilita uma comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas e o rastreamento da movimentação de linhagens individuais, de forma semelhante à técnica de RFLP, entretanto, por ser de fácil execução, possibilita a análise de um número maior de amostras em um menor período de tempo (Malaspina, 2009).

A possibilidade da aplicação de técnicas de biologia molecular para a detecção e identificação rápida do MTB vem-se mostrando crucial para a prevenção e o controle da TB, uma vez que os conhecimentos adquiridos a partir dessas análises permitiram a discriminação entre as espécies, bem como correlacioná-las com as características clínicas da doença, além de fornecerem dados como patogenicidade, adaptação ao hospedeiro e origem (Santos, 2007).

Há diferentes tipos de abordagens na epidemiologia molecular da TBEP, uma delas é por meio da análise de clusters. Um exemplo é Madagascar, no qual um estudo com pacientes com TBP e com TBEP eram mais propensos a ter mais padrões únicos do que pacientes com TB pleural (Rasolofo Razanamparany, Menard et al., 2002).

Outras pesquisas bastante difundidas na área visam a entender a correlação entre as formas clínicas de TB com a linhagem filogenética ou linhagem genotípica (ou família). É importante a diferença entre as duas: linhagem filogenética se refere à classificação baseada no LPS/SNP (*Large Sequence Polymorphisms/Single Nucleotide Polimorphisms*) e linhagem genotípica refere-se à classificação baseada em *Spoligotyping* encontrada no banco de dados SITVITWEB (Kato-Maeda, Gagneux et al., 2011; Demay, Liens et al., 2012).

As 06 principais linhagens filogenéticas do MTB são: *Euro-American*, *East-Asian*, *Indo-Oceanic*, *East-African-Indian (EAI)*, *West-African 1 e 2* (também conhecida como *M. africanum*) (Gagneux, DeRiemer et al., 2006).

Já na última classificação dos Spoligotipos em 2012, entre os 2740 ST (Shared Types – número da família no SITVITWEB), os mais comuns foram os que designaram as seguintes linhagens genotípicas do MTB: *Africanum*, *Beijing*, *Bovis*, *CAS (Central-Asian)*, *EAI (East-African Indian)*, *H (Haarlem)*, *LAM (Latin-American Mediterran)*, *S*, *T*, e *X*. (Demay, Liens et al., 2012).

A família LAM é encontrada por todo mundo, mas é a predominante na América do Sul, e uma de suas sublinhagens – a RD Rio – tem sido atualmente investigada no Brasil e foi apontada como a maior causadora de TB no Rio de Janeiro. Uma associação entre RD Rio e uma elevada prevalência de TB podem estar relacionadas à maior virulência e/ou adaptação específica para a população Europeia-Latino-Americana (Lazzarini, Huard et al., 2007).

Estudos visando relacionar a TBEP com linhagens específicas têm sido realizados por todo mundo. Na Itália, em um estudo com 1009 pacientes, uma associação estatisticamente significativa foi encontrada com a TBEP e com as linhagens *Bovis* (OR ajustado 3.2; IC 95% 1.2–8.1) e CAS (OR ajustado 2.3; IC 95% 1.0–5.1) (Lari, Rindi et al., 2009). Já na comparação entre vietnamitas com meningite por TB e com TB pulmonar não complicada foi encontrada uma associação protetora significativa entre a linhagem *Euro-American* para a meningite por TB comparada à TB (OR: 0.395, CI 95%.193–0.806, P = 0.009), sugerindo que esta cepa é menos capaz de causar disseminação do que as outras nessa população (Caws, Thwaites et al., 2008).

A linhagem *Beijing*, umas das mais estudadas, é endêmica na Ásia ocidental. Contudo, disseminações epidêmicas dessa linhagem já foram descritas em Nova York, Rússia, Vietnã e África do Sul, sendo, nesses casos, frequentemente associada à resistência a drogas e, em modelos animais, é claramente virulenta, causando maior carga bacilar, disseminação e morte prematura (Nicol and Wilkinson, 2008).

Vê-se, assim, que muitos estudos analisam a associação entre linhagens genotípicas/filogenéticas com a TBEP, mas mostram resultados muitas vezes conflitantes e são limitados pela amostra pequena e pela baixa diversidade filogenética inerente às diferentes regiões geográficas (Click, Moonan et al., 2012). Um grande estudo realizado nos EUA tentou superar essas dificuldades, vista a grande quantidade de indivíduos, 53.972, sendo 5.085 (15,9%) de casos exclusivamente extrapulmonares, e a diversidade étnica do país, caracterizado por grande imigração. Foram associadas à TBEP as linhagens filogenéticas: *indo-Oceanic* e *East African Indian*, mesmo quando controlados por região de nascimento, raça/etnia, estado de infecção pelo HIV e idade (Click, Moonan et al., 2012).

No Brasil, a epidemiologia molecular da TB vem ganhando espaço aos poucos, mas ainda são poucas as publicações quando comparadas à magnitude da TB no país (Lazzarini, Huard et al., 2007; Santos, 2007; Lazzarini, Rosenfeld et al., 2012; Vinhas, 2012). Quando o foco é a epidemiologia molecular da TBEP, a escassez de estudos é ainda maior.

No estado do ES, o estudo da epidemiologia molecular da TB é recente e somente um estudo foi publicado até o momento. Vinhas e colaboradores (Vinhas, 2012) investigaram a relação de clusters de MTB com o genótipo RdRio (sublinhagem da linhagem LAM) e mostraram que RdRio não foi fortemente relacionada à transmissão recente da TB no ES.

A TBEP tem menor foco tanto nas pesquisas quanto nos programas de controle da TB, porém, foi destacado que, com o surgimento do HIV, suas taxas tenderam a elevação e sua diminuição está sendo mais lenta quando comparada à TBP (Peto, Pratt et al., 2009).

Assim, observa-se que, para a diminuição dos casos de TBEP no Brasil, o entendimento dos fatores determinantes da doença em todos os seus aspectos sociais, ambientais, clínicos e moleculares é uma proposta inédita e de suma importância.

CAPÍTULO 4

4.1 ARTIGO 1

Epidemiologia da Tuberculose Extrapulmonar no Brasil: Utilização do modelo hierárquico.

Epidemiology of Extrapulmonary Tuberculosis in Brazil: use of the hierarchical model.

RESUMO

Introdução: A tuberculose extrapulmonar (TBEP) é menos frequente e menos abordada pelos programas de controle da tuberculose (TB), porém, com o advento do vírus da imunodeficiência (HIV), vem ganhando importância no cenário mundial. Sabendo que entender os fatores determinantes de um agravamento é imprescindível no melhor planejamento das ações em saúde pública, este estudo objetivou analisar a epidemiologia da TBEP no Brasil no período de 2007 a 2011. **Metodologia:** Estudo transversal com todos os casos de TB notificados no Sistema de Informações de Agravamento de Notificação (SINAN) no Brasil entre 2007 e 2011. Realizada análise descritiva da TBEP e gráfico de tendência dos casos de TB pulmonar (TBP) e TBEP nos 05 anos, seguido da comparação entre as formas clínicas quanto às características sócio-demográficas e clínicas. Foi realizado teste do qui-quadrado de Pearson, as variáveis com valor de $p < 0,05$ seguiram para um modelo de regressão hierárquica e as variáveis com $p < 0,05$ no seu nível permaneciam no modelo. **Resultados:** O estudo teve 427.548 casos de TB, compreendendo 356.341 (83,35% IC95% 83,23% - 83,45%) casos de TBP, 53.853 (12,60% IC95% 12,49% - 12,69%) casos de TBEP, 11.586 (2,70% IC95% 2,66% - 2,75%) casos de TBP+TBEP e 5.768 (1,35% IC95% 1,31% - 1,38%) casos de TB miliar. Os principais sítios acometidos foram o pleural (42%) e o ganglionar (21%). A tendência da TBP e TBEP não teve grande variação no período. A principal faixa etária do grupo TBEP foi 18 a 39 anos (47,0%), porém a proporção de crianças de 0 a 5 anos foi significativa quando comparada com a TBP (OR: 1,91 IC95% 1,73 - 2,10). Casos de TBEP eram principalmente brancos (45,2%) e a maioria teve de 5 a 8 anos de estudo (28,0%). Entre as comorbidades, destacou-se o HIV (OR: 2,24 IC95% 2,18 - 2,31) e alta proporção de testagem para HIV em andamento ou não realizada (39,9%). Uso de álcool (OR: 0,45 IC95% 0,43 - 0,47), diabetes (OR: 0,54 IC95% 0,51 - 0,57) e doença mental (OR 0,88 IC95% 0,82 - 0,95) foram relacionados à TBP. A TBEP teve maior proporção de resultado de baciloscopia negativa (21,2% $p < 0,001$). A histopatologia teve uma proporção 5 vezes maior de resultados sugestivos de TB do que a TBP (OR: 5,09 IC95% 4,62 - 5,61). O Tratamento Diretamente Observado (TDO) não foi realizado em 65% dos casos de TBEP. Quanto ao desfecho, houve um grande número de transferências comparado à TBP (OR: 1,23 IC95% 1,18 - 1,29). A tendência da TBEP e TBP no país em 05 anos não mostrou aumento nem

declínio marcantes, mostrando que medidas de controle da TB devem ser mais efetivas para diminuição no número de casos. **Conclusão:** Nota-se que características relacionadas à TBEP muitas vezes diferem daquelas relacionadas à TBP e àquelas relatadas em países com baixa carga da TB, assim, este estudo auxilia no entendimento da magnitude da TBEP no Brasil.

Palavras-chave: Tuberculose extrapulmonar. Vigilância epidemiológica. Epidemiologia. Estudo transversal.

ABSTRACT

Introduction: Extrapulmonary tuberculosis (EPTB) is less frequent and less addressed by programs of control of tuberculosis (TB), but with the advent of the human immunodeficiency virus (HIV), the EPTB is gaining importance on the world stage. Knowing that to understand the determinants of a disease is essential to better public health planning, this study aimed to analyse the epidemiology of EPTB in Brazil in the period 2007 to 2011. **Methods:** It's a cross-sectional study with all TB cases reported in the National Surveillance System Information (SINAN) in Brazil between 2007 and 2011. It was made a descriptive analysis and a trend graph of EPTB cases and of pulmonary TB (PTB) cases in 05 years, followed by the comparison between the clinical forms regarding socio-demographic and clinical aspects. Chi-square test was conducted, the variables with $p < 0.05$ followed for a hierarchical regression model, and variables with $p < 0.05$ in each level remained in the model. **Results:** The study had 427,548 TB cases, including 356.341 (83,35% IC95% 83,23% - 83,45%) PTB cases, 53.853 (12,60% IC95% 12,49% - 12,69%) EPTB cases, 11.586 (2,70% IC95% 2,66% - 2,75%) concomitant pulmonary and extrapulmonary TB cases (PTB + EPTB) and 5.768 (1,35% IC95% 1,31% - 1,38%) miliary TB cases. The main sites affected were pleural (42%) and lymph node (21%). The trend of PTB and EPTB had no variation in the period. The main age group was 18-39 years (47.0%) but the proportion of children aged 0-5 years was significant when compared to PTB (OR: 1.91 95% CI 1.73 to 2.10). EPTB cases were mostly white skin (45.2%) and most had 5-8 years of education (28.0%). Among the comorbidities stood out HIV (OR: 2.24 95% CI 2.18 to 2.31) and high proportion of HIV testing in progress or not performed (39.9%). Alcohol use (OR: 0.45 95% CI 0.43 to 0.47), diabetes (OR: 0.54 95% CI 0.51 to 0.57) and mental illness (OR 0.88 CI

95% 0.82 - 0.95) were related to PTB. The EPTB group had a higher proportion of smear-negative result (21,2% $p < 0,001$). Results of histopathology was a ratio of 5 times higher on suggestive of tuberculosis than the PTB (OR: 5.09 95% CI 4.62 to 5.61). The Directly Observed Treatment (DOT) was not performed in 65% of EPTB cases. About outcome, there was a large number of transfers compared to PTB (OR: 1.23 95% CI 1.18 to 1.29). The trend of PTB and EPTB in the country in 05 years showed no increase or decline striking, and it showed that TB control measures should be more effective to decrease the number of cases. **Conclusion:** This paper demonstrated that characteristics related to EPTB often differ from those related to PTB, and differ from those reported in countries with a low burden of TB, so this study helps in understanding the magnitude of EPTB in Brazil.

Keywords: Extrapulmonary tuberculosis. Epidemiological surveillance. Epidemiology. Cross-sectional study.

INTRODUÇÃO

Ainda que com precariedade de informações sobre a tuberculose extrapulmonar (TBEP), o Brasil parece alcançar importantes proporções dessa forma clínica da tuberculose (TB). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2011 apontam uma proporção de 14% de TBEP entre todos os casos TB no país (1).

Por meio de busca na literatura nacional, observou-se que o tema – epidemiologia da TBEP – encontra-se discretamente inserido em publicações do perfil epidemiológico da TB (2, 3) ou em estudos da relação HIV-TB no país (4, 5). Algumas publicações isoladas são relatadas a nível estadual (6), municipal (4, 7) ou em serviços de saúde (5, 8), porém estudos de abrangência nacional com foco na TBEP são inexistentes. Um exemplo dessa situação é a ausência da abordagem da TBEP no último boletim epidemiológico da TB do Ministério da Saúde (MS) (9).

A TBEP apresentou taxa que variou entre 6,8 por 100 mil habitantes em 1981 a 7,0 por 100 mil habitantes em 1991 no Brasil. Em um estudo no município de Campinas, em São Paulo, entre 2001 a 2009, o número de casos de TBP mostrou um decréscimo de 23,7%, enquanto da TBEP, somente de 5,9% (4).

Um dos principais determinantes dessa tendência de permanência ou mesmo de aumento da proporção de casos de TBEP foi o surgimento do HIV/AIDS (Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), uma vez que todo agravo ou situação que prejudique o sistema imunológico favorece o desenvolvimento da TBEP (10).

Haja vista a epidemia do HIV como mantenedora da TBEP, a pouca literatura nacional sobre o tema e sua relevância no contexto epidemiológico da TB, este estudo objetivou analisar a epidemiologia da TBEP no Brasil no período de 2007 a 2011.

METODOLOGIA

Os sistemas de informação são ferramentas fundamentais para avaliação e planejamento das ações de saúde. Casos de TB são registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), a partir da ficha de investigação e acompanhamento dos casos de TB e tem constituído o principal instrumento no país para a coleta e análise de dados nacionais de TB (11, 12).

Dessa forma, foi realizado um estudo transversal com todos os casos de TB notificados no SINAN no Brasil entre 01 de janeiro de 2007 a 31 de dezembro de 2011. Constituiu critério de exclusão a ausência de descrição da forma clínica da TB no SINAN.

A forma clínica da doença foi atribuída de acordo com a definição de classificação padrão do sistema de vigilância (13). Os casos foram classificados como: TB exclusivamente extrapulmonar (TBEP); TB exclusivamente pulmonar (TBP), TB concomitantemente pulmonar e extrapulmonar (TBP+TBEP); e TB miliar (forma disseminada).

Primeiro foi realizada análise descritiva das formas (TBP e TBEP) e dos sítios de acometimento extrapulmonar (da TBEP, TBP+TBEP e TB miliar) (pleural, ganglionar, genitourinária, óssea, ocular, miliar, meningoencefálica, cutânea, laríngea, outros) por meio de frequências absolutas e relativas, seguido pela elaboração do gráfico de tendência das formas de TB ao longo dos anos.

Procedeu-se então a comparação da TBEP e TBP quanto às características sociodemográficas e clínicas. Nessa fase, os casos de TBP+TBEP e TB miliar foram excluídos devido a seu comprometimento envolver os sítos pulmonar e extrapulmonar concomitantemente e, assim, não haver possibilidade de serem distintamente classificados.

Foi realizado teste do qui-quadrado de Pearson para comparar as proporções entre TBP e TBEP, a seguir, as variáveis com valor de $P < 0,05$ seguiram para um modelo de regressão hierárquica.

A investigação de fatores de risco para uma doença infecciosa envolve a coleta de número considerável de variáveis. Considerando-se a possibilidade de que uma ou mais variáveis de confusão possam explicar parcial ou totalmente o efeito detectado, torna-se indispensável o emprego de análise multivariável na identificação de fatores de risco independentes (14).

Daí a escolha desse modelo de regressão, a hierarquização das variáveis independentes é estabelecida no marco conceitual e mantida durante a análise dos dados, permitindo a seleção daquelas mais fortemente associadas ao desfecho de interesse, sendo esse marco conceitual o descritor das relações hierárquicas entre os fatores de risco (14, 15). Foi utilizado o modelo conceitual dos determinantes sociais da TB proposto por Maciel, ELN (16).

As seguintes variáveis foram avaliadas e distribuídas nos seguintes níveis: Nível 1 (variáveis sociodemográficas) – gênero (feminino, masculino), idade (<5 anos, 6-17 anos, 18-39 anos, 40-59 anos, >60 anos), cor (branco, preto, pardo, amarelo, índio) e escolaridade (analfabeto, 1-4 anos, 5-8 anos, 9-12 anos, > 12 anos, não se aplica). No nível 2 (variáveis ambientais) – residência (urbana, rural e periurbana) e institucionalização [sim (que compreende prisão, asilo, orfanato, hospital, psiquiátrico, outros) ou não].

As variáveis clínicas puderam ser divididas em 03 níveis e constituíram: nível 3 (comorbidades) – HIV/AIDS (negativo, positivo), alcoolismo (sim ou não), diabetes (sim ou não), doença mental (sim ou não), outras doenças (sim ou não); Nível 4 (variáveis clínicas) – tipo de entrada (caso novo, recidiva, reingresso após abandono, desconhecido e transferência), teste tuberculínico (PPD) [positivo (>5mm)] ou negativo (resultado 0 a 4 mm)], baciloscopia (BK) (negativo, positivo), cultura (positivo, negativo), histopatologia [não sugestivo de TB, BAAR (bacilo álcool ácido resistente) positivo, sugestivo de TB]; e Nível 5 (variáveis do desfecho) – realização de Tratamento Diretamente Observado (TDO) (sim/ não) e a situação de encerramento [cura, abandono, morte por TB, morte por outras causas, transferência ou TB multi-droga resistente (TBMDR)].

Em cada nível, as variáveis associadas à forma clínica ($p \leq 0,05$) foram mantidas nas próximas análises, resultando no seguinte modelo: nível 1 características sociodemográficas; nível 2 variáveis retidas a partir do nível 1 + características ambientais; nível 3 variáveis retidas a partir do nível 3 + comorbidades; nível 4

variáveis retidas de nível 3 + características clínicas da TB; e nível 5 variáveis retidas a partir do nível 4 + variáveis do desfecho.

O programa Microsoft Excel 2010 foi utilizado para organização dos bancos de dados e geração de gráficos, já a análise estatística dos dados foi realizada no programa Stata versão 11.0, sendo calculado o Odds Ratio com Intervalo de Confiança de 95%.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde sob o numero de registro 121/06.

