



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

RENATA LYRIO PERES NÓBREGA

**ANÁLISE DE TRANSMISSÃO E DA DINÂMICA DE MODIFICAÇÃO
DE GENÓTIPOS DE *Mycobacterium tuberculosis* NA REGIÃO
METROPOLITANA DE VITÓRIA – ES EM UM INTERVALO DE 10
ANOS**

Vitória
2015

RENATA LYRIO PERES NÓBREGA

**ANÁLISE DE TRANSMISSÃO E DA DINÂMICA DE MODIFICAÇÃO
DE GENÓTIPOS DE *Mycobacterium tuberculosis* NA REGIÃO
METROPOLITANA DE VITÓRIA – ES EM UM INTERVALO DE 10
ANOS**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças
Infecciosas do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, como pré-requisito
para a obtenção do título de Doutor
em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof.Dra. Ethel Leonor Noia Maciel
Co-Orientador: Prof. Dr Moisés Palaci.

Vitória
2015

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

N754a Nóbrega, Renata Lyrio Peres, 1975 -
Análise de transmissão e da dinâmica de modificação de
genótipos de *Mycobacterium tuberculosis* na Região
Metropolitana de Vitória -ES em um intervalo de 10 anos /
Renata Lyrio Peres Nóbrega – 2015.
164 f. : il.

Orientador: Ethel Leonor Noia Maciel.
Coorientador: Moisés Palaci.

Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Técnicas de Genotipagem.
3. Epidemiologia Molecular. I. Maciel, Ethel Leonor Noia.
II. Palaci, Moisés. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



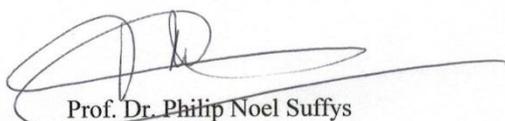
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
TESE DE DOUTORADO

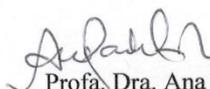
A doutoranda RENATA LYRIO PERES NÓBREGA apresentou a tese intitulada “**Análise de Transmissão e da Dinâmica de Modificação de Genótipos de M. Tuberculosis na Região Metropolitana de Vitória – ES em um Intervalo de 10 Anos**” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

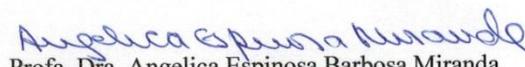
Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a tese para habilitar a mestre em Doenças Infecciosas RENATA LYRIO PERES NÓBREGA a obter o Grau de DOUTORA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 25 de fevereiro de 2015


Prof. Dr. Philip Noel Suffys
(Membro Externo)


Prof. Dra. Martha Maria de Oliveira
(Membro Externo)


Prof. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes
(Membro Interno)


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


Prof. Dra. Ethel Leonor Noia Maciel
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Léa Helena Lyrio Peres e Bento Miranda Peres, pelo amor incondicional, por terem me ensinado que na vida nada se consegue sem esforço e por nunca terem poupado esforços, para que eu jamais deixasse de trilhar os caminhos do conhecimento.

Ao meu esposo, Marcos de Aguiar Nóbrega, que durante todo esse tempo sempre acreditou em mim, me incentivou, compreendeu a minha ausência nesses últimos meses e me acompanhou nessa caminhada em busca dos meus sonhos. Sem você nada disso seria possível. Meu eterno amor e gratidão!

Ao meu querido irmão, Luiz Felipe Lyrio Peres, por toda alegria, carinho e amizade que existe entre nós, que ajuda a vida a ficar mais fácil e por todo o orgulho que sei que sente de mim, dedico também a você este trabalho. Amo você!

A Maria Júlia de Aguiar Nóbrega (minha sogrinha), minha profunda admiração e agradecimento por mesmo de longe estar sempre me incentivando e torcendo por mim!

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém e nada cresce sozinho; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão. A todos vocês que compartilharam meus ideais, dedico este trabalho, com a mais profunda gratidão e respeito”

A Deus, pela presença constante em todos os momentos da minha vida, me concedendo força e perseverança para entender e superar as dificuldades e continuar em busca do que acredito.

À minha orientadora Profa. Dra. Ethel Leonor Noia Maciel, pelo contínuo exemplo de conduta pessoal, profissional e científica. Agradeço pela sabedoria compartilhada, por todas as oportunidades proporcionadas, pela confiança e incentivo durante todos esses anos, sobretudo por seu carinho, amizade e respeito que me fizeram crescer como profissional e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Moisés Palaci, e, de fato, também orientador, pela competência científica e por todos esses anos de ensinamento. Agradeço pelo incentivo, paciência, oportunidade e por acreditar no meu trabalho!

A Dra. Solange Alves Vinhas, minha querida amiga, por quem tenho grande respeito e admiração. Sua paciência, conhecimento e presteza foram determinantes para finalização desse trabalho. Obrigada por sempre orientar-me!

Ao Dr. Philip Noel Suffys, do Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias do Instituto Oswaldo Cruz, pela disponibilidade e contribuições valiosas para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Reynaldo Dietze, coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas, a minha admiração por todos os desafios enfrentados para a manutenção deste respeitado centro de pesquisa. Obrigada por permitir que eu faça parte da sua equipe.

À banca examinadora da tese, Dr. Philip Noel Suffys, Dra. Martha Maria de Oliveira, Dra. Ana Paula Ferreira Nunes e a Dra. Angélica Espinosa Barbosa Miranda pelas contribuições na apresentação escrita da tese.

À equipe do Laboratório de TB, que há alguns meses atrás tive a oportunidade de coordenar: Luiz Guilherme Schmidt Castellani, Paola Poloni de Aguiar e Pedro Sousa de Almeida Junior, pelo espírito de equipe e por suprirem com competência e dedicação a minha ausência no laboratório. Agradeço pelo carinho e preocupação que tiveram comigo durante todos esses meses, e por sempre me presentear com palavras e coisinhas gostosas! Com vocês eu cresci e aprendi o verdadeiro espírito de solidariedade e companheirismo!

Ao meu amigo Thiago Nascimento do Prado que, muitas vezes sem entender muita coisa sobre esse mundo da biologia molecular, foi essencial para concretização dessa etapa. Obrigada pelo ouvido, pelas revisões e por estar sempre presente. Prometo não te enviar mais mensagens no meio da madrugada!

A Patrícia Marques Rodrigues, pela grande amizade que construímos ao longo desses anos, pelo carinho, paciência, por sempre acreditar que eu podia mais e por me encorajar nos momentos mais difíceis. Agradeço principalmente por esses últimos meses, você sabe o quão importante foi para finalização dessa etapa. Obrigada amiga, nós vamos superar mais essa fase!

A Elenice Moreira Lemos, grande amiga, que mesmo de longe está sempre na torcida! Seu exemplo de força e dedicação me ensinou a nunca desistir dos meus sonhos e do que acredito.

Aos todos os amigos do Laboratório de TB: João, Hildete, Gerson, Brunelli e a Taline pelo apoio, incentivo e por tornar nossos dias mais alegres com o seu carisma!

À equipe da dengue e dos dados, em especial a Pryscila, Carol, Ana Daniela, Aryadne por me acolherem e pelas palavras de incentivo constante.

Às minhas cunhadas, Marcelle Holz Peres e Ana Kelly Ferreira Nóbrega, e aos meus cunhados, Murilo e Marcelo Nóbrega, por compreenderem a minha ausência nesses últimos meses e pelo incentivo constante durante toda a realização desse trabalho.

Aos meus queridos sobrinhos e afilhados, por encherem de alegria a minha vida!

Às minhas amigas de longa data: Fabíola Karla Correa Ribeiro, Tatiana de Resende Có Pelição, Carla Barone Cunha e Valéria Pereira Cabral, por todos esses anos de amizade e convivência. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos que precisei! Vocês fazem os momentos difíceis se tornarem alegres!

Ao grupo de pesquisa em Epidemiologia (LabEpi), pelo carinho e apoio constante. Em especial a Fernanda pelo valioso auxílio na formatação dessa tese e pela disponibilidade e paciência.

A minha querida amiga, Rafaela Borge Loureiro, pelo carinho e incentivo constante!

A Bárbara pela ajuda na análise estatística dos dados.

A Lorenzo Lyrio Stringari, pela grande ajuda com as figuras inseridas nesse trabalho.

A todos os funcionários do NDI, em especial a Roseane Corrêa Custódio e Ariany Fernandes da Silva, por um bom dia sempre tão animado, pelos sorrisos no corredor, e por sempre estarem dispostas a me ajudarem.

A minha família, pelo apoio dado durante toda a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a execução do mesmo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas em inesquecíveis momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

*“A mente que se abre a uma ideia, jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: A epidemiologia molecular tem colaborado para o entendimento da dinâmica de transmissão da tuberculose (TB). Apesar de inúmeros trabalhos terem sido publicados a esse respeito, poucos estudos, no entanto, foram realizados levando-se em consideração a dinâmica de modificação dos perfis genotípicos de *M. tuberculosis* (Mtb) em um intervalo de tempo longo. **Objetivos:** Caracterizar os genótipos e identificar os fatores associados com transmissão recente e tamanho de *cluster* de Mtb na Região Metropolitana de Vitória – ES (RMV) e analisar a dinâmica de modificação dos genótipos de Mtb na Região Metropolitana de Vitória – ES em intervalo de 10 anos. **Métodos:** Este estudo foi constituído de duas partes. **Primeira parte:** Estudo transversal de casos novos de TB diagnosticados na RMV, entre 2000 e 2010 para identificar fatores associados à transmissão recente da TB e o tamanho do *cluster* de Mtb. A genotipagem dos isolados de Mtb foi realizada com base nos métodos de RFLP IS 6110, *Spoligotyping* e na análise de deleção RD^{Rio}. Foram realizados Modelos de regressão hierárquica polinomial para identificar os fatores associados com o tamanho do *cluster*. **Segunda Parte:** Estudo observacional para analisar a dinâmica de modificação dos genótipos de Mtb na RMV em intervalo de 10 anos (com cortes transversais nos períodos de 2000 – 2001 e 2011) com base nas técnicas de RFLP IS6110 e MIRU- VNTR 24 loci tendo como fonte de dados registros laboratoriais e o SINAN. **Resultados: Primeira Parte:** Dentre os 959 isolados de Mtb, 461 (48%) casos pertenciam a um *cluster*. Nossos modelos de regressão polinomial mostraram que os isolados de Mtb pertencentes a família LAM e ao genótipo RD^{Rio} foram mais prováveis de estarem em *clusters* com 6-9 isolados (OR = 1,17, 95% IC 1,08 – 1,26; OR=1,25, 95% IC 1,14- 1,37; respectivamente) em relação aos outros grupos. Os pacientes com ≥10 isolados foram mais prováveis de pertencerem a família LAM e a família de RFLP ES14 (OR = 1,14, 95% IC 1,06 – 1,23; OR= 7,03, 95% IC 4,00 – 12,34, respectivamente). **Segunda Parte:** No período de 2000-2001, dentre os 329 isolados, 109 (33,2%) foram agrupados em 38 *clusters* enquanto, em 2011, dentre os 485 isolados de Mtb, 176 (36,2%) foram distribuídos em 39 *clusters*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos analisados em relação a formação de um *cluster* ($p=0,35$). A análise dos padrões gerados pelo RFLP IS6110

identificou 8 *clusters*, ao quais estão mais envolvidos com transmissão recente na RMV. A correlação entre as duas técnicas de genotipagem mostrou em 2000-2001 uma concordância de 42,1%, e 42,5% em 2011. **Conclusão:** Esses resultados confirmam que a família LAM e o genótipo RD^{Rio} são mais encontrados em *clusters* com 6-9 isolados, e que a família de RFLP ES14 é o genótipo mais prevalente na RMV, sugerindo que a proporção de casos de TB em uma cidade pode ser causada por um pequeno número de genótipos circulantes dentro de uma região e que fatores relacionados ao patógeno devem ser melhor estudados para melhoria no controle da doença.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, técnicas de genotipagem, epidemiologia molecular, dinâmica de modificação do Mtb.

ABSTRACT

Introduction: Molecular epidemiology have contributed to the understanding of the dynamic of transmission of tuberculosis (TB). Although many papers have been published on this subject, few studies, however, were performed taking into account the dynamic of modification of genotypic profiles of *M. tuberculosis* (Mtb) in a long time frame. **Objective:** To identify genotypes and factors associated with *cluster* size of Mtb in the population of the Metropolitan Area of Vitória – ES (RMV) and to analyze the dynamic of modification of Mtb genotypes in the RMV in a 10 years frame. **Methods:** This study had two parts. **First part:** Cross-sectional study of new cases of TB diagnosed in RMV, between 2000 and 2010. The isolates were classified according to genotype *cluster* size and associations between molecular and epidemiologic features were assessed. Mtb isolates were genotyped by the IS6110 RFLP, *Spoligotyping* and in the analysis of RD^{Rio} deletion. Hierarchical polytomous regression models was performed to identify factors associated with *cluster* size. **Second part:** Observational study to analyze the dynamic of modification of Mtb genotypes in the RMV in a 10 years frame (with cross-sectional cuts in the periods of 2000 – 2001 and 2011) based on the techniques of RFLP IS6110 and MIRU- VNTR 24 *loci* having as data source laboratorial records and the SINAN. **Results: First part:** Among the 959 isolates of Mtb, 461 (48%) cases belonged to one *cluster*. Our polytomous regression models showed that the isolates of Mtb that belonged to LAM family and to RD^{Rio} genotype were more likely to be in *clusters* with 6-9 isolates (OR = 1,17, 95% IC 1,08 – 1,26; OR=1,25, 95% IC 1,14- 1,37; respectively) than in the other groups. The TB patients within a cluster with ≥ 10 isolates were more likely to belong to LAM family and to ES 14 family (OR = 1,14, 95% IC 1,06 – 1,23; OR= 7,03, 95% IC 4,00 – 12,34, respectively). **Second part:** In the period of 2000-2001, among the 329 isolates, 109 (33,2%) were grouped in 38 *clusters*, while, in 2011, among the 485 isolates of Mtb, 176 (36,2%) were distributed in 39 *clusters*. There wasn't statistically significant difference between the analyzed periods in relation to belong to a *cluster* ($p=0,35$). The RFLP IS6110 method identified 8 *clusters*, which are more involved with recent transmission in RMV. The correlation between the two genotyping techniques showed in 2000-2001 a concordance of 42,1%, and 43,5% in 2011. **Conclusion:** These results confirm that LAM family and RD^{Rio} genotype are more found in *clusters* with 6-9

isolates, and that ES 14 family is the most prevalent genotype in RMV, suggesting that the proportion of cases of TB in this a city can be caused by a small number of circulating genotypes inside a region and that the factors related to these pathogen a must be better studied to enhance the disease control.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping techniques, molecular epidemiology, dynamic of modification of Mtb.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 Cálculo da taxa de agrupamento.....75

Equação 2 Cálculo do poder discriminatório para técnicas moleculares....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Correspondência de nomenclatura das principais linhagens do MTBC definidas por <i>spoligotyping</i> e por LSP.....	47
Tabela 2 Fatores de risco associados ao tamanho de <i>cluster</i> - características epidemiológicas, clínicas e moleculares de pacientes com TB.....	84
Tabela 3 Regressão Logística Hierárquica Polinomial da associação entre as características epidemiológicas, clínicas e moleculares com o tamanho de <i>Cluster</i> (Modelo 1 – padrão único com grupo de referência).....	87
Tabela 4 Regressão Logística Hierárquica Polinomial da associação entre as características epidemiológicas, clínicas e moleculares com o tamanho de <i>cluster</i> (Modelo 2 – pacientes com 2-5 isolados/ <i>cluster</i> como grupo de referência).....	88
Tabela 5 Distribuição das características demográficas, clínicas e moleculares de pacientes com TB na RMV nos períodos de 2000-2001 e 2011.....	96

Tabela 6 Número de perfis encontrados, agrupamentos e poder discriminatório do RFLP observados nos diferentes períodos do estudo.....99

Tabela 7 Diversidade alélica de cada *locus* e o poder discriminatório durante o período de 2000-2001.....108

Tabela 8 Diversidade alélica de cada *locus* e o poder discriminatório durante o período de 2011.....109

Tabela 9 Número de perfis encontrados, agrupamentos e poder discriminatório do MIRU Diversidade alélica de cada *locus* e o poder discriminatório durante o –VNTR 24 loci observados nos diferentes períodos do estudo.....110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número estimado de casos de tuberculose em 2013.....	30
Figura 2	Série histórica mostrando o Coeficiente de Incidência da Tuberculose no Espírito Santo, no período de 2001-2012.....	31
Figura 3	Série histórica mostrando o Coeficiente de Incidência da Tuberculose Na RMV -ES, no período de 2001-2013.....	32
Figura 4	Cromossomo de <i>M. tuberculosis</i> , cepa hipotética X, genótipos de <i>M. bovis</i> BCG, <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e cepa X com base no RFLP-IS6110. Genótipos de três cepas hipotéticas (<i>strains</i> 1, 2 e 3) com base no <i>spoligotyping</i> e <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i> – MIRUs.....	45
Figura 5	Fluxograma da seleção dos pacientes e dos métodos moleculares utilizados no estudo.....	72
Figura 6	Perfil genotípico dos isolados que compõem os 108 <i>clusters</i> encontrados no estudo.....	81
Figura 7	Distribuição da frequência dos pacientes incluídos no estudo de acordo com o município de origem.....	93
Figura 8	Proporção de pacientes agrupados em <i>clusters</i> e padrões únicos encontradas através da técnica de RFLP – IS 6110 para os períodos do estudo.....	98
Figura 9	Proporção de “famílias” encontradas através da técnica de RFLP IS 6110 para os períodos do estudo.....	100

Figura 10 Número de isolados encontrados a partir da técnica de RFLP IS 6110 pelo tamanho de <i>cluster</i> para os períodos do estudo.....	101
Figura 11 Perfil genotípico e distribuição dos isolados em <i>clusters</i> que permaneceram nos dois períodos do estudo (2000-2001 e 2011).....	103
Figura 12 Perfis genotípicos de RFLP IS 6110 encontrados nos isolados que compõem os clusters no período de 2000-2001.....	104
Figura 13 Perfis genotípicos de RFLP IS 6110 encontrados nos isolados que compõem os clusters no período de 2011.....	105
Figura 14 Distribuição do tamanho dos <i>Clusters</i> encontradas a partir das técnicas de RFLP – IS 6110 e MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> para os períodos do estudo.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS /SIDA: do inglês “Acquired Immunodeficiency Syndrome” ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BAAR: Bacilo Álcool-Ácido Resistente

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin, variante atenuada do *Mycobacterium bovis*

CTAB: n-cetyl N,N,N, -trimethyl ammonium bromide

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CR: do inglês “Clustered Rate” ou taxa de agrupamento

ES: Espírito Santo

HCl: Ácido clorídrico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HGDI: índice discriminatório de Hunter–Gaston

HUCAM: Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

IS: sequências de inserção

LAM: Latin American Mediterranean

LSP: “Large Sequence Polymorphism” – Polimorfismos de Sequências Longas

MIRU: do inglês “Mycobacterial Interspersed Repetitive Units” – Unidades Repetitivas Micobacterianas Intercaladas

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

mL: Milílitro

NaCl: cloreto de sódio

NDI: Núcleo de Doenças Infeciosas

PU: do inglês “patterns unique” ou padrões únicos

PGG: do inglês “Principle Genetic Group” ou principais grupos genéticos

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Panamericana de Saúde

pb: pares de bases

RD: Regiões de Diferença

RMV: Região Metropolitana de Vitória

RFLP: do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism” ou Polimorfismos de Tamanhos de Fragmentos de Restrição

SDS: dodecil sulfato de sódio

SIT: Shared International Type

SNP: “Single Nucleotide Polymorphism” – Polimorfismo de Nucleotídeo único

TB: Tuberculose

µL: Microlitro

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UPGMA: do inglês “*Unweighted Pair Group Method with Mathematical Averages*”

VNTR: “Variable Number in Tandem Repeats” – Repetições de Número Variável em Sequências

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	25
1 Introdução	26
CAPÍTULO 2	28
2 Revisão de Literatura	29
2.1 Tuberculose.....	29
2.1.1 Aspectos Epidemiológicos.....	29
2.1.2 Tuberculose no Espírito Santo.....	31
2.1.3 Agente Etiológico e vias de transmissão.....	33
2.2 Epidemiologia Molecular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb).....	35
2.2.1 O papel do IS6110 na Evolução de Mtb.....	37
2.3 Técnicas de Tipagem Molecular para Identificação de Mtb.....	39
2.3.1 Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição (RFLP).....	39
2.3.2 <i>Spoligotyping</i>	40
2.3.3 MIRU-VNTR.....	42
CAPÍTULO 3	48
3 Justificativa	49
CAPÍTULO 4	51
4 Objetivos	52
CAPÍTULO 5	53
5 Material e Métodos	54
5.1 Local e Modelo do Estudo.....	54
5.2 Caracterização da Região do Estudo.....	54

5.3	Primeira Parte do Estudo - (referente aos objetivos 1 e 2).....	56
5.3.1	Local e População do Estudo.....	56
5.3.2	Subcultivo dos isolados.....	57
5.3.3	Identificação de Mtb através de métodos fenotípicos.....	57
5.3.4	Técnicas de Tipagem Molecular.....	58
5.3.4.1	Análise do RFLP IS6110.....	58
5.3.4.2	<i>Spoligotyping</i>	64
5.3.4.3	Polimorfismo de Longa Sequência (LSP) – Detecção da Deleção do RD ^{Rio}	66
5.3.6	Caracterização das variáveis demográficas e clínicas.....	67
5.3.7	Análises estatísticas.....	68
5.3.8	Aspectos éticos.....	69
5.4	Segunda Parte do Estudo - (referente aos objetivos 1 e 3).....	70
5.4.1	Local e População do Estudo.....	70
5.4.2	Caracterização da amostra.....	71
5.4.3	Subcultivo dos isolados e identificação de Mtb através de métodos fenotípicos.....	72
5.4.4	Técnicas de Tipagem Molecular.....	73
5.4.4.1	Análise do RFLP IS6110.....	73
5.4.4.2	Análise do MIRU-VNTR.....	73
5.4.4.3	Análise do perfil genotípico dos isolados.....	74
5.5	Caracterização das variáveis demográficas e clínicas.....	76
5.6	Análises estatísticas.....	76
5.7	Aspectos éticos.....	77
	CAPÍTULO 6	78

6 Resultados e Discussão	79
6.1 Resultados da Primeira Parte	79
6.1.1 Caracterização da População do Estudo.....	79
6.1.2 Análise do perfil genotípico dos isolados de Mtb por RFLP IS6110.....	80
6.1.3 Análise dos fatores de risco associados com o tamanho do <i>cluster</i> de Mtb.....	82
6.2 Discussão - Primeira parte.....	89
6.3 Resultados da Segunda Parte	92
6.3.1 Caracterização da População do Estudo.....	92
6.3.2. Caracterização da população do estudo em relação as características sociodemográficas e clínicas.....	92
6.3.3 Análise RFLP IS6110.....	97
6.3.4 Caracterização dos <i>clusters</i> e sua dinâmica de modificação durante o período de 2000-2001 e 2011.....	101
6.3.5 Análise do perfil genotípico dos isolados de Mtb pelo MIRU-VNTR.....	106
6.3.6 Análise de correlação entre as técnicas de genotipagem RFLP IS6110 e MIRU-VNTR.....	111
6.4 Discussão - Segunda Parte.....	112
CAPÍTULO 7	118
7 Conclusão	119
CAPÍTULO 8	121
8 Referencias Bibliográficas	122
ANEXOS	137

APRESENTAÇÃO

Com o objetivo de otimizar a leitura do texto, essa pesquisa está estruturada em capítulos. No primeiro capítulo abordamos a introdução, no segundo a revisão de literatura, no terceiro a justificativa e no quarto os nossos objetivos. Para auxiliar a compreensão dos leitores, no quinto capítulo apresentamos os métodos divididos em duas partes. No sexto capítulo, primeiramente apresentamos os resultados e discussões da primeira parte (referentes aos objetivos 1 e 2) e depois os resultados e discussão da segunda parte (referentes aos objetivos 1 e 3) dessa pesquisa

Este trabalho, será apresentado em duas partes, sendo a primeira exposta por meio de um estudo transversal que visou identificar os fatores de risco associados ao tamanho do *cluster* de *M. tuberculosis* nos diferentes genótipos de RFLP na Região Metropolitana de Vitória-ES, e a segunda a partir de um estudo observacional que analisou a dinâmica temporal de modificação dos genótipos de *M. tuberculosis* na Região Metropolitana de Vitória-ES em um intervalo de 10 anos, utilizando técnicas moleculares como o RFLP IS 6110 e o MIRU-VNTR 24 *loci*.

No sétimo capítulo apresentamos as conclusões da nossa pesquisa.

Portanto, pretende-se com essa pesquisa destacar o papel de certos genótipos na transmissão e disseminação da doença na Região Metropolitana de Vitória -ES e direcionar os Programas de Controle da TB na contenção e redução da cadeia de transmissão da doença.

O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq por meio do Edital 14/2013/Universal.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença milenar que constitui 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).

A partir de 1990, a epidemiologia clássica, que identifica os fatores que determinam a distribuição, transmissão, manifestação e progressão da doença no tempo e no espaço, aliada à epidemiologia molecular, que utiliza concomitantemente técnicas de biologia molecular que caracterizam o conteúdo nucleotídico de um patógeno, tem auxiliado na melhor compreensão da dinâmica de transmissão de *M. tuberculosis* (Mtb) (COHN & O'BRIEN, 1998).

Nos últimos anos, com o desenvolvimento de metodologias de genotipagem para Mtb, como o RFLP, *Spoligotyping* e o MIRU-VNTR, baseadas no reconhecimento de sequências ou padrões genéticos do microrganismo, tem-se conseguido identificar as linhagens, traçar rotas de transmissão da doença, determinar o grau de parentesco entre as cepas individuais e identificar os possíveis genes responsáveis por sua virulência (FOXMAN & RILEY, 2001; NGUYEN *et al.*, 2004).

Assim, sistemas que possam diferenciar cepas de Mtb epidemiologicamente relacionadas das outras não relacionadas, são ferramentas poderosas numa investigação de surtos de infecção hospitalar, ou comunitária, bem como para diferenciar reativação endógena de uma reinfecção exógena. Na prática, dois ou mais isolados com padrões de DNA idênticos ou muito semelhantes (± 1 banda), são agrupados em *clusters* e, geralmente aceitos como eventos que representam transmissão recente. Assume-se que a taxa de transposição do IS 6110 é constante entre as cepas. Entretanto, em algumas famílias, tem sido notado pequenas alterações no padrão de bandas dos isolados pertencentes a Mtb, compatíveis com a evolução de cepas (GLYNN *et al.*, 1999; TANAKA *et al.*, 2004; McEVOY *et al.*, 2007). Essas cepas são denominadas de variantes clonais e podem diferir em número e/ou tamanho das cópias de IS 6110 (VIEDMA *et al.*, 2006; LAGO – PÉREZ *et al.*, 2012).

