

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

CARACTERIZAÇÃO DAS INFECÇÕES MISTAS NA  
TUBERCULOSE POR *SPOLIGOTYPING*, *MIRU-VNTR* EM  
COORTES DAS POPULAÇÕES GERAL E CARCERÁRIA DE  
RONDÔNIA E POR WGS EM GENOMAS DO BRASIL E DE  
MOÇAMBIQUE

**ÍCARO RODRIGUES DOS SANTOS**

Rio de Janeiro  
Janeiro de 2020

Rodrigues dos Santos, Ícaro.

CARACTERIZAÇÃO DAS INFECÇÕES MISTAS NA TUBERCULOSE POR SPOLIGOTYPING, MIRU-VNTR EM COORTES DAS POPULAÇÕES GERAL E CARCERÁRIA DE RONDÔNIA E POR WGS EM GENOMAS DO BRASIL E DE MOÇAMBIQUE / Ícaro Rodrigues dos Santos. - Rio de Janeiro, 2020.

159 f.

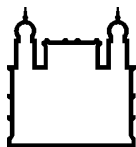
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientador: Philip Noel Suffys.

Co-orientador: Harrison Magdinier Gomes.

Bibliografia: f. 96-117

1. Biologia Molecular. 2. Tuberculose. 3. Infecção mista. 4. Genotipagem.  
5. Presídio. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*ÍCARO RODRIGUES DOS SANTOS*

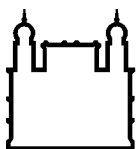
### **CARACTERIZAÇÃO DAS INFECÇÕES MISTAS NA TUBERCULOSE POR *SPOLIGOTYPING*, MIRU-VNTR EM COORTES DAS POPULAÇÕES GERAL E CARCERÁRIA DE RONDÔNIA E POR WGS EM GENOMAS DO BRASIL E DE MOÇAMBIQUE**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

**Orientadores:** Dr. Philip Noel Suffys e Dr. Harrison Magdinier Gomes

**RIO DE JANEIRO**

2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: ÍCARO RODRIGUES DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DAS INFECÇÕES MISTAS NA  
TUBERCULOSE POR *SPOLIGOTYPING*, MIRU-VNTR EM  
COORTES DAS POPULAÇÕES GERAL E CARCERÁRIA DE  
RONDÔNIA E POR WGS EM GENOMAS DO BRASIL E DE  
MOÇAMBIQUE**

**ORIENTADORES: Dr. PHILIP NOEL SUFFYS  
Dr. HARRISON MAGDINIER GOMES**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Antônio Basílio de Miranda – **Presidente e revisor**

**Profa. Dra.** Maria Cristina Vidal Pessolani

**Prof. Dra.** Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes

**Profa. Dra.** Fernanda Carvalho Queiróz Mello (Suplente)

**Profa. Dra.** Leila de Mendonça Lima (Suplente)

Rio de Janeiro, 24 de janeiro de 2020

“Não esmorecer para não desmerecer”  
Oswaldo Cruz

## AGRADECIMENTOS

À Joana D'arc Madeira, minha mãe, por tudo. Sei dos sacrifícios que fez para que eu chegasse até aqui. Não mediu esforços e sempre me incentivou. Obrigado também por ser orgulhar de mim.

Ao Paulo Albuquerque de Noronha, meu namorado, por ser meu parceiro em todos os momentos e por ter nascido no campo que não foi cultivado.

À Marcela Madeira, minha irmã, por ter pedido um irmão. Se não fosse por isso, talvez eu nem estivesse aqui. Apesar de nossas diferenças sempre quis o melhor para mim.

À minha tia, Helenira Madeira, por cortar as minhas primeiras unhas e guardá-las no dicionário. Sempre disse que minha inteligência veio desse ato. Não sabemos se é verdade, mas o que importa é a intenção. Acreditou e torceu por mim toda a minha vida.

Aos meus gatos, Azula, Dodô, Narciso, Raio Negro e Yoda, pela companhia e alegria que me trazem. Em especial ao Zini (*in memoriam*), que partiu no meu primeiro ano de doutorado, por ter sido o melhor gato que eu poderia ter.

Aos meus primos, Fagner Vinícius, Caroline Cristine, Igor e Mikael, por me permitirem acompanhar o crescimento de vocês, fazendo com que eu desenvolvesse responsabilidade enquanto passávamos bons momentos juntos. Espero que eu tenha ensinado algo que cada um de vocês possa levar para a vida.

Ao Ramiro Balzana, meu tio de coração, por ficar feliz só de beber uma cerveja comigo.

À Cordolina Madeira, minha avó, apesar de não estar mais entre nós, sua presença se faz constante. Seu legado vive em cada um de seus descendentes. Além disso, juro que aprendi a fazer os seus biscoitos de polvilho e passarei a receita adiante para os seus bisnetos.

À Kelly Menezes por todos esses anos como minha melhor amiga, parceira, confidente, conselheira e comadre. Obrigado por fazer parte da minha vida e por ser a extensão da minha família, além de ser mãe do meu afilhado. É a minha torcida organizada e, se fosse um time de futebol, jogaria em todas as posições por mim.

À Mayra Veríssimo, minha comadre, por todos os momentos divertidos e histórias que compartilhamos além de ter trazido o meu afilhado ao mundo.

Aos Gustavo e Guilherme, meus afilhados queridos, por representarem o que espero do futuro.

Aos meus compadres, Daenny e Daniel, por todos os momentos durante esse período.

Ao Alexandre Carvalho, meu tão estimado amigo, por ser a epítome do que gosto no mundo, por me presentear com o seu sorriso constante e por sorrir com a alma. Além do mais, por se preocupar e torcer mais por mim do que eu mesmo.

Ao Lucas Gossani, pela amizade e por todos os risos que tivemos, incluindo as gargalhadas com meus áudios cantando.

À Rayane Silva, minha aluna de iniciação científica, não apenas por ser uma excelente aluna, mas sem ela não teria finalizado essa tese.

Aos meus orientadores, Philip e Harrison, por abrirem as portas do LABMAM pra mim e pela oportunidade.

Aos meus amigos do LABMAM, incluindo os que não mais fazem parte da equipe, em especial Ana Carolina Wittmann, Victoria Moraes, Eloah Aguiar, Maria Carolina Sisco, Jéssica Oliveira e Lia Gomes.

Aos colaboradores do LACEN-RO, em especial Cleoni Mendes e Vivian Gonçalves.

À Emilyn Conceição por me acompanhar nessa jornada e por todo auxílio prestado sempre com a maior das gentilezas.

Aos meus companheiros de representação, Andreza Salvio e João Paulo Correia, por lutarem diariamente ao meu lado em tudo o que foi preciso.

À todos os amigos e colegas que fiz durante esse período na pós-graduação que participaram de algum modo no processo.

Aos colaboradores do Lab Bact por parte dos experimentos.

À banca, Antônio, Maria Cristina, Fátima Cristina, Fernanda e Leila.