RESULTADOS

População do estudo

No período de 2007 a 2011, 428.039 casos de TB foram reportados ao SINAN. Destes foram excluídos 491 casos onde o campo da forma clínica não estava preenchido, resultando em 427.548 casos de TB de 2007 a 2011, a população final do estudo. Os Casos de TB compreenderam 356.341 (83,35% IC95% 83,23% - 83,45%) casos de TBP, 53.853 (12,60% IC95% 12,49% - 12,69%) casos de TBEP, 11.586 (2,70% IC95% 2,66% - 2,75%) casos de TBP+TBEP e 5.768 (1,35% IC95% 1,31% - 1,38%) casos de TB miliar.

O total de casos com algum acometimento extrapulmonar (todas as formas exceto a TBP) compreendeu 71.207 casos. Destes um total de 70.131 tiveram o sítio clínico envolvido relatado no SINAN, e a proporção de cada sítio pode ser vista na Figura 1. A figura mostra somente o 1º sítio informado, além desses, 4.307 (6%) casos de TBEP ou TBP+TBEP tiveram um segundo sítio envolvido.

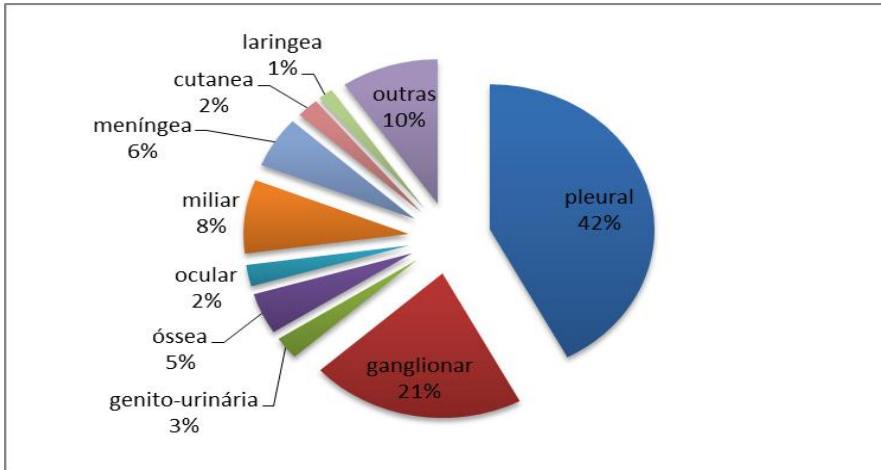


Figura 1 – Sítios clínicos de acometimento extrapulmonar da Tuberculose no Brasil, 2007 a 2011.

A análise descritiva somente dos casos de TBEP destacou algumas características tais como sexo masculino em 60,2% dos casos, a faixa etária mais presente entre 18 a 39 anos com 47% dos casos, a cor de pele branca (45,2%) como principal, e a maioria com 5 a 8 anos de estudo (28,0%). A proporção de testes HIV em andamento ou não realizado foi de 39,9% e o TDO não foi realizado em 65% dos casos de TBEP, transferência foi o desfecho de 9,5% dos casos de TBEP e 73% obteve cura (Dados não mostrados). Além destas, outras características da TBEP podem ser visualizadas na Tabela 1, com a proporção de casos de TBEP comparados à TBP.

Tendência da TBEP e da TBP

Quanto à tendência da TBEP no passar dos anos comparada com a tendência da TBP, vemos na Figura 2 que houve pouca variação no número e proporção de cada forma da TB entre 2007 e 2011.

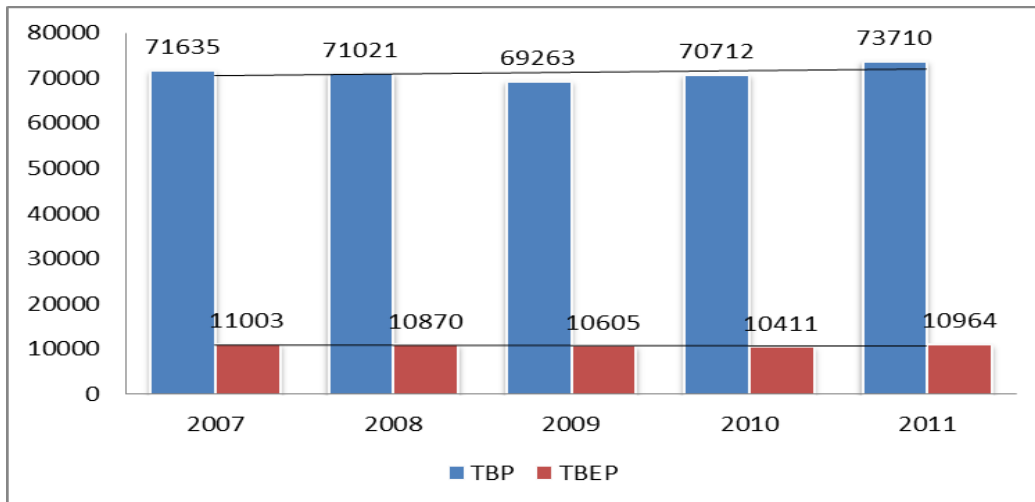


Figura 2 – Tendências da TBP e da TBEP no Brasil, 2007 a 2011. As linhas representam a regressão linear. Valor de p para todos os casos: 0,635, valor de p para TBP: 0,534, valor de p para TBEP: 0,582. TBP: Tuberculose pulmonar. TBEP: Tuberculose extrapulmonar.

Análise comparativa: TBEP x TBP

Na comparação entre as formas da doença, o sexo masculino abrangeu a maioria dos casos de TBP e TBEP, porém a proporção de mulheres foi maior na TBEP com 15,7% ($p < 0,001$). Também foram encontradas diferenças entre as faixas etárias, sendo que a faixa etária menor de 05 anos (22%) e entre 6-17 anos (18,7%) em casos de TBEP tiveram uma maior porcentagem quando comparadas à TBP ($p < 0,001$) (Tabela1).

Dentre a forma extrapulmonar, uma maior proporção de brancos foi encontrada, bem como indivíduos com mais de 7 anos de estudo, ambos com $p < 0,001$ (Tabela1). Presença de alcoolismo ($p < 0,001$), diabetes ($p < 0,001$) e doença mental ($p < 0,001$) tiveram maior ocorrência no grupo TBP, enquanto o HIV ($p < 0,001$) e outras doenças relacionadas ($p = 0,001$) tiveram proporções maiores no grupo TBEP (Tabela 1).

Características clínicas da Tabela 1 expressam uma maior proporção de casos novos do que reingresso após abandono, recidiva, desconhecido e transferência na TBEP quando comparados à TBP. Embora as porcentagens de PPD positivo e PPD negativo mostrem valores próximos entre as formas clínicas, significância estatística foi encontrada ($p < 0,001$) (Tabela 1). Exame histopatológico foi menos realizado nos casos de TBP ($p < 0,001$), porém essa forma foi a mais contemplada quando da

realização do TDO ($p < 0,001$). Óbito por TB foi significativamente maior nos casos de TBP, enquanto óbito por outras causas na TBEP ($p < 0,001$) (Tabela 1).

Dada as significâncias apresentadas no teste qui-quadrado (Tabela 1), todas as variáveis passaram para o modelo hierárquico e neste permaneceram significativas durante todas as etapas, sendo mostradas na Tabela 2.

O Odds Ratio (OR) para a ocorrência da TBEP foi menor entre homens (OR: 0,77 IC95% 0,76 – 0,78) e entre institucionalizados (OR: 0,61 IC95% 0,59 – 0,64) (Tabela 2).

Por outro lado, casos de TBEP tiveram maior chance de serem brancos comparado a todas outras cores de pele, de serem crianças menores de 05 anos (OR: 1,91 IC95%: 1,73 – 2,10), pessoas com maior escolaridade (escolaridade > 12 anos OR: 4,79 IC95% 4,48 – 5,13) e positivos para o vírus do HIV (OR: 2,24 IC95% 2,18 – 2,31) (Tabela 2).

Ainda na Tabela 2, observa-se no nível 03 do modelo, que trata das comorbidades, que alcoolismo (OR: 0,45 IC95% 0,43 – 0,47), doença mental (OR: 0,88 IC95% 0,82 – 0,95) e diabetes (OR: 0,54 IC95% 0,51 – 0,57) ocorrem menos em casos de TBEP quando comparados à TBP. No nível 04, encontram-se associados à TBEP: entrada por transferências (OR: 1,31 IC95% 1,24 – 1,37), PPD positivo (OR: 1,08 IC95% 1,02 – 1,13) e exame histopatológico sugestivo de TB (OR: 5,09 IC95% 4,62 – 5,61). No entanto, entre as variáveis desse nível com menor associação com essa forma estão a positividade de BK (OR: 0,12 IC95% 0,12 – 0,13) e realização da cultura (OR: 0,81 IC95% 0,78 – 0,85).

Por último, nas variáveis ligadas ao desfecho, o TDO foi realizado cerca de 31% menos vezes na TBEP do que na TBP (OR: 0,69 IC95% 0,67 – 0,71) e houve uma chance menor de abandono na TBEP (OR 0,76 IC95% 0,76 – 0,83) (Tabela 2).

Tabela 1 – Características de Pacientes com Tuberculose Extrapulmonar (TBEP), comparado com Tuberculose Pulmonar (TBP), Brasil, 2007 a 2011 (N=410.194).

Características		TBEP (%)	TBP (%)	Valor de p**	
N*		(n=53.853)	(n=356.341)		
Gênero	Feminino	21.437 (15,7)	115.541 (84,3)	<0,001	
	(410.168)	Masculino	32.414 (11,9)		240.776 (88,1)
Idade	<5 anos	1.221 (22,0)	4.322 (78,0)	<0,001	
	(409.981)	6 – 17 anos	3.640 (18,7)		15.798 (81,3)
	18 – 39 anos	25.334 (12,8)	171.978 (87,2)		
	40 – 59 anos	16.990 (12,6)	117.679 (87,4)		
	>60 anos	6.645 (12,5)	46.374 (87,5)		
Cor	Branco	21.161 (15,9)	112.112 (84,1)	<0,001	
	(358.473)	Preto	5.941 (11,1)		47.566 (88,9)
	Pardo	18.685 (11,5)	144.380 (88,5)		
	Amarelo	534 (13,1)	3.531 (86,9)		
	Indígena	451 (9,9)	4.112 (90,1)		
Escolaridade	Analfabeto	1.311 (6,5)	18.873 (93,5)	<0,001	
	(257.179)	1 – 4 anos	8.081 (9,5)		77.014 (90,5)
	5 – 8 anos	9.665 (12,2)	69.786 (87,8)		
	9 – 12 anos	8.177 (17,3)	39.089 (82,7)		
	>12 anos	4.381 (27,0)	11.818 (73,0)		
	Não se aplica	1.723 (19,2)	7.261 (80,8)		
Residência	Urbana	35.976 (12,9)	241.956 (87,1)	<0,001	
	(313.719)	Rural	3.025 (9,1)		30.260 (90,9)
	Periurbana	261 (10,4)	2.241 (89,6)		
Institucionalização	Não	43.040 (13,7)	270.977 (86,3)	<0,001	
	(351.377)	Sim	3.002 (8,0)		34.358 (92,0)
HIV/AIDS	Negativo	23.045 (13,4)	149.526 (86,6)	<0,001	
	(410.194)	Positivo	9.312 (24,3)		28.983 (75,7)
Alcoolismo	Não	43.507 (14,8)	249.994 (85,2)	<0,001	
	(352.275)	Sim	3.769 (6,4)		55.005 (93,6)
Diabetes	Não	45.244 (13,9)	279.414 (86,1)	<0,001	
	(347.763)	Sim	1.845 (8,0)		21.260 (92,0)
Doença Mental	Não	46.199 (13,6)	293.038 (86,4)	<0,001	
	(348.245)	Sim	885 (9,8)		8.123 (90,2)

(Continua)

Tabela 1 (Continuação) – Características de Pacientes com Tuberculose Extrapulmonar (TBEP), comparado com Tuberculose Pulmonar (TBP), Brasil, 2007 a 2011 (N=410.194).

Características		TBEP (%)	TBP (%)	Valor de p
Outras doenças (314.004)	Não	35.898 (13,5)	229.706 (86,5)	0,001
	Sim	6.822 (14,1)	41.578 (85,9)	
Tipo de Entrada (410.194)	Caso Novo	47.256 (14,0)	290.430 (86,0)	<0,001
	Recidiva	2.016 (8,1)	23.013 (91,9)	
	Reingresso após abandono	1.270 (5,2)	23.191 (94,8)	
	Desconhecido	133 (11,5)	1.026 (88,5)	
	Transferência	3.178 (14,5)	18.681 (85,5)	
PPD (410.194)	Negativo	4.330 (23,0)	14.461 (77,0)	<0,001
	Positivo	11.257 (23,2)	37.255 (76,8)	
BK (410.194)	Negativo	22.164 (21,2)	82.602 (78,8)	<0,001
	Positivo	5.599 (2,4)	229.271 (97,6)	
Cultura (410.194)	Negativo	6.361 (22,4)	22.103 (77,6)	<0,001
	Positivo	4.396 (9,0)	44.478 (91,0)	
Histopatologia (410.194)	Não sugestivo TB	852 (28,1)	2.184 (71,9)	<0,001
	BAAR+	4.149 (23,4)	13.573 (76,6)	
	Sugestivo TB	17.346 (73,3)	3.311 (26,7)	
TDO (410.194)	Não Realizado	27.318 (15,1)	153.811 (84,9)	<0,001
	Realizado	14.706 (9,3)	143.597 (90,7)	
Situação do Encerramento (410.194)	Cura	28.916 (13,4)	186.427 (86,6)	<0,001
	Abandono	3.183 (8,8)	33.016 (91,2)	
	Óbito por TB	1.194 (10,0)	10.718 (90,0)	
	Óbito-outras causas	2.495 (18,4)	11.046 (81,6)	
	Transferência	3.727 (13,7)	23.566 (86,3)	
	TBMDR	25 (2,2)	1.1140 (97,8)	

* Número de observações válidas. ** Teste qui-quadrado de Pearson.

HIV/AIDS: Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. PPD: Teste Tuberculínico (*purified protein derivative*). BK: Baciloscopia. TDO: Tratamento Diretamente Observado. TBEP: tuberculose extrapulmonar. TBP: tuberculose pulmonar.

Tabela 2 – Regressão Logística Hierárquica da associação entre as formas clínicas de TB e características relacionadas, Brasil, 2007 a 2011.

Características		OR*	IC (95%)**	
Nível 1	Gênero	Feminino	Referência	
		Masculino	0,77	
	Idade	<5 anos	1,91	1,73 – 2,10
		6 – 17 anos	1,63	1,56 – 1,69
		18 – 39 anos		Referência
		40 – 59 anos	1,07	1,05 – 1,09
		>60 anos	1,13	1,10 – 1,72
	Cor	Branco		Referência
		Preto	0,75	0,72 – 0,77
		Pardo	0,74	0,73 – 0,76
		Amarelo	0,82	0,74 – 0,90
		Indígena	0,63	0,57 – 0,70
	Escolaridade	Analfabeto		Referência
		1 – 4 anos	1,49	1,40 – 1,58
		5 – 8 anos	1,93	1,82 – 2,06
9 – 12 anos		2,87	2,70 – 3,06	
>12 anos		4,79	4,48 – 5,13	
Não se aplica		2,20	1,99 – 2,43	
Nível 2	Residência	Urbana	Referência	
		Rural	0,82	0,78 – 0,85
		Periurbana	0,89	0,78 – 1,01
	Institucionalização	Não		Referência
		Sim	0,61	0,59 – 0,64
Nível 3	HIV/AIDS	Negativo	Referência	
		Positivo	2,24	2,18 – 2,31
	Alcoolismo	Não		Referência
		Sim	0,45	0,43 – 0,47
	Diabetes	Não		Referência
		Sim	0,54	0,51 – 0,57
	Doença Mental	Não		Referência
		Sim	0,88	0,82 – 0,95
	Outras Doenças	Não		Referência
		Sim	1,19	1,15 – 1,22

(continua)

Tabela 2 (Continuação) – Regressão Logística Hierárquica da associação entre as formas clínicas de TB e características relacionadas, Brasil, 2007 a 2011.

Características		OR*	IC (95%)**
Nível 4	Tipo de Entrada	Caso Novo	Referência
		Recidiva	0,65 0,62 – 0,69
		Reingresso após abandono	0,39 0,37 – 0,42
		Desconhecido	0,66 0,53 – 0,81
		Transferência	1,31 1,24 – 1,37
	PPD	Negativo	Referência
		Positivo	1,08 1,02 – 1,13
	BK	Negativo	Referência
		Positivo	0,12 0,12 – 0,13
	Cultura	Negativo	Referência
Positivo		0,63 0,60 – 0,67	
Histopatologia	Não sugestivo TB	Referência	
	BAAR+	1,80 1,62 – 1,99	
	Sugestivo TB	5,09 4,62 – 5,61	
Nível 5	TDO	Não Realizado	Referência
		Realizado	0,69 0,67 – 0,71
	Situação de Encerramento	Cura	Referência
		Abandono	0,79 0,76 – 0,83
		Óbito por TB	0,73 0,68 – 0,79
		Óbito-outras causas	1,05 0,99 – 1,11
		Transferência	1,23 1,18 – 1,29
		TBMDR	0,43 0,27 – 0,68

*OR: Odds Ratio. **IC: Intervalo de Confiança.

HIV/AIDS: Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. PPD: Teste Tuberculínico (*purified protein derivative*). BK: Baciloscopia. TDO: Tratamento Diretamente Observado. TBEP: tuberculose extrapulmonar. TBP: tuberculose pulmonar.

DISCUSSÃO

No Brasil, a TBEP ocorre principalmente em adultos, mas com uma proporção significativa em crianças, em brancos, pessoas com escolaridade entre 05 e 08 anos de estudo, residentes em áreas urbanas e não institucionalizadas. Foram

relacionados com a TBP álcool, diabetes e doença mental, bem como maior positividade na baciloscopia. Histopatologia é usualmente recomendada, tendo grande quantidade de amostras sugestivas de TB na TBEP. A baixa realização do TDO merece a devida atenção pelos órgãos de controle da TB, e a grande quantidade de transferências sugere a dificuldade ou falta de conhecimento no manejo desses pacientes.

Os principais sítios extrapulmonares acometidos são o pleural e o ganglionar, e a tendência da TBEP e TBP no país em 05 anos não mostrou aumento nem declínio visíveis.

Limitações do nosso estudo poderiam estar relacionadas à incompletude do banco de dados secundários, porém, devido ao grande número de casos, as análises estatísticas permaneceram significativas, não sendo afetadas. Além disso, acredita-se que a TBEP possa estar subnotificada, devido à dificuldade no seu diagnóstico, que exige alto grau de suspeição clínica. Forças do nosso estudo incluem a abordagem da TBEP a nível nacional com o banco de informações do sistema de vigilância vigente, utilização do modelo hierárquico e a contribuição para os saberes sobre essa forma clínica no Brasil.