Estudos recentes têm mostrado que a definição de *cluster* não deveria se limitar, somente a cepas com genótipos idênticos, mas também a cepas oriundas de microevoluções, resultantes de eventos de transposições, deleções ou inserções no genoma da micobactéria, o que poderia fazer uma estimativa melhor de transmissão recente. De Boer e colaboradores (1999) mostraram que, em média, metade das cepas de Mtb apresentam mudança de uma banda em seus perfis genotípicos em um período de 3-4 anos. Este período é considerado rápido o suficiente para que os isolados de pacientes sem nenhuma relação epidemiológica apresentem perfis genotípicos distintos e, por outro lado, lento o suficiente para que os isolados de casos epidemiologicamente relacionados apresentem perfis genotípicos idênticos (CAVE *et al.*, 1994; YEH *et al.*, 1998; de BOER *et al.*, 1999).

Entretanto, poucos são os estudos de base populacional que são realizados em países com alta carga da doença. Para se entender melhor como funciona a dinâmica de modificação desses genótipos, o que ocorre ao longo do tempo, estudos de base populacional são necessários. Supõe-se que em locais onde o controle da doença é melhor estruturado, a transmissão cede espaço à reativação. Dessa forma, espera-se que ao longo de um período de tempo o percentual de cepas com um mesmo perfil genotípico tenderia a diminuir e que conseqüentemente aumentaria o número dos perfis únicos (PU), denotando assim, uma reativação de uma infecção causada em um passado remoto, havendo portanto, pouca contribuição na dinâmica de transmissão da doença.

Ainda nesse contexto, identificar quais os fatores relacionados à transmissão da tuberculose e a distribuição dos genótipos dentro da população são determinantes cruciais para contribuir com o entendimento da distribuição da doença e auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais específicas para conter sua disseminação mais rapidamente.

Diante do exposto, o presente estudo visa identificar os fatores de risco relacionados à transmissão recente e associá-los ao tamanho do *cluster* de *M. tuberculosis*, além disso, nos propomos a analisar a dinâmica temporal de modificação dos genótipos de *M. tuberculosis* na Região Metropolitana de Vitória – ES.

CAPÍTULO 2

2 Revisão de Literatura

2.1 Tuberculose

2.1.1 Aspectos Epidemiológicos

Apesar dos esforços empreendidos mundialmente, a tuberculose (TB) atinge mais pessoas que qualquer outra infecção curável no mundo (MAZARS *et al.*, 2001; WHO, 2014), exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle que considerem aspectos humanos, econômicos e sociais e políticas, por ser uma doença fortemente determinada pelas condições sócio-econômicas do ambiente. Os avanços no seu conhecimento e na tecnologia disponível para controlá-la não têm sido suficientes para impactar significativamente em sua morbi-mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento. Portanto, permanece como um problema de expressiva magnitude nos dias de hoje, desafiando a saúde pública.

Vários fatores contribuem para a permanência da TB como uma endemia nas populações humanas, como: a desigualdade na distribuição de renda, a intensificação dos movimentos migratórios, o processo de envelhecimento da população, especialmente nos países mais desenvolvidos, e o longo tempo necessário para o tratamento (MATHEMA *et al.*, 2006). Além desses, nas últimas décadas dois novos fatores contribuíram para este quadro: o surgimento de cepas multirresistentes aos principais quimioterápicos utilizados na luta contra a doença e a associação com outras morbidades, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (RUFFINO-NETTO, 2002; ABUBAKAR *et al.*, 2013). Juntas, a TB e a AIDS causam mais mortes em adultos do que qualquer outra doença infecciosa.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a co-infecção Mtb/Vírus da Imunodeficiência Humana (Mtb/HIV) constitui hoje uma calamidade para os sistemas de saúde. De acordo com alguns autores, o risco de progressão para doença ativa por Mtb em pacientes co-infectados é de 5 a 15% por ano, contra 0,5 a 1% para os não infectados, sugerindo que, além das precárias condições de vida, a co-infecção contribui com o aumento da incidência da doença, como em algumas regiões africanas, tais como Botswana, África do Sul, Zâmbia e Zimbábue, onde a co-infecção Mtb/HIV alcançou níveis absurdos, próximos a 60% (FRIEDEN, 2003).

A OMS estima que um terço da população mundial, ou aproximadamente 2 bilhões de pessoas, estejam infectadas por Mtb. Em 2013, estimou-se a ocorrência de 9 milhões de casos novos de TB (com coeficiente de incidência de 126 casos novos/100.000 habitantes) e a morte de aproximadamente 1,4 milhão de pessoas, sendo que 430.000 estão associadas a pacientes HIV – positivos (WHO, 2014; GLAZIOU *et al.*, 2013; ZUMLA *et al.*, 2013). No Brasil, os números são preocupantes. Neste ano, estimou-se 93.000 casos novos, resultando em um coeficiente de incidência anual médio de 46 casos/100.000 habitantes. O país ocupa a 16ª posição entre os 22 países que abrigam cerca de 80% de todos os casos de TB no mundo (WHO, 2014) (Figura 1).

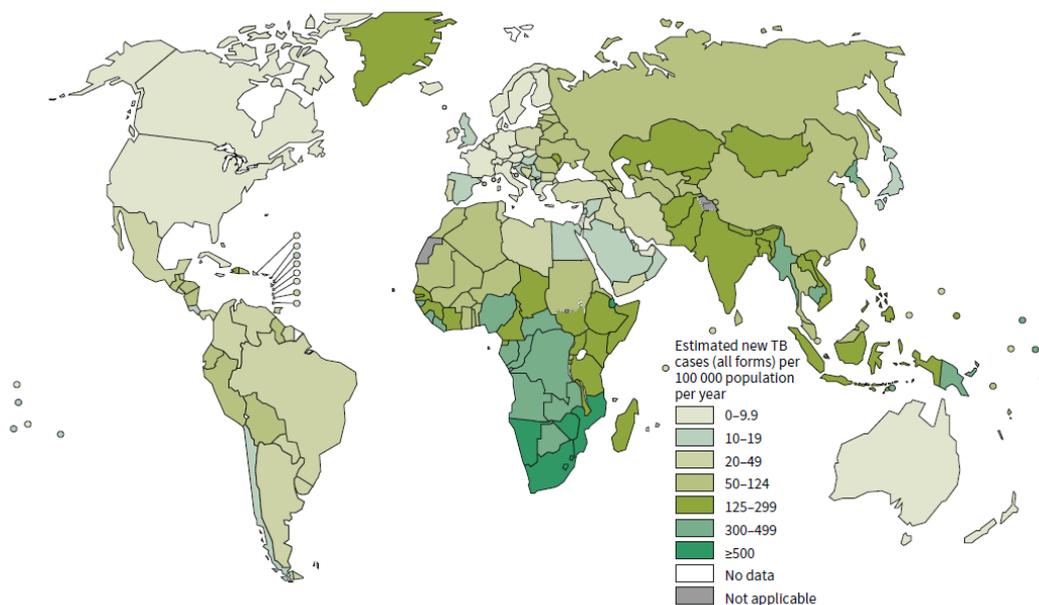


Figura 1 – Número estimado de casos de tuberculose em 2013.

Fonte: WHO, 2014.

2.1.2 Tuberculose no Espírito Santo

No cenário nacional, o Estado do Espírito Santo surge em 11º lugar em incidência em relação aos demais estados, alcançando uma incidência de 35,1 casos/100.000 habitantes para a TB em todas as formas. A incidência média do estado está, portanto, abaixo da média da Região Sudeste, que é de aproximadamente 41,5 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2012).

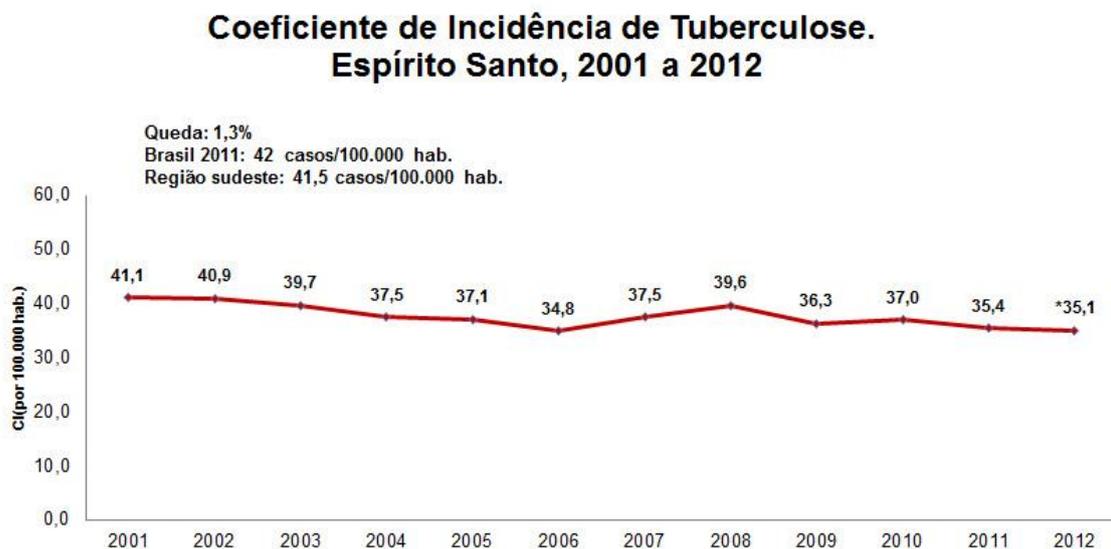


Figura 2 – Série histórica mostrando o Coeficiente de Incidência da Tuberculose no estado do Espírito Santo, no período de 2001 - 2012.

Fonte: SESA/NEVE/SINAN NET, 2012.

O Estado possui 78 municípios, em sua maior parte (75%) com até 30 mil habitantes e 9 (10%) com mais de 100 mil. Nesse cenário, são 9 os municípios prioritários para o controle da tuberculose: Cariacica, Vitória, Vila Velha, Serra, Cachoeiro de Itapemirim, São Mateus, Guarapari, Linhares e Colatina.

Grande parte da população concentra-se nos municípios que constituem a Região Metropolitana de Vitória (RMV). Inicialmente formada pelos municípios de Cariacica, Serra, Viana, Vila Velha e Vitória, a partir de 1999 foi incluído o município de Guarapari e, em 2001, o município de Fundão. Juntos, esses municípios representavam, em 2004, cerca de 47,5% da população capixaba (IPES, 2005), e foram responsáveis pela notificação de 847 casos novos de TB (coeficiente de incidência de 50,9/100.000 habitantes).

Dentre os municípios prioritários do ES com a maior carga da doença, destacam-se o município de Vitória e o de Cariacica que notificaram em 2013, 49,4 e 39,7 casos/100.000 habitantes, respectivamente (Figura 3) (SESA, GEVS, NEVE, SINAN-ES, 2014).

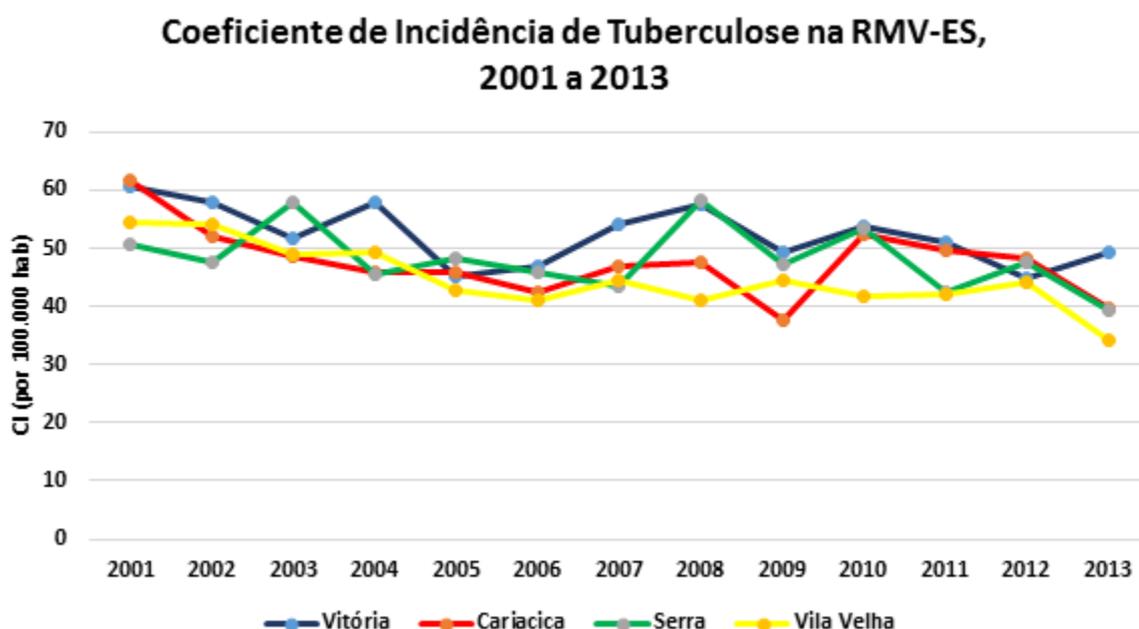


Figura 3 – Série histórica mostrando o Coeficiente de Incidência da Tuberculose na Região Metropolitana de Vitória - ES, no período de 2001 - 2013.

Fonte: SESA/NEVE/SINAN NET, 2014.

2.1.3 Agente Etiológico e vias de transmissão

Em 1882 o cientista alemão Robert Koch estabeleceu definitivamente a relação etiológica entre a tuberculose humana e Mtb. Koch demonstrou o isolamento e forma de cultivo, a partir de tubérculos (granulomas) macerados, de Mtb, identificando-o como agente etiológico da doença que ficou mais conhecido como bacilo de Koch (SAKULA, 1982).

O gênero *Mycobacterium* compreende pequenos microrganismos em forma de bastão ou ligeiramente curvos, medindo 0,2 a 0,6 μm de diâmetro x 1 a 10 μm de comprimento. São organismos imóveis, aeróbios estritos, não formadores de esporos e não capsulados. Uma série de aspectos torna esses microrganismos distintos dos demais gêneros bacterianos, muitos dos quais relacionados à composição de sua parede celular, a qual é composta primordialmente por uma variedade de lipídeos complexos. Calcula-se que aproximadamente 60% da parede celular micobacteriana é constituída de lipídeos que consistem basicamente de ácidos graxos, denominados ácidos micólicos e ceras, o que lhes confere características peculiares, como: formação de películas em meios líquidos, uma resistência à dessecação, à descoloração por álcool-ácido, álcalis, anti-sépticos e a diversos agentes químicos e antibióticos (WAYNE; KUBICA, 1986). A esse respeito, soluções de hidróxido de sódio, fosfato trissódico ou cloreto de cetilpiridínio não afetam as micobactérias da mesma maneira como afetam microorganismos contaminantes e podem ser usadas em procedimentos de descontaminação de espécimes antes da realização do cultivo para diagnóstico (KENT & KUBICA, 1985).

Apesar da abundância de espécies existentes no gênero, apenas algumas representantes do mesmo se adaptaram a algum tipo de hospedeiro ou se tornaram patogênicas para animais e humanos. Dentre as que merecem destaque está o Mtb que, sem hospedeiros intermediários, reservatórios no meio ambiente ou vetores, encontrou no homem o seu reservatório natural e mantenedor da espécie.

O Mtb pertence à família *Mycobacteriaceae* e é o principal responsável pela tuberculose em seres humanos. É um dos componentes do complexo Mtb, juntamente com *Mycobacterium bovis*, causador da doença em gado e que eventualmente pode acometer outros tipos de animais e também o homem; *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guerin), utilizado para vacinação; *Mycobacterium africanum*, associado à tuberculose em humanos na África ; *M. caprae* e *M. pinnipedii*, que causam TB em mamíferos domésticos e selvagens; *M. microti*, que causa TB em ratos silvestres, *M. canetti* que também infecta humanos (WHO, 2012; DELOGU *et al.*, 2013) e, mais recentemente, *M. mungi* que foi identificado em 2010 como causador de TB em mangustos na África (ALEXANDER *et al.*, 2010).

Em 1998, o genoma completo da cepa H37Rv de Mtb foi sequenciado, fornecendo informações importantes sobre a genética desse microrganismo para melhor compreensão da doença. Ele é composto por 4.411.529 pares de bases (pb), contém aproximadamente 4000 genes, e um conteúdo de guanina + citosina equivalente a 65,5% do genoma (COLE *et al.*, 1998; LAMRABET & DRANCOURT, 2012). A recombinação gênica ocorre através dos *transposons*, que são elementos inerentemente instáveis e têm o potencial para causar muitos tipos de rearranjos, tais como, transposições, deleções, inversões e duplicações (MOSTRÖM *et al.*, 2002). Os *transposons* mais simples são as sequências de inserção (IS) e mais de 14 tipos de sequências de inserção já foram identificadas no genoma de Mtb. Estas sequências de inserção são geradoras de polimorfismo genético e, portanto, são frequentemente utilizadas para discriminar cepas (MOSTRÖM *et al.*, 2002).

O Mtb é considerado um microrganismo parasita intracelular facultativo, capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de células fagocitárias. Seu tempo de geração é longo, de aproximadamente 18 horas, em temperaturas próximas a 37°C. Isso pode explicar a predileção dessa bactéria pelos pulmões (devido à tensão de oxigênio existente nesses órgãos), e a demora na sua detecção em meios de cultura e na ação eficiente das drogas utilizadas no tratamento (METCHOCK *et al.*, 1999).

A principal fonte de infecção humana é o indivíduo portador da forma pulmonar bacilífera da tuberculose, ou seja, aqueles que têm a capacidade de eliminarem uma quantidade superior a 5.000 bacilos/ml de escarro, o que permite a detecção desses

microrganismos pela baciloscopia. A fala, o espirro e, principalmente, a tosse de um doente de tuberculose pulmonar bacilífera lançam no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados. Apenas as gotículas com diâmetro de 2 a 10 μm (Núcleos de Wells) e poucos bacilos (1 ou 2) conseguem alcançar os bronquíolos e alvéolos pulmonares onde iniciam sua multiplicação (TARANTINO; LEITÃO DE OLIVEIRA, 1990).

Além disso, a frequência da tosse, idade do transmissor, fluidez do escarro, virulência do bacilo e intensidade do contato, são fatores cruciais na transmissão da doença (BRASIL, 2002).

O Mtb desenvolveu a habilidade de viver dentro do hospedeiro, em um estado dormente, sem causar doença e por um período muito longo. Este período de latência variável, possibilita que a doença se desenvolva meses ou anos após a exposição inicial e infecção, o que torna estudos sobre a transmissão da doença ainda mais difíceis de serem compreendidos (MATHEMA *et al.*, 2006).

2.2 Epidemiologia molecular de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)

A epidemiologia clássica, que auxilia na identificação dos fatores que determinam a distribuição, transmissão, manifestação e progressão da doença no tempo e no espaço, aliada a epidemiologia molecular, que utiliza concomitantemente técnicas de tipagem molecular, têm permitido a melhor compreensão da dinâmica de transmissão de Mtb (COHN & O'BRIEN, 1998, FOXMAN & RILEY, 2001).

Há 20 anos atrás, era quase impossível identificar linhagens individuais de Mtb e, em consequência, acompanhar a transmissão de uma determinada linhagem numa certa região. Nos últimos anos, com o desenvolvimento de técnicas de genotipagem para Mtb baseadas no reconhecimento de sequências ou padrões genéticos do microrganismo, tem-se conseguido avaliar a proporção de casos agrupados em

clusters dentro de uma população, que indicam eventos de transmissão recente, bem como inferir nas taxas de transmissão recente entre diferentes grupos étnicos e, identificar as linhagens e os possíveis genes responsáveis por sua virulência, resistência a drogas e produção de antígenos relacionados a vacinas (GLYNN Et al., 2010; GLYNN et al., 2005; NGUYEN *et al.*, 2004; FOXMAN & RILEY, 2001; FERRAZOLI et al, 2000).

Assim, sistemas que possam diferenciar cepas de Mtb epidemiologicamente relacionadas, das outras não relacionadas, são ferramentas poderosas numa investigação de surtos de infecção hospitalar, ou comunitária, bem como para diferenciar reativação endógena de uma reinfeção exógena.

Além disso, estudos epidemiológicos recentes de TB têm mostrado que fatores relacionados a cepa e fatores epidemiológicos, como a idade e o sexo, podem contribuir para o aparecimento de grandes *clusters* dentro de uma população (GLYNN et al., 2008; HOUBEN & GLYNN, 2009) e, que são causados por um único genótipo ou cepa de Mtb. Em algumas situações, esses casos são atribuídos a um aumento da capacidade de transmissão e/ou replicação pela cepa específica.

Ainda nesse cenário, em um estudo populacional, Murray e colaboradores em 2002 alertaram que a variação na distribuição dos *clusters* de Mtb em diferentes comunidades pode refletir na dinâmica de transmissão da doença. Supõe-se em locais onde o controle da doença é melhor estruturado, a transmissão cede espaço à reativação. Dessa forma, espera-se que ao longo de um período de tempo o percentual de cepas com um mesmo perfil genotípico tenderia a diminuir, e conseqüentemente aumentaria o número dos perfis únicos (PU), denotando assim, uma reativação de uma infecção causada em um passado remoto, havendo, portanto, pouca contribuição na dinâmica de transmissão da doença. No entanto, a alta proporção de *clusters* encontrados em uma determinada região sugere transmissão recente, o que demonstraria deficiências no sistema de controle da tuberculose.

Boer e colaboradores (1999) observaram que alterações nos padrões de RFLP são mais comuns em indivíduos com doença extrapulmonar e para aqueles indivíduos que possuíam ambos isolados provenientes do sítio pulmonar e extrapulmonar. Em um estudo realizado nos EUA, para analisar um grande surto de TB da cepa W

multirresistente mostrou que no período de 3 anos houve uma alteração no perfil genotípico do RFLP dessas cepas, indicando que em poucos anos uma fração significativa de Mtb pode sofrer alterações (BIFANI et al., 2002). Alguns estudos estabeleceram que a vida – média para que ocorra alterações no padrão genotípico de uma cepa é de 3 – 4 anos (YEH et al., 1998; BOER et al., 1999; GLYNN et al., 1999). Dessa forma, para uma correta interpretação do uso de métodos de tipagem molecular na dinâmica de transmissão da TB, torna-se essencial o conhecimento da taxa nos quais os perfis genotípicos de RFLP alteram ao longo do tempo, como uma estimativa para identificar casos de TB associados a transmissão recente.

2.2.1. O papel do IS6110 na Evolução de Mtb

A descoberta do primeiro elemento transponível de DNA de uma micobactéria se deu em 1987 (SMITH, 1996). Desde então já foram descritos 46 elementos de inserção em 10 espécies de micobactérias. São identificados pela sigla *IS* (*Insertion Sequence*) e são subdivididos em famílias, de acordo com as características e espécies onde foram identificadas. Existem identificadas quatro diferentes sequências de inserção (IS) em cepas do complexo Mtb, a saber: IS6110, IS1081, IS1547 e os “IS-like elements” (McEVOY et al., 2007). A sequência IS6110 pode ter uma grande variação de cópias no genoma, a IS 1081 está presente de cinco a sete cópias, estando associada a um polimorfismo de DNA. As demais sequências (IS 1547 e IS like element) estão presentes em número de uma ou duas cópias por genoma.

A IS6110, encontrada no complexo Mtb, foi inicialmente descrita em 1990. Ela possui 1.355 pares de bases e pertence à família IS3. O número de cópias de IS6110 varia entre 0-25 e sua posição no cromossomo é variável entre diferentes isolados (MOSTRÖM et al., 2002; McEVOY et al., 2007).

O alto grau de polimorfismo do IS6110, tanto em número quanto em posição, bem como a sua estabilidade ao longo do tempo, tornou o IS6110 uma poderosa

ferramenta epidemiológica entre as diferentes cepas de Mtb. Além disso, é útil para distinguir entre eventos de transmissão recente e eventos de reativação.

Na prática, dois ou mais isolados com padrões de DNA idênticos são agrupados em *clusters* e geralmente aceitos como eventos que representam transmissão recente. Isolados com pequenas alterações no número ou no tamanho das bandas, devido à inserção, deleção ou inversão, podem ser identificados como pertencentes a um mesmo grupamento ou família (TENOVER *et al.*, 1997). Assume-se que a taxa de transposição do IS6110 é constante entre as cepas (McEVOY *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2004; GLYNN *et al.*, 1999). Entretanto, estudos recentes têm mostrado que a definição de *cluster*, não deveria se limitar a cepas com genótipos idênticos, mas também incluir cepas oriundas de microevoluções, resultantes de eventos de transposições, deleções ou inserções no genoma da micobactéria, o que poderia fazer uma estimativa melhor de transmissão recente. Essas cepas são denominadas de variantes clonais e podem diferir em número e/ou tamanho das cópias de IS6110 (VIEDMA *et al.*, 2006; LAGO – PÉREZ *et al.*, 2012).

Diversos estudos têm investigado a estabilidade dos métodos genéticos em pacientes com cultura positiva persistente ou recidiva. De Boer e colaboradores (1999) mostraram que, em média, metade das cepas de Mtb apresenta mudança de uma banda em seus perfis genotípicos em um período de 3-4 anos (IC 95%, 2,1 – 5,0). Este período é considerado rápido o suficiente para que os isolados de pacientes sem nenhuma relação epidemiológica apresentem perfis genotípicos distintos e, por outro lado, lento o suficiente para que os isolados de casos epidemiologicamente relacionados apresentem perfis genotípicos idênticos (de BOER *et al.*, 1999; YEH *et al.*, 1998; CAVE *et al.*, 1994).

Geralmente, isolados com menor número de cópias IS6110, têm mostrado uma taxa de transposição menor e, portanto, esses casos podem ser possíveis de gerar uma superestimação dos *clusters* na população (McEVOY *et al.*, 2007). Glynn e colaboradores (1999) mostraram que isolados com poucas bandas são mais prováveis de serem idênticos ao acaso e menos prováveis de terem alguma ligação epidemiológica do que os isolados que possuem muitas bandas.