Aos pacientes por se voluntariarem ao estudo. Sem eles nada disso seria possível.

À PGBCM, englobando todos os funcionários, pela qualidade do ensino e suporte que me foi dado.

À SEAC por toda estrutura e suporte.

À FIOCRUZ, em especial ao IOC, por me permitir fazer parte de tudo isso.

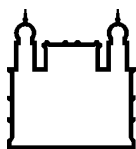
À CAPES que, apesar dos pesares, manteve a minha bolsa até o final do doutorado e permitiu a conclusão deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer aos que não foram citados, mas que de alguma forma estiveram presentes e ajudaram durante o processo.



“O sonho é poder...  
...Juntos teremos que  
O mundo defender.”

Por Janaína Bianchi, de Nico Nicolaiewsky



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

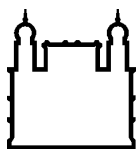
# CARACTERIZAÇÃO DAS INFECÇÕES MISTAS NA TUBERCULOSE POR *SPOLIGOTYPING*, MIRU-VNTR EM COORTES DAS POPULAÇÕES GERAL E CARCERÁRIA DE RONDÔNIA E POR WGS EM GENOMAS DO BRASIL E DE MOÇAMBIQUE

## ABSTRACT

### TESE DE DOUTORADO

**Ícaro Rodrigues dos Santos**

A tuberculose (TB), provocada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, é uma doença crônica contagiosa em aglomerados populacionais como as unidades prisionais. Neste trabalho realizou-se a identificação molecular de isolados de *M. tuberculosis* e investigação de infecção mista utilizando *spoligotyping* e MIRU-VNTR em 224 amostras de uma coorte do estado de Rondônia, populações geral e carcerária e análises de bioinformática em dois grupos distintos de genomas de micobactérias, sendo 30 genomas de Moçambique e 88 genomas da coleção do nosso laboratório. Amostras de escarro foram submetidas à baciloscopia, cultura para micobactérias, teste de sensibilidade aos antimicrobianos e identificação molecular pela técnica de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR demonstraram a diversidade dos isolados de *M. tuberculosis* circulantes na região havendo a predominância de 63,8% da família LAM, seguido da família X com 11,6%, Haarlem 6,3% e família T com 4%, além de dois isolados da família Ural e cinco da família EAI. Ainda, 18 novos perfis foram identificados, incluindo um perfil que há indícios de exclusividade do Brasil. Os resultados indicam que as cadeias de transmissão entre as populações geral e carcerária estão interligadas. As unidades prisionais apresentaram formação de grupos específicos de aglomerações e exclusividade das subfamílias T3 e X3. Entre a coorte de Rondônia, a taxa de resistência foi de 28% (4,8% MDR) e 46,6% entre os genomas analisados. Além disso, sugere-se que os isolados resistentes estão mais associados a população geral desse estudo e que processos evolutivos potencialmente associados ao surgimento de resistência. Foi detectada uma frequência de 19,3% de infecção mista pelo MIRU-VNTR e 80% por WGS; casos suscetíveis foram mais associados a infecção mista, exceto para casos MDR/XDR da coorte Brasil/Moçambique. Portanto, verifica-se a manutenção dos índices de TB em Rondônia, mas com uma diversidade maior do que o esperado, incluindo famílias com notificação em baixa frequência, bem como a indicação de que a presença da infecção mista pode ter importância clínica de acordo com a população.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **CHARACTERIZATION OF MIXED INFECTIONS IN TUBERCULOSIS BY SPOLIGOTYPING, MIRU-VNTR IN GENERAL AND PRISIONAL COHORTS OF RONDÔNIA AND BY WGS IN GENOMES OF BRAZIL AND MOZAMBIQUE**

#### **ABSTRACT**

#### **DOCTORAL THESIS**

**Ícaro Rodrigues dos Santos**

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is an infectious chronic disease in agglomerations such as prison units. In this work, the molecular identification of *M. tuberculosis* isolates and investigation of mixed infection using spoligotyping and MIRU-VNTR was carried out in 224 samples of a cohort in the state of Rondônia, general and prison populations and bioinformatics analyzes in two distinct groups of mycobacterial genomes, 30 genomes from Mozambique and 88 genomes from the collection of our laboratory. Samples were analyzed with sputum smear microscopy, mycobacterial culture, antimicrobial susceptibility test and molecular identification using the Spoligotyping and MIRU-VNTR technique which revealed the diversity of *M. tuberculosis* isolates present in the region, with a predominance of 63.8% of the family LAM, followed by family X with 11.6%, Haarlem 6.3% and family T with 4%, in addition to two isolates from the Ural family and five isolates from the EAI family. In addition, 18 new profiles were identified, including a profile that shows signs of being exclusive to Brazil. The results indicate that the transmission chains between the general and prison populations are interconnected. The prison units showed specific groups of agglomerations, and subfamilies T3 and X3 were exclusive to this population. In the Rondônia cohort, the resistance rate was 28% (4.8% MDR) and 46.6% among the analyzed genomes. In addition, the results suggest that resistant isolates are more associated with the general population of this study and that evolutionary processes potentially associated with the emergence of resistance. We detected a frequency of 19.3% of mixed infection by MIRU-VNTR and 80% by WGS; susceptible cases were more associated with mixed infection, except for MDR/XDR cases from the Brazil/Mozambique cohort. Therefore, the TB rates in Rondônia persist, with a greater than expected diversity, including families with low frequency notification. The suggestion of mixed infection may have clinical importance according to the population.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE SIGLAS.....	x
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epidemiologia da Tuberculose.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Transmissão.....	1
1.1.2 Números.....	6
1.1.3 Prisão.....	10
1.1.4 Evidências de Infecção Mista.....	11
<b>1.2 Caracterização do agente etiológico.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Resistência e suscetibilidade aos antimicrobianos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Tipagem molecular.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP).....	22
1.4.2 <i>Spoligotyping</i> .....	23
1.4.3 MIRU-VNTR.....	26
1.4.4 Sequenciamento de genoma completo.....	28
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1 Objetivo geral:.....	33
2.2 Objetivos específicos:.....	33
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Desenho de estudo, pacientes e amostras.....</b>	<b>34</b>
3.1.1 Critérios de Inclusão.....	36
3.1.2 Critérios de Exclusão.....	36
3.1.3 Aspectos éticos.....	36
3.2 Cultura de micobactérias, armazenamento e extração de DNA.....	36
<b>3.3 Fenótipos e genótipos associados a resistência aos antimicrobianos.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4. Genotipagem.....</b>	<b>37</b>
3.4.1 <i>Spoligotyping</i> .....	37
3.4.2 MIRU-VNTR.....	38
3.4.3 Análises de <i>spoligotyping</i> e MIRU-VNTR.....	38
<b>3.5 Análise de sequências genômicas.....</b>	<b>39</b>
3.5.1 Tipagem molecular digital e identificação de polimorfismos de resistência a partir de genomas.....	39
3.5.2 Identificação de infecção policlonal através de análise de sequência de genoma.....	40
3.5.2.1 <i>Variant Call</i> .....	40
3.5.2.2 Caracterizando chamadas de bases heterozigotas.....	41
3.5.2.3 Detecção de infecção mista usando as chamadas de bases heterozigotas.....	41
3.6 Análises estatísticas e produção de gráficos.....	42
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>