A proporção de casos de TBEP entre todas as formas de TB varia muito de um país para outro e parece ser geralmente maior em países de baixa incidência da TB como EUA (21%), Itália (32%), Japão (23%) e Austrália (39%). Supõe-se que nestes a proporção de pacientes com TBP, principais responsáveis pela transmissão e expansão da TB, seja menor e por isso os casos de TBEP tomaram uma maior dimensão quando comparados à TBP e, principalmente com o advento do HIV/AIDS, as taxas de TBEP vieram a se elevar ou declinar mais lentamente (1, 17).

Já em países de maior incidência da TB, a TBEP geralmente se apresenta em uma menor proporção entre os casos totais. Em 2011, a Índia teve 19% de TBEP, Indonésia 4% de TBEP e Paquistão 18% de TBEP. O Brasil, que se encontra em 17º lugar entre os 22 países que concentram 82% dos casos de TB mundiais, evidenciou uma proporção de 12,60% (IC95% 12,49% - 12,69%) de TBEP entre 2007 e 2011 no nosso estudo, seguindo a tendência de países com alta carga da doença (1, 9).

É importante salientar que, nos países em que houve redução na incidência de TB, observou-se uma redução dinâmica dos casos de TBP e uma redução menos acentuada das formas extrapulmonares, e o mesmo não se tem observado em países de média e alta carga da doença (18, 19). Assim, quanto à análise da tendência das formas de TBP e TBEP no período de 2007 a 2011 no Brasil, nota-se a estagnação das taxas das duas formas clínicas da TB, que demonstra que o controle da TB no Brasil ainda é um grande desafio, embora a incidência, padrão usado para avaliar a carga da doença, tenha diminuído no país com o passar dos anos (20).

Os principais sítios clínicos envolvidos foram pleural e ganglionar periférico, respectivamente, já nos EUA, entre 1993 e 2006, o comprometimento ganglionar foi o principal, seguido do pleural (18). Porém, a TB pleural já foi apontada como a mais prevalente em vários estudos, como em uma região da Espanha na qual 41,1% dos casos de TBEP eram de TB pleural, seguido por 30,6% de casos de TB ganglionar (19). Em um estudo de base hospitalar no Maranhão, havia 52,6% de casos de TB pleural e 29,3% de TB ganglionar(8).

A forma pleural, a mais encontrada nesse estudo, merece adequada atenção, além da alta prevalência, encontra-se frequentemente associada à TBP e há evidências de que a TB pleural é uma manifestação precoce da infecção primária pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), e assim pode ser sentinela no estudo de cadeias de transmissão recente (17).

Embora tenha atingido principalmente homens (60,2%), corroborando outros estudos do país (6, 8), a maior proporção do acometimento da TBEP em mulheres, quando comparado à TBP, foi estatisticamente significativa e é coerente com outros estudos (18, 19), sendo cogitada sua relação com as diferenças de oportunidades de exposição ao TBP ativo, como a mais extensa atividade social dos homens, hábitos ligados ao álcool e tabaco ou mesmo diferenças genéticas inexplicáveis (19).

O maior acometimento da TBEP nas faixas etárias de 0 a 5 anos é explicado pela relação intrínseca entre essa forma e uma menor capacidade do sistema imune ao se defender do MTB, sendo assim, comum em crianças jovens, cujo sistema imune está imaturo (10).

A associação da cor branca com a TBEP é contrastante com estudos realizados em outros lugares, principalmente em países com alta carga da doença, como nos EUA, em que a forma esteve presente na população não branca em 81% dos casos (18). Pesquisadores ingleses apontam que a TBEP é mais prevalente em certos grupos étnicos, como asiáticos, e ocorre muito raramente em caucasianos (10). O predomínio da cor branca também se mostra diferente entre os casos de TBEP e de TB totais no Brasil, nos quais cores de pele parda e negra têm as maiores proporções nas diversas estratificações de grupos (16).

As análises demonstraram que quanto maior a escolaridade maior foi a associação com a TBEP, confirmando a baixa escolaridade comumente associada à TBP ou TB total. Em um estudo em Ribeirão Preto, SP, a taxa de TB foi correlacionada ao menor nível educacional e vulnerabilidade social, determinantes da transmissão do MTB, principalmente na forma pulmonar, mostrando a TB fortemente relacionada às características sociais de uma população (21).

Algumas comorbidades reconhecidamente relacionadas à TBP não demonstram a mesma relação com a TBEP, como alcoolismo, diabetes e doença mental, como já relatado por outros autores (19, 22-24). Populações institucionalizadas, como em asilos ou presídios, são consideradas mais vulneráveis à TB, principalmente TBP (13), assim, tal vulnerabilidade foi menos encontrada no grupo com TBEP.

Quanto às características clínicas, o HIV/AIDS, como já esperado, teve importante associação com a TBEP, tendo uma chance de ocorrência cerca de 2 vezes maior nesta forma do que na TBP, concordando com estudos nacionais (4, 6) e internacionais (10, 18, 25) que apontam a estrita relação entre as duas doenças. No Brasil, em um estudo sobre a emergência da coinfeção TB-HIV no período de 2006 a 2010, a TBEP ocorreu em 26,2%, considerada pelos autores como alarmante (26).

Chama a atenção *status* de 39,9% dos testes anti-HIV em andamento ou não realizado em casos de TBEP. Quanto menor o número de pacientes com TB que realizam o teste de HIV, maior a incerteza sobre a prevalência da coinfeção (27). A realização do teste anti-HIV deve estar garantida para todos os que consentirem, mas, também, deve estar assegurado que os resultados sejam inseridos nos sistemas de informação, logo que disponíveis (27).

Destacaram-se as transferências como tipo de entrada da TBEP no sistema de saúde. Sugere-se que esse fato esteja relacionado à maior dificuldade na suspeita e diagnóstico dessa forma entre os profissionais de saúde, necessitando de encaminhamentos para outros serviços para confirmação diagnóstica, ou início do tratamento muitas vezes sem essa confirmação, necessitando de um alto grau de suspeição clínica (28).

A BK teve grande proporção de resultados negativos. O número de bactérias em espécimes extrapulmonares é menor do que o número de espécimes pulmonares. Além disso, a coleta de materiais pulmonar extrapulmonar muitas vezes requer procedimentos invasivos e é difícil a obtenção de amostras adicionais (29).

A cultura que não é universal no Brasil é indicada em casos específicos como os casos de TBEP, suspeita de resistência a drogas e em populações vulneráveis (30), mostrando assim ter uma proporção significativamente maior de realização do que nos casos de TBP, muito embora sua positividade tenha sido menor.

O exame histopatológico também muito colabora no diagnóstico da TBEP. Nos pacientes não imunossuprimidos, a BK do tecido usualmente é negativa e a presença de um granuloma, com necrose de caseificação, é compatível com o diagnóstico de TB. Nos pacientes imunossuprimidos, é menos frequente a presença de granuloma com necrose caseosa, mas é mais frequente a positividade da BK no material de biópsia (13). Os resultados BAAR positivo e sugestivos de TB foram significativamente maiores nas amostras extrapulmonares.

O TDO não foi realizado em 65% dos casos de TBEP, uma proporção significativamente maior do que na forma pulmonar. Dentre as recomendações para o tratamento da TBEP, os médicos devem considerar descumprimento, má absorção e resistência a medicamentos como possíveis razões para atraso ou resposta subótima à terapia apropriada, e o TDO é fortemente recomendado para encorajar a adesão à medicação (31).

Por último, ao analisar a situação de encerramento, foi notado um maior número de transferências e menor de abandonos, TBMDR e mortes por TB na TBEP comparado à TBP. Em um estudo na Tailândia, a porcentagem de cura foi de 66%, menor que os 73% do presente trabalho, e transferências de 9% similares aos 9,5% encontrados no Brasil (32). Em Salvador, a porcentagem de óbitos por TB em

pacientes com TBEP comparado à TBP foi de 14,7%, maior do que a média nacional de 10% observada nas análises (33).

Nota-se que a TBEP, embora geralmente não transmissível e fora do foco principal dos programas de controle, vem tendo destaque no cenário epidemiológico mundial da TB, principalmente com o surgimento do HIV (34).

É assim um grande problema de saúde devido à taxa significativamente alta de mortalidade e morbidade, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (35). Nota-se que características relacionadas à TBEP muitas vezes diferem daquelas relacionadas à TBP e àquelas relatadas em países com baixa carga da TB, assim, pesquisas que identifiquem esses fatores são de grande relevância para o entendimento do problema.

O diagnóstico da TBEP continua a ser um diagnóstico muitas vezes difícil de estabelecer, necessitando de um alto grau de suspeição clínica e um exame criterioso do paciente (29), assim, a identificação dos fatores associados à população acometida é importante para nortear os profissionais e alertá-los que se trata de uma população diferente da TBP.

Por último, a TB pleural, principal forma de TBEP encontrada no país, pode ser vista como de grande relevância para o programa de controle da TB, pois está intimamente associada a primo-infecção pelo MTB (17), indicativo de transmissão recente de TBP, sendo considerada um evento sentinela em saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization .Tuberculosis countries profiles. 2012 [cited 2013 14/02]; Available from: <http://www.who.int/tb/country/en/>.
2. Braga JU GG, Miranda JA, Teixeira GM, Natal S, Nijjar MA, et al. Comportamento epidemiológico da Tuberculose no Brasil na década de 80: estudo de morbidade. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 1992;18(2):119.
3. Mascarenhas MDM, Araújo LM, Gomes KRO. Perfil epidemiológico da tuberculose entre casos notificados no Município de Piripiri, Estado do Piauí, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2005;14:7-14.
4. Saita NM, Oliveira HBd. Tuberculosis, AIDS and tuberculosis-AIDS co-infection in a large city. *Revista latino-americana de enfermagem*. 2012;20:769-77.
5. Boffo MMS, Mattos IGd, Ribeiro MO, Oliveira Neto ICd. Tuberculose associada à AIDS: características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes atendidos em um serviço de referência do sul do Brasil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2004;30:140-6.
6. Seiscento M, Vargas FS, Rujula MJ, Bombarda S, Uip DE, Galesi VM. Epidemiological aspects of pleural tuberculosis in the state of Sao Paulo, Brazil (1998-2005). *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2009;35(6):548-54. Epub 2009/07/21.
7. Coutinho L, Oliveira, DS, Souza, GF, Fernandes Filho, GMS, Saraiva, MG. Perfil Epidemiológico da Tuberculose no Município de João Pessoa – PB, entre 2007 - 2010. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 2012;16(1).
8. Silva A, Monteiro SG, Figueiredo, PMS. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de tuberculose extrapulmonar atendidos em hospital da rede pública no estado do Maranhão. *Rev Bras Clin Med* 2011;9(1).
9. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Especial Tuberculose. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2012;43.

10. Rowinska-Zakrzewska E. [Extrapulmonary tuberculosis, risk factors and incidence]. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2011;79(6):377-8. Epub 2011/10/27. Gruzlica pozaplcna - ryzyko zachorowania i czestosc wystepowania.
11. Selig L, Kritski AL, Cascao AM, Braga JU, Trajman A, de Carvalho RM. Proposal for tuberculosis death surveillance in information systems. *Rev Saude Publica*. 2010;44(6):1072-8. Epub 2010/11/26.
12. Oliveira GP, Pinheiro RS, Coeli CM, Barreira D, Codenotti SB. Mortality information system for identifying underreported cases of tuberculosis in Brazil. *Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology*. 2012;15(3):468-77. Epub 2012/10/24. Uso do sistema de informacao sobre mortalidade para identificar subnotificacao de casos de tuberculose no Brasil.
13. Brasil. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil In: *Epidemiológica DdV*, editor. 2011. p. 32-4.
14. Fuchs SC, Victora CG, Fachel J. Modelo hierarquizado: uma proposta de modelagem aplicada à investigação de fatores de risco para diarreia grave. *Revista de Saúde Pública*. 1996;30:168-78.
15. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC, Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *International journal of epidemiology*. 1997;26(1):224-7. Epub 1997/02/01.
16. Maciel E. A promoção de saúde e os determinantes sociais da Tuberculose: elementos para ação. In: *Saberes*, editor. Promoção de saúde na diversidade humana e na pluralidade de itinerários terapeuticos. Campinas, SP2012.
17. Ong A, Creasman J, Hopewell PC, Gonzalez LC, Wong M, Jasmer RM, et al. A molecular epidemiological assessment of extrapulmonary tuberculosis in San Francisco. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;38(1):25-31. Epub 2003/12/18.
18. Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49(9):1350-7. Epub 2009/10/02.

19. Garcia-Rodriguez JF, Alvarez-Diaz H, Lorenzo-Garcia MV, Marino-Callejo A, Fernandez-Rial A, Sesma-Sanchez P. Extrapulmonary tuberculosis: epidemiology and risk factors. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(7):502-9. Epub 2011/05/17.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Tuberculose no Brasil: Avancos e Perspectivas In: saude SdVe, editor. Seminario de Manejo Clinico da Tuberculose; São Paulo 2010.
21. Roza DLd, Caccia-Bava MdCGG, Martinez EZ. Spatio-temporal patterns of tuberculosis incidence in Ribeirão Preto, State of São Paulo, southeast Brazil, and their relationship with social vulnerability: a Bayesian analysis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45:607-15.
22. Ferreira AAdA, Queiroz KCdS, Torres KP, Ferreira MÂF, Accioly H, Alves MdSCF. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2005;8:142-9.
23. Cavanaugh JS, Powell K, Renwick OJ, Davis KL, Hilliard A, Benjamin C, et al. An outbreak of tuberculosis among adults with mental illness. *The American journal of psychiatry*. 2012;169(6):569-75. Epub 2012/06/12.
24. Sreeramareddy CT, Panduru KV, Verma SC, Joshi HS, Bates MN. Comparison of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in Nepal- a hospital-based retrospective study. *BMC infectious diseases*. 2008;8:8. Epub 2008/01/26.
25. Abraham BK, Winston CA, Magee E, Miramontes R. Tuberculosis Among Africans Living in the United States, 2000-2009. *Journal of immigrant and minority health / Center for Minority Public Health*. 2012. Epub 2012/04/27.
26. Barbosa IR CI. A emergencia da co-infecção Tuberculose - HIV no Brasil. *HYGEIA Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*. 2012;8(15):232 - 44,.
27. Carvalho CN, Dourado I, Bierrenbach AL. Underreporting of the tuberculosis and AIDS comorbidity: an application of the linkage method. *Rev Saude Publica*. 2011;45(3):548-55. Epub 2011/04/20.
28. Portillo-Gomez L, Morris SL, Panduro A. Rapid and efficient detection of extrapulmonary Mycobacterium tuberculosis by PCR analysis. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2000;4(4):361-70.

29. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(4):1202-5. Epub 2011/01/29.
30. Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, Dalcin Pde T, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2009;35(10):1018-48. Epub 2009/11/18.
31. Golden MP, Vikram HR. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American family physician*. 2005;72(9):1761-8. Epub 2005/11/23.
32. Kingkaew N, Sangtong B, Amnuaiphon W, Jongpaibulpatana J, Mankatittham W, Akksilp S, et al. HIV-associated extrapulmonary tuberculosis in Thailand: epidemiology and risk factors for death. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2009;13(6):722-9. Epub 2009/02/07.
33. Xavier MIM, Barreto ML. Tuberculose na cidade de Salvador, Bahia, Brasil: o perfil na década de 1990. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007;23:445-53.
34. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378(9785):57-72. Epub 2011/03/23.
35. Sankar MM, Singh J, Angelin Diana SC, Singh S. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from North Indian patients with extrapulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012. Epub 2012/11/13.

4.2 ARTIGO 2

Tuberculose Extrapulmonar: Determinantes epidemiológicos e moleculares no Espírito Santo, Brasil.

Extrapulmonary Tuberculosis: epidemiological and molecular determinants in Espírito Santo, Brazil.

RESUMO

Introdução: Fatores relacionados à tuberculose extrapulmonar (TBEP) permanecem não totalmente elucidados, principalmente em países com alta incidência da tuberculose (TB) como o Brasil. A biologia molecular pode auxiliar o entendimento de fatores determinantes da TBEP, uma vez que a genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é útil no entendimento da dinâmica de transmissão e a identificação dos fatores de risco em uma comunidade. O Objetivo do trabalho foi comparar as características epidemiológicas e moleculares de casos de TBEP e de TB pulmonar (TBP) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Metodologia:** Estudo transversal de base laboratorial dos casos novos de TB diagnosticados no Espírito Santo entre 1998 e 2007. História prévia de TB foi coletada por meio de registros laboratoriais e do sistema nacional de notificação (SINAN). 612 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) foram genotipados a partir de 606 pacientes por meio de *spoligotyping* e Polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição-RFLP do elemento de inserção IS6110 e comparadas características sociodemográficas, clínicas e moleculares de pacientes com TBP e TBEP. **Resultados:** Dos pacientes incluídos, 464 (76,5% IC95% 72,9% - 79,8%) possuíam TBP, 79 (13,0% IC95% 10,4% - 15,9%) possuíam TBEP e 51 (8,4% IC95% 6,3% - 10,9%) TB concomitantemente pulmonar e extrapulmonar (TBP+ TBEP) e 12 TB miliar (1,9% IC95% 1,0 – 3,4%). A análise por RFLP IS6110 demonstrou que 250 (41%) isolados de MTB pertenciam a clusters, sendo 27 (11% do total de casos e 34% dos casos de TBEP) em isolados de TBEP. Foram identificados 73 clusters, incluindo 35 (48%) compostos por 2 isolados, e 3 (4%) com mais de 9 isolados. Na análise por *spoligotyping*, 506 (83%) isolados possuíam padrões de SIT (Tipo Internacional de *Spoligotyping*) conhecidos e 106 (17%) desconhecidos. Os isolados pertenciam predominantemente à família LAM [297 (48%)]. Na análise por regressão logística, as variáveis escolaridade (inferior a 7 anos) (OR: 0,60 IC95% 0,38 – 0,95), cor branca (OR: 2,54 IC95% 1,03 – 6,25) e infecção pelo HIV (OR: 16,83 IC95% 5,23 – 54,18) foram associadas à TBEP, porém nenhuma linhagem específica de cepa de MTB ou porcentagem de cluster foi associada ao sítio extrapulmonar da doença. **Conclusão:** Nosso estudo é o primeiro a investigar a epidemiologia molecular relacionado à TBEP no Brasil, e nossos resultados destacam o HIV como

fator de risco para TBEP. Conhecer os fatores determinantes da doença é importante para melhorar o diagnóstico de TBEP e auxiliar o controle da doença.

Palavras-chave: Tuberculose extrapulmonar. Epidemiologia Molecular. DNA fingerprinting. Vigilância epidemiológica.