Atualmente existe uma variedade de métodos de tipagem molecular para a caracterização dos membros do complexo Mtb. A partir da década de 1990, a descoberta de elementos transponíveis e elementos repetitivos no complexo Mtb, tem sido a base de diversos métodos que são utilizados tanto na identificação, como na genotipagem desses microrganismos. Alguns são baseados na amplificação de sequências repetidas de DNA, usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e outros investigam a posição, no genoma, de sequências de inserção (IS) (van EMBDEN *et al.*, 1993).

2.3 Técnicas de Tipagem Molecular para Identificação de *M. tuberculosis*

2.3.1 Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição (RFLP)

A técnica de RFLP IS6110 é reconhecida como padrão ouro para diferenciar cepas de Mtb, que aliada aos dados dos pacientes permite que se estabeleça uma correlação epidemiológica. É um método de tipagem altamente discriminatório, baseado na variação da sequência de DNA no genoma bacteriano, denominado de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorfism*). Este método baseia-se na digestão do DNA genômico bacteriano por enzimas de restrição, denominadas de endonucleases, que geram fragmentos de diferentes comprimentos. Os fragmentos são então separados em gel de agarose e hibridizados por sonda de DNA (Figura 4a). O perfil de bandas gerados a partir dessa metodologia é específico para cada cepa de Mtb (van SOOLINGEN *et al.*, 1991).

Estudos com base em observações laboratoriais e em pacientes durante surtos, têm demonstrado que o RFLP IS6110, apesar de altamente diverso, geralmente

permanece estável o suficiente para ser usado como um marcador para comprovar ligações epidemiológicas (van SOOLINGEN *et al.*, 1991).

Esta técnica possibilita mensurar a diversidade de linhagens de Mtb, incluindo cepas provenientes de diferentes regiões geográficas, além de permitir que se caracterizem surtos e epidemias (van EMBDEN, 1993). Dados assim são de grande importância no estudo da transmissão global da tuberculose e na identificação de linhagens com propriedades particulares, como alta infectividade, virulência e resistência a drogas (van EMBDEN *et al.*, 1993).

Entretanto, apesar de seu excelente poder discriminatório, a técnica de RFLP IS6110, quando aplicada em cepas com baixo número de cópias da IS6110 (< 5 cópias), tem sua capacidade de discriminação diminuída, havendo a necessidade da utilização de métodos de genotipagem complementares (SAHADEVAN *et al.*, 1995).

2.3.2. Spoligotyping

Mais recentemente, foram desenvolvidos métodos de genotipagem baseadas na Reação de Cadeia de Polimerase (PCR). Duas das técnicas mais populares são baseadas em *Clustered Regulatory Short Palindromic Repeats* (CRISPR) e no *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR), respectivamente (Figura 4a e 4b, respectivamente). A genotipagem por CRISPR e VNTR foram estabelecidas para muitas bactérias geneticamente monomórficas, dentre elas inclui-se o *M. leprae*. Para as micobactérias que pertencem ao complexo Mtb as metodologias de CRISPR e VNTR são reconhecidas como *Spoligotyping* e MIRU-VNTR, respectivamente (COMAS *et al.*, 2009).

O *Spoligotyping* descrito por Kamerbeek e colaboradores (1997) tem sido utilizado em associação com o RFLP, principalmente em isolados com menos de 5 cópias do IS6110. Essa técnica baseia-se na amplificação por PCR do DNA presente

no *locus*, denominado de região de repetição direta (“*Direct Repeat*” – DR), presente exclusivamente no genoma de micobactérias do complexo Mtb. Esse *locus* contém múltiplas cópias de sequências bem conservadas de 36 pares de bases (pb), intercaladas por sequências curtas não repetitivas, denominadas espaçadores, que variam de 34 a 41 pb de tamanho (KAMERBEEK *et al.*, 1997). A subsequente hibridização diferencial dos produtos amplificados é realizada com oligonucleotídeos complementares às regiões espaçadoras variáveis, localizadas entre as DRs que estão ligados à membrana. A presença das sequências espaçadoras varia entre diferentes cepas e é visualizada por um sinal em um ponto fixo da membrana de hibridização.

O método é simples, rápido e prático, sendo considerado uma ferramenta tanto para o estudo da diversidade genética de isolados de Mtb quanto para abordar estrutura populacional de Mtb, atentando para identificar principais linhagens em diferentes distribuições geográficas (SOLA *et al.*, 2001; KANDUMA *et al.*, 2003; PANDOLFI *et al.*, 2007).

A distribuição geográfica global dos genótipos de Mtb foi estabelecida a partir de uma base de dados internacional de espoligotipos (SOLA *et al.*, 2001). O quarto banco internacional de espoligotipos, SpolDB4, foi construído para determinar a estrutura populacional global do MTBC bem como sua transmissão e evolução. Este banco de dados contém 1939 perfis compartilhados (*Shared International Type* - SIT), representando um total de 39.295 isolados clínicos originários de 122 países (BRUDEY *et al.*, 2006). Além de fornecer uma visão global da diversidade genética do complexo Mtb, seu livre acesso permite a utilização das informações para o estabelecimento de análises e comparações genéticas e epidemiológicas.

Em 2012, Demay e colaboradores descreveram um banco de dados internacional denominado SITVITWEB. Esse banco permite a avaliação da diversidade global de Mtb e é baseado na existência de 62582 isolados clínicos de 153 países de origem dos pacientes. Os autores reportaram 7105 padrões de *Spoligotyping* (o que corresponde a 53816 isolados clínicos) agrupados em 2740 SIT (*Shared International Types*) e 4364 padrões órfãos. Além disso, o banco fornece um total de 2379 padrões de MIRU (8161 isolados clínicos) de 87 países de origem dos

pacientes. Esse banco de dados permitiu atualizar novas linhagens de Mtb e as suas distribuições geográficas além de uma melhor compreensão da estrutura populacional de Mtb.

Entretanto, essa técnica possui um poder discriminatório baixo em relação ao método de RFLP IS6110. Ela é menos discriminatória em isolados com alto número de cópias de IS6110 e com poder discriminatório superior nos isolados com menos de cinco cópias de IS6110 (KAMERBEEK *et al.*, 1997). Apesar disso, estudos demonstraram que essa técnica não seria suficiente para estabelecer todas as correlações epidemiológicas entre as cepas do complexo Mtb, sendo necessária a associação com outros métodos moleculares.

2.3.3. MIRU-VNTR

Os métodos baseados em minissatélites que contém número variável de repetições em sequência (*Variable Numbers of Tandem Repeats - VNTRs*) foram demonstrados ser efetivos para a tipagem de *M. tuberculosis* (Kanduma *et al.*, 2003). A técnica de MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit – MIRU*) utiliza os princípios da Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) e foi desenvolvido por Supply e colaboradores (2001) para estudar números variáveis de repetições em sequência (*VNTRs*) no genoma da micobactéria, com comprimento variável de 50 a 100 pb (SUPPLY *et al.*, 2001; MAZARS *et al.*, 2001; PANDOLFI *et al.*, 2007).

O poder discriminatório da análise do MIRU-VNTR é proporcional ao número de *loci* avaliados. Em geral, quando somente 12 *loci* são utilizados, é menos discriminatório que a técnica de RFLP IS6110 para isolados com maior número de cópias IS6110, entretanto, seu poder discriminatório aumenta quando é utilizado para os isolados com baixo número de cópias de IS6110 (MATHEMA *et al.*, 2006).

Quando mais de 12 *loci* são utilizados (esta técnica pode utilizar um sistema de combinação de 12, 15 ou 24 *loci*), ou a análise é combinada com o *Spoligotyping*, o poder discriminatório torna-se semelhante ao do RFLP IS6110 (SUPPLY *et al.*, 2006; MATHEMA *et al.*, 2006).

O MIRU-VNTR está cada vez mais sendo também aplicado ao estudo de questões evolutivas. Enquanto que o MIRU-VNTR com 15 *loci* tem sido utilizado principalmente para estudos de epidemiologia molecular, o MIRU-VNTR que utiliza 24 *loci* tem sido proposto para análises filogenéticas e populacionais de MTBC.

Vários estudos têm sido realizados evidenciando que o uso dessa técnica pode ser comparado, de forma semelhante, à técnica de RFLP, porém de execução muito mais fácil e rápida, possibilitando dessa forma uma comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas, além de permitir a identificação de mais focos de contágio na população, podendo-se assim estudar métodos mais adequados para interromper a transmissão da doença (SUPPLY *et al.*, 2001; SHAMPUTA *et al.*, 2010; THUMAMO *et al.*, 2012). Essa metodologia também tem auxiliado na definição de reinfecção exógena, que é normalmente baseada na observação da variação de no mínimo 3 a 4 bandas de RFLP IS6110 (SUPPLY *et al.*, 2006).

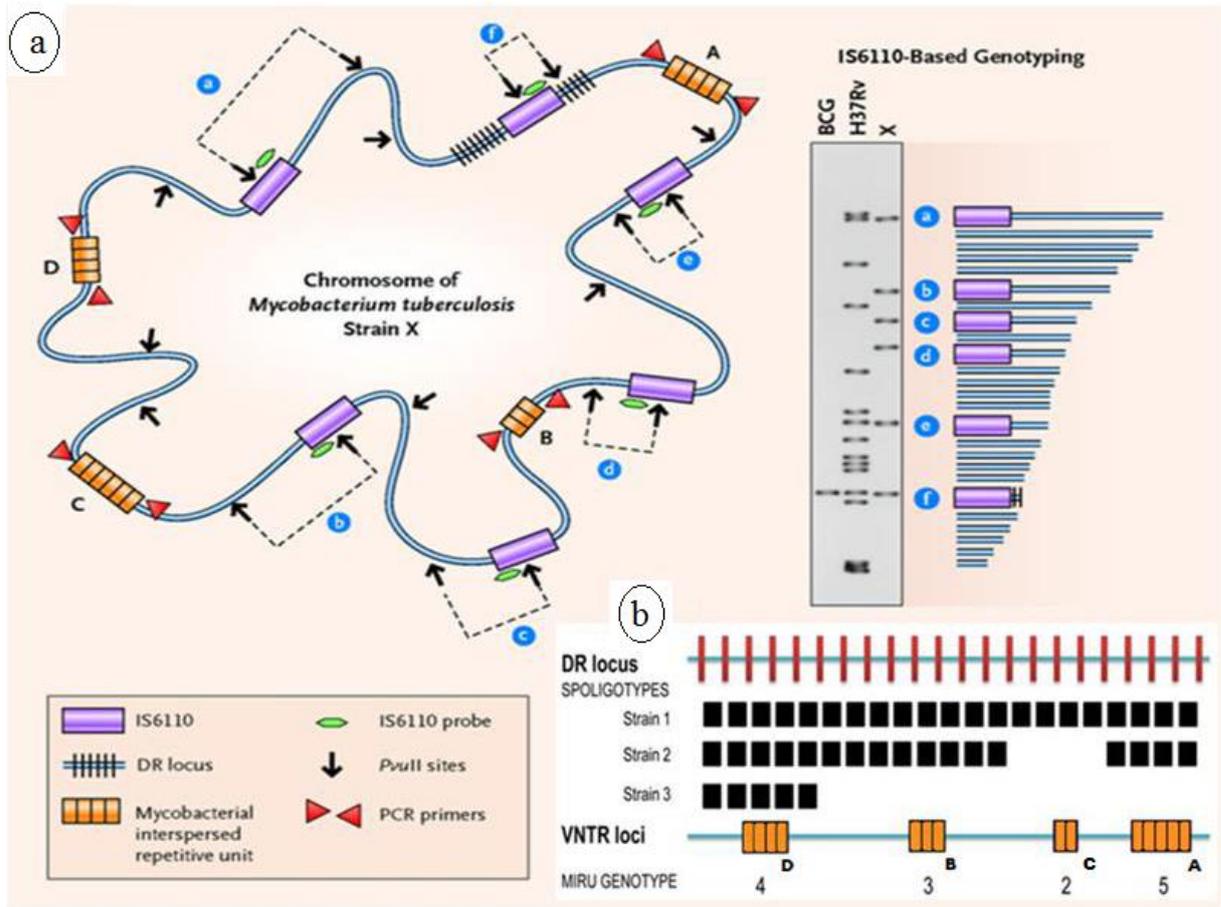
Em um estudo realizado por Supply e colaboradores (2006), os pesquisadores encontraram uma alta eficiência e uma boa concordância entre os métodos utilizados (MIRU 24 *loci* versus RFLP) no estudo. Observou-se que alguns isolados que compartilhavam o mesmo padrão de RFLP apresentavam diferenças (um ou dois *loci*) no MIRU. Esse grupo de pesquisadores detectou um grande *cluster* de RFLP, que foi separado pelo MIRU 15 (e também pelo *Spoligotyping*) com diferenças em 2-5 *loci* para todos os isolados.

Alguns estudos têm relatado essa mudança da formação de *clusters* encontradas pelo MIRU em relação ao RFLP. Em alguns casos o poder discriminatório do MIRU-VNTR foi menor que o do RFLP (VIEDMA *et al.*, 2006; RODRIGUEZ *et al.*, 2010).

O aparecimento de um grande *cluster* na comunidade sugere uma alta prevalência dessa cepa nessa população. Uma explicação para esse acontecimento é que genótipos que são altamente persistentes em uma população, infectam

múltiplos hospedeiros e estão envolvidos em uma longa cadeia de transmissão, podendo ser sujeitos a rearranjos genéticos mais frequentemente que genótipos identificados em pequenas cadeias de transmissão. Esses rearranjos genéticos são mais prováveis de surgirem no MIRU-VNTR em relação ao RFLP (GLYNN *et al.*, 2004).

Supply e colaboradores (2006) mostraram que essa diferença entre os dois métodos ocorreu em isolados com maior número de cópias (7 cópias de elemento IS6110). O uso combinado do MIRU-VNTR com o RFLP tem-se mostrado útil para revelar *clusters* imprecisos de casos definidos pela análise padrão com base somente no RFLP, tornando-se uma poderosa ferramenta para a compreensão da dinâmica de transmissão da doença e estimar os níveis de sucesso dos programas de controle de tuberculose.



Adaptado de Comas *et al.*, 2009; Barnes & Cave, 2003.

Figura 4. a. Cromossomo de *M. tuberculosis*, cepa hipotética X, genótipos de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv e cepa X com base no RFLP-IS 6110. **b.** Genótipos de três cepas hipotéticas (strains 1, 2 e 3) com base no Spoligotyping e Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - MIRUs.

Além disso, estudos envolvendo comparações de genomas microbianos completos podem revelar diferenças significativas no conteúdo gênico e organização do genoma entre as bactérias estreitamente relacionadas, fornecendo melhor compreensão sobre fisiologia e patogênese, e contribuindo na identificação de sequências polimórficas com potencial relevância para a patogênese, imunidade e evolução.

Recentemente duas novas técnicas foram descritas para a avaliação de agrupamentos genéticos: a genotipagem por polimorfismos de base única ou *Single*

Nucleotide Polymorphism (SNP) (FILIOI et al., 2006) e a genotipagem mediante o polimorfismo de sequências compridas ou *Large Sequence Polymorphism* (LSP) (TOSOLAKI et al., 2005).

Sreevatsan e colaboradores (1997) propuseram a classificação das espécies do complexo Mtb em três grupos genéticos principais (*Principle Genetics Groups – PGG*) de acordo com a combinação de dois alelos de *katG463* e *gyrA95*.

Os LSP acontecem com maior frequência em regiões genômicas onde há tendência de eventos de inserção e deleção, podendo ser responsáveis pela variedade genética no complexo Mtb. São marcadores genéticos que mudam vagarosamente e são essencialmente limitados aos estudos filogenéticos (ALLAND et al., 2007).

Os LSP e SNP elucidam linhagens genéticas do MTBC que diferem em sua distribuição geográfica, imunogenicidade, associação com a multiresistência da TB aos fármacos e virulência (WENIGER et al., 2010). Gagneux e colaboradores (2006) usaram o LSP para definir linhagens do complexo Mtb, e foi possível observar uma relação desses com a distribuição geográfica. Nesse contexto, revelou-se a existência de seis principais linhagens de Mtb e 15 sublinhagens, adaptadas a áreas e populações humanas específicas.

Dentre essas, a linhagem Euro-American é claramente a mais frequente linhagem na Europa e Américas, no entanto, sublinhagens específicas desta linhagem predominam também em regiões da África e Oriente Médio (Tabela 1). Embora os autores tenham observado tal estrutura geográfica para a linhagem Euro-American, nenhuma outra sublinhagem estava associada com qualquer área geográfica específica. Além disso, na África todas as seis principais linhagens estiveram representadas, embora, a maioria das áreas geográficas foram associadas com apenas uma ou duas linhagens (GAGNEUX et al., 2006).

Tabela 1 – Correspondência de nomenclatura das principais linhagens do MTBC definidas por *spoligotyping* e por LSP.

<u>Spoligotyping (Filiol 2003)</u>	<u>LSP (Gagneux 2006)</u>
EAI	Indo- Oceanic
Beijing	East-Asian
CAS	East-African-Indian
X, Haarlem, LAM	Euro-American
<i>M. africanum</i>	West-African 1
<i>M. africanum</i>	West-African 2

Fonte: Gagneux, 2006.

Nesse contexto, avaliando isolados de Mtb no Rio de Janeiro, à procura de deleções genômicas, Lazzarini e colaboradores (2007) detectaram uma LSP que uniu cepas num único grande clado dentro da família LAM. Esta linhagem, altamente prevalente em alguns estados do Brasil, como no Rio de Janeiro e no Espírito Santo (LAZZARINI et al., 2007; VINHAS et al., 2013), foi descrita com uma deleção específica de >26,3 Kb e designada como RD^{Rio} (LAZZARINI et al., 2007), sendo identificada, como pertencente à família LAM, ao grupo PPG2, com uma cópia do alelo MIRU40 e com um padrão genotípico de 8 a 13 cópias do IS6110.

Atualmente, a epidemiologia molecular se fundamenta na análise de múltiplos marcadores tais como sequências de inserção, o locus DR, regiões de deleções, SNPs entre outros.

Nesse sentido, o presente estudo visou identificar os fatores associados a transmissão recente da tuberculose com base em uma análise epidemiológica molecular e a analisar a dinâmica de modificação dos genótipos de *M. tuberculosis* circulantes na Região Metropolitana de Vitória – ES.

CAPÍTULO 3

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos técnicas de epidemiologia molecular têm colaborado para o entendimento da dinâmica de transmissão da TB e na caracterização de linhagens supostamente mais virulentas de Mtb.

A variabilidade de cepas em grupo populacional pode refletir no número de introduções de Mtb dentro do mesmo. Em algumas regiões da África, existe pouca variação de cepas circulantes, enquanto em algumas regiões da Europa a quantidade de cepas circulando é alta. Essas pequenas alterações nos padrões genotípicos são compatíveis com a evolução das cepas dentro de uma população.

Neste cenário, é essencial conhecer a taxa na qual padrões de IS6110 alteram ao longo dos anos para poder inferir na identificação de casos de TB associados com transmissão recente.

Supõe-se que a transmissão da doença esteja relacionada a 4 fatores: (i) características do hospedeiro, tais como idade, sexo, status do HIV, imunologia do hospedeiro e co-morbidades, principalmente a diabetes; (ii) características da organização dos programas de controle da tuberculose que implicam na busca ativa do sintomático respiratório, no atraso do diagnóstico, na estratégia de tratamento; (iii) características socio-econômicas e (iv) características biológicas relacionadas a cepa.

Diversos estudos populacionais têm sido realizados para estimar taxas de transmissão recente e eventos de reativação endógena da tuberculose, no entanto apenas poucos estudaram a dinâmica de modificação desses genótipos ao longo dos anos, e os determinantes que influenciam no tamanho dos *clusters* principalmente em países com alta carga da doença. Alguns autores ponderam que a definição de *cluster*, não deveria se limitar somente a cepas com genótipos idênticos, mas também incluir cepas oriundas de microevoluções, resultantes de eventos de transposições, deleções ou inserções no genoma da micobactéria, o que poderia tornar mais consistente a identificação de cepas relacionadas de fato ao processo de transmissão. (VIEDMA *et al.*, 2006; LAGO – PÉREZ *et al.*, 2012).

Para compreender esses eventos, o uso de técnicas de tipagem como o RFLP e MIRU, que, a despeito de suas limitações, têm sido bastante esclarecedoras e dessa forma têm contribuído para estabelecer a origem de uma infecção recente, disseminação de determinadas linhagens, e para discriminar entre doença endógena e exógena (FOK *et al.*, 2008).

Nesse sentido, apesar de inúmeros trabalhos terem sido publicados nas últimas décadas sobre estes aspectos, poucos estudos, no entanto, foram realizados levando-se em consideração o tamanho de *cluster* com base em um modelo hierárquico de regressão polinomial e a dinâmica de modificação dos perfis genotípicos de *M. tuberculosis* em um longo intervalo de tempo.

CAPÍTULO 4

4 OBJETIVOS

- 4.1 Identificar e caracterizar os perfis genotípicos de *M. tuberculosis* e sua distribuição na população da Região Metropolitana de Vitória – ES durante os períodos de 2000 a 2010;
- 4.2 Identificar fatores relacionados à transmissão recente da tuberculose e associá-los ao tamanho de *cluster* de *M. tuberculosis* na Região Metropolitana de Vitória – ES com base em análise epidemiológica molecular;
- 4.3 Analisar a dinâmica de modificação dos genótipos de *M. tuberculosis* na Região Metropolitana de Vitória – ES no intervalo de 10 anos (2000-2001 e 2011) com base nas técnicas de RFLP IS6110 e MIRU- VNTR 24 *loci*.

CAPÍTULO 5

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e Modelo do Estudo

Esse estudo foi conduzido no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES e realizado em duas partes: **(i)** na **primeira parte** o estudo foi caracterizado como um estudo transversal que identificou os fatores de risco associados à transmissão recente da tuberculose e ao tamanho do *cluster* na Região Metropolitana de Vitória – ES e, **(ii)** na **segunda parte** o estudo foi caracterizado como um estudo observacional que analisou a dinâmica temporal de modificação dos genótipos de Mtb na Região Metropolitana de Vitória – ES , no período de 2000 a 2011, com cortes transversais nos períodos de 2000 – 2001 e 2011, com base nas técnicas de RFLP IS6110 e MIRU-VNTR 24 *loci*.

5.2 Caracterização da Região do Estudo

Atualmente, o estado do Espírito Santo possui 78 municípios (população - 3.578.067 habitantes), em sua maior parte (75%) com até 30 mil habitantes e 9 (10%) com mais de 100 mil. No Estado, embora o número absoluto de casos notificados não figure entre os mais elevados do país, a incidência registrada (aproximadamente 35,6/100.000 habitantes), constitui motivo de atenção (Fonte: Sinan / SIM / IBGE - Abril/2013). Grande parte da população concentra-se nos municípios que constituem a Região Metropolitana de Vitória (RMV). Inicialmente formada pelos municípios de

Cariacica, Serra, Viana, Vila Velha e Vitória, a partir de 1999 foi incluído o município de Guarapari e, em 2001, o município de Fundão. Juntos, esses municípios representavam, em 2004, cerca de 47,5% da população capixaba (IPES, 2005). A RMV possui uma população de aproximadamente 2 milhões de habitantes (IBGE, 2014) e é responsável pela notificação de aproximadamente 50% dos casos de tuberculose do Estado. Dentre os municípios da RMV com maior carga da doença destacam-se: Vitória, que possui uma população estimada em 333.162 habitantes e uma taxa de incidência de 52/100.000 habitantes; Cariacica, que possui 352.431 habitantes e uma incidência da doença de 50,5/ 100.00 habitantes; o município da Serra, que possui uma população de 422.569 habitantes e concentra uma incidência de TB de 44/100.000 habitantes; e Vila Velha, cuja população é de 424.948 habitantes e concentra uma taxa de incidência da doença de 42,4/100.000 habitantes (Fonte: SINAN / SIM / IBGE - Abril/2013, <http://189.28.128.178/sage/>).

Baseados nas taxas de incidência da doença na RMV, e diante das facilidades operacionais, como armazenamento dos isolados e facilidade de acesso, decidimos escolher os municípios com as maiores incidências da doença para a realização desse estudo. Nesse contexto, os municípios selecionados para realização do estudo foram: Vitória, Vila Velha, Cariacica e Serra.

Uma vez realizada a escolha dos municípios selecionados para o estudo, as etapas do projeto foram realizadas conforme a seguir.

5.3 Primeira Parte do Estudo – (referentes aos objetivos 1 e 2)

5.3.1 Local e População do Estudo

Um estudo do tipo transversal utilizando os casos novos de TB foi conduzido na Região Metropolitana de Vitória (RMV), no período de 2000 a 2010 com o intuito de identificar os fatores de risco associados à transmissão recente da tuberculose e ao tamanho do *cluster* nessa região com base nos achados clínicos, epidemiológicos e moleculares. A região metropolitana compreende principalmente os quatro municípios (Vitória, Cariacica, Serra e Vila Velha) com aproximadamente 2 milhões de habitantes. Todos os isolados de pacientes com resultado de cultura positiva foram incluídos nesse estudo.

Neste trabalho foram desenvolvidos dois modelos diferentes para determinar a relação entre fatores de risco para TB e o tamanho de *cluster* do Mtb.

Sendo assim, um *cluster* de Mtb foi definido como: dois ou mais isolados com padrões de DNA idênticos no que se refere ao número e posições do IS 6110 ao RFLP (GLYNN et al., 1999). Enquanto, um padrão único foi considerado um isolado que não exibem padrões de DNA idênticos, ou seja, exibem perfis moleculares únicos.

Nesse contexto:

O **Primeiro Modelo** foi definido como:

Isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes da RMV, cujo isolado não exibiam um perfil genotípico idêntico, ou seja, que foram classificados como padrões únicos (PU) foram definidos como grupo de referência e comparados com as categorias de acordo com o tamanho de *cluster*. O tamanho do *cluster* foi dividido em categorias: 2-5 isolados/cluster, 6-9 isolados/cluster e ≥ 10 isolados por *cluster*.

O **Segundo Modelo** foi definido como:

Isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes da RMV, cujo isolado pertencia a um *cluster* com 2-5 isolados. Foi estabelecido esse grupo como referência e as demais categorias com 6-9 e ≥ 10 isolados por *cluster* foram utilizadas na análise de associação.

5.3.2 Subcultivo dos isolados

Os isolados selecionados para a análise molecular foram descongelados à temperatura ambiente, subcultivados em dois frascos contendo meio de Ogawa e incubados em estufa a 37°C. Após o crescimento das colônias, um dos frascos foi utilizado para posterior recongelamento do isolado, enquanto o outro foi utilizado para proceder a extração do DNA.