4.1 Pacientes e amostras.....	43
4.2 Faixa etária e sexo .....	44
4.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	44
4.4 Tipagem molecular por <i>spoligotyping</i> .....	45
4.5 Baciloscopia e famílias de <i>spoligotyping</i> .....	49
4.6 MIRU-VNTR .....	51
4.6.1 <i>Minimum Spanning Tree</i> (MST) .....	51
4.6.2 SUGESTÃO DE INFECÇÃO MISTA .....	54
4.6.2.1 investigando os isolados mistos .....	54
4.6.3 Caracterização dos padrões de <i>spoligotyping</i> ausentes no banco de dados ...	57
4.7 Isolados de <i>M. tuberculosis</i> provenientes de amostras clínicas do mesmo paciente coletadas em diferentes momentos .....	57
4.7.1 MIRU-VNTR das amostras do mesmo paciente .....	62
<b>PARTE II.....</b>	<b>66</b>
4.8 Análises genômicas.....	66
4.8.1. Infecção mista por sequenciamento genômico em amostras com fenótipo de resistência.....	66
4.8.2 Genomas de uma coorte do Brasil .....	69
4.8.2.1 Infecções mistas .....	73
4.8.2.2 Número de isolados presentes por amostra nas diversas sublinhagens .....	76
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
Famílias por <i>spoligotyping</i> .....	80
MIRU-VNTR.....	83
Sugestão de infecção mista .....	85
Evidências de infecção mista em WGS .....	90
Genomas exclusivamente do Brasil .....	93
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>137</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: CASCATAS DE TRANSMISSÃO DA TUBERCULOSE.....	3
FIGURA 1.2: TAXAS ESTIMADAS DA INCIDÊNCIA DE TB EM 2018.....	7
FIGURA 1.3. COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA DE TUBERCULOSE (POR 100 MIL HAB.), BRASIL, 2009-2018.....	9
FIGURA 1.4. DOENÇA RECORRENTE E INFECÇÕES COM ESTIRPES MISTAS DE M. TUBERCULOSIS.....	12
FIGURA 1.5. FILOGEOGRAFIA GLOBAL DOS MEMBROS DO CMTB ADAPTADOS AO HOMEM.....	14
FIGURA 1.6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO DE UM ISOLADO HIPOTÉTICO DE M.....	21
<b>FIGURA 1.7. ESTRUTURA DO LOCUS DR NO GENOMA MICOBACTERIANO.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 3.1. FLUXO DE DESENVOLVIMENTO DAS PARTES I E II.....</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA 4.1. IDADE DOS PACIENTES.....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 4.2. GRÁFICOS COM A DISTRIBUIÇÃO DAS FAMÍLIAS DEFINIDAS POR SPOLIGOTYPING ENTRE AS POPULAÇÕES (GERAL E CARCERÁRIA).....</b>	<b>46</b>
<b>FIGURA 4.3. DISTRIBUIÇÃO DE 167 ISOLADOS POR SPOLIGOTYPING DA POPULAÇÃO GERAL E 56 ISOLADOS DA POPULAÇÃO CARCERÁRIA.....</b>	<b>47</b>
FIGURA 4.4. DISTRIBUIÇÃO DAS FAMÍLIAS NOS ANOS 2014 E 2015 ENTRE A POPULAÇÃO GERAL E CARCERÁRIA.....	48
<b>FIGURA 4.5. MINIMUM SPANNING TREE BASEADA NOS RESULTADOS DE MIRU-VNTR- 15.....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 4.6. NEIGHBORJOINING TREE DA VARIAÇÃO POR AMOSTRA.....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURA 4.7. COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA ENTRE TSA FENOTÍPICO E WGS.....</b>	<b>67</b>
<b>FIGURA 4.8. SUBLINHAGENS IDENTIFICADAS NOS 88 GENOMAS.....</b>	<b>69</b>
<b>FIGURA 4.9. DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DE ACORDO COM AS LINHAGENS.....</b>	<b>72</b>
<b>FIGURA 4.10. DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DE ACORDO COM AS LINHAGENS.....</b>	<b>73</b>
<b>FIGURA 4.11. INFECÇÃO MISTA DE M. TUBERCULOSIS DE ACORDO COM A SUBLINHAGEM.....</b>	<b>74</b>
<b>FIGURA 4.12. PROPORÇÃO DE INFECÇÃO MISTA DE ACORDO COM O PERFIL DE RESISTÊNCIA. A. FENOTÍPICO. B. GENOTÍPICO.....</b>	<b>75</b>
<b>FIGURA 4.13. RELAÇÃO DO NÚMERO DE ISOLADOS DETECTADOS NA INFECÇÃO MISTA EM SUAS RESPECTIVAS SUBLINHAGENS E PERFIS DE RESISTÊNCIA.....</b>	<b>77</b>

## **LISTA DE QUADROS**

<b>QUADRO 1.1. PRINCIPAIS REGIÕES ASSOCIADAS COM RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM M. TUBERCULOSIS. ADAPTADO DE CIRILLO ET AL. 2017.</b>	<b>18</b>
<b>QUADRO 4.1. PADRÕES NOVOS OU ÓRFÃOS. ....</b>	<b>49</b>
<b>QUADRO 4.2. PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS XDR EM ANÁLISES MOLECULARES. ....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.1. CORRESPONDÊNCIA DOS ISOLADOS DE CMTB ADAPTADOS AOS HUMANOS IDENTIFICADOS PELOS PRINCIPAIS MÉTODOS DE TIPAGEM E A ÚLTIMA NOMENCLATURA. ADAPTADA DE BARBIER &amp; WIRTH, 2016.....</b>	<b>22</b>
<b>TABELA 4.1. CIDADES/LOCAIS DOS PACIENTES, NÚMERO E FREQUÊNCIA. ....</b>	<b>43</b>
<b>TABELA 4.2. RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DOS 224 ISOLADOS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>. ....</b>	<b>45</b>
<b>TABELA 4.3. SITS DE ACORDO COM O BANCO DE DADOS INTERNACIONAL SITVIT2 .</b>	<b>48</b>
<b>TABELA 4.4. CLASSIFICAÇÃO BASEADA NA COMBINAÇÃO DE MIRU-VNTR E SPOLIGOTYPING.....</b>	<b>51</b>
<b>TABELA 4.5. EXEMPLO DO ESQUEMA DE SEPARAÇÃO DOS PICOS DUPLOS.....</b>	<b>54</b>
<b>TABELA 4.6. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE UM MESMO PACIENTE DISPOSTAS EM ORDEM CRONOLÓGICA DE COLETA. ....</b>	<b>60</b>
<b>TABELA 4.7. NÚMERO DE REPETIÇÕES DO MIRU-VNTR ENTRE AS AMOSTRAS DOS MESMOS PACIENTES.....</b>	<b>64</b>
<b>TABELA 4.8. RELAÇÃO DAS AMOSTRAS COM INFECÇÃO MISTA ENTRE OS GENOMAS DO BRASIL E MOÇAMBIQUE OBTIDOS COM <i>MIXEDINFECTR</i>.....</b>	<b>68</b>
<b>TABELA 4.9. FENÓTIPO E GENÓTIPO DE RESISTÊNCIA. ....</b>	<b>70</b>