ABSTRACT

Introduction: Factors related to extrapulmonary tuberculosis (EPTB) still not fully elucidated, particularly in countries with high incidence of tuberculosis (TB) like Brazil. Molecular biology can aid the understanding of determinants of EPTB, since genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is useful in understanding the dynamics of transmission and identification of risk factors in community. The purpose of this study was to compare the epidemiological and molecular EPTB cases and pulmonary TB (PTB) cases in Espírito Santo, Brazil. **Methods:** We conducted a cross-sectional laboratory-based surveillance study of new tuberculosis (TB) cases diagnosed in Espírito Santo State, Brazil between 1998 and 2007. We genotyped 612 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) from 606 TB patients using *spoligo*typing and IS6110-restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing and compared sociodemographic, clinical and molecular characteristics of patients with PTB and with EPTB. **Results:** Patients included 464 (76,5% IC95% 72,9% - 79,8%) with PTB, 79 (13,0% IC95% 10,4% - 15,9%) with EPTB, 51 (8,4% IC95% 6,3% - 10,9%) with both PTB and EPTB and (1,9% IC95% 1,0 - 3,4%) with miliary TB. Previous history of TB was abstracted from laboratory records and the national TB surveillance system. The IS6110 RFLP analysis demonstrated that 250 (41%) isolates belonged to clustered RFLP patterns, and 27 (34%) clustered isolates from EPTB. We identified 73 clusters including 35 (48%) composed by 2 isolates, and 3 (4%) by more than 9 isolates. By *spoligo*typing, 506 (83%) isolates fell into known International Type (SIT) patterns and 106 (17%) fell into patterns with no family assignment in the SITVITWEB. The isolates belonged mainly to the LAM family (297 (48%)); the remainder belonged to families T, S, X, and Haarlem. In a multivariate analysis, beneath 7 years of education (OR: 0,60 IC95% 0,38 - 0,95), white skin (OR: 2,54 IC95% 1,03 - 6,25) and HIV infection (OR: 16,83 IC95% 5,23 - 54,18) were associated with EPTB. No specific MTB strain lineage or clustering index was associated with EPTB site of disease. **Conclusion:** Our study is the first to

investigate the molecular epidemiology related to EPTB in Brazil, and our results highlight HIV as a risk factor for EPTB. To know the determinants of disease is important for improving the diagnosis of EPTB and to help control of disease.

Keywords: Extrapulmonary tuberculosis. Molecular epidemiology. DNA fingerprinting. Epidemiologic surveillance.

INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) está em segundo lugar no ranking de causa de mortes por doenças infecciosas no mundo (1). Em 2010, 6,2 milhões de casos novos de TB ocorreram globalmente, incluindo 800 mil (13%) pacientes com tuberculose extrapulmonar (TBEP) (2). Em 2010, o Brasil reportou 81.946 novos casos de TB; 12% eram TBEP (3).

Nos Estados Unidos (EUA), as taxas totais de TB declinaram ao longo dos últimos 20 anos, no entanto, a proporção de casos com TBEP aumentou de 8% em 1962 para 20% em 2006 (4). Os autores observaram que os fatores de risco para TBEP diferem dos casos de tuberculose pulmonar (TBP) e sugeriram novas pesquisas para identificar a causa do aumento relativo TBEP, um fenômeno que também foi relatado no Brasil e em outros países industrializados (4, 5).

Fatores de risco individuais já associados para TBEP incluem infecção pelo HIV, menor idade, sexo feminino e raça não branca (6-8). Em contraste, pouco se sabe sobre a influência dos determinantes bacterianos sobre a forma clínica da TB. Estudos de epidemiologia molecular do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) têm sido usados na tentativa de entender a base biológica para as diferenças de sítios da TB (4, 9, 10).

Em um recente estudo conduzido nos EUA, as linhagens filogenéticas infectantes Indo-Oceanic e East African Indian tiveram associação com uma maior proporção de TBEP, mesmo quando controlados por região de nascimento, raça/etnia, *status* de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e idade (11).

O estado do Espírito Santo (ES), juntamente com Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, se localiza na região do país com maior número de casos de TB (12). O ES possui 3.5 milhões de pessoas e apresentou uma taxa de incidência de TB de 36.7 por 100,000 habitantes em 2010; 7.4 % dos novos casos diagnosticados estavam infectados com HIV no mesmo ano (13, 14).

Para adicionar ao conhecimento atual na investigação dos fatores individuais e bacterianos relacionados à TBEP a partir de outras regiões geográficas, com uma alta carga de TB, foi realizada comparação das características epidemiológicas e

moleculares de casos de TBP e de TBEP diagnosticados entre 1998 e 2007, no estado do Espírito Santo, Brasil.

METODOLOGIA

População do estudo

Trata-se de um estudo transversal de base laboratorial de casos novos de TB diagnosticados no Espírito Santo no período de 1998 a 2007 em um laboratório de referência de diagnóstico de TB no estado – o Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI).

O NDI atende os seguintes municípios da região metropolitana: Vitória, Vila Velha, Cariacica, Serra e complexo presidiário de Viana. Tais municípios são considerados prioritários pelo Programa Nacional de Controle de TB (PNCT) (15).

Foram analisados isolados estocados obtidos de pacientes do estado do Espírito Santo com diagnóstico de TB confirmados por cultura. Todas as culturas do laboratório de referência foram incluídas, bem como as de pacientes avaliados em ensaio clínico realizado nesse laboratório – estágio 3 (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00130247) (16).

Países com recursos limitados e com alta carga de TB são incapazes de disponibilizar cultura para todos os casos suspeitos. A cultura é apenas recomendada para circunstâncias especiais, como suspeita clínica de TB em pacientes com Bacilo Álcool-acido resistente (BAAR) negativo, pessoas com achado radiográfico suspeito para TB, re-tratamento, indivíduos infectados pelo HIV com suspeita de TB, suspeita de resistência a drogas antituberculosas, TB extrapulmonar e em populações vulneráveis (situação prisional, pacientes em casas de repouso, população de rua e profissionais da saúde) (17). Portanto, foram passíveis de inclusão neste estudo somente isolados de casos de tuberculose suspeitos cujas culturas foram realizadas.

Características clínicas e epidemiológicas incluindo idade (média), gênero (feminino/masculino), cor (branco, não branco, ignorado), escolaridade (0 a 7 anos, > 7 anos, ignorado), baciloscopia (BK) (positiva, negativa, não realizada) e *status* de HIV (positivo/negativo) foram obtidas através de registros laboratoriais e médicos e do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Dados ignorados, não realizados ou não preenchidos encontram-se na análise descritiva, porém foram excluídos na fase analítica.

O sítio da doença foi atribuído de acordo com a definição de classificação padrão do sistema de vigilância (18). Os casos foram classificados como: TB exclusivamente pulmonar (TBE); TB concomitantemente pulmonar e extrapulmonar (TBP+TBEP); miliar (disseminada); e como exclusivamente extrapulmonar (TBEP). A TBEP ainda foi estratificada em 07 categorias: pleural, ganglionar periférico, genitourinário, óssea e articular, ocular, meníngea, e outros.

Análise - IS6110 *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Métodos padronizados foram utilizados para o isolamento do DNA genômico e a análise do polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP) baseada na enzima *PvuII-IS6110* (19).

Os padrões de bandas de RFLP IS6110 foram analisados pelo *software BioNumerics* versão 6.5 (*Applied Maths – Belgium*). No intuito de visualizar o grau de similaridade entre os isolados, um dendrograma foi construído pelo método de pares agrupados por média aritmética não ponderada (UPGMA) e pelo índice *Dice* (1,0% de tolerância, 1,5% otimização). Duas ou mais cepas com padrões RFLP (*fingerprint*) indistinguíveis foram definidas como pertencentes ao mesmo cluster por RFLP. Como descrito em outros estudos, cepas de um mesmo cluster foram consideradas como resultantes de transmissão recente de TB, enquanto padrões únicos representaram reativação de uma infecção adquirida no passado (20, 21). Foram consideradas da mesma família as cepas com padrões de RFLP com pelo menos 70% de similaridade.

Spoligotyping

Todos isolados de MTB foram tipados por *spoligotyping* usando um kit comercial (Ocimum Biosolutions Ltd., Hyderabad, India), sendo seguidas as instruções do fabricante (22, 23). Os resultados foram a seguir registrados em sequências binárias de 43 dígitos representando os 43 espaçadores. Os padrões de *spoligotyping* foram comparados com a atualização do banco de dados SpolDB4 - o SITVIT WEB do Instituto Pasteur de Guadalupe (Disponível em: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE>), que oferece informação dos spoligotipos de MTB mundialmente (23, 24).

Long Sequence Polymorphism (LSP)

Foi realizado um *PCR multiplex* adaptado de Gibson et al., para diferenciar os isolados pertencentes à sublinhagem RDRio (25). Para isso, 20ng de DNA genômico foram adicionados a um mix de volume final de 25 µL, o qual continha: 20 pmol de cada iniciador: *BridgeF*: 5' – CAC TCC GGC TGC CAA TCT CGT C –3', *BridgeR*: 5' – CAC CGC GAG GCT GAA TGA GAC CA – 3', IS1561F: 5' – GAC CTG ACG CCG CTG ACA C –3', IS1561R: 5' – CAC CTA CAC CGC TTC CTG CC –3', 1U da enzima *Taq polymerase* (*Invitrogen Life Technologies*, USA), tampão 1X, 2.0mM de MgCl₂, DMSO 5%, 0.2 mM de nucleotídeos e água deionizada. A amplificação foi feita no Sistema Gene Amp PCR 2400 termociclador (Perkin Elmer, USA). As condições do ciclo foram 95°C por 10 minutos (min), seguidos por 35 ciclos a 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 4 min, e uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram detectados em gel de agarose 1,5% tratado com bromidídeo de etídio, sob transluminação ultravioleta (UV). A identificação de genótipos RD^{Rio} ou não-RD^{Rio} foi estabelecida de acordo com tamanho da banda do produto de PCR; a presença da banda de 1175 bp era indicativo de cepa RD^{Rio} e a presença da banda de 530-bp era indicativo de cepas não-RD^{Rio}.

Análise Estatística

Realizada análise descritiva da população do estudo e dos dados de genotipagem, seguida pela comparação das características de pacientes com TBEP e de pacientes com TBP. As covariáveis foram divididas em sociodemográficas (idade, cor, gênero, nível educacional), fatores clínicos (*status* de HIV e pesquisa de BAAR) e fatores relacionados à genotipagem da cepa (percentual de clusters por RFLP, se família LAM – *Latin-American-Mediterran* – ou não LAM e presença ou não da linhagem Rd-Rio). As famílias de *Spoligotyping* foram comparadas quanto à forma da TB por meio do teste de qui-quadrado de Pearson. Já todas as outras variáveis foram analisadas por meio de qui-quadrado de Pearson e Regressão Logística, sendo estimados valores de *Odds ratios* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%. Explica-se a escolha de apenas a variável “ser ou não família LAM” ter entrado na regressão logística uma vez que esta é a família de *Spoligotyping* mais presente no Brasil (24), assim, viu-se a necessidade de sua maior investigação.

Devido à dificuldade de classificação, as formas de TB miliares e concomitantemente pulmonar e extrapulmonar (TBP+TBEP) foram excluídas da análise primária. Tais formas foram incluídas em análises secundárias: (a) TBP + TBEP versus TBP; e (b) TBP + TBEP versus TBEP.

Todas as análises foram conduzidas no programa Stata. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Espírito Santo, número 121/06.

RESULTADOS

População do estudo

Após análises do sítio da doença dos 606 pacientes, foram encontrados: 464 (76,5% IC95% 72,9% - 79,8%) casos de TBP, 79 (13,0% IC95% 10,4% - 15,9%) casos de TBEP, 51 (8,4% IC95% 6,3% - 10,9%) casos de TBP+TBEP e 12 de TB miliar (1,9%

IC95% 1,0 – 3,4%). Dos 130 casos com algum acometimento extrapulmonar [TBEP e (TBP+TBEP)], 55 (42.3%) isolados eram provenientes de gânglios periféricos (ganglionar), 36 (27.7%) de fluido pleural (pleural), 13 (10%) do trato geniturinário (genito-urinária), 4 (3%) de ossos e articulações (ósteo-articular), 7 (5.4%) de líquido cérebro-espinhal (meníngea) e 15 (11.6%) de outros sítios.

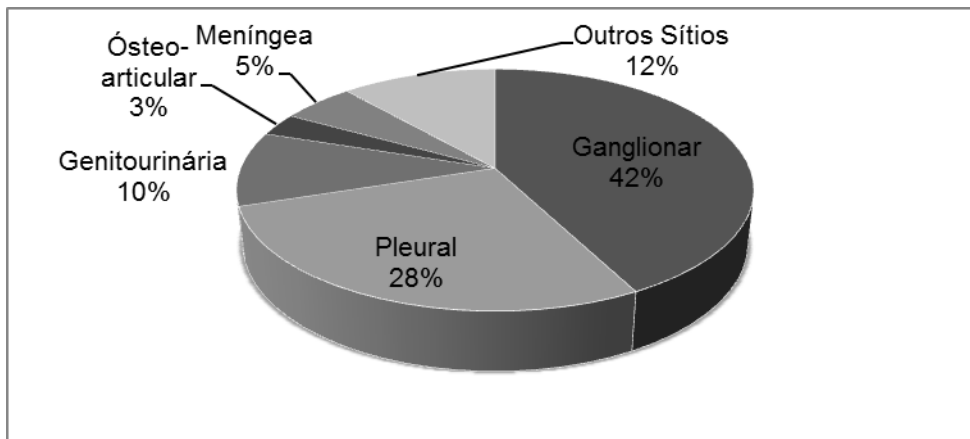


Figura 1 – Sítios clínicos dos 130 pacientes com TBEP e TBP+TBEP, diagnosticados entre 1998 e 2007 no Espírito Santo. TBEP: tuberculose extrapulmonar. TBP + TBEP: tuberculose concomitantemente pulmonar e extrapulmonar.

Genotipagem do *M. tuberculosis*

Padrões de RFLP e de *spoligotyping* de qualidade foram obtidos a partir de 612 isolados de 606 pacientes; explica-se o maior número de isolados do que pacientes uma vez que 6 pacientes com TBP+TBEP tinham cepas diferentes do sítio pulmonar e do sítio extrapulmonar, sendo que nessas situações, duas cepas de um mesmo paciente foram incluídas na análise genotípica.

A análise pela técnica RFLP- IS6110 demonstrou que 250 (41%) isolados pertenciam a padrões de RFLP formando clusters. Esses isolados em cluster estavam distribuídos em 73 grupos (Figura 2). A composição de 35 (48%) dos clusters foi de apenas dois isolados, 35 (48%) clusters foram compostos por 3 a 9 isolados e 3 (4%) por mais de 9 isolados. O maior cluster por RFLP – ES14 –, com cepas idênticas de 14 bandas, foi composto por 21 isolados. Ao cluster ES-14 pertenciam 16 cepas da família LAM e todos pacientes deste cluster tinham TBP. O segundo maior cluster, chamado ES1, incluiu 15 cepas, todas da família LAM, e novamente todos pacientes com TBP. O terceiro maior cluster – ES19 – foi

composto por 10 cepas da família LAM e pacientes com TBP, demonstrando uma maior relação de grandes clusters com a TBP do que com a TBEP (Figura 2).

A respeito dos dados de *Spoligotyping* dos 612 isolados obtidos, 506 (83%) puderam ser classificados de acordo com o SIT (*Shared International Type*), enquanto 106 (17%) tiveram padrões órfãos (Figura 3). Dentre as famílias de spoligotipos de maior prevalência, podemos citar a família LAM, com 297 (48%) isolados, a família T, com 82 (13%), e a família Haarlem, com 45 (7%) isolados.

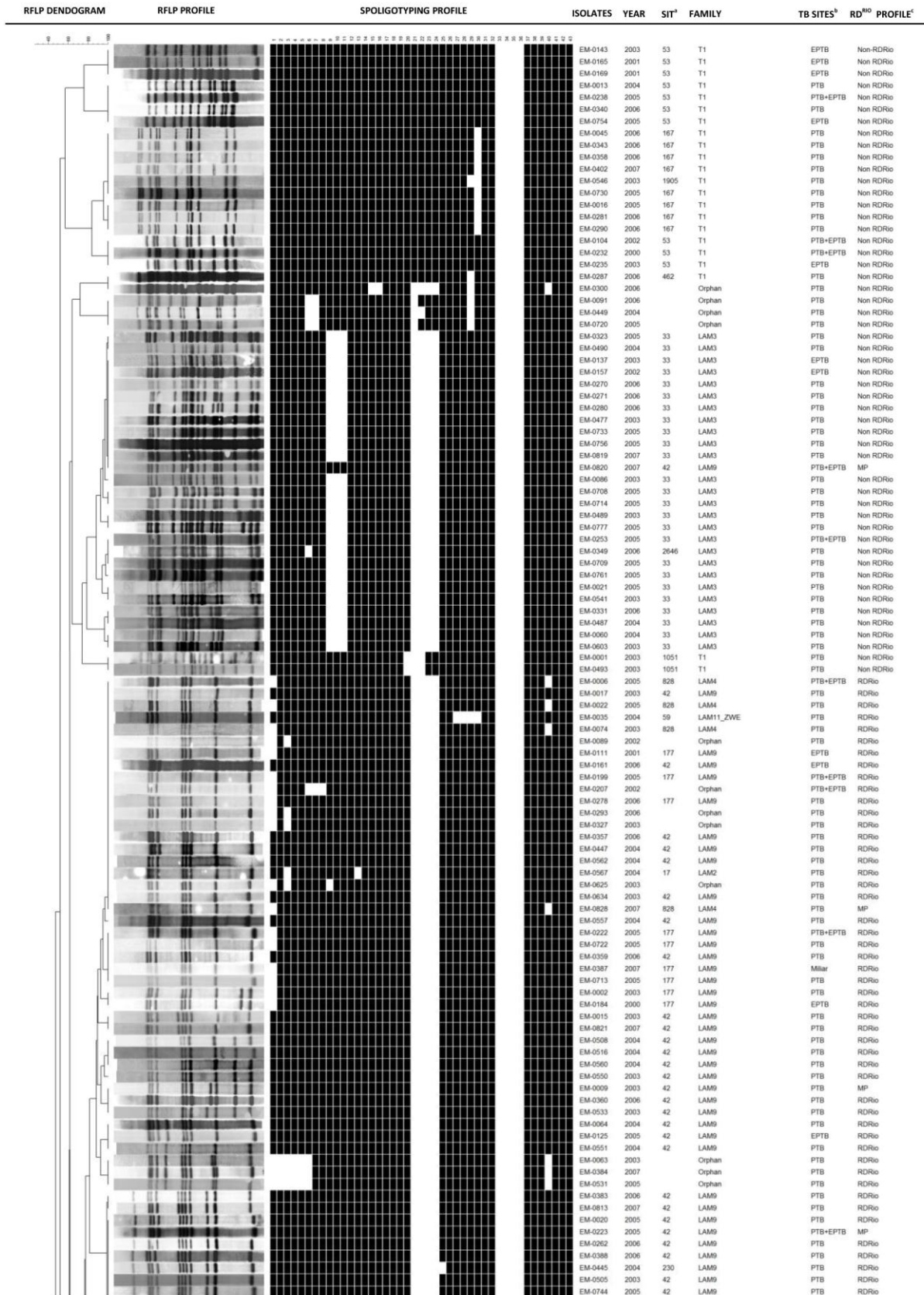


Figura 2 – Análise do RFLP IS6110 demonstrou 73 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* em cluster, Espírito Santo, Brasil, 1998 a 2007.