5.3.3 Identificação de *Mycobacterium tuberculosis* por meio de métodos fenotípicos

Para todas as culturas puras que apresentaram crescimento de micobactéria em meio Ogawa foi realizada uma análise fenotípica com base nas seguintes características: tempo de crescimento, aspecto morfológico e pigmentação das colônias.

Essas culturas também foram avaliadas quanto à sensibilidade ao ácido *p*-nitrobenzóico (500µg/mL) e resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (2µg/mL) (KENT & KUBICA, 1995).

5.3.4 Técnicas de Tipagem molecular:

Para minimizar problemas com a qualidade e reprodutibilidade dos testes moleculares, estes foram sempre realizados pelos mesmos técnicos, que estavam cegos para a identidade dos isolados no estudo.

5.3.4.1 Análise do RFLP baseado na sequência de inserção IS6110

Esta técnica foi utilizada para analisar o polimorfismo dos fragmentos de DNA gerados após digestão com enzimas de restrição em todos os isolados do estudo. Esta técnica foi realizada de acordo com o método descrito por van Embden e colaboradores (1993).

I Extração e purificação do DNA bacteriano

Duas alças cheias de colônias de *M. tuberculosis* de cada um dos isolados selecionados para o estudo crescidas em meio de Ogawa, foi transferida com o auxílio de uma alça descartável para microtubos contendo 500 µl de tampão TE 1X (0,01 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA [ácido etilenodiaminotetracético, pH 8,0) e incubada em bloco aquecedor a 82°C por 30 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 50 µl da solução de lisozima (10mg/ml) e os microtubos incubados a 37°C por um período de 2 horas (ou durante a noite). Em seguida, um volume de 76 µl da solução de proteinase K/SDS foi adicionado a cada microtubo

(70µl de dodecil sulfato de sódio - SDS a 10% e 6 µl de proteinase K 10mg/ml) sob vigorosa agitação e incubados a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µl de uma solução de NaCl 5M e 80 µl da solução CTAB (n-cetyl N,N,N, -trimethyl ammonium bromide)/NaCl previamente aquecida, e estes novamente incubados a 65°C por 10 minutos.

Posteriormente, para separação das proteínas, foram adicionados 750 µl de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1, e as preparações foram centrifugadas a 12.000xg por 5 minutos. A fase superior de cada preparação (aproximadamente 750µl) foi transferida para microtubos esterilizados e, em seguida, foram adicionados 500 µl de isopropanol, a fim de se precipitar o ácido nucleico. A mistura foi homogeneizada delicadamente e, após precipitação do DNA submetida a -20°C por no mínimo 1 hora ou aproximadamente 18 horas (durante a noite). Posteriormente, os tubos foram submetidos à centrifugação a 12.000xg por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 1000 µl de etanol 70% por centrifugação a 12.000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e a secagem realizada a temperatura ambiente por um período de 1 - 2 horas. O DNA foi ressuspenso em 20 µl de solução tampão TE e, incubado a 37°C durante 1-2 horas para que o mesmo fosse totalmente dissolvido. Em seguida, armazenado a -20°C para posterior quantificação do DNA.

II Estimação da concentração do DNA

Para determinar a concentração de DNA, 2 µl das amostras purificadas foi submetido à leitura da absorbância em espectrofotômetro específico (*NanoDrop*[®] 1000, NanoDrop Technologies) e os resultados registrados no Microsoft Office Excel. As suspensões de DNA purificados após determinadas as dosagens, foram diluídas

para se obter a concentração padronizada de 600 ng/ μ L e mantidas a -20°C para uso futuro.

III Digestão do DNA por enzima de restrição

Os DNAs extraídos foram digeridos com a enzima de restrição *PvuII* (Life Technologies[®]) responsável pela clivagem do DNA. A digestão foi realizada em um volume final de 20 μ l, nas seguintes condições: 2 μ l do tampão 10X da enzima (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM pH=7,9); 4,5 μ g de DNA extraído e da cepa de referência MT14323; 1 μ l da enzima *PvuII* (10U/ μ l - Invitrogen) e completado com água ultra-pura e estéril. Os microtubos de polietileno foram agitados manualmente e centrifugados por um minuto (12.000xg) e incubados em banho-maria à 37°C por 2 horas. A seguir, foi adicionado 5 μ l de azul de bromofenol 10X, agitados manualmente e centrifugados por um minuto. A digestão completa dos DNAs foi observada por corrida eletroforética (utilizando-se 5 μ l do DNA digerido) em gel de agarose 0,8% (100v por 40 minutos em tampão TBE 0,5X - Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM/ EDTA 2,5 mM/ pH 8,0) e a seguir coradas com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) e visualizados em aparelho específico. Em seguida, as amostras de DNA foram conservadas a -20°C.

IV Separação e transferência para membrana

A separação por eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% (20 X 20 cm) a 50 volts durante um período de aproximadamente 14 horas. O DNA da cepa de referência MT14323 foi aplicado na primeira, décima e décima oitava canaleta do gel, como marcador externo para monitorar a migração do DNA durante a eletroforese.

Os demais isolados foram aplicados no restante do gel. Após a corrida eletroforética, o gel foi submetido à luz UV até eliminação total do brometo de etídio e, tratado em solução de 500mL HCl 0,25 M durante 10 minutos sendo, em seguida, lavado em água destilada. O DNA foi, então, desnaturado pelo tratamento com uma solução de 500mL NaOH 0,4 M por 20 minutos e o gel lavado em água destilada. A transferência dos fragmentos de DNA para uma membrana de náilon Hybond N-Plus (GE Healthcare Life Sciences) foi realizada utilizando o “vacuum blotter apparatus” (GE Healthcare Life Sciences) durante um período de 1 - 2 horas. Após a transferência, o DNA foi fixado na membrana em UV a 200J (Crosslink-Hoefer®). Essa membrana foi utilizada diretamente na hibridização.

V Preparo da sonda genética

O DNA utilizado para preparo da sonda consiste em uma sequência de 245 pb do elemento de inserção IS6110 e foi preparado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos iniciadores: INS1 (5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC) e INS2 (5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA) (Van EMBDEN *et al.*, 1993).

Os microtubos para microcentrífuga, contendo a mistura completa, foram introduzidos no termociclador para efetuar a amplificação, segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto. O produto da PCR foi submetido à dosagem da concentração do DNA utilizando-se o aparelho NANODROP® e armazenado a -20°C até o uso.

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

cuidadosamente e, incubados a 37°C por 10 minutos. A sonda marcada foi utilizada imediatamente na membrana pré-hibridizada.

VI Hibridização do DNA bacteriano com a sonda de DNA marcada

A membrana contendo os fragmentos de DNA preparada foi colocada dentro de uma garrafa de hibridização. Esta membrana foi pré-hibridizada a 42°C, com o tampão de hibridização do kit (volume de 15 mL), por uma hora em forno de hibridização. Nesse momento, a sonda marcada foi adicionada diretamente à solução de hibridização dentro da garrafa e a membrana hibridizada por 24 horas a 42°C em forno de hibridização (Amersham Pharmacia Biotech[®]). Após hibridização a 42°C por um período de 16 - 18 horas, a membrana foi lavada quatro vezes. As duas primeiras lavagens foram realizadas com SSC/SDS previamente aquecido a 55°C, por 10 minutos diretamente à garrafa de hibridização. As demais lavagens foram realizadas com SSC 2X à temperatura ambiente por 5 minutos.

VII Detecção

Esta etapa foi realizada em câmara escura, apenas na presença de luz vermelha. Para a detecção foi utilizada o Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech[®]), contendo os reagentes de detecção um e dois. Um volume de 7 ml do reagente de detecção 1 (peroxidase) foi misturado ao mesmo volume do reagente de detecção 2 (luminol), ambos fornecidos pelo kit ECL. Em um pirex de vidro, a membrana (com a face contendo DNA voltada para cima) foi banhada com esta solução de detecção. Posteriormente, foi retirado o excesso de líquido da membrana em um papel de filtro, sendo a mesma colocada no cassete, sempre com a face contendo DNA voltada para

cima. Sobre a membrana, foi colocado um Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences) por um período que pode variar de 15 minutos a 2 horas para a detecção dos perfis de IS 6110. Em seguida, o filme foi imerso por 1 minuto em solução reveladora e lavado em água corrente. Após a lavagem, o filme foi imerso por 1 minuto em solução fixadora e lavado novamente.

VIII Análise do perfil genotípico dos isolados com base na técnica de RFLP IS 6110

Os perfis moleculares obtidos através de auto-radiografias pela técnica de RFLP foram transferidos para um computador e seus resultados analisados com o auxílio do Programa BioNumerics, versão 6.5 (Applied Maths – Bélgica). Este programa fornece uma análise dos *clusters* utilizando a análise de agrupamento pelo método de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Mathematical Averages*) baseado no coeficiente de Dice para o pareamento, com uma tolerância de 1,0% e otimização de 1,5%.

Dois ou mais isolados que apresentaram perfis moleculares idênticos (100% de similaridade), no que se refere ao número e posições das cópias de IS 6110 ao RFLP, foram classificados como pertencentes a um mesmo *cluster*. Os *clusters* que apresentaram diferenças de uma até três banda foram considerados membros de uma mesma família (similaridade de 99% até 65%) de acordo com estudos anteriores (GLYNN *et al.*, 2004). Aqueles isolados que apresentaram perfis moleculares únicos foram classificados como padrões únicos (PU - *unique patterns*).

5.3.4.2 Spoligotyping

Esta técnica baseia-se amplificação da região DR, a partir de um PCR, e subsequente hibridização diferencial dos produtos amplificados com oligonucleotídeos, complementares às regiões espaçadoras variáveis localizadas entre as DRs, imobilizados em uma membrana de nylon, onde 43 dessas sequências espaçadoras são previamente sensibilizadas. Esta técnica foi realizada de acordo com o protocolo descrito por BRUDEY e colaboradores (2006).

I Reação de Amplificação do Locus DR

Para cada reação de PCR foram utilizados 20ng de DNA. Cepas de referência *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG foram utilizadas como controles da reação. A PCR foi realizada utilizando 20pmol dos iniciadores DRa 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3' – biotinilado e DRb 5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3'; 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM MgCl₂, perfazendo um volume total de 50µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial do DNA a 96°C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 30 segundos e um ciclo final de 72 °C por 5 minutos, em termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA).

II Hibridização dos Produtos de PCR e Detecção

Um total de 30 µL dos produtos da PCR foram diluídos em 150 µL de SSPE 2x (0,02M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,36 M NaCl, 2mM EDTA – pH 7,4) / SDS 0,1%, e desnaturados a 100°C durante 10 minutos.

As amostras diluídas foram aplicadas em canais paralelos de 1 miniblotter (Isogen, Bioscience BV, Holanda e posteriormente Ocimum Biosolutions Inc., Hyderabad India), de modo que ficassem perpendiculares às linhas de oligonucleotídeos previamente imobilizados. A hibridização foi realizada por 60 minutos a 60 °C em um forno giratório. Em seguida, a membrana de foi lavada 2 vezes em 250 mL de solução de SSPE 2x/0,5% SDS por 5 minutos a 60°C e em seguida foi incubada com um conjunto de estreptavidina-peroxidase por 60 minutos. Logo após, a membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2x/ 0,5% SDS por 10 minutos a 42 °C e 2 vezes com 250mL de SSPE por 5 minutos à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela sensibilização de um filme autorradiográfico através de uma reação de quimioluminescência durante 15 minutos utilizando um kit comercial (IMMOBILONTM WESTERN- Chemiluminiscent HRP Substrate - Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

III Reutilização da membrana

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

IV Interpretação dos Resultados

Os resultados foram registrados em um formato binário de 43 dígitos que representa os 43 espaçadores. Os padrões de espoligotipo foram comparados com um banco de dados SITVITWEB (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>) para identificar o Shared International Type (SIT) (DEMAY et al., 2012). A partir do SIT as famílias foram identificadas de acordo com o banco internacional de espoligotipos SpolDB4 (BRUDEY et al., 2006), o qual fornece informações sobre os espoligotipos de *M. tuberculosis* em todo o mundo. Os padrões órfãos foram analisados pelo algoritmo SPOTCLUST (http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_spotclust.html).

5.3.5 Polimorfismo de Longa Sequência (LSP) – Detecção da Deleção do RD^{Rio}

O LSP de 26,3 Kb denominado RD^{Rio} encontra-se entre os genes Rv3346c e RV335c. A deleção pode ser detectada por uma PCR multiplex que foi descrita por Lazzarini e colaboradores (2007).

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 realizada no termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA). As condições do ciclo foram: 95°C por 5 minutos, seguidos por 45 ciclos a 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 4 minutos, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma quantidade de 12 µL do produto de PCR adicionado a 3 µL de tampão de corrida 6x, foram detectados em gel de agarose 2% tratado com brometo de etídeo, sob transluminação ultravioleta (UV). Foram utilizados na reação 20ng de DNA das cepas *M. tuberculosis* H37Rv como controle positivo e água como controle negativo. Os produtos amplificados foram fracionados por meio de eletroforese (5V/cm) em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X e visualizados

com posterior coloração com brometo de etídio (0,5µg/mL) e transiluminação. As imagens foram capturadas e armazenadas no sistema de imagem MiniBis (DNR Imaging Systems LTD, Israel). Os tamanhos dos fragmentos resultantes foram estimados comparando-se ao tamanho das bandas do marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies). A identificação de genótipos RD^{Rio} ou não-RD^{Rio} foi estabelecida de acordo com tamanho do fragmento do produto de PCR; a presença do fragmento da banda de 530-bp era indicativo de cepas não-RD^{Rio}.

5.3.6 Caracterização das variáveis demográficas e clínicas

Os dados demográficos e clínicos foram obtidos a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e também a partir de registros laboratoriais mantidos no Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI-UFES), em Vitória – ES. O SINAN tem constituído o principal instrumento no país para a coleta e análise de dados nacionais de TB.

As seguintes variáveis sócio-demográficas foram avaliadas: idade (em média de anos), sexo (masculino, feminino), raça (branca, negra e outros) e escolaridade (≤4 anos, 5-8 anos, > 8 anos).

As co-variáveis relacionadas à TB incluídas foram: forma da TB (pulmonar, extrapulmonar, pulmonar + extrapulmonar), raio-X com suspeita de TB (não, sim) e baciloscopia (positiva e negativa).

As variáveis moleculares foram avaliadas como: *Spoligotyping* (LAM, Não-LAM), e o genótipo RD^{Rio} (RD^{Rio}, Não-RD^{Rio}).

5.3.7 Análise estatística

Inicialmente foi realizada avaliação da consistência dos dados e depois análise exploratória descritiva inicial.

Foi realizada análise para verificar a distribuição dos isolados de acordo com o tamanho do *cluster*. Essa análise nos mostrou que a amostra não foi distribuída normalmente. Para evitarmos a dicotomização arbitrária no tamanho dos *clusters* foi realizada uma classificação dessa variável em 4 categorias: padrão único (PU – *unique patterns*), 2-5 isolados/*cluster*, 6-9 isolados/*cluster* e ≥ 10 isolados/*cluster*. Essa classificação nos permitiu um melhor ajuste para análise de associação.

Sendo assim, a análise descritiva dos dados moleculares e epidemiológicos foi realizada de acordo com a classificação de tamanho do *cluster*. Com base em um modelo teórico destinado ao estudo de determinação de TB, realizamos análises preliminares e construímos dois modelos hierárquicos de regressão polinomial para identificarmos os fatores associados com o tamanho do *cluster*.

Apesar das categorias de tamanho de *cluster* indicarem a existência de uma ordem implícita, elas não se configuravam como uma regressão logística ordenada. Portanto, optamos pela regressão polinomial, que nos permite modelar essas múltiplas categorias simultaneamente, sem as suposições de resposta da ordem.

No **Primeiro Modelo** todos os isolados analisados foram incluídos. Os padrões únicos foram definidos como grupo de referência e comparados com as categorias de tamanho de *cluster* (com 2-5, 6-9 e ≥ 10 isolados por *cluster*). Além disso, foi realizado um **Segundo Modelo** que teve como grupo de referência a categoria com 2-5 isolados por *cluster* sendo comparado com as categorias de 6-9 e ≥ 10 isolados por *cluster*.

Os níveis hierárquicos para ambos os modelos foram definidos da seguinte forma: Nível 1, variáveis moleculares (*Spoligotyping* + Genótipo RD^{Rio}); Nível 2,

variáveis de nível 1 e variáveis demográficas (ano de notificação de TB + município de residência); Nível 3, variáveis de nível 2 e variáveis sócio-demográficas (idade, sexo, raça e escolaridade); e Nível 4, variáveis de nível 3 e variáveis clínicas (raio-X, baciloscopia e forma clínica da TB). Dessa forma, o efeito total de cada variável é ajustado em relação às variáveis do mesmo nível e dos níveis acima.

Os dados descritivos foram apresentados como frequência absoluta e frequência relativa ou como desvio médio e desvio padrão. Os resultados da análise de associação foram apresentados por meio de razão de chances (OR) com intervalo de confiança de 95%.

Todas as análises foram realizadas com o pacote estatístico Stata®, versão 12.0 (StataCorp LP, College Station, TX, EUA).

5.3.8 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo sob o número 121/06. Este estudo analisou os dados retrospectivos de informações coletadas rotineiramente nos programas de controle da RMGV. Os pacientes não foram contactados para informações adicionais. A cultura de escarro para os indivíduos suspeitos com TB é feita rotineiramente nas Unidades de Saúde da RMGV e no Laboratório de referência de Micobacteriologia localizado no Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

5.4 Segunda Parte do Estudo – (referente aos objetivos 1 e 3):

5.4.1 Local e População do Estudo

A segunda parte do estudo foi caracterizado como um estudo observacional que analisou a dinâmica temporal de modificação dos genótipos de *M. tuberculosis* na Região Metropolitana de Vitória – ES em um intervalo de 10 anos, com base nas técnicas de RFLP IS6110 e MIRU- VNTR 24 loci.

Essa parte do estudo foi realizada em dois cortes transversais: 2000 – 2001 e 2011. O primeiro período selecionado para o estudo (2000 – 2001) foi anterior ao sistema empregado de cultura universal nos municípios prioritários da RMV. E o segundo período escolhido para a realização desse estudo (2011) foi selecionado após o sistema universal de cultura ser empregado nesses municípios.

No período anterior a 2002 a realização da cultura era indicada somente em alguns casos, como (KENT & KUBICA, 1985; MS, 2002):

- suspeitos de TB com amostras paucibacilares;
- suspeitos de TB com dificuldades de obtenção da amostra (por exemplo, crianças);
- suspeitos de TB extrapulmonar; e
- casos suspeitos de infecções causadas por micobactérias não tuberculosas – MNT, notadamente nos casos de pacientes HIV positivos, com AIDS.

A partir de 2002 em parceria com a Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB) e com o apoio financeiro do Projeto Institutos do Milênio – CNPq, o Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI-UFES) consolidou uma parceria com os Municípios da Região Metropolitana de Vitória (Vitória, Vila-Velha, Cariacica e Serra e o LACEN) para realização de pesquisas operacionais em tuberculose. Uma consequência imediata desta parceria foi a implantação de uma rede diagnóstica com a padronização e informatização do banco de dados de tuberculose da região

metropolitana de Vitória que antes era fragmentada nos respectivos municípios. Paralelamente a isto o NDI implantou também nos quatro municípios supracitados um sistema simples de cultura de escarro utilizando o método de Ogawa-Kudoh. Isto permitiu um incremento no diagnóstico da tuberculose nos municípios trabalhados da ordem de 24% (PALACI et al., 2013).

A partir dessa colaboração entre os laboratórios da Secretaria Municipal de Saúde e o NDI-UFES, foi possível implantação de um banco de dados eletrônico denominado TB Notes para os casos de tuberculose e a criação de uma coleção de cepas isoladas nestes Municípios.

5.4.2 Caracterização da amostra

De acordo com os dados obtidos da ficha de notificação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período de Janeiro de 2000 a Dezembro de 2001 e Janeiro a Dezembro de 2011, foram notificados, um total de 1934 casos de tuberculose na RMV no estado do Espírito Santo – ES. Sendo que durante o período de 2000 – 2001, 1086 casos de TB foram notificados. Desses, 524 pacientes foram diagnosticados somente com bases em informações clínicas e/ou radiológicas compatíveis com TB. Para o nosso estudo, partimos de um total de 562 (52%) pacientes, que tiveram cultura realizada nesse período. Desses, foram excluídos dessa análise 197 pacientes por residirem em outros municípios da RMV (Figura 4).

Em 2011, um total de 848 casos de TB foram notificados pelo SINAN. Desses, 105 pacientes foram excluídos da análise por terem sido diagnosticados com base apenas em informações clínicas e/ou radiológicas compatíveis com TB e 173 foram excluídos por residirem em outros municípios da RMV (Figura 4).

Portanto, foram selecionados para realização da tipagem molecular do estudo, um total de 951 pacientes com diagnóstico clínico de tuberculose pulmonar e/ou extrapulmonar e que tiveram resultado de cultura positiva em meio Ogawa, distribuídos nos diferentes períodos do estudo (Figura 5). Cada paciente teve uma única amostra, que foi selecionada no intervalo de tempo de até 1 mês após o diagnóstico laboratorial.

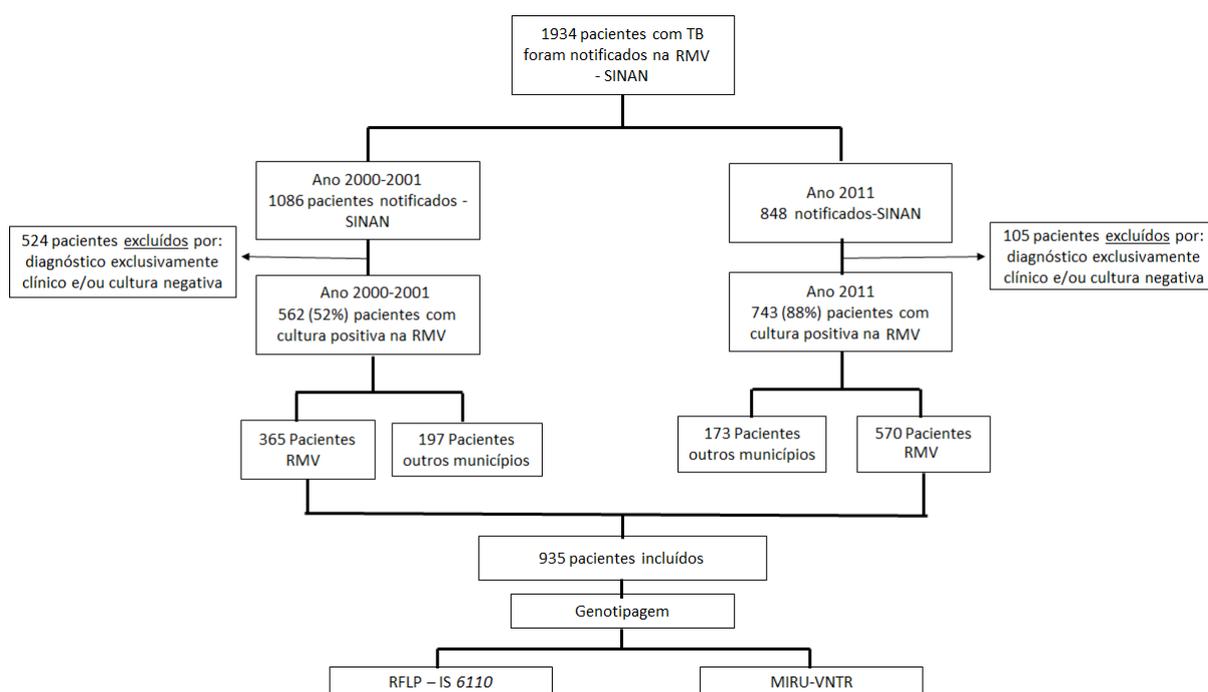


Figura 5. Fluxograma da seleção dos pacientes e dos métodos moleculares utilizados referentes a parte 2 do estudo.

5.4.3 Subcultivo dos isolados e Identificação de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de métodos fenotípicos

Para todos os isolados selecionados para a análise molecular nessa etapa do estudo, foram realizados os mesmos procedimentos da primeira parte do estudo, conforme está descrito no item 5.3.2 e 5.3.3 desse capítulo.

5.4.4 Técnicas de tipagem molecular

5.4.4.1 Análise do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) baseado na se quência de inserção IS6110

Esta técnica foi realizada de acordo com o método descrito por van Embden *et al.* (1993) e referida no item 5.3.4.1 desse capítulo.

5.4.4.2 Análise do *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit* (MIRU) – Número Variável de Repetições em *Tandem* (VNTR)

Para realização do procedimento do MIRU-VNTR, os DNAs foram purificados e diluídos a uma concentração de 10ng/μl e posteriormente, submetidos a tipagem por MIRU-VNTR pela GenoScreen (Lille, France). Esta empresa realiza a tipagem MIRU-VNTR de 24 loci de acordo com os padrões internacionais (SUPPLY *et al.*, 2006). Foram incluídos nessa etapa um controle negativo e DNA de dois controles positivos com perfis conhecidos (H37Rv e *M. bovis* BCG P3), de forma a assegurar a qualidade e reprodutibilidade do método.

Após a definição de todos os alelos para os 24 *loci* analisados de todas as amostras, uma planilha em Excel foi confeccionada com os valores correspondentes ao número de repetições para que fosse submetida a plataforma MIRU-VNTR_{plus} (www.miru-vntrplus.org). Essa plataforma gerou um dendograma, utilizando o algoritmo de UPGMA.

A plataforma MIRU-VNTR $plus$ permite que se compare as cepas em estudo com cepas de referência, presentes na base de dados. Para essa comparação, estão disponíveis vários coeficientes de similaridade, sendo o coeficiente de diferença entre *loci*, o padrão adotado para a análise. Este coeficiente de diferença divide o número de marcadores com um alelo de diferença, pelo total de marcadores usados. Para o presente estudo será usado o limite máximo de 0,17, o mesmo proposto pela plataforma, o que corresponde a uma tolerância de dois *loci* de diferença entre as cepas.

Com o intuito de se confirmar os clusters formados pela técnica de RFLP IS 6110 foi realizada uma correlação entre as duas técnicas. Essa correlação foi estabelecida da seguinte maneira:

- a. Total correlação: quando os isolados em *clusters* por RFLP IS6110 e MIRU-VNTR compartilham perfis genotípicos idênticos;
- b. Alta correlação: quando isolados em *cluster* pelo MIRU-VNTR não compartilham perfis genotípicos idênticos ao RFLP IS6110, mas com uma diferença de 1 ou 2 bandas.
- c. Nenhuma correlação: quando isolados em *cluster* por RFLP IS6110 forem claramente separados pelo MIRU-VNTR (diferença de dois *loci*) ou isolados em *cluster* pelo MIRU forem totalmente diferentes por RFLP IS6110.