## LISTA DE SIGLAS

AD	frequência alélica
AG	aminoglicosídeos injetáveis
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BR	Brasil
CAS	Ásia Central
CC	complexos clonais
CGPNCT	Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CRISPR	Repetições palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	profundidade do sequenciamento
DR	repetições diretas
DR	resistência aos antimicrorganismos
EAI	East African Indian
EMB	etambutol
ETH	etionamida
FIMCA	Faculdades Integradas Aparício Carvalho
FQ	fluoroquinolonas
G+C	guanina e citosina
GT	genótipo
GyrA	DNA girasse
H	Harleem
Hab	habitantes
HIV	síndrome da imunodeficiência humana
<i>indels</i>	inserções e deleções
INH	isoniazida
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IS	sequências de inserção
Lab Bact/INI	Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios em Micobactérias/Intituto Nacional de Infectologia
LACEN/RO	Laboratório Central de Saúde Pública de Rondônia
LAM	Latin American-Mediterranean

MIRU-VNTR	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats</i>
MLST	tipagem de sequência multilocus
Mono-INH	monorresistência a isoniazida
MPTR	<i>Major Polymorphic Tandem Repeats</i>
MS	Ministério da Saúde
MST	<i>minimum spanning tree</i>
MZB	Moçambique
ND	não determinado
NJ	<i>Neighbor Joining</i>
ODM	Objetivos do Milênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PE	prolina e ácido glutâmico
PGRS	polimorfismo de sequências repetitivas ricas em GC
PPE	prolina, prolina e ácido glutâmico
PZA	pirazinamida
RD	regiões de diferença
RDRQ	região determinante de resistência a quinolonas
RDRR	região determinante de resistência a rifampicina
RFLP	análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição
RIF	rifampicina
RNA	ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerase
rpoB	subunidade b da RNAP
RR-TB	resistentes a rifampicina
Sens.	Sensível
SIT	<i>Shared International Type</i>
SNP	polimorfismos de único nucleotídeo
SNV	variants de único nucleotídeo
<i>Spoligotyping</i>	<i>spacer oligonucleotide typing</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	tuberculose
TB-MDR	tuberculose multirresistente

TB-SPRINT	<i>tuberculosis-spoligo-rifampin-isoniazid typing</i>
TB-XDR	tuberculose extremamente resistente
TDO	terapia observada diretamente
TSA	teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
WGS	sequenciamento de genoma completo
µm	micrômetro

# 1 INTRODUÇÃO

Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, um dos maiores problemas de saúde pública, uma das 10 principais causas de morte no mundo e principal causa de morte causada por um agente infeccioso. Tem como agente etiológico o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que se dispersa quando indivíduos com TB expõem bactérias no ar, por exemplo, pela tosse. Tipicamente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas também pode afetar outros locais (TB extrapulmonar). Aproximadamente, um quarto da população mundial está infectada por *M. tuberculosis* e está em risco de desenvolver a doença (WHO, 2019).

TB é uma doença antiga – estudos de esqueletos humanos mostram que ela tem afetado humanos por milhares de anos – mas sua causa permanecia desconhecida até 24 de março de 1882, quando o Dr. Robert Koch anunciou sua descoberta do bacilo e o nomeou *Mycobacterium tuberculosis* (Koch, 1882; Sakula, 1982; Hershkovitz *et al.*, 2015).

A doença pode afetar qualquer um, qualquer lugar, mas a maioria das pessoas que desenvolvem TB (cerca de 90%) são adultos – maior proporção de homens – e os índices de casos em níveis nacionais variam de 50 a mais de 5000 para cada 1 milhão da população por ano. Quase 90% dos casos anuais se concentram em 30 países com alta taxa de TB. Globalmente, estima-se que 1,7 bilhão de pessoas estejam infectadas com *M. tuberculosis* e estão, portanto, sob risco de desenvolver a doença (WHO, 2019).

## 1.1 Epidemiologia da Tuberculose

### 1.1.1 Transmissão

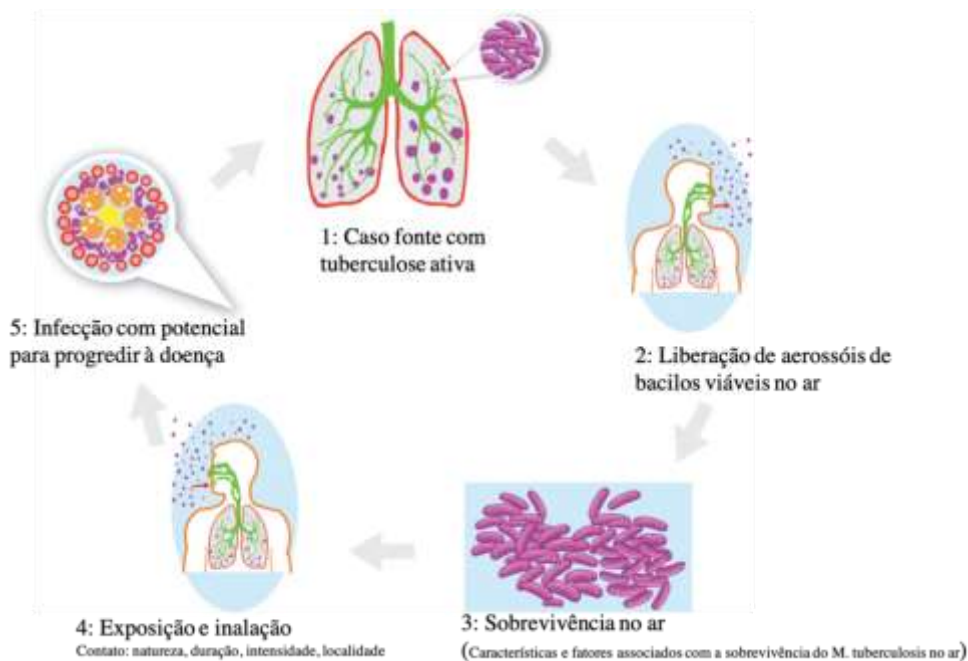
William Osler, em 1909, escreveu, como citado por Dobbs & Kimmerling (2008) que ‘todos aqueles que se misturam com pacientes com tuberculose são infectados, mas permaneceram bem pelo tempo que eles se cuidaram e mantiveram o solo em condições desfavoráveis para o crescimento da semente’.