(continua)

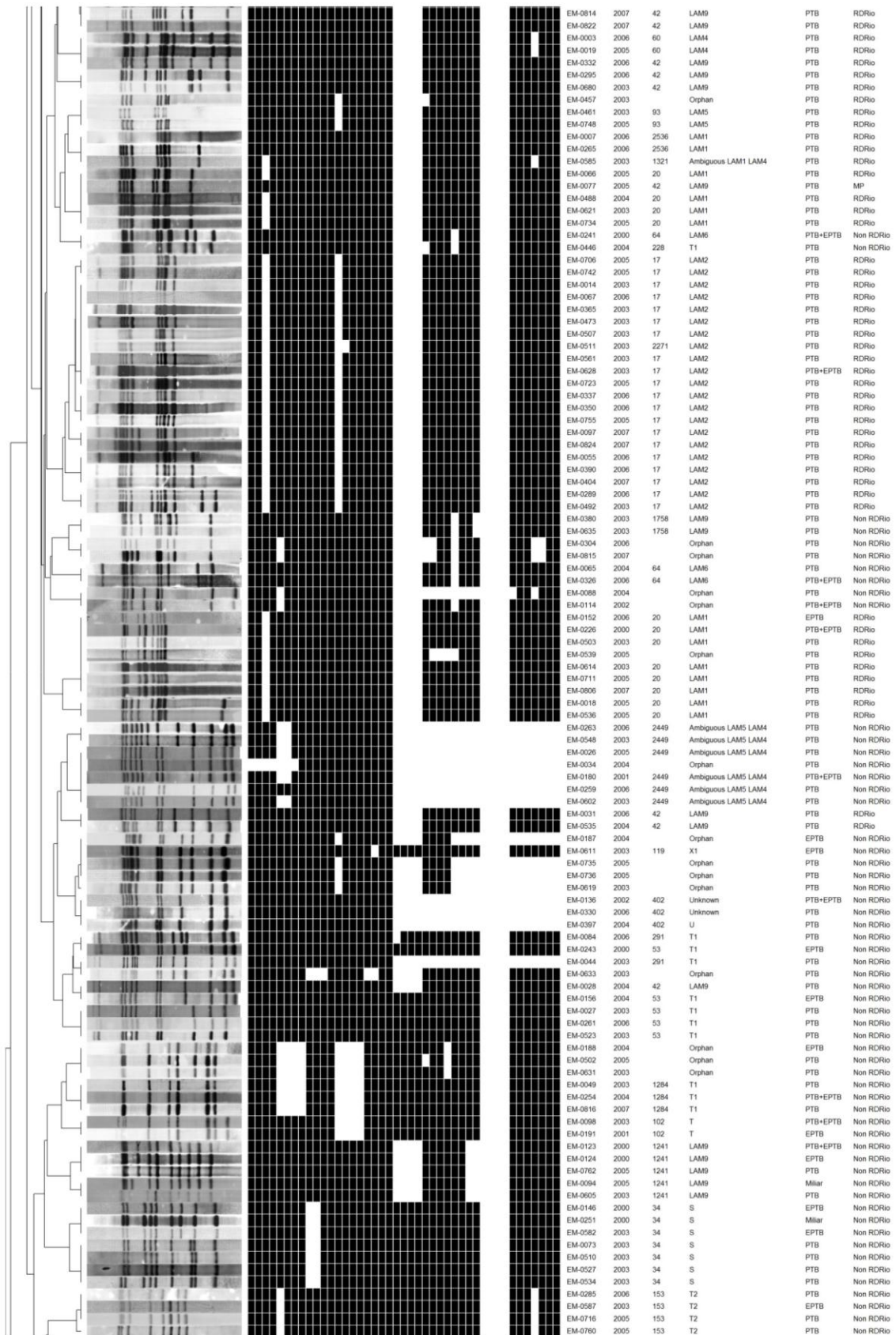
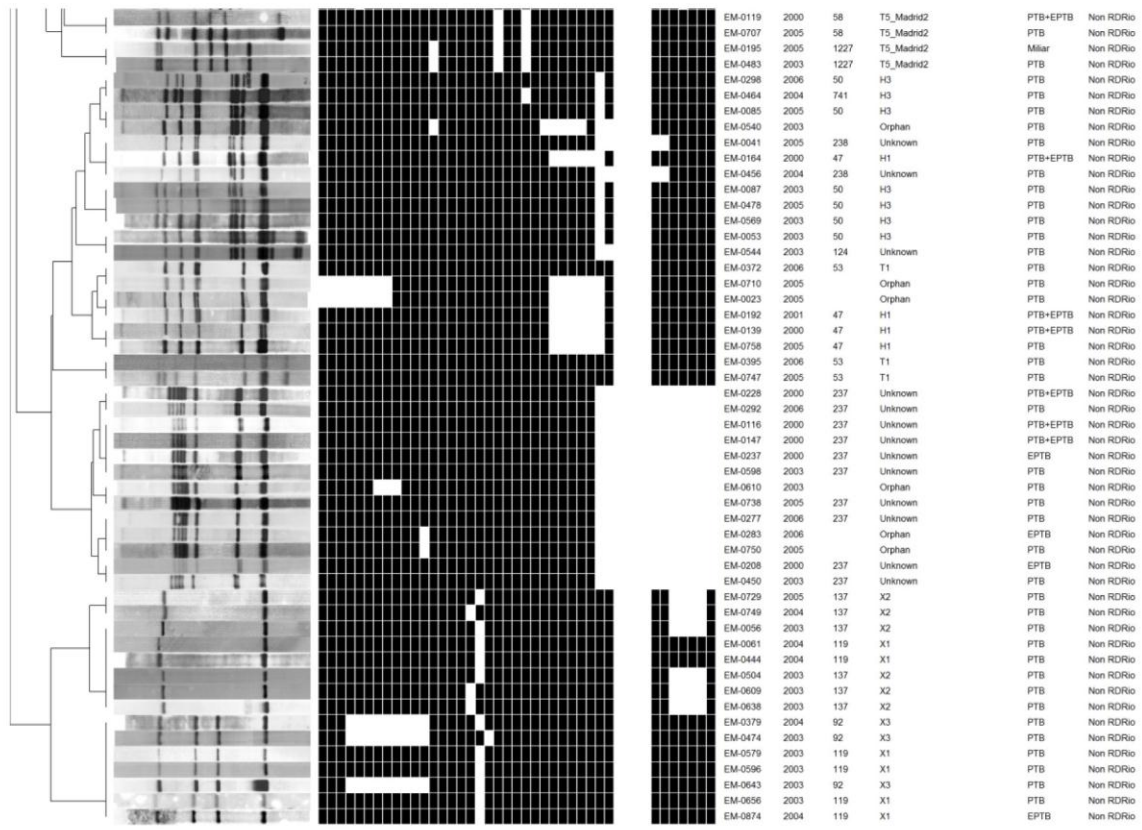


Figura 2 (continuação) – Análise do RFLP IS6110 demonstrou 73 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* em cluster, Espírito Santo, Brasil, 1998 a 2007.

(continua)



(a) SIT - Shared International Type.

(b) PTB= Pulmonary TB; EPTB= Extrapulmonary TB; PTB + EPTB= Pulmonary TB + Extrapulmonary TB.

(c) MP= Mixed Population.

Figura 2 (continuação) – Análise do RFLP IS6110 demonstrou 73 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* em cluster, Espírito Santo, Brasil, 1998 a 2007.

Características da TBP e da TBEP

Características da população do estudo são mostradas na Tabela 1. A média de idade de todos os pacientes foi 35,9 anos. A maioria em ambos grupos era do sexo masculino (63% do grupo TBEP e 69% do grupo TBP). A maior parte possuía cor não branca (49%); a proporção de não brancos foi menor entre o grupo TBEP (31%) comparado àqueles apresentando TBP (56%). A minoria dos casos teve escolaridade superior a 7 anos e 96 (15,8%) eram analfabetos. Nota-se uma menor porcentagem de casos de TBEP com BK positivo (17%) quando comparado à TBEP (79%) (Tabela 1).

Coinfecção pelo vírus HIV foi fortemente associada com a ocorrência da TBEP. Na análise multivariável, casos de TBEP tiveram 16,8 vezes mais chances de apresentarem HIV positivo do que os casos de TBP (Tabela 2).

Por fim, na regressão logística incluindo todas as variáveis, somente infecção por HIV (OR: 116,83 IC 95% 5,23 – 54,18), baixa escolaridade (OR:0,60 IC95% 0,38 – 0,95) e cor branca (OR: 2,54 IC95% 1,03 – 6,25) foram associadas ao sítio extrapulmonar da TB.

Um segundo modelo também foi analisado, no qual foram incluídos os casos de TBP+TBEP comparados com aqueles de TBP, e um terceiro modelo que comparou TBP+TBEP com TBEP, mostrados na tabela 2.

Dessas análises, somente o HIV no segundo modelo mostrou-se significativo (TBP+TBEP versus TBP) com OR de 29.8 IC95% 6 – 147 (Tabela 2).

Tabela 1 – Características sociodemográficas, clínicas e moleculares por forma de TB: Extrapulmonar (TBEP), pulmonar (TBP) e concomitante (TBP+TBEP), Espírito Santo, 1998 a 2007.

Características	TBEP N = 79	TBP N = 464	TBP+TBEP N=63	Total N=606
Sociodemográficas				
<u>Idade (anos)</u>				
Média	36,14	35,8	36,6	35
<u>Gênero</u>				
Feminino	29 (37%)	144 (31%)	09 (14%)	182 (30%)
Masculino	50 (63%)	320 (69%)	54 (86%)	424 (70%)
<u>Cor</u>				
Branca	21 (27%)	101 (22%)	7 (11%)	129 (21%)
Não Branca	25 (35%)	258 (56%)	16 (26%)	299 (49%)
Ignorado	33 (38%)	105 (23%)	40 (63%)	178 (30%)
<u>Escolaridade</u>				
0-7 anos	26 (72%)	261 (56%)	36 (57%)	353 (58%)
>7 anos	09 (11%)	91 (20%)	7 (11%)	107 (18%)
Ignorado	14 (18%)	112 (24%)	20 (32%)	146 (24%)
Clínicos				
<u>HIV</u>				
Positivo	21 (27%)	20(4%)	23 (37%)	64 (11%)
Negativo	43 (54%)	366 (21%)	33 (52%)	442 (73%)
Não realizado	15 (19%)	78 (17%)	7 (11%)	100 (16%)
<u>BK</u>				
Positivo	14 (17%)	366 (79%)	20 (31%)	400 (66%)
Negativo	62 (79%)	98 (21%)	42 (67%)	202 (33%)
Não Realizado	3 (4%)	0 (0%)	01(02%)	04 (01%)
Moleculares				
<u>em cluster – RFLP</u>				
Sim	27 (24%)	196 (42%)	29 (46%)	252 (41%)
Não	52 (66%)	268 (58%)	34 (54%)	354 (59%)
<u>Rd-Rio</u>				
Presente	20 (25%)	147 (32%)	14 (22%)	181 (30%)
Ausente	45 (57%)	245 (53%)	39 (62%)	329 (54%)
Ignorado	14 (18%)	72 (16%)	10 (16%)	96 (16%)
<u>Spoligotyping</u>				
LAM	35 (44%)	234 (50%)	24(38%)	293 (48%)
Não LAM	44 (56%)	230 (50%)	39 62%	315 (52%)

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana. BK: Baciloscopia, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). LAM: Latin-American-Mediterran.

Tabela 2 – Associação entre as características sociodemográficas, clínicas e moleculares e a forma de TB, Espírito Santo, 1998 a 2007.

Características	OR*(IC95%) TBEP X TBP	OR **(IC95%) TBEP X TBP	OR (IC95%) (TBP+TBEP) X TBP	OR (IC 95%) (TBP+TBEP) X TBEP
Sociodemográficas				
<u>Idade (anos)</u>				
Média	-	0,99 (0,96 – 1,03)	0,98 (0,93 – 1,04)	0,97 (0,90 – 1,06)
<u>Gênero</u>				
Feminino	0.77 (0.46-1.33)	0,71 (0,27 – 1,87)	1	1
Masculino			referência	
<u>Cor</u>				
Branca	2,14 (1,08 – 4,18)	2,54 (1,03 – 6,25)	1,11 (0,24 – 5,09)	0,17 (0,02 – 1,45)
Não Branca			referência	
<u>Escolaridade</u>				
0-7 anos	2.16(1.01 – 5.18)	0,60 (0,38 – 0,95)	0,81 (0,45 – 1,47)	1,90 (0,80 – 4,49)
>7 anos			referência	
Clínicos				
<u>HIV</u>				
Positivo	8.93(4.20-18.81)	16,83 (5,23 – 54,18)	29,8 (6,04 – 147,78)	0,97 (0,14 – 6,70)
Negativo			referência	
<u>BK</u>				
Positivo	0.07(0.03-0.13)	0,87 (0,56 – 1,36)	1,28 (0,70 – 2,33)	1,13 (0,76 – 1,69)
Negativo			referência	
Moleculares				
<u>em cluster – RFLP</u>				
Sim	0.70 (0.41 – 1.19)	0,57 (0,22 – 1,43)	0,41 (0,10 – 1,72)	0,48 (0,09 – 2,38)
Não			referência	
<u>Rd-Rio</u>				
Presente	0.74 (0.39-1.33)	0,91 (0,34 – 2,74)	0,94 (0,21 – 4,15)	0,61 (0,08 – 4,76)
Ausente			referência	
<u>Spoligotyping</u>				
LAM	0.78 (0.46-1.29)	1,35 (0,47 – 3,87)	1,81 (0,43 – 7,55)	0,41 (0,38 – 4,50)
Não LAM			referência	

*Odds Ratio bruto **Odds Ratio ajustado por Regressão Logística. HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana. BK: Baciloscopia, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). LAM: Latin-American-Mediterran.

Na regressão logística, o percentual de pacientes em cluster (índice de cluster) pelo método RFLP-IS6110 não demonstrou associação com os grupos de casos com TBP ou com TBEP (Tabela 2).

Não houve distinção significativa (Qui quadrado de Pearson com $p=0,83$) na proporção de pacientes com TBP e TBEP entre as famílias de *Spoligotyping*. Na análise por regressão logística, também foram comparadas as categorias “LAM” e “não LAM”, porém não foram encontradas diferenças quanto à família entre pacientes com TBP e pacientes com TBEP (Tabela 2).

A frequência da linhagem Rd-Rio também foi variável de comparação e novamente os grupos com TBP e TBEP mostraram associação semelhante nesse aspecto (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A prevalência de 13% (IC95% 10,4% - 15,9%) de casos de TBEP diagnosticados concorda com a atual proporção de casos no Brasil de 14% (26). Os sítios mais frequentes foram o ganglionar e pleural, similar a outros estudos (5, 7).

Este estudo foi conduzido para identificar possíveis fatores associados à TBEP quando comparados à TBP. Na regressão logística, coinfeção com o HIV foi o fator mais associado à TBEP. Tal associação era esperada, uma vez que a ocorrência dessa forma clínica aumenta quando o sistema imune está comprometido (27, 28), sendo o HIV um fator de risco para a progressão do MTB para doença ativa, aumentando o risco em 20 vezes (29).

Porém, o elevado número de pacientes HIV positivos na população do estudo pode ter sido acrescido pelo fato de essa população se enquadrar em uma das situações em que a cultura é indicada, sendo esse teste ainda não universal no Brasil e fator de inclusão no estudo (17).

Em contraste com outros estudos (4, 11, 30), foi observada uma maior frequência de TBEP em brancos do que em não brancos. Outro fator contrastante com a literatura é a maior presença de TBEP em homens do que mulheres (8), tais diferenças

podem ser intrínsecas da amostra utilizada neste estudo, e estudos com maior número de participantes devem ser realizados no Brasil para averiguá-los.

Baseado nas análises de clusters por RFLP, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada de acordo com os sítios TBP e TBEP. Um estudo de Madagascar com 316 isolados também achou proporções de clusters semelhantes entre casos de TBP e de TBEP (31).

Nos EUA, casos de 05 anos de todo país foram examinados, sendo 5085 de TBEP. Pacientes com essa forma clínica tiveram maiores chances de estarem infectados com as famílias *Euro-American* (OR ajustado 1,3; IC 95%, 1,1-1,4), *Indo-Oceanic* (OR ajustado, 1,7; IC95%, 1,5-1,9) e *East-African Indian* (OR ajustado 1,6; IC 95%, 1,4-1,9) (11).

Ao contrário do reportado nos EUA (11), nenhuma família de *spoligotyping* foi associada à TBP ou TBEP no estado, o que pode ter ocorrido pelo tamanho da população do estudo (606) e pouca variabilidade de famílias, já esperada numa pequena região geográfica, ou sugerindo que realmente não exista uma relação intrínseca entre linhagem e forma clínica da doença a nível local, como em um estudo da Índia (32) no qual não houve associação significativa entre uma linhagem específica de MTB e localização extrapulmonar. Tal assunto ainda precisa ser mais explorado no Brasil e no mundo para conclusões mais elucidativas.

Ume estudo prévio realizado no Rio de Janeiro, estado vizinho do ES, sugeriu a hipótese da sublinhagem RDRio estar ligada a uma maior virulência do MTB, logo, essa variável também foi motivo de análise (33). Um recente estudo do nosso grupo de pesquisa mostrou que não é claro se há relação entre a sublinhagem RdRio e um aumento da virulência intrínseca ou transmissibilidade (34), que podem ser reforçadas com nosso estudo, que não demonstrou relação dessa sublinhagem com a TBEP, uma forma frequentemente mais grave da doença.

Nosso estudo teve algumas limitações. Primeiro, se baseou nos casos com cultura positiva, e uma vez que a cultura e a genotipagem não são universais no Brasil, nosso banco de dados incluiu apenas 65% dos pacientes diagnosticados no período do estudo. Outro fator diz respeito ao preenchimento dos dados no SINAN, que ainda precisa ser melhorado. Deve-se levar em consideração também que a TBEP pode estar subnotificada devido a sua dificuldade diagnóstica. Forças do nosso

estudo incluem a análise de formas de TB relacionada a dados moleculares no Brasil, um país de alta carga de TB, a performance do processo de genotipagem em um único laboratório com controle de qualidade e o uso de 2 métodos de genotipagem concomitantemente.

Por fim, os principais achados do nosso estudo sugerem a forte associação da TBEP com HIV e a semelhança dos isolados provenientes de TBP e de TBEP quanto às técnicas de genotipagem por RFLP IS6110 e *spoligotyping* e presença de RDRio.

Um resultado que merece atenção foi a grande proporção de pacientes com TBEP em clusters, uma vez que clusters são sugestivos de transmissão recente (35). Essa proporção pode estar relacionada à TB pleural. Já foi relatada a associação da TB pleural com cadeias de transmissão recente, por ser um sinal precoce de primoinfecção pelo MTB, sendo relacionada inclusive com a detecção mais rápida de clusters do que as outras formas TBEP e de TBP (36). Quase três quartos dos surgimentos de casos de cluster de TB pleural ocorreram dentro de 6 meses de um caso anterior, contrastando com outras formas que demoraram até 7 anos (36). A TB pleural, a segunda principal forma clínica do presente estudo, assim, necessita de futuras investigações quanto ao seu papel e utilidade em investigações epidemiológicas.