5.4.4.3 Análise do perfil genotípico dos isolados

Os perfis moleculares obtidos através de auto-radiografias pela técnica de RFLP foram transferidos para um computador e seus resultados analisados com o auxílio do Programa BioNumerics, versão 6.5 (Applied Maths – Bélgica). Este programa fornece uma análise dos *clusters* utilizando a análise de agrupamento pelo método de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA – *Unweighted Pair Group*

Method with Mathematical Averages) baseado no coeficiente de Dice para o pareamento, com uma tolerância de 1,0% e otimização de 1,5%.

Dois ou mais isolados que apresentaram perfis moleculares idênticos (100% de similaridade), no que se refere ao número e posições das cópias de IS6110 ao RFLP, foram classificados como pertencentes a um mesmo *cluster*. Os *clusters* que apresentaram diferenças de uma até três bandas foram considerados membros de uma mesma família (similaridade de 99% até 65%) de acordo com estudos anteriores (GLYNN *et al.*, 2004). Aqueles isolados que apresentaram perfis moleculares únicos foram classificados como padrões únicos (PU - *unique patterns*).

Para avaliar transmissão recente foi realizada a taxa de agrupamento (*Clustered Rate- CR*) que pode ser calculada como $(n_c - c) / n$; onde **n** é o número total de casos no estudo, **c** é o número de genótipos representado por pelo menos dois casos, e **n_c** é o total de casos em *cluster* de dois ou mais pacientes (SUPPLY *et al.*, 2006; BÉGUEC & FAUVILLE-DUFAUX & SUPPLY, 2008).

O poder discriminatório de um método de tipagem é a sua habilidade de distinguir entre cepas não relacionadas. Isto é determinado pelo número de tipos definidos pelo método e a frequência relativa dos tipos (HUNTER & GASTON, 1988). O índice discriminatório de Hunter–Gaston (HGDI), disponível no endereço eletrônico: http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/) pode ser utilizado como um parâmetro numérico do poder discriminatório de RFLP, MIRU-VNTR e Spoligotyping, isoladas ou em associação.

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

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

onde D é o índice de poder discriminatório, N o número de linhagens testadas não relacionadas, S o número de tipos diferentes, e x_j o número de cepas pertencentes ao tipo j, assumindo que os agrupamentos serão classificados em categorias exclusivas (Hunter & Gaston 1988).

5.5 Caracterização das variáveis demográficas e clínicas

Os pacientes foram também, categorizados de acordo com seus isolados de DNA e seus dados epidemiológicos. Todas as variáveis foram obtidas do Sistema de Informação e Agravos de Notificação do SINAN e dos registros laboratoriais mantidos no Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI/UFES).

As relações epidemiológicas foram definidas como: forma clínica da doença (pulmoar, extrapulmonar, pulmonar+extrapulmonar), município de residência (Vitória, Vila Velha, Serra e Cariacica), além das variáveis demográficas como; sexo (masculino, feminino), idade (< 19 anos, 20-39 anos, 40 – 59 anos, ≥ 60 anos), raça (branca, negra e outros), escolaridade (nenhuma, 1 a 3 anos de estudo, 4 a 7 anos de estudo, 8 a 11 anos de estudo, ≥ 12 anos de estudo), HIV (positivo e negativo), tipo de tratamento (caso novo, recidiva, reingresso após abandono, transferência) e variáveis laboratoriais: baciloscopia (positiva e negativa) e *cluster* (sim, não).

5.6 Análise Estatística

Primeiro foi realizada avaliação da consistência dos dados e depois análise exploratória descritiva inicial.

Foi realizado a análise bivariada utilizando o qui-quadrado de Pearson para identificar as variáveis qualitativas significativas com o ($p \leq 0,05$) entre os dois períodos analisados. Como os grupos são diferentes tanto do ponto de vista dos pacientes, como no tempo, a análise estatística visou avaliar apenas o incremento ou a diminuição dos percentuais encontrados nos dois cortes transversais. Assim, os resultados dessa análise poderão indicar possíveis modelagens matemáticas para

esses dados. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Stata, versão 12.0.

5.7 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico (CEP local), sob o número 121/06.

Por se tratar de um estudo retrospectivo, as informações foram coletadas da ficha de notificação compulsória. A inclusão na pesquisa não implicou em nenhuma mudança na condução clínica individual dos casos. Os dados de identificação dos pacientes foram mantidos em sigilo. Não foram coletados novos exames microbiológicos, tendo sido utilizados os isolados de *M. tuberculosis* estocados pelo Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas- NDI/UFES.

CAPÍTULO 6

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de tornar esse capítulo mais claro, os resultados do presente estudo foram organizados conforme descritos na metodologia do estudo. Inicialmente, identificamos os perfis genotípicos de *Mycobacterium tuberculosis* e sua distribuição na Região Metropolitana de Vitória-ES e descrevemos os fatores de risco que influenciam no tamanho dos *clusters* do Mtb nessa região **(Resultados da Primeira Parte)**.

No momento seguinte, focamos na análise da dinâmica de modificação dos genótipos de *Mycobacterium tuberculosis* na Região Metropolitana de Vitória – ES em intervalo de 10 anos (2000-2001 e 2011) com base nas técnicas de RFLP IS 6110 e MIRU-VNTR 24 *loci* **(Resultados da Segunda Parte)**.

6.1 Resultados da Primeira Parte

Fatores associados com o tamanho do *cluster* de Mtb de diferentes genótipos de RFLP na Região Metropolitana de Vitória.

6.1.1 Caracterização da População do estudo

No período de Janeiro de 2000 a Dezembro de 2010 foram notificados 5470 casos de TB na Região Metropolitana de Vitória (RMV). Desses, 1.320 (24%) tiveram

cultura positiva em meio Ogawa e em 959 (72,6%) foi obtida uma boa qualidade de perfis genotípicos de RFLP IS6110.

6.1.2 Resultados do perfil genotípico dos isolados de *M. tuberculosis* por RFLP IS6110

Na análise dos resultados de genotipagem pelo RFLP IS6110 observou-se que entre os 959 isolados, 461 deles (48%) foram agrupados em 108 *clusters* diferentes e 498 (52%) apresentaram perfis únicos (PU). O número de isolados por *cluster* variou de 2 a 24 (média de tamanho de *cluster* = 3,9; desvio padrão [DP] = 5,28).

Na análise de similaridade entre os isolados obtidos a partir da técnica de RFLP IS 6110 foram identificadas 30 famílias de RFLP, seis das quais compreendiam 45,5% dos isolados agrupados em *cluster*. Neste estudo, foram observados 6 grandes *clusters* agrupados em 108 (11,2%) isolados (≥ 10 pacientes - Figura 6). O maior *cluster* encontrado foi classificado como ES14, contendo 34 isolados (com 100% de padrão de bandas idêntico). Os demais *clusters* foram distribuídos nos *clusters* ES1b, ES8, ES14o, ES19h e ES25 e incluíram 20, 16, 15, 13 e 10 casos de TB respectivamente.

A família ES14 foi a que obteve o maior número de isolados em *cluster*. Foi observado nesse genótipo um padrão de 8 bandas, com um número eventual adicional de 11 bandas. A análise de *Spoligotyping* mostrou uma sublinhagem predominante encontrada nessa família (LAM9 / SIT42; n = 42 [42/86 = 49%]) (Figura 6).

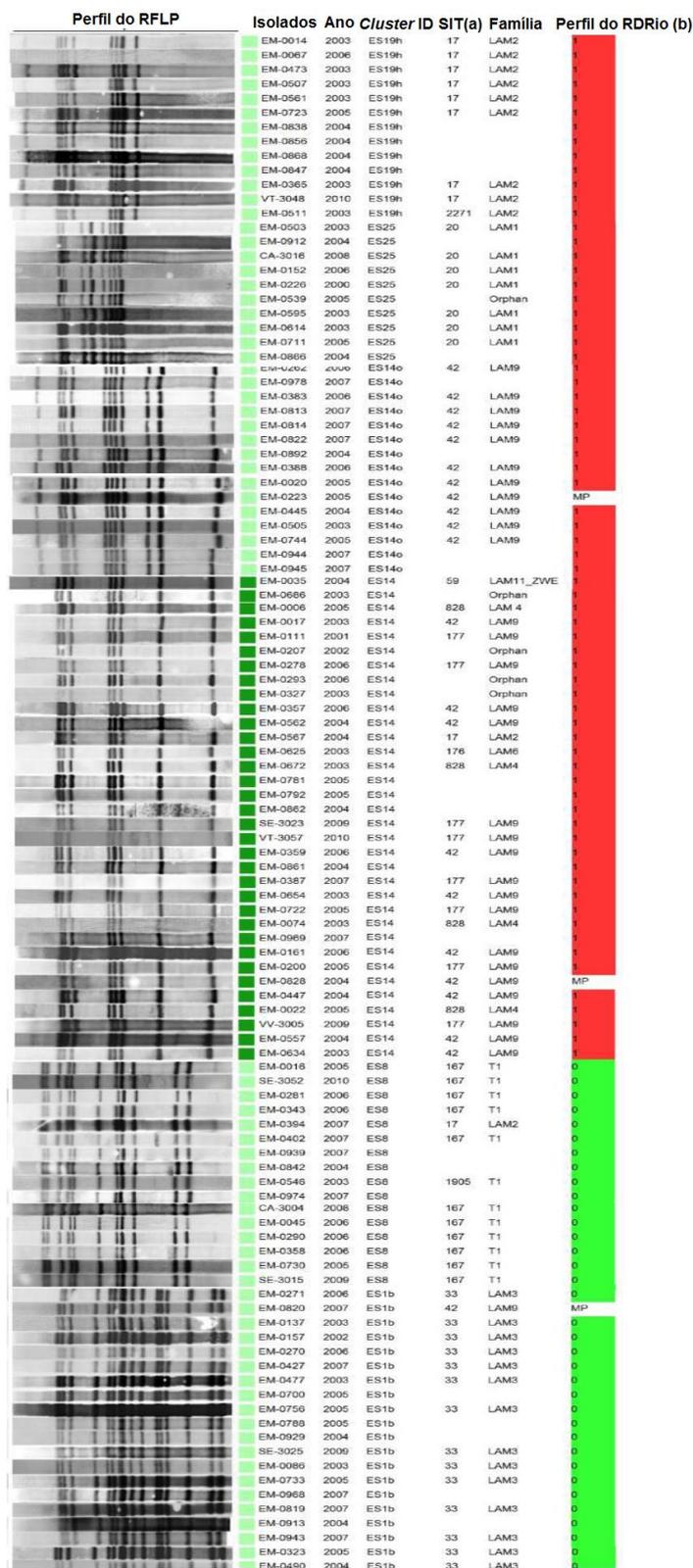


Figura 6 - Perfil genotípico dos isolados que compõem os 108 isolados distribuídos nos 6 maiores *clusters* encontrados no estudo. (a) – SIT (Shared International Type), (b) – perfil do RD^{Rio} – (0): não RD^{Rio}, (1): RD^{Rio} e (MP): população mista.

Em nosso estudo, o maior *cluster* (ES14), foi isolado pela primeira vez em 2001 e esteve presente durante todo o período de 10 anos. Em 2003, 68% de todos os casos de TB pertencentes aos maiores *clusters* foram causados por 3 grupos clonais - ES14, ES19h e ES25. Em 2007, no entanto, os *clusters* ES14o, ES1b e ES8 contribuíram com 88% de todos os casos de TB pertencentes a *clusters* maiores. Nesse contexto, observou-se que o *cluster* que apresentou uma maior redução no número de isolados foi o *cluster* ES19h.

6.1.3 Análise dos fatores associados com o tamanho do *cluster* de *M. tuberculosis*

As características epidemiológicas e os dados clínicos dos pacientes foram avaliados buscando identificar os fatores de risco associados com o tamanho do *cluster* de *M. tuberculosis* (Tabela 2). A média de idade dos pacientes que pertenciam a categoria com 2-5 isolados/*cluster* foi de 36 anos (DP= ± 13), enquanto os pacientes que estavam na categoria com 6-9 isolados/*cluster* apresentaram uma média de idade de 32 anos (DP= ± 13), e os com ≥ 10 isolados/*cluster* apresentaram uma média de idade de 35 anos (DP= ± 14). A maioria dos pacientes era do sexo masculino (27,5% da categoria com 2-5 isolados/*cluster*, 9,4% da categoria com 6-9 isolados/*cluster* e 11,8% da categoria com ≥ 10 isolados/*cluster*).

Dentre os pacientes que pertenciam a categoria com 2-5 isolados/*cluster*, 29,5% eram da cor branca, enquanto a maioria dos pacientes que pertenciam ao grupo com 6-9 e ≥ 10 isolados/*cluster* eram da cor não branca (21,0% e 28,9%, respectivamente).

Na categoria com 2-5 isolados/*cluster*, 30,2% possuíam ≤ 4 anos de estudo, enquanto na categoria com 6-9 e ≥ 10 isolados/*cluster* a maioria apresentava 5 a 8 anos de estudo.

Nota-se uma maior porcentagem de casos que residiam no município de Vitória entre todas as categorias de tamanho de *cluster* (2-5, 6-9 e ≥ 10 isolados/*cluster*).

Foi observada uma maior proporção de casos com baciloscopia negativa e a forma extrapulmonar e pulmonar da doença concomitantemente entre os pacientes que pertenciam ao grupo com 2-5 isolados. No entanto, uma proporção maior de casos com baciloscopia positiva e forma pulmonar da doença foi verificada entre os pacientes com 6-9 e ≥ 10 isolados/*cluster*.

Em relação as variáveis moleculares, pode-se observar uma maior proporção de pacientes que pertenciam a família LAM e ao genótipo RD^{Rio} entre a categoria com ≥ 10 isolados/*cluster*.

Tabela 2 - Fatores associados ao tamanho de *cluster* - características epidemiológicas, clínicas e moleculares de pacientes com TB.

Características	Categorias	Total N=959	PU† N=498 (%)	Tamanho de Cluster					
				2-5 N=266 (%)		6-9 N=87 (%)		≥ 10 N=108 (%)	
Demográficas									
Idade (anos), X ± DP		904	37 ± 14		36 ± 13		32 ± 13		35 ± 14
Sexo	Masculino	672	345 (51,3)	185 (27,5)	63 (9,4)	79 (11,8)			
	Feminino	287	153 (53,3)	81 (28,2)	24 (8,4)	29 (10,1)			
Raça ^a	Branco	190	100 (52,6)	56 (29,5)	20 (10,5)	14 (7,4)			
	Negro	119	55 (46,2)	30 (25,2)	14 (11,7)	20 (16,8)			
	Outros	323	165 (51,1)	89 (27,5)	30 (9,3)	39 (12,1)			
Escolaridade	≤ 4 anos	106	56 (52,8)	32 (30,2)	10 (9,4)	8 (7,5)			
	5 a 8 anos	304	154 (50,6)	86 (28,3)	30 (9,9)	34 (11,2)			
	> 8 anos	90	49 (54,4)	23 (28,2)	9 (9,8)	9 (10,0)			
Região Metropolitana	Vitória	583	293 (50,3)	162 (28,0)	63 (11,0)	65 (11,0)			
	Vila Velha	89	49 (55,0)	25 (28,0)	7 (8,0)	8 (9,0)			
	Cariacica	120	60 (50,0)	34 (28,5)	9 (7,5)	17 (14,0)			
	Serra	123	70 (57,0)	36 (29,0)	4 (3,3)	13 (10,6)			
	Outros	44	26 (59,0)	9 (20,5)	4 (9,0)	5 (11,4)			
Clínicas									
Raio-X	Sim	667	349 (52,3)	178 (26,7)	65 (9,7)	75 (11,2)			
	Não	46	20 (43,5)	17 (37,0)	3 (6,5)	6 (13,0)			
Forma clínica TB	PTB ^b	779	389 (50,0)	217 (27,9)	79 (10,1)	94 (12,1)			
	EPTB	111	71 (64,0)	26 (23,4)	6 (5,4)	8 (7,2)			
	PTB+EPTB	69	38 (55,0)	23 (33,3)	2 (2,9)	6 (8,7)			
Baciloscopia	Negativa	147	82 (55,8)	48 (32,6)	6 (4,1)	11 (7,5)			
	Positiva	802	413 (51,5)	214 (26,7)	81 (10,1)	94 (11,7)			
Moleculares									
Spoligotyping	LAM	448	255 (56,9)	91 (20,3)	37 (8,3)	65 (14,5)			
	Não LAM	412	217 (52,7)	144 (35,0)	33 (8,0)	18 (4,4)			
Genótipo RD ^{Rio}	RD ^{Rio}	369	184 (49,8)	78 (21,2)	36 (9,8)	71 (19,2)			
	Não RD ^{Rio}	552	299 (54,2)	182 (33,0)	36 (6,5)	35 (6,3)			

† - PU (padrão único)

^aBaseado no campo de resposta do SINAN para cor da pele., ^bPTB = TB pulmonar, EPTB = TB extrapulmonar.

Dada as proporções apresentadas na Tabela 1, todas as variáveis passaram para o modelo hierárquico, sendo mostradas na Tabela 3 e 4.

O modelo hierárquico de regressão polinomial (Tabela 2) que teve como base os isolados classificados como padrão único como referência, mostra que, no primeiro nível, os pacientes pertencentes aos grupos com 6-9 e com ≥ 10 isolados/*clusters* eram mais prováveis de pertencer à linhagem LAM (OR ajustado = 1,17, 95% IC 1,08-1,26 e OR ajustado = 1,22, 95% IC 1,14-1,31, respectivamente) em relação aos pacientes que pertenceram ao grupo com 2-5 isolados/*clusters* (OR ajustado = 1,08, 95% IC 1,01- 1,15), utilizando-se os padrões únicos como referência.

Por outro lado, os pacientes do grupo com 2-5 isolados/*cluster* eram menos prováveis de pertencerem ao genótipo RD^{Rio} (OR ajustado = 0,91, 95% IC 0,80-1,03), em relação aos pacientes com 6-9 isolados/*cluster* e com ≥ 10 isolados/*cluster* (OR ajustado = 1,25, 95% IC 1,14- 1,37 e OR ajustado = 1,05, 95% IC 0,93-1,18, respectivamente), utilizando-se os padrões únicos como referência.

No segundo nível, os pacientes com 6-9 isolados/*cluster* tinham uma maior chance de residir no município da Serra (OR ajustado = 0,28, 95% IC, 0,10-0,84), utilizando-se o padrão único como grupo de referência.

No terceiro nível, nenhuma associação foi encontrada nas variáveis sexo, idade, raça e escolaridade quando utilizamos o padrão único como grupo de referência.

Por outro lado, no nível 4, indivíduos que estão no grupo com 2-5 isolados/*cluster* tem uma chance maior de ter a forma extrapulmonar da doença (OR ajustado = 0,38, 95% IC 0,19-0,73), utilizando-se os padrões únicos como referência. Nenhuma associação foi encontrada quanto a baciloscopia em ambos os tamanhos de *cluster*.

Ademais, um segundo modelo utilizando o grupo com 2-5 isolados/*cluster* como referência foi realizado. A análise hierárquica de regressão polinomial (Tabela 2), mostrou que as variáveis que apresentaram-se mais significativas em pacientes com 6-9 isolados/*cluster* foram ser da família LAM e do genótipo RD^{Rio} (OR ajustado = 1,08, 95% IC 1,00-1,17 e OR ajustado = 1,33, 95% IC 1,18-1,50, respectivamente), e de residirem no município da Serra (OR ajustado = 0,32, 95% CI 0,10-0,96).

Por outro lado, os principais resultados encontrados entre os pacientes com ≥ 10 isolados/*cluster* foram: pertencer a linhagem LAM e a família de RFLP ES14 (OR ajustado = 1,14, 95% IC 1,06-1,23 e OR ajustado = 7,03, 95% IC 4,00 - 12,34, respectivamente).

Tabela 3 - Regressão Logística Hierárquica Polinomial da associação entre as características epidemiológicas, clínicas e moleculares com o tamanho de *cluster* (Modelo 1 – padrão único com grupo de referência).

Características	OR Ajustado		
	Tamanho de <i>Cluster</i>		
	2-5 OR (IC)	6-9 OR (IC)	≥ 10 OR (IC)
Nível 1			
Spoligotyping			
Não LAM	Ref	Ref	Ref
LAM	1,08 (1,01-1,15)	1,17 (1,08-1,26)	1,22 (1,14-1,31)
Genótipo Rio^{Rio}			
Não RD ^{Rio}	Ref	Ref	Ref
RD ^{Rio}	0,91 (0,80-1,03)	1,25 (1,14-1,37)	1,05 (0,93-1,18)
Nível 2			
Anos			
	Ref	Ref	Ref
	0,94 (0,87-1,01)	1,00 (0,89-1,13)	1,02 (0,89-1,13)
Região Metropolitana			
Vitória	Ref	Ref	Ref
Vila Velha	0,94 (0,55-1,60)	0,74 (0,30-1,79)	1,06 (0,47-2,42)
Cariacica	1,11 (0,69-1,78)	0,71 (0,32-1,58)	1,80 (0,96-3,38)
Serra	0,98 (0,62-1,54)	0,28 (0,10-0,84)	1,07 (0,54-2,09)
Outros	0,61 (0,27-1,34)	0,74 (0,24-2,31)	1,05 (0,37-2,95)
Nível 3			
Sexo			
Feminino	Ref	Ref	Ref
Masculino	1,02 (0,73-1,44)	1,19 (0,69-2,05)	1,22 (0,73-2,03)
Idade (anos), Média ± DP			
	Ref	Ref	Ref
	0,99 (0,98-1,00)	0,97 (0,95-0,98)	0,99 (0,97-1,00)
Raça			
Branco	Ref	Ref	Ref
Negro	0,83 (0,47-1,47)	0,82 (0,36-1,85)	1,96 (0,88-4,35)
Outros	0,89 (0,58-1,37)	0,74 (0,38-1,44)	1,51 (0,76-3,00)
Escolaridade (anos)			
≤ 4 anos	Ref	Ref	Ref
5 a 8 anos	0,88 (0,52-1,49)	1,02 (0,43-2,44)	1,42 (0,59-3,43)
> 8 anos	0,65 (0,32-1,30)	0,71 (0,24-2,12)	1,20 (0,40-3,58)
Nível 4			
Raio-X			
Normal	Ref	Ref	Ref
Suspeita TB	0,32 (0,13-0,74)	0,34 (0,77-1,55)	0,26 (0,07-0,90)
Baciloscopia			
Negativa	Ref	Ref	Ref
Positiva	0,77 (0,45-1,31)	2,38 (0,77-2,36)	1,23 (0,52-2,91)
Forma TB			
PTB	Ref	Ref	Ref
EPTB	0,38 (0,19-0,73)	0,35 (0,11-1,08)	0,36 (0,12-1,03)
PTB + EPTB	0,72 (0,37-1,41)	0,24 (0,05-1,15)	0,67 (0,22-1,99)

Tabela 4 - Regressão Logística Hierárquica Polinomial da associação entre as características epidemiológicas, clínicas e moleculares com o tamanho de *cluster* (Modelo 2 – pacientes com 2-5 isolados/*cluster* como grupo de referência).

Características	OR Ajustado			
	Tamanho de <i>cluster</i>			
	6-9 OR (IC)	<i>p</i> valor	≥ 10 OR (IC)	<i>p</i> valor
Nível 1				
Spoligotyping		0,137		0,001
Não LAM	Ref		Ref	
LAM	1,08 (1,00-1,17)		1,14 (1,06-1,23)	
Genótipo Rio^{Rio}		0,001		0,373
Não RD ^{Rio}	Ref		Ref	
RD ^{Rio}	1,33 (1,18-1,50)		1,08 (0,90-1,28)	
Família ES14		0,940		0,001
Não	Ref.		Ref.	
Sim	0,94 (0,42-2,11)		7,03 (4,00-12,34)	
Nível 2				
Ano de Notificação		0,104		0,140
	Ref		Ref	
	1,04 (0,58-1,87)		1,00 (0,98-1,02)	
Região Metropolitana				
Vitória	Ref		Ref	
Vila Velha	0,88 (0,34-2,27)	0,801	1,13 (0,44-2,92)	0,786
Cariacica	0,67 (0,28-1,59)	0,366	1,46 (0,69-3,08)	0,315
Serra	0,32 (0,10-0,96)	0,044	0,99 (0,45-2,19)	1,000
Outros	1,26 (0,32-4,91)	0,734	2,01 (0,56-7,22)	0,280
Nível 3				
Sexo		0,878		0,711
Feminino	Ref		Ref	
Masculino	1,04 (0,58-1,87)		1,00 (0,98-1,02)	
Idade (anos), Média		0,035		0,934
	Ref		Ref	
	0,97 (0,95-0,99)		1,11 (0,62-1,99)	
Raça				
Branco	Ref	0,869	Ref	0,066
Negro	0,93 (0,38-2,25)	0,545	2,33 (0,94-5,74)	0,186
Outros	0,80 (0,39-1,63)	0,870	1,68 (0,77-3,64)	0,633
Escolaridade (anos)				
≤ 4 anos	Ref	0,916	Ref	0,411
5 a 8 anos	0,95 (0,38-2,37)	0,873	1,51 (0,56-4,09)	0,407
> 8 anos	0,91 (0,28-2,90)	0,830	1,69 (0,48-5,90)	0,271
Nível 4				
Raio-X		0,857		0,425
Normal	Ref		Ref	
Suspetito TB	0,87 (0,18-4,04)		0,58 (0,15-2,20)	
Baciloscopia		0,054		0,434
Negativa	Ref		Ref	
Positiva	3,46 (0,98-12,26)		1,50 (0,53-4,20)	
Formas TB		0,979		0,514
PTB	Ref		Ref	

EPTB	1,01 (0,29-3,48)	0,67 (0,20-2,20)
PTB + EPTB	0,27 (0,05-1,47)	0,69 (0,19-2,49)

6.2 Discussão – Primeira Parte

Há duas décadas, estudos sobre a transmissão de TB foram complementados por técnicas de genotipagem que permitiram uma identificação mais detalhada de *Mtb* presente estudo, identificamos os fatores associados ao tamanho de *cluster* e à transmissão recente de TB na RMV durante um período de 10 anos. Além disso, avaliamos características relacionadas às cepas associadas à transmissão recente e à progressão da doença ativa, como relatado anteriormente (COSCOLLA et al., 2010). Este é o primeiro estudo no Brasil com uma grande quantidade de isolados com alta abrangência de casos de TB coletado em uma única localização geográfica durante um período de 10 anos.