Ao longo de um século de pesquisa sobre tuberculose, nossa compreensão da transmissão da tuberculose e da progressão da doença foi aprimorada: em 1934, Wells descreveu tempos de queda e evaporação para núcleos de gotículas e Riley, em 1961, descreveu a deposição de bactérias transportada pelo ar no pulmão e, em 1959-1962, descreveu a disseminação aérea de *M. tuberculosis* em uma enfermaria de tuberculose (Devoto, 1934; Riley, 1959, 1962). Chapman, em 1964, descreveu os fatores sociais e outros fatores associados com a transmissão da tuberculose em famílias afetadas por tuberculose.

Indivíduos com tuberculose laríngea ou pulmonar ativa geram núcleo de gotículas que contém *M. tuberculosis* através da tosse, canto, grito, espirro ou qualquer outra manobra expiratória forçada que cisalha secreções respiratórias das vias aéreas, com a tosse sendo a mais eficiente em gerar aerossóis infecciosos (Turner & Bothamley, 2015).

Uma visão amplamente aceita é que a infectividade dos pacientes diminui suficientemente depois de duas semanas de tratamento antituberculose a um ponto tal que a transmissão para os contatos se torne improvável (Dharmadhikari *et al.*, 2014, Yates *et al.*, 2016).

Churchyard e colaboradores, em 2017, redefiniram a cascata proposta por Dowdy e colaboradores (2014) que segue: (1) um caso de origem da tuberculose (2) gerando partículas infecciosas (3) que sobrevivem no ar e (4) são inaladas por um indivíduo suscetível (5) que pode se tornar infectado e que então pode desenvolver a tuberculose (**figura 1.1**).



**Figura 1.1. Cascata de transmissão da tuberculose.** (Fonte: The Aurum Institute. Adaptado de Churchyard *et al.*, 2017)

A intensidade da transmissão local de TB é dependente da prevalência (e infectividade) de indivíduos com formas infecciosas de TB, o número (e suscetibilidade) de indivíduos com quem os indivíduos infecciosos terão contato, a frequência e proximidade das interações entre indivíduos infecciosos e suscetíveis, bem como características biológicas de *M. tuberculosis* que afetam a transmissão (Mathema *et al.*, 2017), de modo que diferentes isolados podem ser adaptados para ter maior sobrevivência no ar, maior capacidade de dispersão e mecanismos que favorecem o sucesso da infecção.

Em cenários com carga alta de tuberculose, a transmissão é mais provável de ocorrer fora de casa, em escolas, transporte público, locais de trabalho, centros de saúde, minas e prisões (Corbett *et al.*, 2007; Escombe *et al.*, 2010; Johnstone-Robertson *et al.*, 2011; Andrews *et al.*, 2013; Andrews *et al.*, 2014; Telisinghe *et al.*, 2014; Yates *et al.*, 2016). Entretanto, visar famílias afetadas pela tuberculose para o rastreamento da infecção, teste para HIV e encaminhamento para o tratamento da tuberculose ou da infecção por *M. tuberculosis* permanece como prioridade devido a alta prevalência de tuberculose e infecção por *M. tuberculosis* entre contatos dentro de casa (Churchyard *et al.*, 2017).

As taxas de contatos podem ser reduzidas através de desenvolvimento socioeconômico levando à redução de aglomeração, melhoria na nutrição para diminuir a progressão para tuberculose. Controle aprimorado da infecção também inclui desenvolvimento socioeconômico, principalmente melhorias de ventilação em áreas onde o contato é mais provável de ocorrer, como nos locais supracitados (Dowdy *et al.*, 2014; Hermans *et al.*, 2015).

A infectividade dos casos de tuberculose pode ser definida clinicamente, incluindo a presença de tosse e organismos ácido-resistentes no escarro, quando indivíduos ainda não receberam a terapia efetiva contra tuberculose. Entretanto, infectividade pode estar presente antes dos sintomas se manifestarem (Dowdy *et al.*, 2014, Esmail *et al.*, 2014, Esmail *et al.*, 2016).

Apesar disso, há um espectro no curso clínico da tuberculose (Barry *et al.*, 2009), que inclui: tuberculose subclínica (caracterizada por resultados negativos na triagem de sintomas da tuberculose, mas com resultados positivos na cultura, com tuberculose presumivelmente infecciosa); doença pré-diagnóstico (caracterizada pelos sintomas que são suficientemente perceptíveis para a detecção sintomática, mas não graves o suficiente para buscar cuidados médicos); e doença clínica (caracterizada pela busca ativa de tratar os sintomas, apesar de que frequentemente ocorre apenas depois de um atraso devido às dificuldades de diferenciação entre outras infecções do trato respiratório em locais onde o diagnóstico clínico permanece como a prática padrão).

Fatores relacionados ao hospedeiro podem aumentar um risco individual de progressão para doença pulmonar ativa após a infecção. Determinantes relacionados ao hospedeiro incluem: infecção por HIV (Corbett *et al.*, 2002), diabetes (Jeon & Murray, 2008), consumo de cigarro (Lin & Murray, 2007) e excesso de álcool (Lönnroth *et al.*, 2008) e desnutrição (Menon *et al.*, 2016).

Quatro principais abordagens são usadas para mensurar a transmissão da tuberculose e identificar seus condutores. A primeira abordagem é a taxa de notificação dos casos, que é utilizada para identificar países e regiões nas quais o risco de tuberculose é alto (WHO, 2015). Taxas de notificações também podem gerar tendências temporais de transmissão (Hermans *et al.*, 2015); além disso, elas podem ser usadas para identificar populações de risco

em locais com baixa incidência entre estrangeiros, prisioneiros e moradores de rua (Broekmans *et al.*, 2002), bem como a heterogeneidade do risco entre comunidades dentro de cenários com alta incidência (transporte público (Andrews *et al.*, 2013), igrejas (Murray *et al.*, 2009), escolas (Andrews *et al.*, 2014 e 2015), bares (Murray *et al.*, 2013) e favelas (Koenig *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2015; Wobudeya *et al.*, 2015).

A segunda abordagem é a estimativa do risco de ser infectado e identificar os fatores de riscos por ser infectado. Esta abordagem usa a prova cutânea da tuberculina e ensaios de liberação de interferon  $\gamma$  para identificar infecções. Estimativas de tendências no risco anual de infecção tem sido derivadas de avaliações repetidas, frequentemente incluindo crianças na escola primária (Stýblo *et al.*, 1969, Odhiambo *et al.*, 1999, Kritzinger *et al.*, 2009).