Sugerem-se estudos maiores e envolvendo maiores regiões para um melhor entendimento dos fatores relacionados à TBEP, alerta-se também a importância da investigação do HIV em pacientes com TB e investigação tanto da TBP quanto da TBEP em pacientes HIV positivos a fim de que se aumente o diagnóstico, fazendo o tratamento mais efetivo, contribuindo para o controle da doença.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (Fapes). Ao United States National Institutes of Allergy and Infectious

Diseases, National Institutes of Health and Human Services, sob contrato NO1-AI95383 e HHSN266200700022C/NO1-AI-70022 e ICOHRTA 5 U2R TW006883-02.

REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization. Global tuberculosis report 2012. Geneva2012.
2. Brasil. Ministerio da Saude. Série histórica da taxa de mortalidade de tuberculose. In: Saúde SdVe, editor. Brasilia2012.
3. Thiago Nascimento do Prado ALC, Murilo Marques, , Ethel Leonor Maciel JEG, Angélica Espinosa Miranda. Perfil epidemiológico de pacientes adultos com tuberculose e AIDS no estado do Espírito Santo, Brasil: Relacionamento dos bancos de dados de tuberculose e AIDS. *Jornal Brasileiro de epidemiologia*. 2011;31(7).
4. Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49(9):1350-7. Epub 2009/10/02.
5. Seiscento M, Vargas FS, Rujula MJ, Bombarda S, Uip DE, Galesi VM. Epidemiological aspects of pleural tuberculosis in the state of Sao Paulo, Brazil (1998-2005). *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2009;35(6):548-54. Epub 2009/07/21.
6. Yang Z, Kong Y, Wilson F, Foxman B, Fowler AH, Marrs CF, et al. Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;38(2):199-205. Epub 2003/12/31.
7. Rieder HL, Snider DE, Jr., Cauthen GM. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *The American review of respiratory disease*. 1990;141(2):347-51. Epub 1990/02/01.

8. Fiske CT, Griffin MR, Erin H, Warkentin J, Lisa K, Arbogast PG, et al. Black race, sex, and extrapulmonary tuberculosis risk: an observational study. *BMC infectious diseases* [Internet]. 2010 2823615]; 10:[16 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096113>.
9. Nicol MP, Sola C, February B, Rastogi N, Steyn L, Wilkinson RJ. Distribution of strain families of *Mycobacterium tuberculosis* causing pulmonary and extrapulmonary disease in hospitalized children in Cape Town, South Africa. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5779-81. Epub 2005/11/08.
10. Lari N, Rindi L, Cristofani R, Rastogi N, Tortoli E, Garzelli C. Association of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2009;15(6):538-43. Epub 2009/03/24.
11. Click ES, Moonan PK, Winston CA, Cowan LS, Oeltmann JE. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* phylogenetic lineage and clinical site of tuberculosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54(2):211-9. Epub 2011/12/27.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Especial Tuberculose. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2012;43.
13. Saúde. BMdSSdVe. Sistema nacional de vigilância em saúde : relatório de situação : Espírito Santo Brasília :. 2011;5.
14. Brasil. Ministério do Planejamento OeG. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. . Contagem Populacional 2012.
15. Definição de critérios para a priorização de municípios no controle da tuberculose no Brasil, (2011).
16. Johnson JL, Hadad DJ, Dietze R, Maciel EL, Sewali B, Gitta P, et al. Shortening treatment in adults with noncavitary tuberculosis and 2-month culture conversion. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;180(6):558-63. Epub 2009/06/23.
17. Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, Dalcin Pde T, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. *Jornal brasileiro*

de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. 2009;35(10):1018-48. Epub 2009/11/18.

18. Brasil. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil In: Epidemiológica DdV, editor. 2011. p. 32-4.

19. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology*. 1993;31(2):406-9. Epub 1993/02/01.

20. Fok A, Numata Y, Schulzer M, FitzGerald MJ. Risk factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2008;12(5):480-92. Epub 2008/04/19.

21. Borgdorff MW, van den Hof S, Kalisvaart N, Kremer K, van Soolingen D. Influence of sampling on clustering and associations with risk factors in the molecular epidemiology of tuberculosis. *American journal of epidemiology*. 2011;174(2):243-51. Epub 2011/05/25.

22. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(4):907-14. Epub 1997/04/01.

23. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international *spoligotyping* database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology*. 2006;6:23. Epub 2006/03/08.

24. Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(4):755-66. Epub 2012/03/01.

25. Gibson JF, Kelso S, Skevington JH. Band-cutting no more: A method for the isolation and purification of target PCR bands from multiplex PCR products using new technology. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2010;56(3):1126-8. Epub 2010/05/13.
26. WHO. World Health Organization .Tuberculosis countries profiles. 2012 [cited 2013 14/02]; Available from: <http://www.who.int/tb/country/en/>.
27. Jones BE, Young SM, Antoniskis D, Davidson PT, Kramer F, Barnes PF. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *The American review of respiratory disease*. 1993;148(5):1292-7. Epub 1993/11/01.
28. Kingkaew N, Sangtong B, Amnuaiphon W, Jongpaibulpatana J, Mankatittham W, Akksilp S, et al. HIV-associated extrapulmonary tuberculosis in Thailand: epidemiology and risk factors for death. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2009;13(6):722-9. Epub 2009/02/07.
29. Pawlowski A, Jansson M, Skold M, Rottenberg ME, Kallenius G. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS pathogens*. 2012;8(2):e1002464. Epub 2012/03/01.
30. Mazza-Stalder J, Nicod L, Janssens JP. [Extrapulmonary tuberculosis]. *Revue des maladies respiratoires*. 2012;29(4):566-78. Epub 2012/05/01. La tuberculose extrapulmonaire.
31. Rasolofo Razanamparany V, Menard D, Auregan G, Gicquel B, Chanteau S. Extrapulmonary and pulmonary tuberculosis in antananarivo (madagascar): high clustering rate in female patients. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(11):3964-9. Epub 2002/11/01.
32. Sankar MM, Singh J, Angelin Diana SC, Singh S. Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates from North Indian patients with extrapulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012. Epub 2012/11/13.
33. Lazzarini LC, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, et al. Discovery of a novel Mycobacterium tuberculosis lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(12):3891-902. Epub 2007/09/28.

34. Vinhas SP, M.; Marques, HS.; Aguiar, PPL; Ribeiro, FK, Peres, RL; Dietze, R; Gomes, HM; Suffys, PN; Golub, JE; Riley, RW; Maciel, ELN. Mycobacterium tuberculosis DNA fingerprint clusters and its relationship with RDRio genotype in Brazil. Tuberculosis. 2012;in press.
35. Benedetti A MD, BehrMA, Schwartzman K, Jin Y. How Close Is Close Enough? Exploring Matching Criteria in the Estimation of Recent Transmission of Tuberculosis. American journal of epidemiology. 2010;172(3):318-26.
36. Ong A, Creasman J, Hopewell PC, Gonzalez LC, Wong M, Jasmer RM, et al. A molecular epidemiological assessment of extrapulmonary tuberculosis in San Francisco. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2004;38(1):25-31. Epub 2003/12/18.

4.3 ARTIGO 3

Análise espacial da Tuberculose Extrapulmonar em Vitória: Uso de Dados moleculares em investigações epidemiológicas

Spatial analysis of Extrapulmonary Tuberculosis in Vitória: Use of Molecular data in epidemiologic investigations

RESUMO

Introdução: A tuberculose extrapulmonar (TBEP) tem se tornado um problema mais comum desde o advento do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), porém, é menos abordada por programas de controle da tuberculose (TB) em países em desenvolvimento. A utilização de novas metodologias de pesquisa é importante para melhoria das ações de controle, estudos moleculares que evidenciam clusters preditores de transmissão recente são relevantes nesse contexto e podem auxiliar diversos estudos, como a análise de dados espaciais. **Objetivo:** Identificar padrões espaciais de ocorrência da TBEP no município de Vitória entre casos de TB diagnosticados no período de 2001 a 2007 utilizando dados genotipados. **Metodologia:** Trata-se de um estudo ecológico dos casos de TBEP genotipados no município de Vitória diagnosticados no período de 2001 a 2007. Do SINAN (Sistema de Informações de Agravos de Notificação), foram extraídos os endereços dos casos, que eram pacientes com TBEP com cultura realizada em um laboratório de referência. Para classificar os casos em TBEP cluster e TBEP não cluster, foi utilizada a análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFPL) baseado na sequência de inserção IS6110. Foram realizadas análises espaciais dos dois grupos (TBEP em cluster e TBEP não cluster) por meio de mapa de pontos, mapa de Kernel e Gráficos da Função K. **Resultados:** Foram identificados 58 casos de TBEP em Vitória, 19 do grupo TBEP cluster e 39 do grupo TBEP não cluster. As regiões administrativas (RA) Centro, Bento Ferreira e Maruípe tiveram concentração de casos de TBEP. Os casos de TBEP em cluster tiveram predomínio na RA Centro, sugestivo de um agrupamento espacial de 900 metros pelo gráfico da função K, ou seja, concentração espacial de cepas sugestivas de transmissão recente. **Conclusões:** A TBEP segue a mesma tendência de ocorrência que casos novos de TB em Vitória. Chama-se a atenção para as áreas sugestivamente com cepas de *Mycobacterium Tuberculosis* provenientes de infecção recente (TBEP em cluster) na RA Centro, devendo assim esta RA ser alvo principal para medidas de controle relacionadas à TBEP. Este estudo, através da análise espacial, corrobora com a hipótese de que cepas em cluster podem estar epidemiologicamente relacionadas, e enfatiza a importância da epidemiologia molecular aplicada à TB em todas as suas formas clínicas.

Palavras-chave: Epidemiologia Molecular. Análise especial. Tuberculose Extrapulmonar.

ABSTRACT

Introduction: The Extrapulmonary Tuberculosis (EPTB) has become a more common health problem since the advent of HIV (Human Immunodeficiency Virus), but TB control programs in developing countries less address it. It's important the use of new research methodologies for improving control measures and molecular studies demonstrates that the use of clusters to predict recent transmission are relevant in this context and it's could improve many studies, such as spatial data analysis. **Objective:** To identify patterns of occurrence of EPTB in Vitória, city among TB cases diagnosed in the period 2001 to 2007 using genotyped data. **Methods:** This is an ecological study of EPTB cases genotyped in Vitória, city, Brazil diagnosed from 2001 to 2007. SINAN (Information System for Notifiable Diseases) was the source of addresses of EPTB patients. Cases was only EPTB patients with culture performed in a reference laboratory. Was used RFPL (Restriction Fragment Length Polymorphism) based on the insertion sequence IS6110 to sort the cases in EPTB cluster and EPTB non-cluster. Spatial analyses were performed on both groups (EPTB cases and EPTB non-cases) through point map, map of Kernel and Graphs of K function. **Results:** 58 EPTB cases were identified, 19 was in the EPTB cluster group and 39 in the EPTB non-cluster group. The Administrative Regions (AR): Centro, Bento Ferreira e Maruípe had major concentration of EPTB cases. The EPTB cluster group had predominance in Centro, suggestive of a spatial cluster of 900 meters by graph of K function. **Conclusions:** The EPTB follows the same trend occurring that new TB cases in Vitória, city, Brazil. It's calls attention to areas suggestively with strains of *Mycobacterium Tuberculosis* from recent infection (EPTB cluster) at Centro, so this AR should be the main target to control measures related to EPTB. This study, through the spatial analysis corroborates the hypothesis of that clustered strains are epidemiologically linked, and emphasize the importance of molecular epidemiology applied to TB in all its clinical forms.

Keywords: Molecular epidemiology. Spatial analysis. Extrapulmonary tuberculosis.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é um importante agravo à saúde e foi considerada uma emergência mundial pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1993 (1). Uma de suas formas clínicas, a tuberculose extrapulmonar (TBEP), tem se tornado um problema mais comum desde o advento do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (2). Foram notificados 10.067 casos novos de TBEP em 2011 no Brasil, uma proporção de 14% de todos os casos de TB no país (3).

A TBEP é menos frequente e menos contagiosa, sendo assim, menos abordada por programas de controle da TB em países em desenvolvimento (4). Sabendo que conhecer a situação epidemiológica de um agravo e fatores que colaborem para sua ocorrência é um passo fundamental para medidas de controle do mesmo, é importante que pesquisas na área da saúde abordem não somente a TB pulmonar (TBP), mas todas as suas formas clínicas.

O Ministério da Saúde do Brasil (MS) segue as recomendações da OMS e tem se empenhado no desenvolvimento de estratégias nacionais que possibilitem o controle da TB no país, um de seus focos é a pesquisa, que permitiu o avanço no conhecimento da doença (5).

Dentre as pesquisas, as técnicas de geoprocessamento e análise espacial têm sido realizadas de forma cada vez mais frequente, gerando conhecimentos sobre as relações entre doenças e o ambiente, visando a identificar padrões espaciais de morbidade ou mortalidade e fatores associados, descrever processos de difusão de doenças e gerar conhecimentos visando à sua predição e controle (6, 7).

A TB também tem sido foco de muitas pesquisas no campo da biologia molecular, uma vez que as técnicas moleculares podem elucidar várias características epidemiológicas da doença, como: determinação da origem de uma infecção em um paciente (familiar ou comunitária); disseminação e detecção precoce de organismos que adquiriram resistência a antibióticos; discriminação entre doença endógena e exógena, além de casos de contaminação cruzada em laboratório (8).

Assim, vê-se que para ampliar a capacidade do setor de saúde no controle das doenças transmissíveis é imprescindível que ocorra o desenvolvimento de novos instrumentos para a vigilância epidemiológica capazes de incorporar aspectos

ambientais, identificadores de riscos e métodos automáticos e semiautomáticos que permitam a detecção de surtos e o acompanhamento destes no espaço e no tempo (9).

É esta a proposta inovadora deste estudo, que interligou a análise molecular e análise espacial com o objetivo de identificar padrões de ocorrência da TBEP no município de Vitória entre casos de TB diagnosticados no período de 2001 a 2007, utilizando dados genotipados.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo ecológico dos casos de TBEP em cluster molecular e casos de TBEP que não formam cluster molecular no município de Vitória, diagnosticados no período de 2001 a 2007.

População do estudo:

Foram utilizados neste estudo os isolados estocados obtidos de pacientes com TB residentes em Vitória com diagnóstico confirmado por cultura em um laboratório de referência do estado, diagnosticados entre janeiro de 2001 e dezembro de 2007.

É válido ressaltar que todas as culturas do laboratório de referência, de acordo com o programa vigente de controle da TB, foram inclusas, porém países com recursos limitados e com alta carga de TB, como o Brasil, são incapazes de disponibilizar cultura para todos os casos suspeitos. A cultura é apenas recomendada para circunstâncias especiais, como suspeita clínica de TB em pacientes com Bacilo Álcool-acido resistente (BAAR) negativo, pessoas com achado radiográfico suspeito para TB, retratamento, indivíduos infectados pelo HIV com suspeita de TB, suspeita de resistência a drogas antituberculosas, TBEP e em populações vulneráveis (situação prisional, pacientes em casas de repouso, população de rua e profissionais da saúde) (10).

O Sistema Nacional de Agravos de Notificação SINAN (Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde) foi a fonte dos dados epidemiológicos na qual foram analisadas as seguintes categorias: ano de notificação, município de residência, bairro, logradouro e número da residência, ponto de referência, forma clínica da doença e sítio clínico.

Dados moleculares:

Para obtenção dos dados moleculares, foi utilizada a análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFPL, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) baseado na sequência de inserção IS6110. Essa metodologia é considerada atualmente a técnica padrão para a comparação de isolados de *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) (11).

O desenvolvimento desse tipo de método e a utilização de DNA *fingerprint* (impressão digital do DNA) têm permitido a distinção das linhagens de MTB. Quando duas ou mais linhagens têm o perfil *fingerprint* idêntico ou muito similar, infere-se que elas pertençam a um mesmo grupo ou cluster. Com isso, linhagens isoladas de diferentes pacientes mas pertencentes a um mesmo grupo podem ter elevada probabilidade de serem epidemiologicamente associadas, isto é, podem refletir transmissão recente entre os pacientes, enquanto linhagens diferentes sugerem uma reativação de uma infecção do passado (latente) (12, 13).

Quanto às técnicas laboratoriais, métodos padronizados foram utilizados para o isolamento do DNA genômico e a análise do polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP) baseada na enzima PvuII-IS6110 (11). Os padrões de bandas de RFLP IS6110 de 612 isolados de pacientes diagnosticados com TB no período do estudo foram analisados pelo *software BioNumerics*. No intuito de visualizar o grau de similaridade entre os isolados, um dendrograma foi construído pelo método de pares agrupados por média aritmética não ponderada (UPGMA) e pelo índice Dice (1,0% de tolerância, 1,5% otimização). Duas ou mais cepas com padrões RFLP (fingerprint) indistinguíveis foram definidas como pertencentes ao mesmo cluster por RFLP. Apenas os casos de TBEP foram utilizados nas análises posteriores.

Dados espaciais

Para georreferenciamento dos casos de TBEP, foi utilizado o programa Google Earth para obtenção das respectivas latitudes e longitudes. A malha digital de Vitória foi obtida no site do Instituto Jones do Santos Neves (14), do Governo do estado do Espírito Santo (ES), e o programa estatístico R possibilitou a geração dos mapas.

Primeiramente, foi gerado um mapa de pontos com todos os casos de TBEP do estudo. A seguir, foram analisados os casos de TBEP em cluster e não cluster por meio da estimativa de Kernel, que consiste em uma técnica de interpolação exploratória que gera uma superfície de densidade para a identificação visual de “áreas quentes”, entendidas como alguma forma da aglomeração em uma distribuição espacial (15).

Por último, foi gerado o gráfico da função K, tanto para casos de TBEP em cluster quanto para casos de TBEP não cluster. A função K representa um estimador de dependência espacial (16). O gráfico de L em função da distância h indica atração espacial entre eventos ou agrupamentos para valores positivos, sendo o agrupamento mais forte em picos positivos, e indica repulsão espacial ou regularidade em pontos de valores negativos. Os envelopes inferior e superior são construídos a partir de simulações independentes de n casos na região e são equivalente a um intervalo de confiança (16).

RESULTADOS

Vitória, capital do ES, é um dos municípios prioritários para o PNCT (17). Possui uma população de 327.801 habitantes e extensão territorial de 98.194 km² divididos em 83 bairros e 08 regiões administrativas (RA): São Pedro, Santo Antônio, Centro, Bento Ferreira, Maruípe, Praia do Canto, Continental e Jardim Camburi (Figura 1) (18).

Foram notificados 225 casos de TBEP no SINAN no período do estudo na cidade de Vitória, dos quais 58 obtiveram cultura e genotipagem realizada e endereço

completo no SINAN, sendo assim, a população final do estudo. Dos 58 casos de TBEP após análise de cluster, 19 (32,0%) pertenciam a clusters, sendo chamados TBEP – cluster, e 39 (68,0%) não formavam cluster, sendo chamados TBEP não cluster. Quanto ao sítio clínico, 26 (44,9%) casos foram de TB pleural, 17 (29,3%) de TB ganglionar, 2 (3,4%) de TB genitourinária, 1 (1,7%) de TB óssea, 3 (5,2%) de TB miliar, 3 (5,2%) de TB meníngea, 4 (6,9%) de outros sítios e em 2 (3,4%) casos o sítio da doença não estava especificado. Quanto aos 19 casos de TBEP em cluster, eles foram encontrados na TB pleural (07 (36,8%) casos), TB ganglionar (7 (36,8%) casos), TB meníngea (02 (10,5%) casos), em outros sítios (02 (10,5%) casos) e em 01 (5,3%) caso com sítio indeterminado.