Nosso estudo possui algumas limitações inerentes ao banco de dados secundário do SINAN. No entanto, devido ao grande número de casos, as análises estatísticas permaneceram significativas, não sendo afetadas. Além disso, a utilização de dados com base em um sistema de informação cuja qualidade foi comprovada em estudos anteriores (MALHÃO et al., 2010; VINHAS et al., 2012, GOMES et al., 2013) reforça a qualidade do estudo. Foram realizadas avaliações de covariáveis estratificadas por características sociodemográficas e clínicas, assim como a técnicas de tipagem molecular utilizando três diferentes métodos de genotipagem durante um período de 10 anos.

Um dos principais achados do nosso estudo foi a grande proporção de genótipos de *Mtb* que estavam concentrados em 6 grandes *clusters* no intervalo de 10 anos na RMV. Esses *clusters* podem estar contribuindo consistentemente para a elevada taxa de transmissão recente na RMV, sendo responsáveis por 11% de todos os casos de TB confirmados por meio de cultura nesta região durante este período. No entanto, os resultados deste estudo mostram que o percentual de *cluster* é

altamente dependente do tamanho, da duração e da população do estudo, conforme relatado por van Soolingen e colaboradores (van SOOLINGEN et al., 1999). Vale ressaltar que o programa de controle de TB não foi eficaz em interromper a cadeia de transmissão da doença nesta região, sendo necessária a implementação de uma abordagem mais adequada.

Dentre os maiores *clusters*, a família de RFLP ES14, com maior número de isolados, foi responsável pela maior proporção de casos de transmissão recente, o que sugere que estas cepas são mais transmissíveis ou mais prováveis de causar a doença após infecção. Nota-se que esses isolados, que também pertenciam ao genótipo RD^{Rio} e a família LAM, estiveram mais associadas a pacientes do sexo masculino e na faixa etária jovem. Além disso, esse perfil genotípico específico de oito bandas, tem sido relatado como predominante em estudos realizados no Rio de Janeiro, em São Paulo e no Rio Grande do Sul, e é frequente em um banco de dados de isolados provenientes de outros países, como nos países do Caribe, da Europa, da África e em outros países da América do Sul (SUFFYS et al., 2000; BAPTISTA et al., 2002). Estes achados sugerem que a incidência de TB nesta região pode ser fortemente influenciada por um subconjunto relativamente pequeno de cepas ativamente circulantes.

Em nosso estudo, a manifestação clínica de TB - pulmonar ou extrapulmonar - não foi associada a nenhum grupo de genótipo em particular. Gomes e colaboradores não mostraram associação entre cepas em *cluster* com a manifestação clínica de TB (GOMES et al., 2013). Além disso, nosso grupo de pesquisa em um estudo anterior observou que cepas do genótipo RD^{Rio} foram menos prováveis de causarem a doença na sua forma extrapulmonar do que as cepas não-RD^{Rio} (VINHAS et al., 2012).

Recentemente, vários grupos, incluindo o nosso, apresentaram dados que mostram a predominância de isolados da família LAM e do genótipo RD^{Rio} em casos de TB no Brasil (LAZZARINI et al., 2007; LAZZARINI et al., 2008; VINHAS et al., 2012; GOMES et al., 2012; WEISENBERG et al., 2012;). Lazzarini e colaboradores mostraram que as sublinhagens LAM1 e LAM2 pertenciam exclusivamente ao genótipo RD^{Rio}, enquanto as linhagens LAM4, LAM5, LAM6 e LAM9 incluíam tanto o genótipo RD^{Rio} quanto o não-RD^{Rio}, e as linhagens LAM3 eram todas não-RD^{Rio}

(LAZZARINI et al., 2007). De fato, estudos anteriores mostraram que o genótipo RD^{Rio} é associado de forma mais significativa a grupos em *cluster* (uma indicação de transmissão recente) do que as cepas de não-RD^{Rio}, tanto em populações brasileiras quanto em populações não-brasileiras (LAZZARINI et al., 2008). Estes dados corroboram os resultados do nosso estudo, o qual mostrou que isolados do genótipo RD^{Rio} são mais prováveis de pertencerem a categoria com 6-9 isolados/*cluster*.

Embora a proporção de casos com 6-9 isolados/*cluster* entre as cepas de RD^{Rio} tenha sido significativamente maior em relação as cepas de não-RD^{Rio}, não está claro se esta diferença pode ser atribuída a uma maior virulência e transmissibilidade dessas cepas. Estudos anteriores sugeriram que as cepas de RD^{Rio} foram recentemente introduzidas em algumas regiões do Brasil e que evoluíram após a sua introdução (LAZZARINI et al., 2008; VINHAS et al., 2012).

Em conclusão, nossos resultados sugerem que isolados pertencentes à família LAM e ao genótipo RD^{Rio} são mais prováveis de pertencerem a *clusters* com 6-9 isolados e que ser da família ES14 e da linhagem LAM tem maior probabilidade de pertencer a um *cluster* com mais de 10 isolados. Além disso, observou-se que a família de RFLP ES14 é o genótipo mais prevalente de Mtb na RMV, o que sugere que uma grande proporção de casos de TB em uma cidade pode ser causada por uma pequena quantidade de genótipos que circulam na cidade.

6.3 Resultados da Segunda Parte

Análise temporal da dinâmica de modificação dos genótipos de *Mycobacterium tuberculosis* na Região Metropolitana de Vitória – ES em intervalo de 10 anos (2000-2001 e 2011) com base nas técnicas de RFLP IS6110 e MIRU- VNTR 24 loci.

6.3.1 Caracterização da População do estudo

No período de Janeiro de 2000 a Dezembro de 2001 e de Janeiro a Dezembro de 2011, foram avaliados 935 pacientes com diagnóstico clínico de tuberculose pulmonar e/ou extrapulmonar distribuídos nos diferentes períodos do estudo. Desses, 92 isolados foram excluídos da tipagem molecular, pois não tiveram crescimento ou tiveram sua cultura contaminada. Portanto, fizeram parte desse estudo, um total de 843 pacientes cujo resultado de cultura foi positivo em meio Ogawa.

6.3.2. Caracterização da população do estudo em relação as características sociodemográficas e clínicas

As características sexo, faixa etária, raça, escolaridade, município de origem, forma clínica da doença, status do HIV, tratamento, baciloscopia e presença ou não de *cluster* foram associadas com os diferentes períodos do estudo. Esses resultados estão descritos na Tabela 5.

Durante os diferentes períodos do estudo, a maior parte dos casos foram distribuídos entre as cidades de Vitória, Cariacica e Serra, conforme descrito na Figura 7.

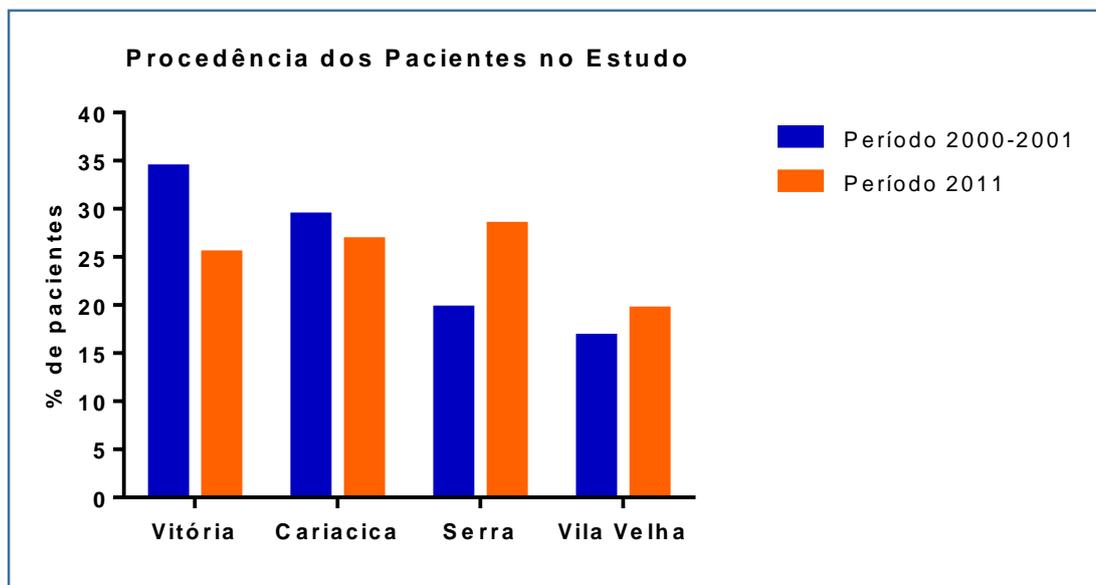


Figura 7 - Distribuição da frequência dos pacientes incluídos no estudo de acordo com o município de origem.

Ao analisarmos os dados demográficos da população do estudo, observou-se que não houve significância estatística entre os períodos analisados com relação à idade quando foram comparadas as médias (média₂₀₀₀₋₂₀₀₁ = 38, DP± 14,4; media₂₀₁₁ = 38, DP± 15,1) e a distribuição por faixa etária (10 e 20 anos). Observou-se que em ambos os períodos do estudo, a maioria dos pacientes, era composto por indivíduos cuja a idade variou de 20 – 39 anos (50,4% no período de 2000 em relação a 49% no período de 2011). Entretanto, não se observou diferença com significância estatística entre os grupos ($p=0,838$).

No presente estudo, foi observado que a maioria dos pacientes pertenciam ao sexo masculino, e ao longo do tempo foi possível verificar um aumento na população masculina em 2011 (63% e 70%, para o período de 2000-2001 e 2011,

respectivamente), evidenciando uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p= 0,049$).

Em relação a escolaridade, a maioria dos pacientes em ambos os grupos tinham entre 4-7 anos de estudo, no entanto, essa proporção foi maior no primeiro período do estudo em comparação ao segundo período (61,5% vs 38,3%, $p=0,001$).

O resultado do teste HIV estava disponível no banco de dados para 476 pacientes (210 no período de 2000-2001 e 266 no período de 2011). Ao investigarmos essa variável, observou-se que em ambos os períodos do estudo, a proporção de pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana foi 27,6% referentes ao período de 2000 – 2001 e 11% no período de 2011. Foi observado uma diferença estatística entre os pacientes que pertenciam ao período de 2011 em relação a 2000 – 2001 ($p= 0,001$).

Em nosso estudo, a proporção de pacientes com forma pulmonar da doença, em ambos os períodos analisados, foi maior do que os pacientes com a forma extrapulmonar e/ou pulmonar mais extrapulmonar (76,5% em 2000 - 2001 e 93,4% em 2011, para forma pulmonar, respectivamente). Também foi observado diferença estatística para essa variável do estudo ($p=0,001$).

Dentre os 715 pacientes analisados nos diferentes períodos do estudo, 80,5% e 86,3% (no período de 2000-2001 e 2011, respectivamente) dos pacientes eram casos novos ($p= 0,055$).

O resultado de baciloscopia realizada nas amostras clínicas nos diferentes períodos do estudo estava disponível para 840 pacientes. A proporção de casos com baciloscopia negativa (diagnosticado somente através da cultura) no período de 2000-2001 foi menor que no segundo período (45,7% e 68%, respectivamente). Essa variável mostrou-se estatisticamente significativa nos diferentes períodos analisados ($p= 0,001$).

Ao analisarmos os municípios de origem no nosso estudo, constatou-se que Vitória no período de 2000-2001 foi o município com maior proporção de casos da doença (34,3%), seguida por Cariacica (29,3%), Serra (19,6%) e Vila Velha (16,7%). No entanto, em 2011, houve uma redução na proporção de casos da doença no

município de Vitória (25,4%). No município da Serra, observou-se um aumento na proporção de casos da doença de 19,6% para 28,3% ($p=0,004$).

Em relação a variável *cluster* observou-se que em ambos os períodos do estudo, a proporção de *clusters* foi semelhante (33,1% em 2000 – 2001 em relação a 36,2% em 2011), não havendo significância estatística entre os grupos ($p=0,350$).

Tabela 5 - Distribuição das características demográficas, clínicas e moleculares de pacientes com TB na RMV nos períodos de 2000-2001 e 2011.

Variáveis	Período de 2000-2001 n= 341 (%)	Período de 2011 n= 502 (%)	X² <i>p valor</i> ^a
Sexo			0,049
Masculino	217 (63%)	352 (70%)	
Feminino	124 (37%)	150 (30%)	
Idade			0,838
< 19 anos	24 (7%)	37 (7,4%)	
20 – 39 anos	172 (50,4%)	246 (49%)	
40 – 59 anos	119 (35%)	172 (34,2%)	
≥ 60 anos	26 (7,6%)	47 (9,4%)	
Escolaridade			0,001
Nenhuma	15 (10,5%)	57 (22,7%)	
1 a 3 anos	2 (1,4%)	21 (8,3%)	
4 a 7 anos	88 (61,6%)	96 (38,3%)	
8 a 11 anos	28 (19,6%)	55 (22%)	
≥ 12 anos	10 (7%)	22 (8,7%)	
Município de Origem			0,004
Cariacica	100 (29,3%)	134 (26,7%)	
Serra	67 (19,6%)	142 (28,3%)	
Vila Velha	57 (16,7%)	98 (19,5%)	
Vitória	117 (34,3%)	127 (25,4%)	
Forma Clínica da TB			0,001
Pulmonar	261 (76,5%)	469 (93,4%)	
Extrapulmonar	48 (14,1%)	26 (5,2%)	
Pulmonar + Extrapulmonar	32 (9,4%)	7 (1,4%)	
HIV			0,001
Positivo	58 (2,8%)	29 (10,9%)	
Negativo	152 (72,4%)	237 (89,1%)	
Tipo de Tratamento			0,055
Caso novo	264 (80,5%)	334 (86,3%)	
Recidiva	21 (6,4%)	19 (4,9%)	
Reingresso após abandono	24 (7,3%)	27 (7%)	
Transferência	2 (0,6%)	1 (0,3%)	
Outros	17 (5,2%)	6(1,5%)	
Baciloscopia			0,001
Positiva	184 (54,3%)	160 (32%)	

Negativa	155 (45,7%)	341 (68%)	
Continuação – Tabela 4			
Em cluster – RFLP^b			0,350
Sim	109 (33,1%)	174 (36,2%)	
Não	220 (66,9%)	311 (63,8%)	

^aFoi utilizado Teste Qui-quadrado de Pearson

^bPara análise em *cluster* da técnica de genotipagem RFLP IS 6110, foram retirados os isolados com pouca banda.

6.3.3 Análise do perfil genotípico dos isolados de *M. tuberculosis* por RFLP IS6110

De um total de 935 isolados selecionados para o estudo, 843 (n= 341 isolados durante o período de 2000 – 2001; n= 502 isolados no período de 2011) isolados tiveram seus perfis genéticos analisados através da técnica de RFLP IS6110.

Foram retirados da análise em *cluster* por apresentarem cinco ou menos cópias de IS6110, doze (3,5%) isolados no período de 2000-2001 e, dezessete (3,5%) isolados no período de 2011. Portanto, fizeram parte da análise de *cluster* no primeiro período do estudo, um total de 329 isolados. Enquanto, 485 isolados foram selecionados no segundo período.

O número de cópias de IS6110 observadas nesses genomas variou entre 1 a 17 bandas em 2000-2001 e de 1 a 19 bandas no período de 2011. Os isolados com 10 sequências IS6110 predominaram no período de 2000 – 2001, enquanto que o número de sequências IS6110 predominantes em 2011 foi igual a 9.

A análise dos resultados de genotipagem pelo RFLP IS6110, no período de 2000-2001, demonstrou a existência de 262 genótipos distintos. Enquanto em 2011, observamos 360 genótipos distintos.

Ao avaliarmos os padrões gerados por RFLP baseado no IS6110 entre os isolados no período de 2000-2001, observou-se que entre os 329 isolados, 109 deles

(33,1%) foram agrupados em 38 *clusters* diferentes e, no período de 2011, dentre os 485 isolados, 176 (36,2%) foram distribuídos em 39 *clusters* (Figura 8).

A taxa de agrupamento (CR) do total de isolados testados pelo RFLP foi de 0,21 para o período de 2000 – 2001 e 0,28 para o período de 2011.

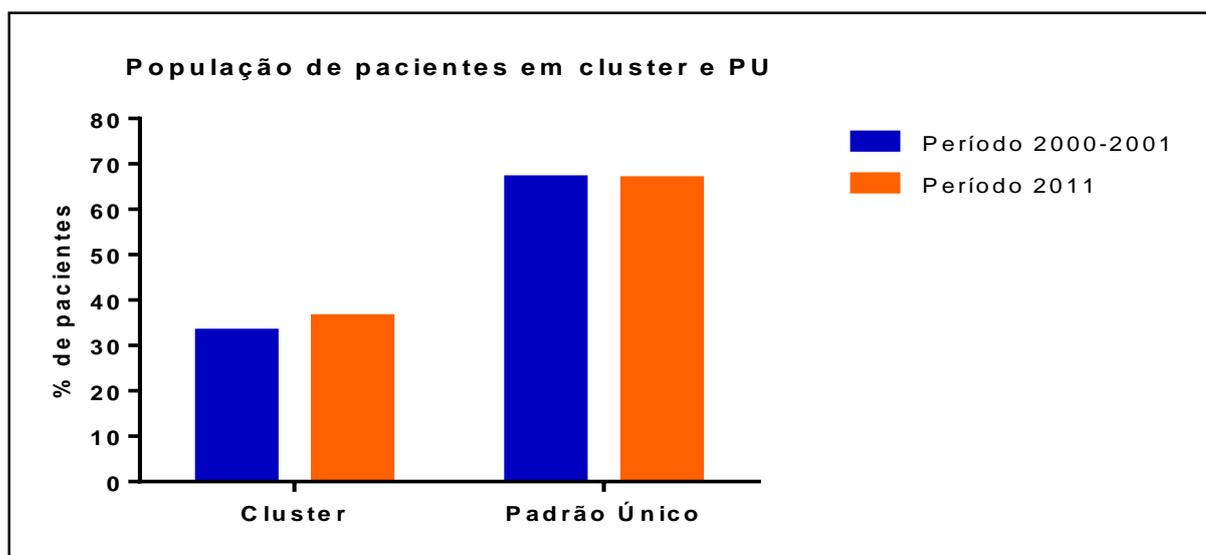


Figura 8 - Proporção de pacientes agrupados em *clusters* e padrões únicos encontradas através da técnica de RFLP IS6110 para os períodos do estudo.

O poder discriminatório de um método de tipagem é a sua habilidade de distinguir entre cepas não relacionadas. Isto é determinado pelo número de tipos definidos pelo método e a frequência relativa dos tipos (HUNTER & GASTON, 1988). Ao analisarmos o cálculo do poder discriminatório de HGI para o RFLP, nos diferentes períodos do estudo, observou-se para o período de 2000 – 2001 um HGDI de 0,972; enquanto para o período de 2011 o HGDI foi de 0,937 (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de perfis encontrados, agrupamentos e poder discriminatório do RFLP observados nos diferentes períodos do estudo.

Período do Estudo	Total de Perfis	Número de Isolados		Número de <i>Clusters</i>	CR*	HGDI ^b
		PU ^a	Agrupados			
2000-2001	262	220	109	38	0,21	0,972
2011	360	309	176	39	0,28	0,937

^a – padrão único (*unique patterns*). ^b – índice de diversidade de Hunter & Gaston, *CR – taxa de agrupamento (*Clustering rate*).

Na análise de similaridade entre os isolados, em ambos os períodos do estudo, foram identificadas 16 famílias, quando se considerou até 65% de similaridade. No primeiro período, quatro delas abrangeram 39,8% de todos os isolados. Entre elas, pode-se destacar a “família” ES14 com maior número de isolados em um *cluster* (41 isolados), seguidas pelas “famílias” ES1 (39 isolados), ES30 (29 isolados) e ES19 (22 isolados). Em 2011, a “família” ES14 e ES19 (ambas com 55 isolados) foram as “famílias” com maior número de isolados em *cluster*. Nesse cenário, pode-se destacar a “família” ES8 que teve um aumento de 7 vezes na quantidade de isolados em *cluster* (Figura 9).

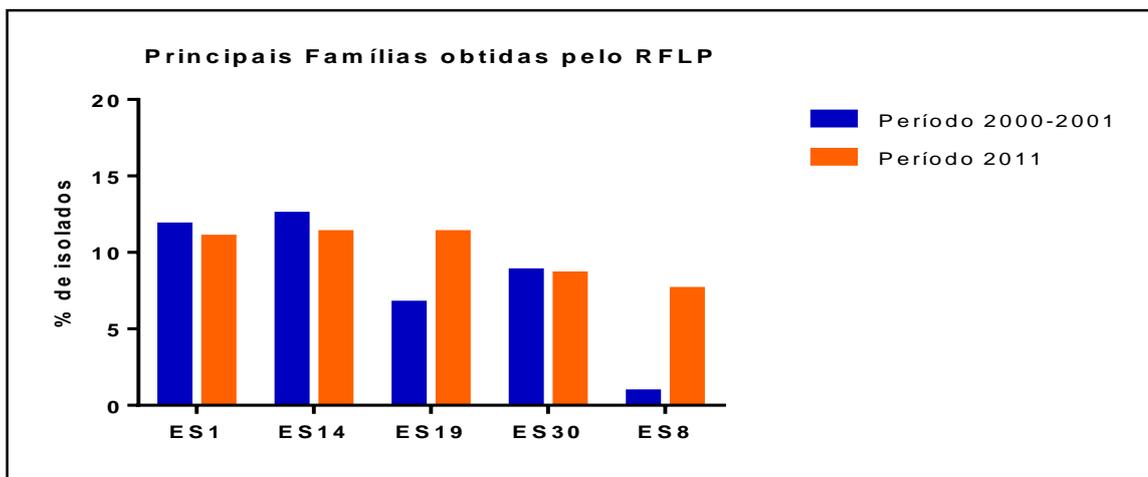


Figura 9 - Proporção de “famílias” encontradas através da técnica de RFLP IS6110 para os períodos do estudo.

Uma análise posterior para avaliar o tamanho dos *clusters* foi realizada na população estudada. No primeiro período, observou-se que o tamanho dos *clusters* variou de 2 a 12 isolados, enquanto em 2011, a distribuição dos *clusters* variou de 2 a 26 isolados. A maioria dos *clusters* foi formada por dois isolados (53,8% em 2000-2001 e 51,2% em 2011), o que caracteriza um *cluster* pequeno. A proporção de *clusters* de tamanho médio (composto de 3 a 9 isolados) encontrada foi o equivalente a 43,5% no primeiro período do estudo e 41,0% em 2011. No período de 2000-2001 somente um *cluster* com 12 isolados foi observado, enquanto, três *clusters* com mais de 10 isolados foram encontrados em 2011 (Figura 10).

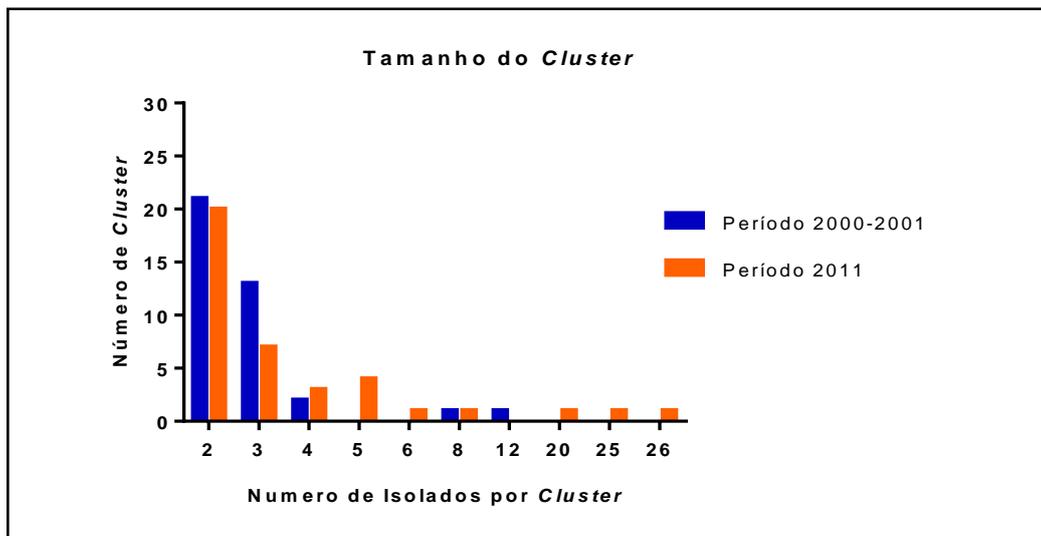


Figura 10 - Número de isolados encontradas a partir da técnica de RFLP IS6110 pelo tamanho de *cluster* para os períodos do estudo.

6.3.4 Caracterização dos *clusters* e sua dinâmica de modificação durante o período de 2000-2001 e 2011.

A análise dos padrões gerados pelo RFLP baseado no IS 6110 permitiu identificar 8 *clusters* que estão mais envolvidos com transmissão recente na Região Metropolitana de Vitória durante os dois períodos estudados (Figura 10).

Dentre esses isolados, o *cluster* ES1b (12 isolados), representou mais de 11% dos *clusters* circulantes no período de 2000-2001. No entanto, ao analisarmos a distribuição desse *cluster* em 2011, pode-se verificar uma redução no número de isolados em *cluster* de 80% (12 isolados para 2 isolados).

Em 2011, os *clusters* que estiveram mais envolvidos com transmissão recente na Região Metropolitana de Vitória foram: ES8, ES14, ES19a e ES6 compostos por 26, 25, 20 e 8 isolados, respectivamente. O restante dos *clusters* que surgiram em

2011, foram formados na sua maioria por *clusters* de tamanho pequeno (2 isolados) ou médio (3-8 isolados).

Os *clusters* identificados como os mais representativos na amostra foram compostos por isolados oriundos de diferentes localidades da Região Metropolitana de Vitória, não sendo possível associar um determinado *cluster* com uma única região.

O *cluster* ES8 em 2011 representou 15% dos *clusters* circulantes na Região Metropolitana de Vitória. No entanto, esse *cluster* não foi observado em 2000-2001. Um perfil genotípico semelhante, com mesmo número de cópias de IS 6110 foi identificado no primeiro período, contudo, foi classificado com um padrão único. Dentre esses, em 68% a baciloscopia foi positiva, com uma elevada carga bacilar na amostra.

Em relação aos isolados pertencentes ao *cluster* ES14, observou-se um aumento no número de isolados em *cluster* em relação ao período de 2000-2001 de 7 vezes (3 isolados para 25 isolados em 2011). Esse *cluster* representou 14% dos *clusters* circulantes na Região Metropolitana de Vitória em 2011.

Ainda em relação a dinâmica de modificação dos *clusters* encontrados nos períodos estudados, o *cluster* ES19a não foi observado em 2000-2001, entretanto em 2011 esse *cluster* representou 11,5% dos circulantes.