Além disso, em cenários de alta transmissão, episódios de infecção repetida não podem ser facilmente identificados com estes tipos de ensaios de infecção que fornecem alguma medida da exposição cumulativa. Para estimar infecções recentemente adquiridas, triagem para a infecção por *M. tuberculosis* também pode ser feita nas investigações de contatos e entre os grupos de riscos, como imigrantes de países com alta carga ou profissionais da saúde (Mathema *et al.*, 2017).

Desde que a tipagem molecular de isolados se tornou avaliável nos anos 1990 (van Embden *et al.*, 1993), uma terceira abordagem, acessar as ligações genotípicas entre o presumido caso índice de tuberculose e seus presumidos casos secundários, se tornou possível. Em nível populacional, métodos como n-1 e outras técnicas baseadas em modelagem tem sido desenvolvidas para níveis estimados de transmissão, baseados em agrupamento genotípico (Small *et al.*, 1994; Yeun *et al.*, 2013; France *et al.*, 2015; Kasaie *et al.*, 2015). Estudos de epidemiologia molecular também tem confirmado que adolescentes estão no grupo de alto risco para a transmissão de tuberculose, estabelecendo a importância da transmissão nosocomial (Wobudeya *et al.*, 2015), além de identificarem outros fatores de risco para transmissão recente, incluindo residência urbana, falta de moradia (Bamrah *et al.*, 2013) e a exposição a ambientes lotados, como prisões (Sacchi *et al.*, 2015; Valença *et al.*, 2015).



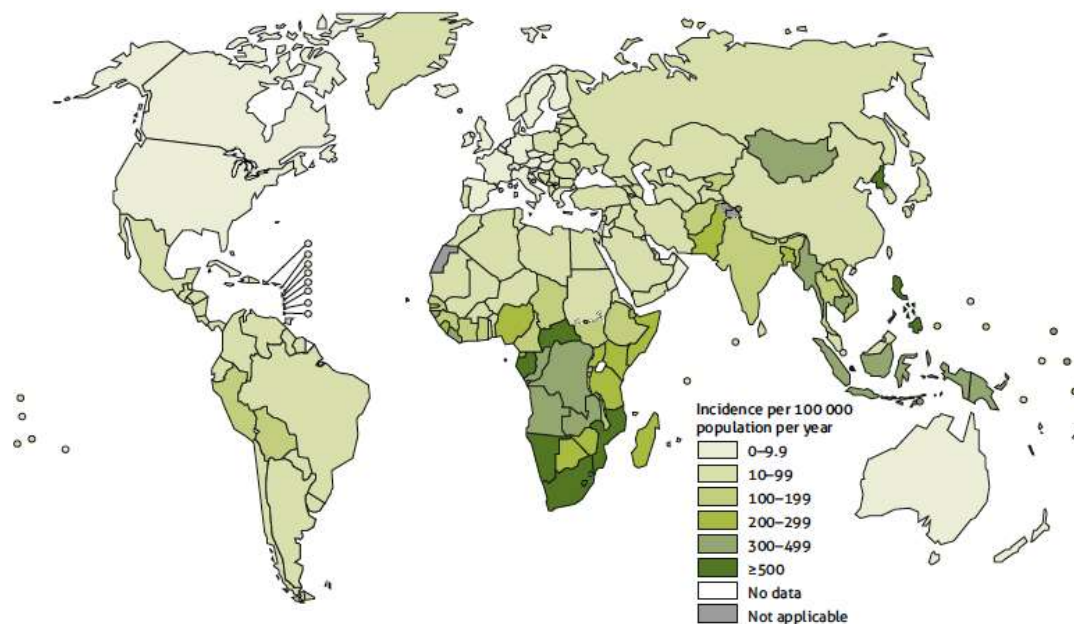
Com o avançar do tempo, a resolução da tipagem dos isolados foi aprimorada; o sequenciamento do genoma completo (WGS) agora providencia a habilidade máxima de distinguir isolados com base nas diferenças de simples nucleotídeos (Walker *et al.*, 2014). Diferentes das abordagens anteriores que dependem da transmissão e do risco de progressão da infecção para doença.

A quarta e indireta abordagem tem sido a caracterização da fonte dos casos. Tradicionalmente, medidas da carga bacilar a partir do esfregaço do escarro e a presença e extensão da cavitação pulmonar tem sido utilizadas para estimar a infectividade dos casos iniciais como uma busca pelo número de casos esperado de contatos infectados e casos secundários (Rieder, 1999). Ainda mais recentemente, novas formas de avaliar a infectividade foram desenvolvidas (Fennely *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2016).

Por fim, intervenções que tenham como alvo a bactéria, o hospedeiro ou catalisadores comportamentais da transmissão irão interromper a transmissão da tuberculose e acelerar o declínio na incidência e mortalidade da tuberculose (Dowdy *et al.*, 2014).

### **1.1.2 Números**

Globalmente, estima-se que 10 mi (9-11 mi) de pessoas desenvolveram TB em 2018, número que tem sido relativamente estável nos últimos anos. A carga da doença varia enormemente entre os países, de pouco mais que cinco para mais que 500 novos casos por 100 000 habitantes por ano, com a média global sendo cerca de 130 (WHO, 2019) (**figura 1.2**).



**Figura 1.2: Taxas estimadas da incidência de TB em 2018.** (retirado de WHO, 2019)

Estima-se que ocorreram 1,2 mi de mortes por TB entre a população HIV-negativa em 2018 (redução de 27% em relação ao ano 2000 que foi de 1,7 mi), e um adicional de 251 mil mortes (223-281 mil) entre indivíduos HIV-positivos (redução de 60% em relação ao ano 2000, 620 mil) (WHO, 2019).

TB afeta pessoas de ambos os sexos em todas as faixas etárias, mas as taxas mais altas são em homens (com 15 anos ou mais velhos), que respondem por 57% de todos os casos de TB em 2018. Enquanto, mulheres representam 32% e crianças (abaixo dos 15 anos) correspondem a 11%. Entre todos os casos de TB, 8,6% eram pessoas vivendo com HIV (PLHIV) (WHO, 2019).

Geograficamente, a maior parte dos casos de TB em 2018 ocorreram nas regiões do sudeste da Ásia (44%), África (24%) e Pacífico Ocidental (18%), com percentagens menores no Mediterrâneo Oriental (8%), nas Américas (3%) e Europa (3%). Oito países contabilizaram dois terços do total global: Índia (27%), China (9%), Indonésia (8%), as Filipinas (6%), Paquistão (6%), Nigéria (4%), Bangladesh (4%) e África do Sul (3%). Estes e outros 22 países, incluindo o Brasil, estão na lista da WHO dos 30 países com altas taxas de TB que correspondem a 87% dos casos mundiais (WHO, 2019).