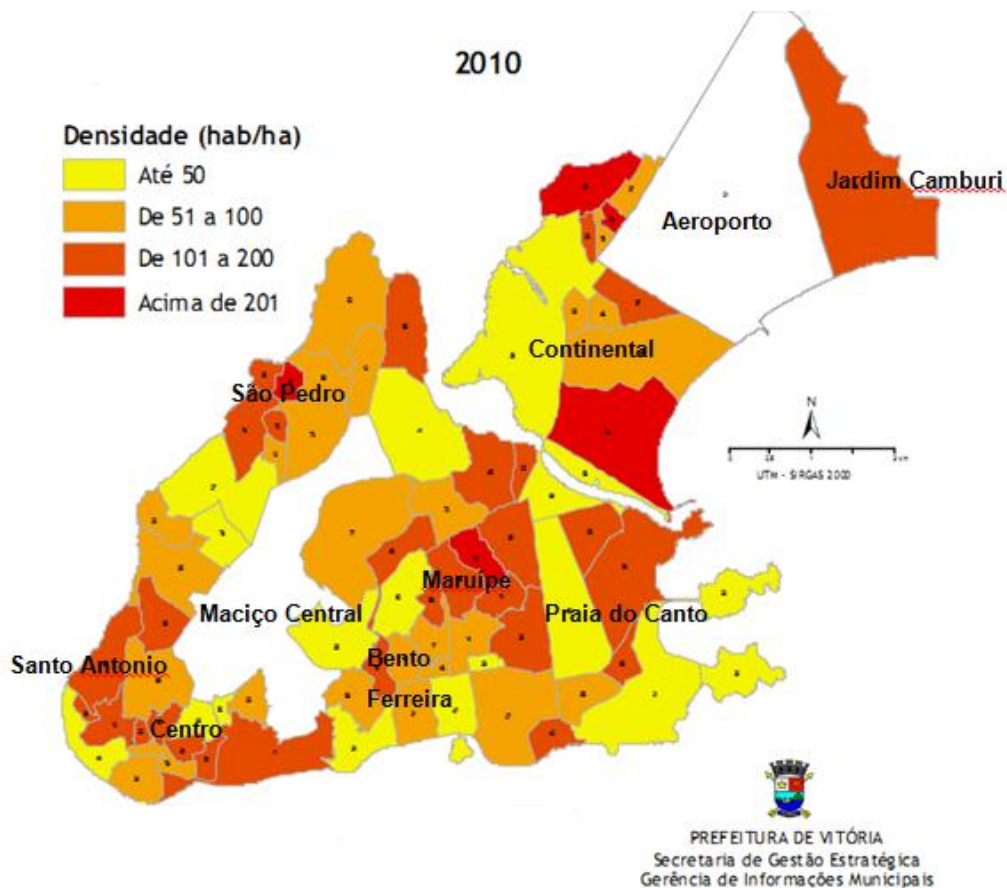


Figura 1 – Densidade populacional de Vitória por bairros e suas 8 Regiões Administrativas: São Pedro, Santo Antônio, Centro, Bento Ferreira, Maruípe, Praia do Canto, Continental e Jardim Camburi. Fonte: Prefeitura de Vitória (18).

A figura 2 mostra os 58 casos de TBEP distribuídos na cidade de Vitória. Nota-se a predominância da TBEP nas RA: Centro, ao sul do mapa, Bento Ferreira e Maruípe,

na região central. Já as outras RAs apresentam poucos casos, como Praia do Canto e Jardim Camburi, com 2 casos de TBEP, respectivamente.

A concentração de pontos no mapa através da estimativa de Kernel, representando os casos de TBEP em cluster e TBEP não cluster, respectivamente, é demonstrada nas figuras 3 e 4.

Nota-se que a principal concentração de casos de TBEP em cluster está na RA do Centro de Vitória, enquanto no mapa de Kernel dos casos de TBEP não cluster a concentração se dá no Centro, Maruípe e Bento Ferreira.

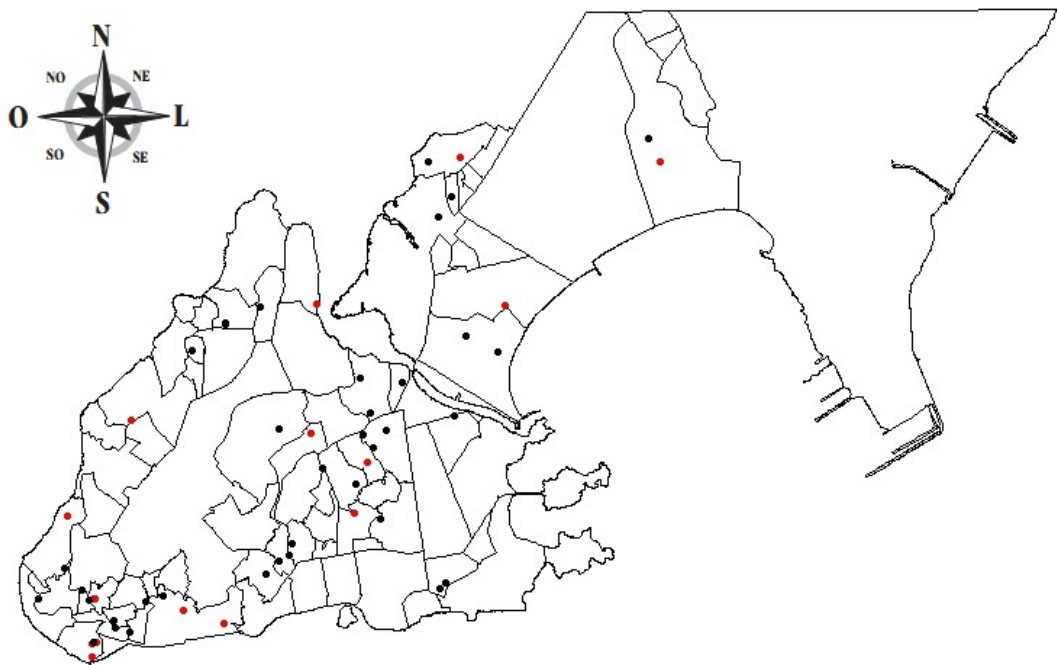


Figura 2 – Os 58 casos de TBEP em Vitória, diagnosticados entre 2001 e 2007. Pontos vermelhos representam casos de TBEP em cluster e pontos pretos, casos de TBEP não cluster. TBEP: tuberculose extrapulmonar.

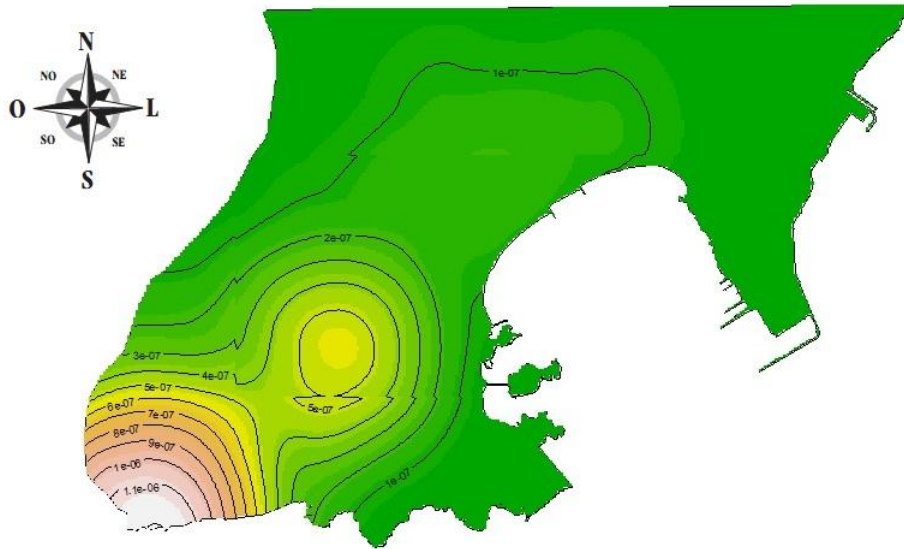


Figura 3 – Estimativa Kernel dos casos de TBEP em cluster em Vitória, diagnosticados entre 2001 e 2007. TBEP: tuberculose extrapulmonar.

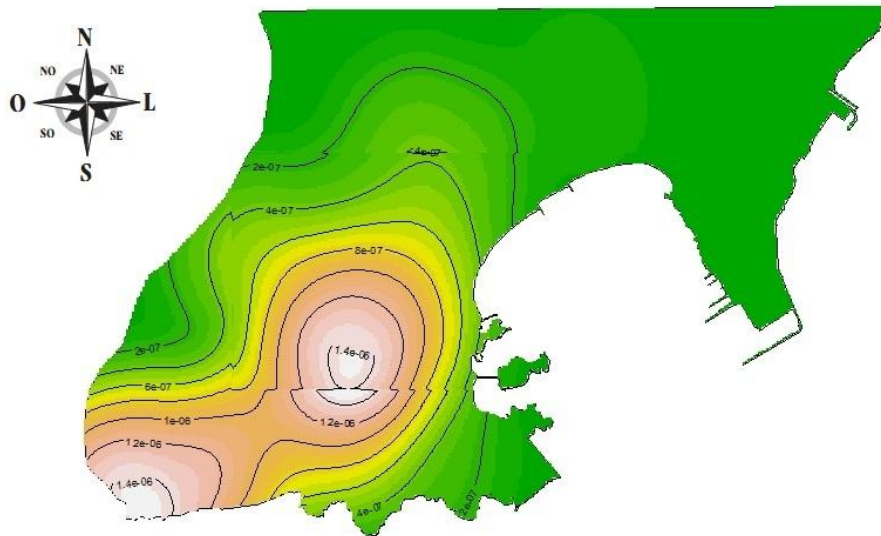


Figura 4 – Estimativa Kernel dos casos de TBEP não cluster em Vitória, diagnosticados entre 2001 e 2007. TBEP: tuberculose extrapulmonar.

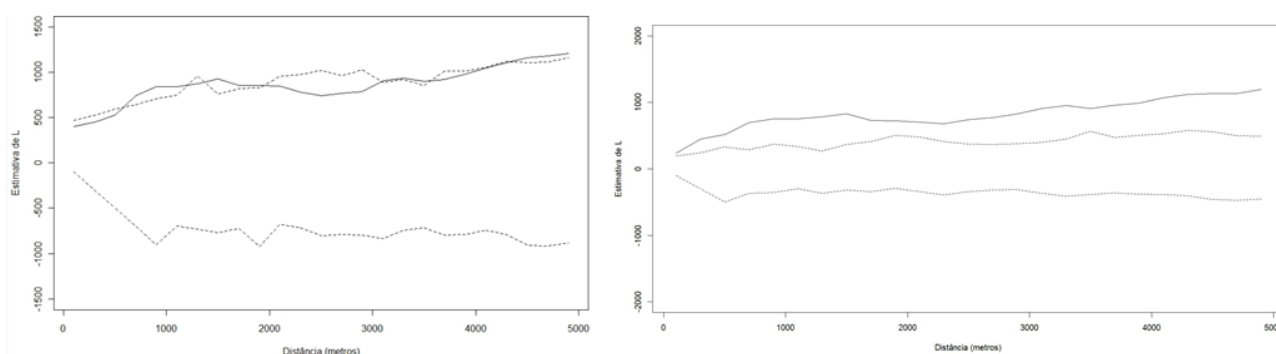


Figura 5 – Gráfico da função K. O 1º referente aos casos de TBEP em cluster, e os 2º referente aos casos de TB não cluster. Linhas cheias são o valor da função K e as linhas tracejadas (envelope) indicam o intervalo de confiança de 95%. TBEP: tuberculose extrapulmonar.

Nota-se na figura 5 que há um provável agrupamento de casos de TBEP em cluster a uma distância de cerca de 900 metros, já no segundo gráfico da mesma figura vê-se o agrupamento em todas as escalas de distâncias. Assim, sugere-se que exista um agrupamento espacial de casos de TBEP em cluster com raio de cerca de 900 metros.

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são a primeira evidência da magnitude da TBEP no município em Vitória. Ele mostra a integração da epidemiologia molecular e análise espacial para identificação de áreas com concentração espacial significativa de clusters moleculares, áreas estas fortemente sugestivas da ocorrência de transmissão recente da TB, e evidencia a ocorrência dessas áreas mesmo com a TBEP, forma clínica geralmente menos associada à transmissibilidade (4).

TBEP ocorreu principalmente nas regiões Centro, Bento Ferreira e Maruípe, poucos casos são vistos nas outras regiões, como Jardim Camburi e Praia do Canto.

A TBEP mostra o mesmo padrão de ocorrência que a TB em Vitória, Vieira (19), ao analisar a distribuição de casos de novos TB na capital de 2000 a 2005, destacou as

diferenças entre a carga de doença (incidência de TB por 100 mil habitantes) nas RA Centro (85,7) e São Pedro (84,7), com as maiores taxas, frente às regiões Praia do Canto (36,5) e Continente (30,7), onde se encontraram as mais baixas. Ressalta-se que, nesse período, o bairro de grande extensão – Jardim Camburi – ainda não havia se desmembrado como RA única e fazia parte da região Continental.

Os casos de TBEP foram categorizados em: TBEP em cluster e TBEP não cluster. Essa divisão é importante epidemiologicamente, uma vez que se acredita que pacientes com TB em clusters estejam envolvidos em cadeias de transmissão recente, enquanto os pacientes com isolados únicos são mais propensos a ter reativado TB adquirida no passado (13).

Transmissão recente se dá quando a transmissão está localizada em lugar e tempo, isto é, progressão para doença TB a partir de uma infecção adquirida dentro dos últimos anos e na mesma jurisdição (20). Assim, o conceito de espaço é importante na definição da cadeia de transmissão e, embora a TBEP seja menos transmissível que a TBP, focos de transmissão recente são os focos de infecção pelo MTB na comunidade, podendo expressar a TBP ou TBEP, esta principalmente em situações que comprometam o sistema imunológico do indivíduo (21, 22).

Além disso, supõe-se que a maioria dos casos de TB pleural encontrada no estudo possa estar diretamente relacionada com a concentração de clusters encontrada, por já ter sido demonstrada como uma forma diferente das outras formas de TBEP, e associada com a maior taxa de cluster entre todas as formas de TB (inclusive TB pulmonar) (23). Essa alta taxa de clusters ocorre porque a TB pleural é muitas vezes uma manifestação precoce de infecção recente pelo MTB, podendo ser considerada assim um evento sentinela de importância nas investigações epidemiológicas sobre cadeias de transmissão recente da TB (23).

Dentre os procedimentos para avaliar a densidade de eventos, a estimativa Kernel é a mais conhecida e a mais utilizada, desempenhando um papel importante no contexto epidemiológico para identificar a concentração de casos (24). Os mapas de Kernel mostraram maior concentração na região central e sul da cidade, porém, os casos de TBEP em cluster sugestivos de infecção recente se concentraram principalmente na região Centro.

Outro fator concordante com essa possibilidade é o fato de a alta densidade populacional não estar somente localizada na região do Centro, o que seria um fator de confusão. Vitória apresenta diferentes pontos com alta densidade populacional, visualizados na Figura 1, inclusive na região Continental e São Pedro, nas quais não houve concentração de casos de TBEP.

A limitação do nosso estudo foi o número pequeno da população com TBEP com cultura realizada, correspondendo a 25,7% dos casos notificados no período. Forças deste trabalho incluem a abordagem espacial integrada com abordagem molecular que possibilitou uma maior especificidade ao apontar áreas prioritárias para o controle da TBEP e a performance do processo de genotipagem em um único laboratório com controle de qualidade.

Este estudo possibilitou demonstrar a interpolação de técnicas moleculares e espaciais como ferramentas aplicáveis na epidemiologia da TB. Como diagnósticos, drogas e vacinas existentes ainda se mostram insuficiente para atingir os objetivos de erradicação da TB pactuados pela OMS, um esforço substancial tanto em ciência básica e epidemiologia será necessário para o desenvolvimento de ferramentas e estratégias mais efetivas para controle da TB (25, 26).

Técnicas moleculares já demonstram um alto rendimento nos estudos da epidemiologia da TB, genômica comparativa, evolução e interação patógeno-hospedeiro, mesmo assim, abordagens multidisciplinares, especialmente a integração dos sistemas da epidemiologia com os sistemas da biologia, chamada por Comas & Gagneux (27) de “sistemas de epidemiologia”, são apontadas como necessárias para a eliminação da TB.

Por meio deste trabalho, evidencia-se o uso dos sistemas da epidemiologia para prever as principais áreas de ocorrência de TBEP em Vitória e, por meio de análise de clusters moleculares, chama-se a atenção para as áreas sugestivamente com cepas de MTB provenientes de infecção recente na RA Centro, devendo, assim, esta RA ser alvo principal para medidas de Controle relacionadas à TBEP.

Dentre as medidas de controle, destacam-se o treinamento dos profissionais dos serviços de saúde e dos programas de controle da TB para sinais e sintomas sugestivos das formas de TBEP, uma vez que seu diagnóstico depende de alto grau de suspeição clínica, alertando-os também sobre a possibilidade da TB pleural ser

uma manifestação precoce de infecção pelo MTB. Além disso, deve-se destacar a TBEP como comorbidade comumente relacionada ao HIV e AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) no manejo de pacientes soropositivos e a realização de testes de HIV para todos os pacientes com diagnóstico de TB (28, 29).

REFERÊNCIAS

1. Ruffino-Netto A. [Tuberculosis: the neglected calamity]. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35(1):51-8. Epub 2002/03/02. Tuberculose: a calamidade negligenciada.
2. Rieder HL, Snider DE, Jr., Cauthen GM. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. The American review of respiratory disease. 1990;141(2):347-51. Epub 1990/02/01.
3. WHO. World Health Organization .Tuberculosis countries profiles. 2012 [cited 2013 14/02]; Available from: <http://www.who.int/tb/country/en/>.
4. Pefura Yone EW, Kengne AP, Moifo B, Kuaban C. Prevalence and determinants of extrapulmonary involvement in patients with pulmonary tuberculosis in a Sub-Saharan African country: A cross-sectional study. Scandinavian journal of infectious diseases. 2013;45(2):104-11. Epub 2012/09/21.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Especial Tuberculose. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2012;43.
6. Carvalho MS, Souza-Santos R. Análise de dados espaciais em saúde pública: métodos, problemas, perspectivas. Cadernos de Saúde Pública. 2005;21:361-78.
7. Buzai GB, CA. Análisis Socioespacial com Sistemas de Información Geográfica. . ed. a, editor. Buenos Aires2006.
8. Santos L, Kipnis, AP.,Kipnis, A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do Mycobacterium tuberculosis. Revista de patologia tropical. 2007;36(1):15.
9. Pellegrini D. Análise espaço-temporal da leptospirose no município do rio de janeiro (1995-1999). Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP). ; 2002.
10. Conde MB, Melo FA, Marques AM, Cardoso NC, Pinheiro VG, Dalcin Pde T, et al. III Brazilian Thoracic Association Guidelines on tuberculosis. Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. 2009;35(10):1018-48. Epub 2009/11/18.
11. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting:

recommendations for a standardized methodology. Journal of clinical microbiology. 1993;31(2):406-9. Epub 1993/02/01.

12. Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis isolates by *spoligotyping* and IS6110 restriction fragment length polymorphism. Journal of clinical microbiology. 1997;35(3):647-51. Epub 1997/03/01.

13. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. The New England journal of medicine. 1994;330(24):1703-9. Epub 1994/06/16.

14. IJSN. . Instituto Jones dos Santos Neves. Consulta de mapas. "Limite Municipal do ES - Estado (Todos) - Ano (2010) ". Governo do Estado do Espírito Santo; 2013 [05 fev]; Available from: <http://www.ijsn.es.gov.br/Mapas/Consulta/?module=Search&action=Results&lookfor=&type=AllFields&filter%5b%5d=format:%22Arquivo+Shapefile%22&view=list>.

15. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Introdução à estatística espacial para saúde pública. Brasília2007.

16. Druck SC, M.S.; Câmara, G.; Monteiro, A.V.M. (eds) Análise Espacial de Dados Geográficos. Brasília2004. Available from: <http://vendasliv.sct.embrapa.br/liv4/principal.do?metodo=iniciar>.

17. Definição de critérios para a priorização de municípios no controle da tuberculose no Brasil, (2011).

18. PMV. Prefeitura Municipal de Vitória. Vitória em dados. Dados geográficos. 2013 [cited 2013 03 mar]; Available from: <http://legado.vitoria.es.gov.br/regionais/geral/geograficos.asp>.

19. Vieira Rda C, Prado TN, Siqueira MG, Dietze R, Maciel EL. [Spatial distribution of new tuberculosis cases in Vitoria, State of Espirito Santo, between 2000 and 2005]. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(1):82-6. Epub 2008/03/28. Distribuicao espacial dos casos novos de tuberculose em Vitoria, Estado do Espirito Santo, no periodo entre 2000 e 2005.

20. Moonan PK, Ghosh S, Oeltmann JE, Kammerer JS, Cowan LS, Navin TR. Using genotyping and geospatial scanning to estimate recent mycobacterium tuberculosis transmission, United States. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(3):458-65.
21. Brasil. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil In: *Epidemiológica DdV*, editor. 2011. p. 32-4.
22. Rowinska-Zakrzewska E. [Extrapulmonary tuberculosis, risk factors and incidence]. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2011;79(6):377-8. Epub 2011/10/27. Gruzlica pozaplycna - ryzyko zachorowania i czestosc wystepowania.
23. Ong A, Creasman J, Hopewell PC, Gonzalez LC, Wong M, Jasmer RM, et al. A molecular epidemiological assessment of extrapulmonary tuberculosis in San Francisco. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;38(1):25-31. Epub 2003/12/18.
24. Gatrell AC, Bailey TC. Interactive spatial data analysis in medical geography. *Soc Sci Med*. 1996;42(6):843-55. Epub 1996/03/01.
25. Partnership TST. *The Global Plan to Stop TB 2011–2015* 2011.
26. Young DB, Perkins MD, Duncan K, Barry CE, 3rd. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(4):1255-65. Epub 2008/04/03.
27. Comas I, Gagneux S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS pathogens*. 2009;5(10):e1000600. Epub 2009/10/27.
28. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(4):1202-5. Epub 2011/01/29.
29. Golden MP, Vikram HR. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American family physician*. 2005;72(9):1761-8. Epub 2005/11/23.

CAPÍTULO 5

5.1 CONCLUSÕES

- As principais características relacionadas à TBEP no Brasil foram: proporção significativa em crianças, em brancos, pessoas com escolaridade entre 05 e 08 anos de estudo, residentes em áreas urbanas e não institucionalizadas, portadores do HIV e que tiveram como entrada e desfecho do tratamento maior número de transferências. Foram negativamente associados uso de álcool, diabetes e doença mental. A TBEP também apresentou menor positividade na BK e baixa realização de TDO.
- Nos 05 anos houve 356.341(83,35% IC95% 83,23% - 83,45%) casos de TBP, 53.853 (12,60% IC95% 12,49% - 12,69%) casos de TBEP, 11.586 (2,70% IC95% 2,66% – 2,75%) casos de TBP+TBEP e 5.768 (1,35% IC95% 1,31% - 1,38%) casos de TB miliar. A tendência da TBEP e TBP no país em 05 anos não mostrou aumento nem declínio visíveis (valor p de todos os casos de TB: 0,635, valor de p para TBP:0,534, valor de p para TBEP:0,582)
- Os principais sítios de acometimento extrapulmonar (TBEP e TBP+TBEP) no Brasil foram: o pleural (42%), o ganglionar (21%), miliar (8%), meníngeo (6%), ósseo (5%), genito-urinário (3%), cutâneo (2%), ocular (2%), laríngeo (1%) e outros (10%).
- No Espírito Santo, as variáveis escolaridade (inferior a 7 anos) (OR: 0,60 IC95% 0,38 – 0,95), cor branca (OR: 2,54 IC95% 1,03 – 6,25) e infecção pelo HIV (OR: 16,83 IC95% 5,23 – 54,18) foram associadas à TBEP, porém, nenhuma linhagem específica de cepa de MTB ou porcentagem de cluster por RFLP IS6110 foi associada com o sítio extrapulmonar da doença.
- Foram identificados 58 casos de TBEP em Vitória com dados genotipados, 19 do grupo TBEP cluster e 39 do grupo TBEP não cluster. Os casos de TBEP em cluster tiveram predomínio na Região Administrativa Centro. O gráfico da função K mostrou um agrupamento espacial de aproximadamente 900m desses casos, que pode demonstrar concentração espacial de cepas provenientes de possível transmissão recente.

• 5.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação traz o panorama da TBEP no Brasil, no Espírito Santo e em Vitória, por meio de diferentes abordagens e da epidemiologia molecular. Essas ferramentas são importantes nas investigações epidemiológicas, ganhando, assim, com técnicas moleculares, um enriquecimento de informações acerca da virulência, patogenia e transmissão da TB.

A TBEP tem sido muitas vezes negligenciada tanto no campo das pesquisas quanto nas estratégias de controle, isto devido ao fato de ela possuir uma menor transmissibilidade do que a TBP, porém, esta possibilidade existe e o impacto na morbidade e mortalidade na população deve ser levado em consideração.

Além disso, a TBEP pode apresentar formas graves, como a TB meníngea, e está bastante relacionada ao HIV/AIDS, uma epidemia mundial. Além da situação epidemiológica e fatores determinantes, o conhecimento do manejo clínico destes pacientes é de fundamental importância para a cura dos casos.

Nota-se que muitos fatores relacionados à TBEP diferem daqueles já relatados em países desenvolvidos, possuidores de maior número de publicações sobre o tema, sendo clara a necessidade de pesquisas em países em desenvolvimento com alta carga de TB, como o Brasil. Outro fato relevante a ser considerado é que esses fatores nem sempre são os mesmo apresentados na TBP no que diz respeito a aspectos sociodemográficos, por exemplo, esses indivíduos apresentaram maior escolaridade e cor branca, contrastantes com o visto na TBP, fato que deve ser levado a conhecimento dos profissionais quando do levantamento de suspeita clínica, fator fundamental para o diagnóstico da TBEP.

Ferramentas diagnósticas para a TBEP se mostram ineficientes, muitas vezes sendo necessário iniciar o tratamento somente com os dados clínicos, assim, novos métodos automatizados são necessários e precisam ser adotados, como o Genexpert, que vem mostrando especificidade e sensibilidade significantes.

Além disso, o enfrentamento da TB a cada dia se mostra atrelado a novas tecnologias no campo da pesquisa. Sugerem-se estudos mais aprofundados quanto à

epidemiologia molecular da TBEP no Brasil e um aprofundamento no que diz respeito à TB pleural, que pode ser um indicador útil em investigações de transmissão recente na comunidade.

Por fim, a TBEP, com uma proporção importante entre todos os casos de TB, também necessita de estratégias de controle, detecção de casos e tratamento melhoradas para que o almejado plano de eliminação da TB no mundo seja plenamente alcançado.

REFERÊNCIAS

Brasil (2010). Ministério da Saúde. Tuberculose no Brasil: Avancos e Perspectivas Seminario de Manejo Clinico da Tuberculose. S. d. V. e. saude. São Paulo.

Brasil (2011). Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil D. d. V. Epidemiológica: 32-34.

Brasil (2012). "Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Especial Tuberculose." Secretaria de Vigilância em Saúde **43**.

Brasil. (2013). "Portal da saúde. Programa nacional de Controle da Tuberculose." Retrieved 15/02, 2013, from http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31101.

Brasil, M. d. S. (2012). Boletim Epidemiológico: Especial Tuberculose. . S. d. V. e. Saúde. Brasilia. **43**: 2-12.

Brudey, K., J. R. Driscoll, et al. (2006). "Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international *spoligo*typing database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology." BMC Microbiol **6**: 23.

Cafrune, P. I. (2009). Avaliacao da tecnica de spoligotyping aplicada diretamente em amostras clinicas de pacientes com suspeita de tuberculose e caracterizacao epidemiologica. . Doctorate, UFRS.

Caws, M., G. Thwaites, et al. (2008). "The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with Mycobacterium tuberculosis." PLoS Pathog **4**(3): e1000034.

Click, E. S., P. K. Moonan, et al. (2012). "Relationship between Mycobacterium tuberculosis phylogenetic lineage and clinical site of tuberculosis." Clin Infect Dis **54**(2): 211-219.

Conde MB, S. G., Kritski AL (2002). Tuberculose sem medo., Atheneu.

Demay, C., B. Liens, et al. (2012). "SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology." Infect Genet Evol **12**(4): 755-766.

Fiske, C. T., M. R. Griffin, et al. (2010) "Black race, sex, and extrapulmonary tuberculosis risk: an observational study." BMC Infect Dis **10**, 16 DOI: 10.1186/1471-2334-10-16.

FOCACCIÀ., R. V. R. (2004). Tratado de Infectología, Atheneu.

Gagneux, S., K. DeRiemer, et al. (2006). "Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2869-2873.

Garcia de Viedma, D., G. Lorenzo, et al. (2005). "Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrapulmonary infection." J Infect Dis **192**(12): 2059-2065.

Giovanni Sotgiu, A. S., Giovanni B. Migliori (2013). "History of Tuberculosis and Drug Resistance." The new england journal of medicine **368**(1): 89.

Golden, M. P. and H. R. Vikram (2005). "Extrapulmonary tuberculosis: an overview." Am Fam Physician **72**(9): 1761-1768.

Hillemann, D., S. Rusch-Gerdes, et al. (2011). "Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system." J Clin Microbiol **49**(4): 1202-1205.

Kamerbeek, J., L. Schouls, et al. (1997). "Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology." J Clin Microbiol **35**(4): 907-914.

Kato-Maeda, M., P. J. Bifani, et al. (2001). "The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*." J Clin Invest **107**(5): 533-537.

Kato-Maeda, M., S. Gagneux, et al. (2011). "Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis*: congruence between large sequence polymorphisms and spoligotypes." Int J Tuberc Lung Dis **15**(1): 131-133.

Kingkaew, N., B. Sangtong, et al. (2009). "HIV-associated extrapulmonary tuberculosis in Thailand: epidemiology and risk factors for death." Int J Infect Dis **13**(6): 722-729.

Kremer, K., D. van Soolingen, et al. (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**(8): 2607-2618.

Lari, N., L. Rindi, et al. (2009). "Association of Mycobacterium tuberculosis complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease." Clin Microbiol Infect **15**(6): 538-543.

Lawn, S. D. and A. I. Zumla (2011). "Tuberculosis." Lancet **378**(9785): 57-72.

Lawn, S. D. and A. I. Zumla (2012). "Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis using the Xpert((R)) MTB/RIF assay." Expert Rev Anti Infect Ther **10**(6): 631-635.

Lazzarini, L. C., R. C. Huard, et al. (2007). "Discovery of a novel Mycobacterium tuberculosis lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil." J Clin Microbiol **45**(12): 3891-3902.

Lazzarini, L. C., J. Rosenfeld, et al. (2012). "Mycobacterium tuberculosis spoligotypes that may derive from mixed strain infections are revealed by a novel computational approach." Infect Genet Evol **12**(4): 798-806.

Malaspina, A. C. (2009). Genotipagem do mycobacterium tuberculosis utilizando RFLP e spoligotyping em associação com MIRU para avaliar a epidemiologia molecular da tuberculose no município de Araraquara-SP. Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Naing, C., J. W. Mak, et al. (2013). "Meta-Analysis: The Association Between HIV Infection and Extrapulmonary Tuberculosis." Lung **191**(1): 27-34.

Nicol, M. P. and R. J. Wilkinson (2008). "The clinical consequences of strain diversity in Mycobacterium tuberculosis." Trans R Soc Trop Med Hyg **102**(10): 955-965.

OPAS (2011). Organización panamericana de la salud. La Tuberculosis en la region de las Americas. c. y. f. Informe Regional 2011. Epidemiologia.

OPAS (2012). Organización Panamericana de la Salud Informe de la Reunion Regional de Jefes de Programas Nacionales de Controle de la Tuberculosis.

Partnership, T. S. T. (2011). The Global Plan to Stop TB 2011–2015

Pefura Yone, E. W., A. P. Kengne, et al. (2013). "Prevalence and determinants of extrapulmonary involvement in patients with pulmonary tuberculosis in a Sub-Saharan African country: A cross-sectional study." Scand J Infect Dis **45**(2): 104-111.

- Peto, H. M., R. H. Pratt, et al. (2009). "Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006." Clin Infect Dis **49**(9): 1350-1357.
- Rasolofo Razanamparany, V., D. Menard, et al. (2002). "Extrapulmonary and pulmonary tuberculosis in antananarivo (madagascar): high clustering rate in female patients." J Clin Microbiol **40**(11): 3964-3969.
- Rieder, H. L., D. E. Snider, Jr., et al. (1990). "Extrapulmonary tuberculosis in the United States." Am Rev Respir Dis **141**(2): 347-351.
- Rowinska-Zakrzewska, E. (2011). "[Extrapulmonary tuberculosis, risk factors and incidence]." Pneumonol Alergol Pol **79**(6): 377-378.
- Ruffino-Netto, A. (2002). "Tuberculose: a calamidade negligenciada." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **35**: 51-58.
- Ruffino-Netto, A. (2002). "[Tuberculosis: the neglected calamity]." Rev Soc Bras Med Trop **35**(1): 51-58.
- Ruffino-Netto, A. and A. M. de Souza (2001). "Evolution of the health sector and tuberculosis control in Brazil." Rev Panam Salud Publica **9**(5): 306-310.
- S. Bonora, G. D. P., V. Vincent, M. C. Gutierrez, E. Concia (1999). "Use of *Spoligotyping* in Molecular Epidemiology of Tuberculosis." Clinical Infectious Disease **28**(4): 940.
- Santos, L., Kipnis, AP., Kipnis, A (2007). "Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*." Revista de patologia tropical **36**(1): 15.
- Sepkowitz, K. A., J. Raffalli, et al. (1995). "Tuberculosis in the AIDS era." Clin Microbiol Rev **8**(2): 180-199.
- Small, P. M., P. C. Hopewell, et al. (1994). "The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods." N Engl J Med **330**(24): 1703-1709.
- Smaltzer, S. S. B., B (2005). Tratado de enfermagem médico cirúrgica.
- TB, R. (2013). "Sobre a Tuberculose." Retrieved 14 feb, 2013, from <http://redetb.org/sobre-a-tuberculose>.

van Embden, J. D., M. D. Cave, et al. (1993). "Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology." J Clin Microbiol **31**(2): 406-409.

Vinhas, S. P., M.; Marques, HS.; Aguiar, PPL; Ribeiro, FK, Peres, RL; Dietze, R; Gomes, HM; Suffys, PN; Golub, JE; Riley, RW; Maciel, ELN (2012). "Mycobacterium tuberculosis DNA fingerprint clusters and its relationship with RDRio genotype in Brazil." Tuberculosis **in press**.

WHO (2007). Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents. Recommendations for HIV-prevalent and resource-constrained settings. s. t. d. d. o. hiv/aids.

WHO (2007). World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva.

WHO (2012). WHO. World Health Organization. Global tuberculosis report 2012. Geneva.

WHO. (2012). "World Health Organization .Tuberculosis countries profiles." Retrieved 14/02, 2013, from <http://www.who.int/tb/country/en/>.

Yang, Z., Y. Kong, et al. (2004). "Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis." Clin Infect Dis **38**(2): 199-205.

ANEXO A

República Federativa do Brasil Ministério de Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO FICHA DE NOTIFICAÇÃO / INVESTIGAÇÃO TUBERCULOSE		Nº	
TUBERCULOSE PULMONAR: Paciente com tosse com expectoração por três ou mais semanas, febre, perda de peso e apetite, com confirmação bacteriológica por baciloscopia direta e/ou cultura e/ou com imagem radiológica sugestiva de tuberculose. TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR: Paciente com evidências clínicas, achados laboratoriais, inclusive histopatológicos, compatíveis com tuberculose extrapulmonar ativa, ou pacientes com pelo menos uma cultura positiva para M. tuberculosis de material proveniente de localização extrapulmonar.					
Dados Gerais	1	Tipo de Notificação		2 - Individual	
	2	Agravado(a)ença		TUBERCULOSE	
	3	Código (CID10)	3		
	4	UF	5	Município de Notificação	Código (IBGE)
Dados Individual	6	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código	
	7	Data do Diagnóstico			
	8	Nome do Paciente		9	
	10	(ou) Idade	11	Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	12
Dados de Residência	13	Raça/Cor		14	
	15	Número do Cartão SUS		16	
	17	UF	18	Município de Residência	Código (IBGE)
	19	Distrito		20	
Dados Complementares do Caso	21	Logradouro (rua, avenida,...)		Código	
	22	Número	23	Complemento (apto., casa, ...)	24
	25	Geo campo 2		26	
	27	CEP		28	
Antecedentes Epidemiológicos	29	Zona		30	
	31	Pais (se residente fora do Brasil)		32	
	33	Tipo de Entrada		34	
	35	Raio X do Tórax		36	
Dados Clínicos	37	Forma		38	
	39	Agravos Associados		40	
	41	Baciloscopia de Escarro (diagnóstico)		42	
	43	Cultura de Escarro		44	
Dados de Laboratório	45	Histopatologia		46	
	47	Drogas		48	
	49	Número de Contatos Registrados		50	
	51	Doença Relacionada ao Trabalho		52	
Tratamento	53	Data de início do Tratamento Atual		54	
	55	Indicado para Tratamento Supervisionado (Tb/DOTS)?		56	
Investigador	57	Município/Unidade de Saúde		58	
	59	Nome		60	
		Função		Assinatura	
		Tuberculose		SINAN NET	
				BVS 18/05/2008	