Posteriormente, foi realizada uma análise para verificar o comportamento dos perfis únicos durante os períodos analisados. Nesse contexto, verificou-se a formação de 22 novos *clusters*. No entanto, esses *clusters* foram formados por pequenos *clusters*.

A Figura 11 mostra a distribuição dos *clusters* que permaneceram ao longo dos períodos analisados.

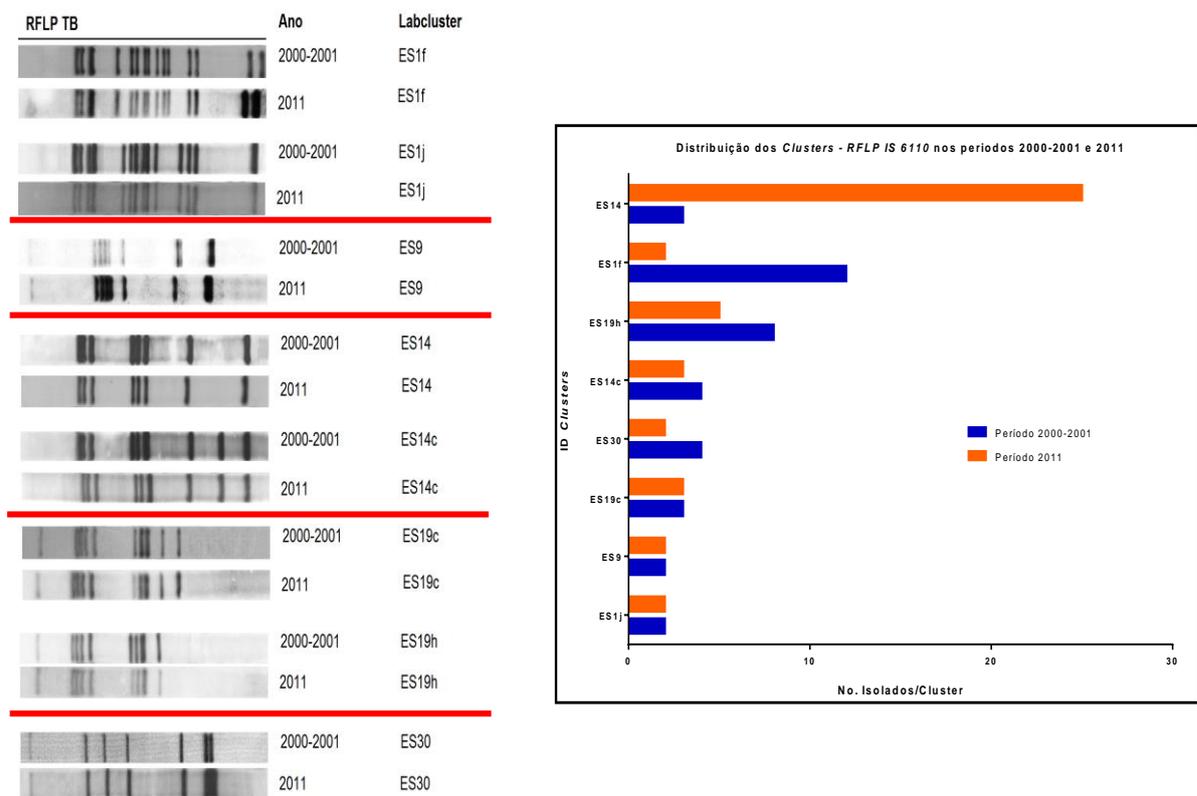


Figura 11 - Perfil genotípico e distribuição dos isolados em *clusters* que permaneceram nos dois períodos do estudo (2000-2001 e 2011).

A Figura 12 e 13 mostra o padrão de bandas IS 6110 dos isolados em *cluster* no período de 2000-2001 e 2011.

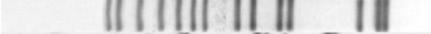
RFLP TB	Ano	Labcluster	Nº Isolados/Cluster
	2000-2001	ES1	2
	2000-2001	ES1c	2
	2000-2001	ES1f	12
	2000-2001	ES1d	2
	2000-2001	ES1t	3
	2000-2001	ES1j	3
	2000-2001	ES21	3
	2000-2001	ES14o	3
	2000-2001	ES14a	2
	2000-2001	ES14	3
	2000-2001	ES14p	2
	2000-2001	ES14d	2
	2000-2001	ES14c	4
	2000-2001	ES14t	3
	2000-2001	ES36	2
	2000-2001	ES19h	8
	2000-2001	ES19c	3
	2000-2001	ES19d	2
	2000-2001	ES34d	3
	2000-2001	ES34a	2
	2000-2001	ES34	3
	2000-2001	ES34b	2
	2000-2001	ES25	3
	2000-2001	ES6a	2
	2000-2001	ES6e	3
	2000-2001	ES23	2
	2000-2001	ES8a	2
	2000-2001	ES15a	2
	2000-2001	ES15	3
	2000-2001	ES3	2
	2000-2001	ES4c	2
	2000-2001	ES4	2
	2000-2001	ES17	2
	2000-2001	ES30b	2
	2000-2001	ES30e	3
	2000-2001	ES30	4
	2000-2001	ES30f	2
	2000-2001	ES9	2

Figura 12 - Perfis genotípicos de RFLP IS6110 encontrados nos isolados que compõem os *clusters* no período de 2000-2001.

RFLP TB	Ano	Labcluster	Nº Isolados/Cluster
	2011	ES11	3
	2011	ES11a	5
	2011	ES33	2
	2011	ES8e	2
	2011	ES8	26
	2011	ES32	2
	2011	ES29	5
	2011	ES4b	2
	2011	ES38	2
	2011	ES14c	3
	2011	ES14	23
	2011	ES14g	2
	2011	ES14f	2
	2011	ES35	2
	2011	ES19c	3
	2011	ES19h	5
	2011	ES19l	20
	2011	ES19	4
	2011	ES19e	3
	2011	ES19j	2
	2011	ES19f	5
	2011	ES25a	4
	2011	ES1	3
	2011	ES1l	3
	2011	ES1e	2
	2011	ES1h	4
	2011	ES1k	2
	2011	ES1f	2
	2011	ES1g	2
	2011	ES1j	2
	2011	ES1a	2
	2011	ES1i	6
	2011	ES6	8
	2011	ES37	2
	2011	ES30a	2
	2011	ES30c	3
	2011	ES30	2
	2011	ES30b	2
	2011	ES9	2

Figura 13 - Perfis genotípicos de RFLP IS6110 encontrados nos isolados que compõem os *clusters* no período de 2011.

6.3.5 Análise do perfil genotípico dos isolados de *M.tuberculosis* pelo MIRU-VNTR

Utilizando-se a técnica de genotipagem MIRU-VNTR 24 *loci* foi possível confirmar os *clusters* obtidos através do RFLP IS6110. Para essa análise foram considerados todos os isolados que pertenciam a um *cluster* ou foram considerados como padrão único, inclusive os com perfis genotípicos com menos de 6 bandas.

Para os 843 isolados (n=341 em 2000-2001 e, n=502 em 2011) submetidos a técnica de genotipagem pelo MIRU-VNTR 24 *loci*, obteve-se resultado em 797 isolados. Em 15 isolados no período de 2000-2001, não foi possível obter o resultado do MIRU-VNTR e, em 2011, 31 isolados, não tiveram seus resultados para técnica de genotipagem.

Dentre os 326 isolados distribuídos no período de 2000-2001, 288 genótipos distintos foram encontrados em 65 (19,9%) isolados agrupados em 27 *clusters*. Em contrapartida, no período de 2011, encontrou-se 296 genótipos distintos distribuídos em 235 (49,9%) isolados agrupados em 60 diferentes *clusters*.

A maioria dos *clusters* no período de 2000-2001, foram compostos por 2 isolados (74%), o restante foi composto por *clusters* de tamanho variável de 3 – 5 isolados em *cluster* (26%). No período de 2011, foi observado 33 *clusters* (55%) com 2 isolados, 23 (38,3%) com 3-9 isolados e 4 *clusters* composto por mais de 10 isolados (6,7%) (Figura 14).

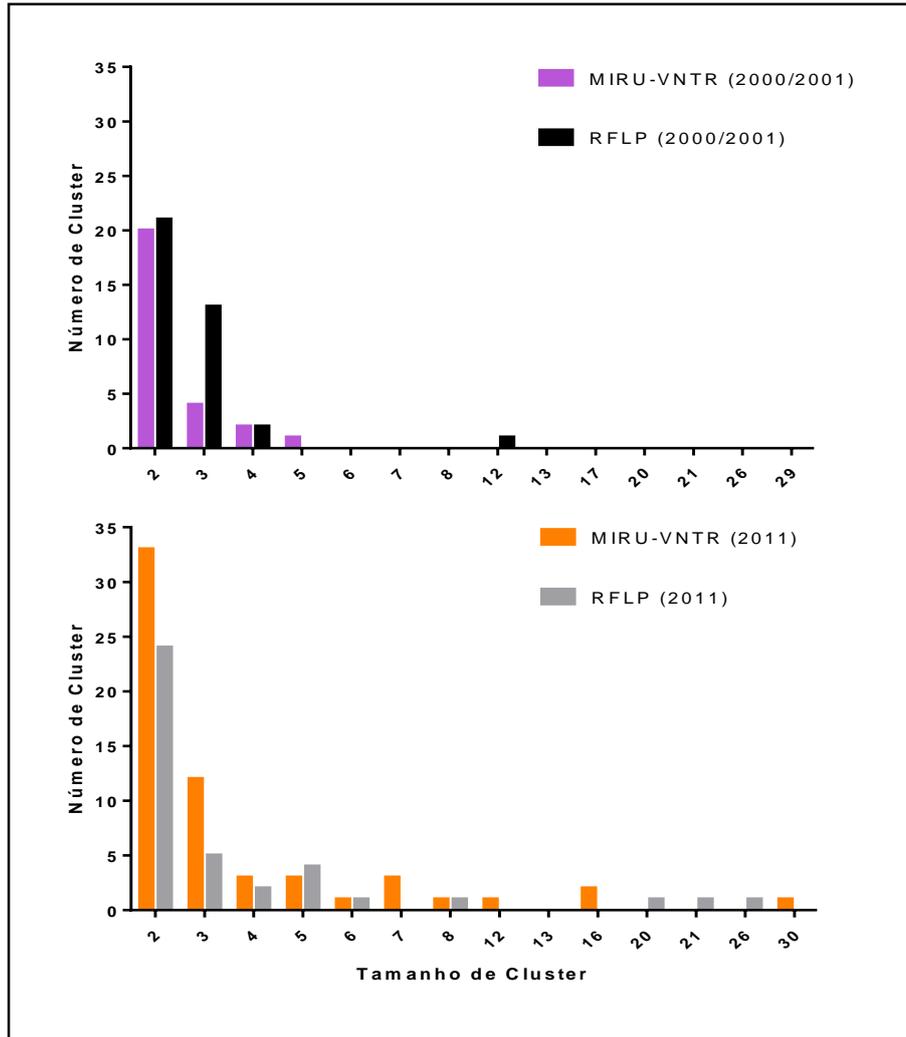


Figura 14 - Distribuição do tamanho dos *clusters* encontradas a partir das técnicas de RFLP IS6110 e MIRU-VNTR 24 *loci* para os períodos do estudo.

Com base nos resultados dos isolados obtidos no período de 2000-2001 e 2011, foi calculado o índice de diversidade alélica para cada *locus* do MIRU-VNTR 24 *loci* conforme é mostrado nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Diversidade alélica de cada *locus* e o poder discriminatório durante o período de 2000-2001.

Locus	Número de Alelos															Diversidade Alélica (h)	Discriminação ^a	
	0	1	1s	2	3	3s	4	5	6	7	8	9	10	11	15			
MIRU 24		326															0,000	Baixa
MIRU 39		2		322	2												0,024	Baixa
MIRU 04	1	4	1	305	14	1											0,123	Baixa
Mtub 29				35	3		273	15									0,285	Baixa
MIRU 02		54		269	3												0,292	Baixa
MIRU 20		58		268													0,293	Baixa
MIRU 31		6		75	242		2	1									0,396	Moderada
ETR C				29	64		228	5									0,464	Moderada
ETR A		10		224	78		14										0,468	Moderada
MIRU 27	2	1		109	211		2	1									0,469	Moderada
QUB 4156	4	3		210	108												0,472	Moderada
Mtub 21		21		65	206		34										0,546	Moderada
MIRU 16		53		68	197		4	1									0,557	Moderada
MIRU 26				5	32		46	206	37								0,558	Moderada
ETR B		57		195	63		1	10									0,573	Moderada
MIRU 10		1		14	63		189	57	2								0,594	Moderada
Mtub 39		38		182	87		6	1	12								0,602	Alta
Mtub 34		49		66	175		6	29	1								0,640	Alta
QUB 11b		3		120	93		77	24	9								0,721	Alta
Mtub 30		53		19	26		17	62	147	2							0,722	Alta
Mtub 04	1	14		97	96		95	19	4						2		0,734	Alta
MIRU 23		133		57	11		50	25	50								0,749	Alta
MIRU 40		125		31	69		57	12	10	5	16						0,765	Alta
QUB 26				4	22		88	51	45	77	29	8	3	2			0,888	Alta

a. A discriminação é definida de acordo com a diversidade alélica (h) como: Alta ($h > 0,6$), Moderada ($0,3 \leq h \leq 0,6$) e Baixa ($h < 0,3$), (Sola et al., 2003).

Todos os cálculos foram realizados com 326 isolados, exceto MIRU 16 com 323 isolados, MIRU 40 com 325 isolados, e QUB 26 com 321 isolados.

Tabela 8 - Diversidade alélica de cada *locus* e o poder discriminatório durante o período de 2011.

Locus	Número de Alelos															Diversidade Alélica (h)	Discriminação ^a
	0	1	1s	2	3	3s	4	5	6	7	8	9	10	11	15		
MIRU 24		466		5												0,021	Baixa
MIRU 04		6	2	440	20	1		2								0,125	Baixa
MIRU 20		62		407	2											0,236	Baixa
MIRU 27		2		58	405		5		1							0,245	Baixa
MIRU 02		66		401	4											0,250	Baixa
Mtub 29				41	9		405	14		2						0,252	Baixa
QUB 4156	2	5		387	71		1	1								0,290	Baixa
MIRU 39		3		390	7		4	27	40							0,304	Moderada
MIRU 31		7		90	367		6	1								0,356	Moderada
ETR B		104		356	10			1								0,379	Moderada
ETR A		14		333	111		10		3							0,443	Moderada
Mtub 34		41		9	345		40	34	2							0,443	Moderada
ETR C				33	91		332	13	2							0,460	Moderada
MIRU 10		8		32	91		278	3								0,489	Moderada
Mtub 21		23		109	291		39	4	2							0,550	Moderada
MIRU 16		48		133	265		4									0,554	Moderada
Mtub 39		44		267	139		5	6	8					2		0,582	Moderada
MIRU 23		267		111	10		82		1							0,592	Moderada
MIRU 26		1		5	45		85	278	52	2	3					0,598	Moderada
QUB 11b		4		212	106		116	21	10	2						0,684	Alta
Mtub 30				81	32		7	151	197	3						0,688	Alta
MIRU 40		190		66	110		65	9	10	13	5			1		0,741	Alta
Mtub 04		56		128	150		107	25	5							0,756	Alta
QUB 26		1		9	21		106	64	85	93	52	6	2	1		0,881	Alta

- a. A discriminação é definida de acordo com a diversidade alélica (h) como: Alta ($h > 0,6$), Moderada ($0,3 \leq h \leq 0,6$) e Baixa ($h < 0,3$), (Sola et al.,2003). Todos os cálculos foram realizados com 471 isolados, exceto MIRU 10 com 412 isolados, MIRU 16 com 450 isolados, MIRU 40 com 469 isolados, Mtub 21 com 468 isolados, QUB 4156 com 467 isolados.

[Digite aqui]

Nesse contexto, os MIRUs 40 e QUB 26 tiveram um alto poder discriminatório em ambos os períodos analisados, em média com 8 e 10 alelos cada, sendo altamente polimórficos, enquanto os MIRUs 24 e 20 no período de 2000-2001 foram os com menor poder discriminatório composto por 1 e 2 alelos cada. O mesmo foi observado no período de 2011, sendo os MIRUs 24, 20 e 2 foram os que apresentaram menor poder discriminatório, com 2,3 e 3 alelos cada. Os demais *loci* apresentaram moderado poder de discriminação.

O poder discriminatório para a técnica de MIRU-VNTR 24 *loci* foi calculado como é mostrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Número de perfis encontrados, agrupamentos e poder discriminatório do MIRU-VNTR 24 *loci* observados nos diferentes períodos do estudo.

Período do Estudo	Total de Perfis	Número de Isolados		Número de <i>clusters</i>	CR*	HGDI ^b
		PU ^a	Agrupados			
2000-2001	288	261	65	27	0,12	0,971
2011	296	236	235	60	0,37	0,965

^a – padrão único (*unique patterns*). ^b – índice de diversidade de Hunter & Gaston, *CR - taxa de agrupamento (*Clustering rate*).

[Digite aqui]

6.3.6 Análise de correlação entre as técnicas de genotipagem RFLP IS6110 e MIRU-VNTR

A análise molecular entre as duas técnicas de genotipagem, no período de 2000-2001, mostrou uma correlação de 100% em 16/38 *clusters* (42,1%) definidos com base na técnica de RFLP IS 6110 e, comparadas com os perfis obtidos por MIRU-VNTR 24 *loci*. Em 7 *clusters* (18,4%) obtidos pela técnica de MIRU-VNTR, mas com perfis únicos para o RFLP, foi possível estabelecer uma alta correlação entre as técnicas. Ao analisarmos esses isolados discordantes obtido com base na técnica do RFLP IS6110, observamos o ganho ou perda de 1 banda no seu perfil genotípico. Nesses isolados uma alta similaridade estabelecida a partir da técnica de RFLP IS6110 foi encontrada (80-94%).

O RFLP IS 6110 não mostrou correlação com o MIRU-VNTR em 4 *clusters*. Essa discrepância mostrada pelo MIRU-VNTR correspondeu em parte a: i) adição de 3 isolados a um *cluster* de RFLP (*cluster* ES9a) e, ii) divisão de um *cluster* grande definido por RFLP (ES1b). Os 11 *clusters* restantes foram agrupados apenas pela técnica de RFLP IS6110.

Dentre os 39 *clusters* obtidos pela técnica de RFLP IS6110 em 2011, apenas 17 (42,5%) concordaram em 100% MIRU-VNTR. Em 26 *clusters* obtidos a partir da técnica de MIRU-VNTR, pode ser estabelecida uma alta correlação com os perfis genotípicos encontrados no RFLP IS6110. Para esses isolados discordantes foi observado o ganho ou perda de 1 ou 2 bandas no perfil genotípico obtido pelo RFLP.

Em 13 *clusters* nenhuma correlação entre as técnicas RFLP IS6110 e MIRU-VNTR pode ser estabelecida. Esses isolados foram agrupados somente pelo MIRU-VNTR.

As maiores discrepâncias observadas nesse período entre os isolados encontrados, foram obtidos entre os maiores *clusters* de RFLP IS6110, devido a adição de isolados em um *cluster*.

[Digite aqui]

6.4 Discussão – Segunda Parte

Ao longo dos últimos anos vários marcadores moleculares têm sido utilizados para definir genótipos de *M. tuberculosis* em estudos epidemiológicos. O desenvolvimento dessas técnicas de genotipagem têm permitido uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão da tuberculose e tem contribuído para medidas de prevenção e políticas de controle da doença (GURJAV et al., 2014). Em estudos populacionais tem-se postulado que pacientes com tuberculose, portando isolados com um padrão único são considerados casos de reativação e pacientes com isolados que compartilham padrões idênticos são considerados como pertencentes em um *cluster* e representam doença decorrente de uma infecção adquirida recentemente.

Outra *proxy* para inferir transmissão de certos genótipos de *M. tuberculosis* é medir o aumento na frequência desses genótipos ao longo do tempo na população (COSCOLLA & GAGNEUX, 2014).

Nesse cenário, esse estudo analisou a dinâmica temporal de modificação dos genótipos de *M. tuberculosis*, em um intervalo de 10 anos na Região metropolitana de Vitória, com cortes transversais em 2000-2001 e 2011, empregando técnicas de genotipagem (RFLP IS 6110 e MIRU-VNTR).

Nosso estudo apresentou algumas limitações. Primeiro, se baseou em casos com cultura positiva, uma vez que a cultura não é universal em nosso país, o nosso banco de dados no primeiro período do estudo incluiu 58% dos pacientes diagnosticados. Outra limitação refere-se à incompletude de um banco de dados secundários (SINAN). Por outro lado, estudos ressaltam o SINAN como uma fonte confiável de informações sobre a

[Digite aqui]

tuberculose (MOREIRA & MACIEL, 2008; MALHÃO et al., 2010; VINHAS et al., 2012; GOMES et al., 2013). Apesar disso, a força do nosso estudo baseia-se no tamanho da nossa amostra, oferecendo um poder estatístico maior do que na maioria dos outros estudos.

Nossos resultados mostraram um predomínio do sexo masculino nos períodos analisados. Proporção semelhante tem sido relatada em outros estudos no Brasil e em outros países (MARTINEZ et al., 2000; THORSON et al., 2004; MENDES et al., 2008). No que tange essa questão, essa diferença pode ser explicada devido a homens terem maior atividade social e ocupacional, principalmente nos países com baixas condições socioeconômicas.

No que se refere a idade, em ambos os períodos estudados, o maior número de casos foi observado entre indivíduos na faixa etária mais jovem, geralmente entre 20-39 anos. Nossos dados corroboram com outros estudos, que relatam que a TB é uma doença que acomete principalmente pessoas jovens e na faixa etária mais produtiva (WOOD et al., 2011). Estudos tem mostrado que o êxito da transmissão está diretamente relacionado a alguns genótipos que estão associados com idade mais jovem (BORGDORFF & van SOOLINGEN, 2013).

Em relação a escolaridade, nos dois períodos estudados, observamos que houve uma maior proporção de casos com TB entre os pacientes com 4 a 7 anos de estudo. Nesse contexto, pode-se destacar um aumento na proporção de casos da doença em pacientes analfabetos no período de 2000-2001 para 2011. Vieira e colaboradores (2007) alertou que o baixo grau de instrução e de acesso a informações sobre a cadeia de transmissão da tuberculose pode justificar a demora do paciente na busca por atendimento. No nosso estudo

[Digite aqui]

observamos que houve um deslocamento da epidemia para uma camada menos favorecida da população.

A maioria dos casos notificados residia no município de Vitória, no entanto, observou-se um aumento no número de casos notificados no município da Serra em relação ao período de 2011. San Pedro e colaboradores destacam a importância da influência das características específicas das áreas geográficas em relação a utilização de indicadores socio-econômicos capazes de agregar atributos individuais e espaciais (SAN PEDRO & OLIVERIA, 2013). Esses autores explicam que a área geográfica pode ter uma importância menor em relação a transmissão do que a área no qual os indivíduos habitam, trabalham ou transitam. Segundo esses autores, somente os indicadores socio-econômicos não seriam suficientes para explicar sozinho a transmissão da doença, sugerindo a existência de particularidades inerentes a cada unidade territorial analisada.

Na população do estudo foi observada uma maior proporção de baciloscopia positiva no período de 2000-2001. Além disso, em ambos os períodos a forma pulmonar da doença esteve presente em maior proporção. Corroborando com estes resultados, em 2007, nosso grupo já havia demonstrado que há uma clara associação entre doença cavitária, carga bacilar e maior gravidade da doença (PALACI et al., 2007). Nota-se que em 2011 havia uma proporção menor de pacientes com baciloscopia positiva em relação a 2000-2001. Esses resultados podem ser explicados pela implantação da cultura universal na RMV. PALACI e colaboradores (2013) relatam um acréscimo de 24% no diagnóstico da TB devido ao incremento da cultura para o diagnóstico da TB. Tendo em vista esses dados, a baciloscopia pode ser uma boa variável de predição e possivelmente modelos multivariados possam ser construídos levando-se em conta esse desfecho.

[Digite aqui]

A análise dos resultados de genotipagem por RFLP IS 6110 revelou uma maior proporção de pacientes no período de 2011 estavam em *cluster* (36%) comparado aos pacientes no período de 2000-2001 (33%), no entanto, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os períodos analisados. Estudos têm relatado que pacientes infectados por isolados em *clusters* são considerados bons marcadores para indicar transmissão recente dentro de uma população e tem sido utilizado para analisar padrões de transmissão e auxiliar nas medidas de controle e prevenção dos Programas de Controle da TB (SMALL et al., 1994; GURJAV et al., 2014).

Estudos conduzidos em outras regiões, como Baltimore (32%), Hamburg (34%), Nova Iorque (37%) e Espanha (38%), mostraram uma proporção semelhante de isolados em *cluster* ao encontrado em nosso estudo e, maior do que encontrado em outras cidades ou países (FERRAZOLI et al., 2000; EASTERBROOK et al., 2004; MALASPINA et al., 2008). Além disso, um estudo realizado em Malawi, mostrou que apesar de pacientes com perfis genotípicos idênticos pertencerem a um *cluster*, nenhum link epidemiológico aparente pode ser identificado (GLYNN et al., 2008). Em nosso estudo, não foi possível estabelecer links epidemiológicos.

Durante os períodos de 2000-2001 e 2011, foram identificados 8 *clusters* que estão mais envolvidos com transmissão recente na RMV, a maioria deles foi constituído por *clusters* de tamanho pequeno e médio.

No período de 2000-2001 que a maioria dos isolados submetidos a RFLP-IS6110 foram distribuídos em *clusters* pequenos e médios, tendo sido encontrado apenas um *cluster* grande nesse período. Esses resultados corroboram com outros estudos que relatam uma maior proporção de *clusters* pequenos e médios (SOLSONA et al., 2001)

[Digite aqui]

Embora em 2011, verificou-se uma grande proporção de genótipos de *M. tuberculosis* que estavam concentrados em 3 grandes *clusters*, dentre eles o ES14 e o ES8, responsáveis por 15% de todos os *clusters* circulantes na RMV nesse período. Estudos recentes têm focado no aparecimento de grandes *clusters* dentro da população e que são causadas por um único genótipo de Mtb (VICTOR et al., 2004; TEETER et al., 2013, ZAMMARCHI et al., 2014). Em algumas situações esses casos são atribuídos a um aumento na capacidade de transmissão ou replicação por uma cepa específica. (GLYNN et al., 2008; HOUBEN & GLYNN, 2009). No entanto, a frequência de *cluster* dentro da população pode estar altamente relacionada a prevalência da doença e políticas de controle locais (SUFFYS et al., 2000).