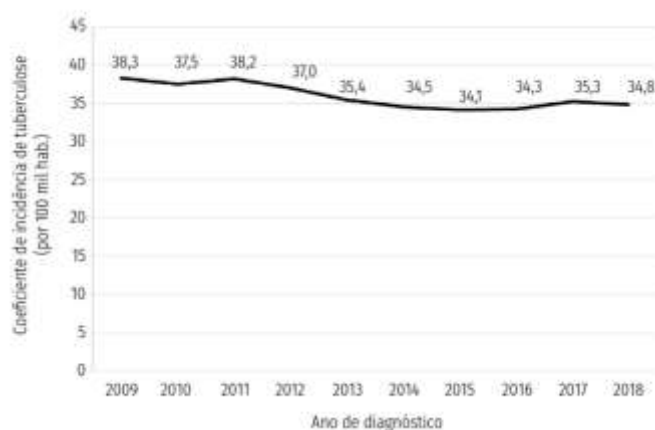
Entre os 30 países, três destes se mostraram com taxas de incidência *per capita* evidentemente mais baixas: Brasil, China e Rússia, com as estimativas de 45, 61 e 54, respectivamente, para cada 100 mil habitantes.

Visando a redução desta doença, o Plano Global para o Combate da Tuberculose 2011-2015 (*The Global Plan to Stop Tuberculosis 2011-2015*) proposto pela OMS (Organização Mundial de Saúde) teve a finalidade de reduzir drasticamente a carga da doença até 2015; isto foi feito de acordo com o que foi pactuado nos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) onde a Tuberculose aparece no 6º objetivo intitulado: combater a AIDS, a malária e outras doenças. O Plano ainda apresenta como principal meta a eliminação da tuberculose como problema de saúde pública até o ano 2050.

Segundo o Ministério da Saúde (2016), o Brasil atingiu as metas propostas pela OMS em 2015, bem como a redução dos coeficientes de prevalência e de mortalidade previstos.

Seguindo a Estratégia pelo Fim da Tuberculose da OMS (WHO, 2015), o Ministério da Saúde (MS), por meio da Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (CGPNCT), lançou o Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública (Plano Nacional) (Brasil, 2017), com metas para reduzir os coeficientes de incidência da doença para menos de 10 casos e de mortalidade para menos de um óbito a cada 100 mil habitantes até 2035. As estratégias estão organizadas em três eixos: 1 – prevenção e cuidado integrado centrados na pessoa com tuberculose; 2 – políticas arrojadas e sistema de apoio; e 3 – intensificação da pesquisa e inovação.

No Brasil, em 2018, foram diagnosticados 72.788 casos novos de TB, o que corresponde a um coeficiente de incidência de 34,8 casos/100 mil hab (**figura 1.3**). Embora, tenha sido observada uma queda média anual de 1,0% no período de 2009 a 2018, o coeficiente de incidência aumentou nos anos de 2017 e 2018 em relação ao período de 2014 a 2016 (Brasil, 2019).



**Figura 1.3. Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil hab.), Brasil, 2009-2018. (Brasil, 2019).**

As taxas de incidência e de mortalidade por tuberculose, no Brasil, foram reduzidas a cada ano até o ano de 2017, em que foram registrados 4.534 óbitos pela doença, o que equivale ao coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/100 mil hab., o mesmo obtido no ano anterior. De 2008 a 2017, o decréscimo médio anual do indicador foi igual a 2,1%, com queda de 2008 a 2012 e posterior estabilização (Brasil, 2017 e 2019).

No entanto, esses resultados não foram homogêneos entre as unidades federais e capitais, e também não são suficientes para se alcançarem as metas do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública (Brasil, 2017).

O aumento do coeficiente de incidência da TB nos dois últimos anos e em alguns subcenários pode representar uma ampliação do acesso às ferramentas de diagnóstico. No entanto, este aumento também pode estar relacionado às mudanças no contexto social e econômico do país nos últimos anos. Além disso, a maior representatividade de populações vulneráveis à TB entre os casos novos é um aspecto que precisa de especial atenção. Dessa forma, torna-se ainda mais importante que os Programas de Tuberculose considerem o contexto em que estão inseridos, para que suas estratégias sejam efetivas e superem os desafios locais. Serão necessários esforços adicionais, com a articulação das três esferas de gestão do SUS, para se atingir um único objetivo: acabar com a tuberculose como problema de saúde pública no Brasil (Brasil, 2017 e 2019)

### 1.1.3 Prisão

Estudos demonstraram que a tuberculose epidêmica em prisões representa um grande desafio para o controle nacional de tuberculose no Brasil (Basu *et al.*, 2011, Barbour *et al.*, 2010, Bourdillon *et al.*, 2017).

Prisões tem sido fontes similares não apenas em surtos de países com baixa carga de tuberculose (Valway *et al.*, 1994), mas também com altos níveis de transmissão endêmica nos países com renda média e baixa (Baussano *et al.*, 2010, Sanchez *et al.*, 2013). Por meio dos dados de notificação da tuberculose em nível nacional do Brasil, Bourdillon *et al.* demonstraram que >25% de todos os casos incidentes entre homens entre os 20 e 29 anos ocorreram em prisões, onde as taxas de notificação foram 31 vezes maiores do que na população geral (Bourdillon *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

Também foi visto que as taxas encontradas nas prisões influenciaram para que ocorresse um aumento na proporção da carga nacional de tuberculose; de fato, em 2014, os casos de tuberculose em prisão representaram 8,4% de todos os casos reportados no país (Bourdillon *et al.*, 2017).

Segundo o Gerenciador de Ambiente Laboratorial (2014), das 700 amostras de escarro analisadas em Porto Velho, no ano de 2012, apenas 27 (3,85%) eram da população carcerária sendo que 8 culturas foram positivas, o que equivale à 29,6% de positividade (Gonçalves, 2016).

O impacto causado pela tuberculose em presídios vai além da população carcerária, pois também afeta seus familiares e funcionários dos presídios, durante e após a detenção, ou seja, toda a comunidade com que se relacionam (Oliveira & Cardoso, 2004).

Portanto, evidencia-se a necessidade de elaboração e implantação de programas específicos de vigilância epidemiológica e de controle da tuberculose na população carcerária. Entretanto, ainda não são numerosos os estudos a respeito da real situação das unidades carcerárias brasileiras quanto à ocorrência de casos de tuberculose.

#### 1.1.4 Evidências de Infecção Mista

Por muitas décadas, acreditou-se que as infecções por *M. tuberculosis* eram homogêneas e permaneciam estáveis dentro do hospedeiro durante o curso da infecção. O fenômeno das infecções com isolados mistos, reconhecido pela primeira vez em 1975 por Mankiewicz & Liivak, foi apresentado como um importante desafio ao diagnóstico, ao tratamento e ao controle da tuberculose (Zheng *et al.*, 2015; Kontsevaya *et al.*, 2017).

Enquanto o conceito anterior era que os pacientes com tuberculose estavam infectados com um único isolado conservado geneticamente (van Rie *et al.*, 2005), a aplicação de métodos moleculares demonstrou que o fenômeno das infecções mistas em tuberculose é mais comum do que o inicialmente considerado (Péres-Lago *et al.*, 2016).