Um estudo realizado por Glynn e colaboradores (2004) mostrou que essas cepas podem estar envolvidas em uma longa cadeia de transmissão, podendo ser sujeitos a rearranjos genéticos mais frequentemente que genótipos envolvidos em pequenas cadeias de transmissão. Esses rearranjos genéticos são mais prováveis de acontecerem no MIRU-VNTR ao invés do RFLP.

Em nosso estudo o uso combinado do MIRU-VNTR com o RFLP mostrou uma correlação entre as técnicas de 42% em 2000-2001 e 43,5% em 2011. Supply e colaboradores (2006) mostrou que essa diferença entre dois métodos ocorreu em isolados com um número maior de IS6110. Mears e colaboradores (2014) em uma revisão, mostraram que embora o MIRU-VNTR tenha sido adotado mundialmente deve-se ter cuidado para estimar a taxa de *cluster* dentro de uma população.

Embora 22 novos *clusters* tenham sido encontrados em 2011, esses *clusters* foram formados por *clusters* pequenos. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo

[Digite aqui]

realizado por Glynn e colaboradores (1999) que mostraram que isolados com poucas bandas e tamanho pequeno são mais prováveis de serem idênticos ao acaso e menos prováveis de terem alguma ligação epidemiológica.

Embora as técnicas moleculares de genotipagem tenham evoluído muito no decorrer dos anos, cada marcador genético revela apenas pequena parte da informação genômica, e dependendo do marcador, diferentes estirpes exibirão genotipagem com perfis idênticos, sendo a análise de toda a sequência do genoma a forma mais precisa para a comparação das estirpes.

Em conclusão, o nosso trabalho permitiu identificar os genótipos que estão envolvidos na transmissão e disseminação da doença na Região Metropolitana de Vitória –ES, dessa forma poderemos direcionar os Programas de Controle da TB na contenção e redução da cadeia de transmissão da doença.

[Digite aqui]

CAPÍTULO 7

[Digite aqui]

7 CONCLUSÃO

As conclusões serão apresentadas conforme os objetivos:

7.1 Referentes aos objetivos 1 e 2:

- 1- Não foi estabelecido associação entre as variáveis clínicas e sócio-demográficas do estudo em relação ao tamanho dos *clusters*.
- 2- A família ES14 foi a mais prevalente na RMV entre 2000 a 2010.
- 3- A presença da deleção RD^{Rio} foi mais provável entre pacientes em *cluster* com 6-9 isolados.
- 4- Isolados pertencentes a linhagem LAM foram mais prováveis de pertencerem a *clusters* de tamanho médio e grandes (com 6-9 isolados e com ≥ 10 isolados).na RMV nos períodos de 2000 – 2010.

7.2 Referentes aos objetivos 1 e 3:

- 5- Foi observada uma maior proporção de pacientes em *cluster* pelo RFLP em 2011 em relação ao período de 2000-2001, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos analisados
- 6- Foi observado a presença de 8 *clusters* que estão mais envolvidos com transmissão recente na RMV durante os dois períodos estudados.
- 7- Os ES14 e o ES8, foram responsáveis por 15% de todos os clusters circulantes na RMV durante o período de 2011.
- 8- A dinâmica de modificação dos genótipos foi principalmente caracterizada pelo aumento do *cluster* ES14 e pela redução do *cluster* ES1f em 2011.

[Digite aqui]

- 9- Foi observado a formação de 22 novos *clusters* no período de 2011. No entanto, esses foram formados por pequenos *clusters*.
- 10- Para ambas as metodologias moleculares, RFLP IS6110 e MIRU-VNTR 24 loci foi observado um alto índice discriminatório.
- 11- Foi observado um número maior de isolados em *clusters* pelo RFLP IS6110 em relação ao MIRU-VNTR no período de 2000-2001, enquanto em 2011 observou-se um número maior de isolados em *cluster* pelo MIRU-VNTR.
- 12- Uma grande proporção de casos de TB na RMV pode ser causada por um pequeno número de genótipos circulantes nessa região.

[Digite aqui]

CAPÍTULO 8

[Digite aqui]

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKAR I., ZIGNOL M., FALZON D., RAVIGLIONE M., DITIU L., *et al.* **Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political leadership.** Lancet Infect Dis. 2013; 13 (6): 529-39.

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

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

ALONSO-RODRÍGUEZ N., MARTÍNEZ-LIROLA M., HERRÁNZ M., SANCHEZ-BENITEZ M., BARROSO P., INDAL-TB group, BOUZA E, GARCÌA de VIEDMA D. **Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology studies.** BMC Microbiol. 2008; 24; 8:34.

BAPTISTA I.M., OELEMANN M.C., OPROMOLLA D.V., SUFFYS P.N. **Drug resistance and genotypes of strains of Mycobacterium tuberculosis isolated from human immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(8):1147-52.

BARNES P.F., CAVE M.D. **Molecular epidemiology of tuberculosis.** N Engl J Med. 2003; 349 (12): 1149-56.

[Digite aqui]

BIFANI P.J., MATHEMA B., KUREPINA N.E., KREISWIRTH B.N. **Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains.** Trends Microbiol. 2002; 10 (1): 45-52.

BORGDORFF M.W., VAN SOOLINGEN D. **The re-emergence of tuberculosis: what have we learnt from molecular epidemiology?** Clin Microbiol Infect. 2013; 19(10):889-901.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**, 5ª Ed, Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Espírito Santo.** Brasília, 2012.

BRODIE D., SCHLUGER N.W. **The diagnosis of tuberculosis.** Clin Chest Med. 2005; 26 (2): 247-71.

BRUDEY, K., DRISCOLL, J. R., RIGOUTS, L., PRODINGER, W. M., GORI, A., ALHAJOJ, S. A., ALLIX, C., ARISTIMUNO, L., ARORA, J., BAUMANIS, V., BINDER, L., CAFRUNE, P., CATALDI, A., CHEONG, S., DIEL, R., ELLERMEIER, C., EVANS, J. T., FAUVILLE-DUFAUX, M., FERDINAND, S., GARCIA DE VIEDMA, D., GARZELLI, C., GAZZOLA, L., GOMES, H. M., GUTTIEREZ, M. C., HAWKEY, P. M., VAN HELDEN, P. D., KADIVAL, G. V., KREISWIRTH, B. N., KREMER, K., KUBIN, M., KULKARNI, S. P., LIENS, B., LILLEBAEK, T., HO, M. L., MARTIN, C., MOKROUSOV, I., NARVSKAIA, O., NGEOW, Y. F., NAUMANN, L., NIEMANN, S., PARWATI, I., RAHIM, Z., RASOLOFORAZANAMPARANY, V., RASOLONAVALONA, T., ROSSETTI, M. L., RUSCH-GERDES, S., SAJDUDA, A., SAMPER, S., SHEMYAKIN, I. G., SINGH, U. B., SOMOSKOVI, A., SKUCE, R. A., VAN SOOLINGEN, D., STREICHER, E. M., SUFFYS,

[Digite aqui]

P. N., TORTOLI, E., TRACEVSKA, T., VINCENT, V., VICTOR, T. C., WARREN, R. M., YAP, S. F., ZAMAN, K., PORTAELS, F., RASTOGI, N. e SOLA, C. ***Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology.** BMC Microbiol. 2006; v.6, p.23.

CAVE M.D., EISENACH K.D., TEMPLETON G., SALFINGER M., MAZUREK G., BATES J.H., CRAWFORD J.T. **Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*.** J Clin Microbiol. 1994; 32 (1): 262-6.

COHN D.L., O'BRIEN R.J. **The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries.** Int J Tuberc Lung Dis. 1998; 2 (1): 16-26.

COLE ST, BROSCHE R, PARKHILL J, GARNIER T, CHURCHER C, HARRIS D, GORDON SV, EIGLMEIER K, GAS S, BARRY CE 3RD, TEKAIA F, BADCOCK K, BASHAM D, BROWN D, CHILLINGWORTH T, CONNOR R, DAVIES R, DEVLIN K, FELTWELL T, GENTLES S, HAMLIN N, HOLROYD S, HORNSBY T, JAGELS K, KROGH A, MCLEAN J, MOULE S, MURPHY L, OLIVER K, OSBORNE J, QUAIL MA, RAJANDREAM MA, ROGERS J, RUTTER S, SEEGER K, SKELTON J, SQUARES R, SQUARES S, SULSTON JE, TAYLOR K, WHITEHEAD S, BARRELL BG. **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.** Nature. 1998; 393 (6685):537-44.

COSCOLLA M, GAGNEUX S. **Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*.** Semin Immunol. 2014; 26(6):431-44.

COSCOLLA M, GAGNEUX S. **Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity?** Drug Discov Today Dis Mech. Spring. 2010, 7(1):e43-e49).

DE BOER A.S., BORGDORFF M.W., DE HAAS P.E., NAGELKERKE N.J., VAN EMBDEN J.D., VAN SOOLINGEN D. **Analysis of rate of change of IS6110 RFLP**

[Digite aqui]

patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. J Infect Dis. 1999; 180 (4): 1238-44.

DELOGU G, SALI M, FADDA G. **The biology of mycobacterium tuberculosis infection.** Mediterr J Hematol Infect Dis. 2013 16;5(1), Review.

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

EASTERBROOK P.J., GIBSON A., MURAD S., LAMPRECHT D., IVES N., FERGUSON A., LOWE O., MASON P., NDUDZO A., TAZIWA A., MAKOMBE R., MBENGERANWA L., SOLA C., RASTOGI N., DROBNIIEWSKI F. **High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study.** J Clin Microbiol. 2004;42(10):4536-44.

FERRAZOLI L., PALACI M., MARQUES L.R., JAMAL L.F., AFIUNE J.B., *et al.* **Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil.** Int J Tuberc Lung Dis. 2000; 4 (1): 18-25.

FILLIOL, I., MOTIWALA, A. S., CAVATORE, M., QI, W., HAZBON, M. H., BOBADILLA DEL VALLE, M., FYFE, J., GARCIA-GARCIA, L., RASTOGI, N., SOLA, C., ZOZIO, T., GUERRERO, M. I., LEON, C. I., CRABTREE, J., ANGIUOLI, S., EISENACH, K. D., DURMAZ, R., JOLOBA, M. L., RENDON, A., SIFUENTES-OSORNIO, J., PONCE DE LEON, A., CAVE, M. D., FLEISCHMANN, R., WHITTAM, T. S. e ALLAND, D. **Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set.** J Bacteriol. 2006; 188 (2):759-772.

[Digite aqui]

FOK A., NUMATA Y., SCHULZER M., FITZ GERALD M.J. **Risk factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies.** Int J Tuberc Lung Dis 2008; 12: 480-92.

FOXMAN B., RILEY L. **Molecular epidemiology: focus on infeccion.** Am J Epidemiol 2001; 153: 1135-41.

FRIEDEN T.R., STERLING T.R., MUNSIFF S.S., WATT C.J., DYE C. **Tuberculosis.** Lancet. 2003; 362 (9387): 887-99.

GARCÍA DE VIEDMA D., ALONSO RODRÍGUEZ N., ANDRÉS S., MARTÍNEZ LIROLA M., RUIZ SERRANO M.J., BOUZA E.. **INDAL-TB working group Evaluation of alternatives to RFLP for the analysis of clustered cases of tuberculosis.** Int J Tuberc Lung Dis. 2006; 10(4):454-9.

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

GLAZIOU P., FALZON D., FLOYD K., RAVIGLIONE M. **Global epidemiology of tuberculosis.** Semin Respir Crit Care Med. 2013; 34 (1): 3-16.

GLYNN J.R., ALGHAMDI S., MALLARD K., MCNERNEY R., NDLOVU R., *et al.* **Changes in Mycobacterium tuberculosis genotype families over 20 years in a population-based study in Northern Malawi.** PLoS One. 2010 17; 5 (8): e12259.

GLYNN J.R., CRAMPIN A.C., TRAORE H., CHAGULUKA S., MWAFULIRWA D.T., *et al.* **Determinants of cluster size in large, population-based molecular epidemiology study of tuberculosis, northern Malawi.** Emerg Infect Dis. 2008; 14 (7): 1060-6.

[Digite aqui]

GLYNN J.R., CRAMPIN A.C., YATES M.D., TRAORE H., MWAUNGULU F.D., *et al.* **The importance of recent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in an area with high HIV prevalence: a long-term molecular epidemiological study in Northern Malawi.** J Infect Dis. 2005; 192 (3): 480-7.

GLYNN J.R., VYNNYCKY E., FINE P.E. **Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* derived from DNA fingerprinting techniques.** Am J Epidemiol 1999; 149: 366–71.

GLYNN J.R., YATES M.D., CRAMPIN A.C., NGWIRA B.M., MWAUNGULU F.D., BLACK GF, CHAGULUKA SD, MWAFULIRWA DT, FLOYD S, MURPHY C, DROBNIIEWSKI F.A., FINE P.E. **DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution, or laboratory error?** J Infect Dis. 2004 15; 190 (6): 1158-66.

GLYNN J.R., CRAMPIN A.C., TRAORE H., CHAGULUKA S., MWAFULIRWA D.T., ALGHAMDI S., NGWIRA B.M., YATES M.D., DROBNIIEWSKI F.D., FINE P.E. **Determinants of cluster size in large, population-based molecular epidemiology study of tuberculosis, northern Malawi.** Emerg Infect Dis. 2008, 14(7):1060-6.

GOMES H.M., ELIAS A.R., OELEMANN M.A., PEREIRA M.A., MONTES F.F., MARSICO A.G., KRITSKI A.L., FILHO LDOS A., CALDAS P.C., POSSUELO L.G., CAFRUNE P., ROSSETTI M.L., LUCENA N., SAAD M.H., CAVALCANTI H.R., LEITE C.Q., DE BRITO R.C., LOPES M.L., LIMA K., SOUZA M., TRINDADE RDE C., ZOZIO T., SOLA C., RASTOGI N., SUFFYS P.N. **Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil.** Infect Genet Evol. 2012, 12(4):649-56.

GOMES T., VINHAS S.A., REIS-SANTOS B., PALACI M., PERES R.L., AGUIAR P.P., RIBEIRO F.K., MARQUES H.S., DETTONI VDO V., JOHNSON J.L., RILEY L.W., MACIEL E.L. **Extrapulmonary tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis* strains and host risk factors in a large urban setting in Brazil.** PLoS One. 2013, 8 (10):e74517.

[Digite aqui]

GURJAV U., JELFS P., MCCALLUM N., MARAIS B.J., SINTCHENKO V. **Temporal dynamics of Mycobacterium tuberculosis genotypes in New South Wales, Australia.** BMC Infect Dis. 2014; 23 (14):455.

Houben R.M., Glynn J.R. **A systematic review and meta-analysis of molecular epidemiological studies of tuberculosis: development of a new tool to aid interpretation.** Trop Med Int Health. 2009; 14 (8): 892-909.

Hunter, P. R. e Gaston, M. A. **Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity.** J Clin Microbiol. 1988; 26 (11): 2465-2466.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 2014.

IPES (Instituto de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento Jones dos Santos Neves). **Região Metropolitana da Grande Vitória – RMGV.** Sistema gestor e informações básicas. Vitória, 2005.

Jasmer R.M., Ahn J.A., Small P.M., Daley C.L., Behr M.A., *et al.* **A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco.** Ann. Intern. Med. 1999; 130: 971–8.

Kamerbeek J., Schools L., Kolk A., Van Agterveld M., Van Soolingen., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., Van Embden. **J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology.** J Clin Microbiol. 1997; 35 (4): 907-14.

Kanduma E., Mchugh T.D., Gillespie S.H. **Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a user's guide.** J Appl Microbiol 2003; 94: 781-91.

[Digite aqui]

KENT P.T., KUBICA G.P. **Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory.** Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, U.S. Atlanta, Ga, 1985.

LAGO – PÉREZ L., HERRANZ M., BOUZA E., GARCÍA DE VIEDMA D. **Dynamic and complex *Mycobacterium tuberculosis* microevolution unrevealed by standard genotyping.** Tuberculosis. 2012; 92 (3): 232-5.

LAMRABET O., DRANCOURT M. **Genetic engineering of *Mycobacterium tuberculosis*: a review.** Tuberculosis. 2012; 92 (5): 365-76.

LAZZARINI L.C., SPINDOLA S.M., BANG H., GIBSON A.L., WEISENBERG S., DA SILVA CARVALHO W., AUGUSTO C.J., HUARD R.C., KRITSKI A.L., HO J.L. **RD^{RIO} *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitary pulmonary disease.** J Clin Microbiol. 2008; 46(7):2175-83.

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

MALASPINA A.C., CAVALCANTI H.R., LEITE C.Q., MACHADO S.M., VIANA B.H., SILVA R.M., HAGE E.F., FIGUEIREDO W.M., MARQUES E., FERRAZOLI L., ARBEX M., LESSI M., FONSECA L.S., RIGOUTS L., SAAD M.H. **Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* molecular typing in a tuberculosis low-endemic agro-industrial setting of Brazil.** Jpn J Infect Dis. 2008; 61(3):231-3.

MALHÃO T.A., OLIVEIRA G.P., CODENNOTI S.B., MOHERDAUI F. **Evaluation of Data Completeness in the Tuberculosis Notification Information System, Brazil, 2001–2006.** Epidemiol Serv Saúde. 2010, 3: 245–256.

[Digite aqui]

MILTGEN J., MORILLON M., KOECK J.L., VARNEROT A., BRIANT J.F., *et al.* **Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*.** Emerg Infect Dis. 2002; 8 (11): 1350 – 52.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para tratamento da tuberculose para o Programa de Saúde da Família.** Brasília, Brasil: Ministério da Saúde. 2002.

MOREIRA C.M., MACIEL E.L. **Completeness of tuberculosis control program records in the case registry database of the state of Espírito Santo, Brazil: analysis of the 2001–2005 period.** J Bras Pneumol. 2008, 34 (4): 225–229.

MOSTRÖM P., GORDON M., SOLA C., RIDELL M., RASTOGI N.. **Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis.** Clin Microbiol Infect. 2002; 8 (11): 694-704. Review.

MURRAY M. **Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99 (3): 1538-43.

NGUYEN L.N., GILBERT G.L., MARKS G.B. **Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis.** Respirology. 2004; 9 (3): 313-9.

PALACI M., DIETZE R., HADAD D.J., RIBEIRO F.K., PERES R.L., VINHAS S.A., MACIEL E.L., DO VALLE DETTONI V., HORTER L., BOOM W.H., JOHNSON J.L., EISENACH K.D. **Cavitary disease and quantitative sputum bacillary load in cases of pulmonary tuberculosis.** J Clin Microbiol. 2007; 45(12):4064-6.

PALACI M., PERES R.L., MAIA R., CUNHA E.A., RIBEIRO M.O., LECCO R., DE SOUZA RIBEIRO C., FERRO E SILVA R.R., VINHAS S.A., DIETZE R., VIANNA S., DE MORAIS C.G. **Contribution of the Ogawa-Kudoh swab culture method to the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazil.** Int J Tuberc Lung Dis. 2013; 17(6):782-6.

[Digite aqui]

PANDOLFI J.R., MALASPINA A.C., SANTOS A.C.B., SUFFYS P.N., OELLEMANN M.A.C., *et al.* **Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia.** Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2007; 28 (3): 251-257.

RUFFINO-NETTO A. **Tuberculosis: the neglected calamity.** Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35 (1): 51-8.

SAHADEVAN R., NARAYANAN S., PARAMASIVAN C.N., PRABHAKAR R., NARAYANAN P.R. **Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe.** J Clin Microbiol. 1995; 33 (11): 3037-9.

SAKULA A. **Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882.** Thorax. 1982; 37 (4): 246-51.

SAN PEDRO A., OLIVEIRA R.M. **Tuberculosis and socioeconomic indicators: systematic review of the literature.** Rev Panam Salud Publica. 2013; 33(4):294-301. Review.

SESA, GEVS, NEVE, SINAN-ES, 2014.

SHAMPUTA I.C., LEE J., ALLIX-BÉGUEC C., CHO E.J., LEE J.I., *et al.* **Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from a tertiary care tuberculosis hospital in South Korea.** J Clin Microbiol. 2010; 48 (2): 387-94.

SINAN/SIM/IBGE – www.saude.gov.br/sinanweb. Acessado em Abril 2013.

SMALL P.M., HOPEWELL P.C., SINGH S.P., PAZ A., PARSONNET J., RUSTON D.C., SCHECTER G.F., DALEY C.L., SCHOOLNIK G.K. **The epidemiology of tuberculosis in**

[Digite aqui]

San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med. 1994; 330(24):1703-9.

SMITH DR. **Restriction Endonuclease Digestion of DNA.** In: (Harwood AJ, Ed.). **Methods in Molecular Biology, vol. 58; Basic DNA and RNA protocols;** pp 11-15. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1996.

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

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

SUFFYS P.N., IVENS DE ARAUJO M.E., ROSSETTI M.L., ZAHAB A., BARROSO E.W., BARRETO A.M., CAMPOS E., VAN SOOLINGEN D., KREMER K., HEERSMA H., DEGRAVE W.M. **Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strain of Mycobacterium tuberculosis and comparison with an international fingerprint database.** Res Microbiol. 2000; 151 (5): 343-351.

SUPPLY P., ALLIX C., LESJEAN S., CARDOSO-OELEMANN M., RÜSCH-GERDES S., WILLERY E., SAVINE E., DE HAAS P., VAN DEUTEKOM H., RORING S., BIFANI P., KUREPINA N., KREISWIRTH B., SOLA C., RASTOGI N., VATIN V., GUTIERREZ M.C., FAUVILLE M., NIEMANN S., SKUCE R., KREMER K., LOCHT C., VAN SOOLINGEN D. **Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive**

[Digite aqui]

unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006; 44(12):4498-510.

SUPPLY P., LESJEAN S., SAVINE E., KREMER K., VAN SOOLINGEN D., AND LOCHT C. **Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units.** J Clin Microbiol. 2001; 39: 3563-71.

TANAKA M.M., ROSENBERG N.A., SMALL P.M. **The control of copy number of IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*.** Mol Biol Evol. 2004; 21 (12): 2195-201.

TARANTINO A.B., LEITÃO DE OLIVEIRA M.C. **Tuberculose.** Arq Bras Med. 1990; 64: 123-131.

TEETER L.D., HA N.P., MA X., WENGER J., CRONIN W.A., MUSSER J.M., GRAVISS E.A. **Evaluation of large genotypic *Mycobacterium tuberculosis* clusters: contributions from remote and recent transmission.** Tuberculosis. 2013, 93 Suppl:S38-46.

THORSON A., HOA N.P., LONG N.H., ALLEBECK P., DIWAN V.K. **Do women with tuberculosis have a lower likelihood of getting diagnosed? Prevalence and case detection of sputum smear positive pulmonary TB, a population-based study from Vietnam.** J Clin Epidemiol. 2004; 57(4):398-402.

THUMAMO B.P., ASUQUO A.E., ABIA-BASSEY L.N., LAWSON L., HILL V., *et al.* **Molecular epidemiology and genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex in the Cross River State, Nigeria.** Infect Genet Evol. 2012; 12 (4): 671-7.

[Digite aqui]

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

van EMBDEN J.D., CAVE M.D., CRAWFORD J.T., DALE J.W., EISENACH K.D., *et al.* **Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology.** J Clin Microbiol 1993; 31: 406-09.

van SOOLINGEN D., BORGDORFF M.W., DE HAAS P.E., SEBEK M.M., VEEN J., DESSENS M., KREMER K., VAN EMBDEN J.D. **Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997.** J Infect Dis. 1999, 180(3):726-36.

van SOOLINGEN D. **Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements.** J. Intern. Med. 2001; 249: 1–26.

van SOOLINGEN D., HERMANS P.W., DE HAAS P.E., SOLL D.R., VAN EMBDEN J.D. **Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis.** J Clin Microbiol. 1991; 29 (11): 2578-86.

VICTOR T.C., DE HAAS P.E., JORDAAN A.M., VAN DER SPUY G.D., RICHARDSON M., VAN SOOLINGEN D., VAN HELDEN P.D., WARREN R. **Molecular characteristics and global spread of Mycobacterium tuberculosis with a western cape F11 genotype.** J Clin Microbiol. 2004; 42(2):769-72.

VINHAS S. A., PALACI M., MARQUES H. S., LOBO DE AGUIAR P. P., RIBEIRO F. K., PERES R. L., DIETZE R., GOMES H. M., SUFFYS P. N., GOLUB J. E., RILEY L. W. e

[Digite aqui]

MACIEL E.L. ***Mycobacterium tuberculosis* DNA fingerprint clusters and its relationship with RD (Rio) genotype in Brazil.** Tuberculosis. 2012; 93(2):207-12.

WAYNE L.G., KUBICA G.P. **Genus *Mycobacteria*.** In: SNEATH P.H.A., MAIR N.S., SHARPE M.E., HOLT J.G. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Vol. 2. 9th Ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986. p. 1436 – 1457.

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

WENIGER T., KRAWCZYK J., SUPPLY P., NIEMANN S. e HARMSSEN D. **MIRUVNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria.** Nucleic Acids Res. 2010; 38(Web Server issue): W326-331.

WHO. **Global tuberculosis report 2012.** Geneva, Switzerland: WHO; 2012.

WHO. **Global tuberculosis report 2013.** Geneva, Switzerland: WHO; 2014.

WOOD R., LAWN S.D., CALDWELL J., KAPLAN R., MIDDELKOOP K., BEKKER L.G. **Burden of new and recurrent tuberculosis in a major South African city stratified by age and HIV-status.** PLoS One. 2011; 6(10):e25098.

YEH R.W., PONCE DE LEON A., AGASINO C.B., HAHN J.A., DALEYC.L., HOPEWELL P.C., SMALL P.M. **Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes.** J Infect Dis. 1998; 177 (4): 1107-11

[Digite aqui]

ZAMMARCHI L., TORTOLI E., BORRONI E., BARTALESI F., STROHMEYER M., BARETTI S., SIMONETTI M.T., LIENDO C., SANTINI M.G., ROSSOLINI G.M., GOTUZZO E., BARTOLONI A. **High prevalence of clustered tuberculosis cases in peruvian migrants in florence, italy. COHEMI project study group.** Infect Dis Rep. 2014; 6(4):5646.

ZUMLA A., RAVIGLIONE M., HAFNER R., VON REYN C.F. **Tuberculosis.** N Engl J Med. 2013, 21; 368 (8): 745-55.

[Digite aqui]

ANEXO A

Title: Risk factors associated with cluster size of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) of different RFLP lineages in Brazil.

[Digite aqui]

[Digite aqui]