A evidência de infecção mista em um único hospedeiro, sugerindo reinfeção antes ou durante a doença, foi observada inicialmente pelo método de tipagem por fagos (Mankiewicz & Liivak, 1975, Bates *et al.*, 1976) e foi posteriormente confirmado utilizando a análise de DNA *fingerprint* (Niemann *et al.*, 2000, Braden *et al.*, 2001, Garcia de Viedma *et al.*, 2003).

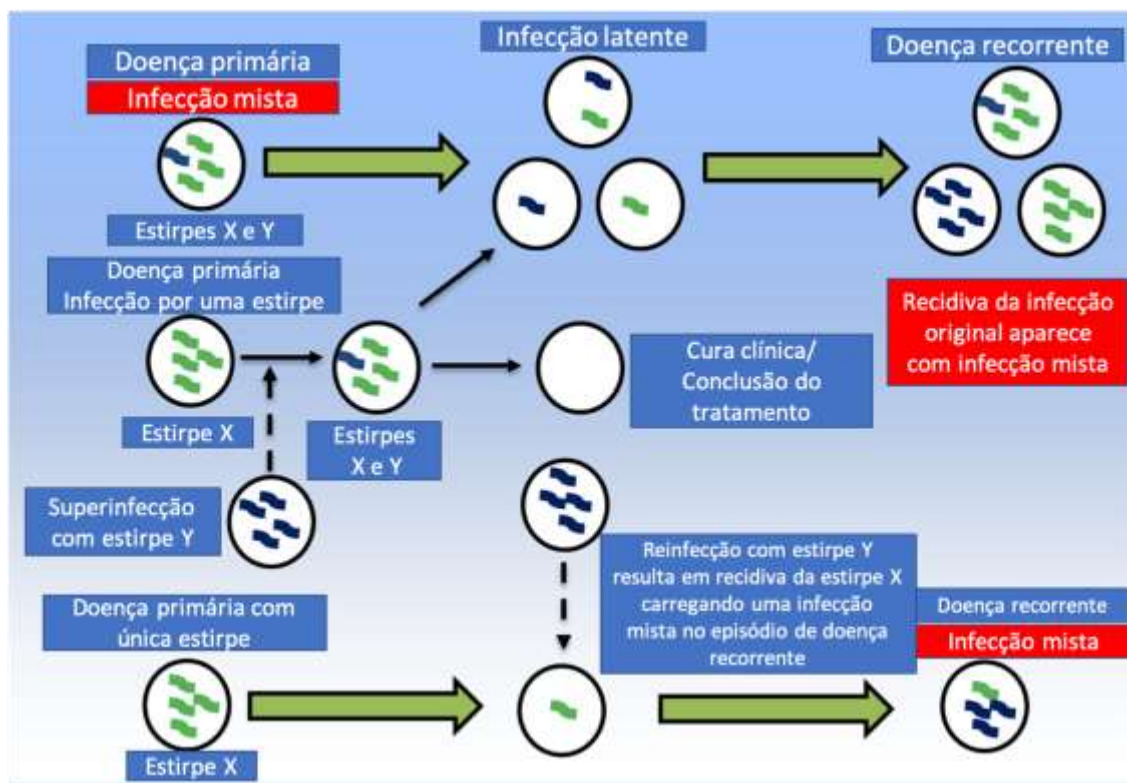
Foi mostrado, recentemente, usando métodos de geotipagem baseados em PCR, que pacientes com tuberculose em cenários de alta carga frequentemente tem diferentes isolados na mesma amostra de escarro (Warren *et al.*, 2004, van Rie *et al.*, 2005).

Posteriormente, de acordo com recomendações de padrão internacional (Supply *et al.*, 2006), a técnica MIRU-VNTR 24 locus teve maior sensibilidade e poder discriminatório em detectar isolados mistos do que outros métodos de análise (Cohen *et al.*, 2011, Huyen *et al.*, 2012).

Diversos estudos reportaram infecções mistas em 1% a 60% dos pacientes, com mediana de 20%, dependendo da incidência de tuberculose e do cenário do estudo (revisado por Cohen *et al.* 2012).

Estudos epidemiológicos moleculares demonstram que infecções complexas e heterogêneas dentro de um simples hospedeiro podem surgir

devido a infecções mistas com diferentes isolados de *M. tuberculosis* que são simultaneamente ou sequencialmente adquiridos (**figura 1.4**) (Fang *et al.*, 2008, van Rie *et al.*, 2005) ou devido a infecções heterogêneas onde mutações espontâneas resultam de microevoluções dentro do hospedeiro (Al-Hajoj *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2013; Péres-Lago *et al.*, 2013).



**Figura 1.4. Doença recorrente e infecções com estirpes mistas de *M. tuberculosis*.** Vários cenários que levam a tuberculose recorrente e infecções mistas. Infecções mistas podem ocorrer tanto na infecção primária quanto na recorrente (secundária, terciária e assim por diante). Durante a doença primária, infecções mistas podem ocorrer durante um único episódio de infecção, onde duas estirpes distintas estão presentes ao mesmo tempo durante o episódio de infecção inicial. Alternativamente, uma infecção com uma estirpe secundária (superinfecção) pode ocorrer durante a infecção latente ou doença ativa. A reinfecção com uma segunda estirpe pode também resultar na reativação de uma estirpe subjacente (adaptado de Mclvor *et al.*, 2017).

Ley *et al.*, em 2019, revisaram estudos que se basearam no sequenciamento do genoma completo para compreender a microevolução dentro do hospedeiro. Após a análise de 38 estudos diferentes, observaram a ocorrência de vários níveis de microevolução e diversidade entre os estudos, com a demonstração da presença simultânea de várias subpopulações dentro do mesmo hospedeiro, enquanto outros encontraram genomas muito estáveis com poucas ou nenhuma alteração genômica.

Alguns estudos no intuito de inferir a transmissão direta, determinam a distância de variantes de único nucleotídeo (SNV, do inglês *Single Nucleotide Variant*) entre isolados de uma cadeia de transmissão. Walker *et al.* (2013) apontam que uma distância <12 SNVs entre dois isolados seriam suficientes para indicar transmissão direta.

Trabalhos mais recentes sugerem que este limite pode não ser válido em todos os cenários e que vários fatores como o tempo passado entre os isolados, a pressão seletiva, infecções mistas ou clonalidade dos isolados da cadeia podem impactar no número de SNVs que surgem dentro do hospedeiro, alterando a distância entre os isolados (Eldholm *et al.*, 2014; Péres-Lago *et al.*, 2014; Casali *et al.*, 2016; Lieberman *et al.*, 2016; Herranz *et al.*, 2017).

Devido as limitações inerentes dos métodos utilizados para detectar infecções mistas, os cenários reais podem estar sendo subestimados. Modelos matemáticos sugerem que as infecções mistas impactam o controle da tuberculose em pacientes tanto ao nível individual como ao nível populacional (Cohen *et al.*, 2012).

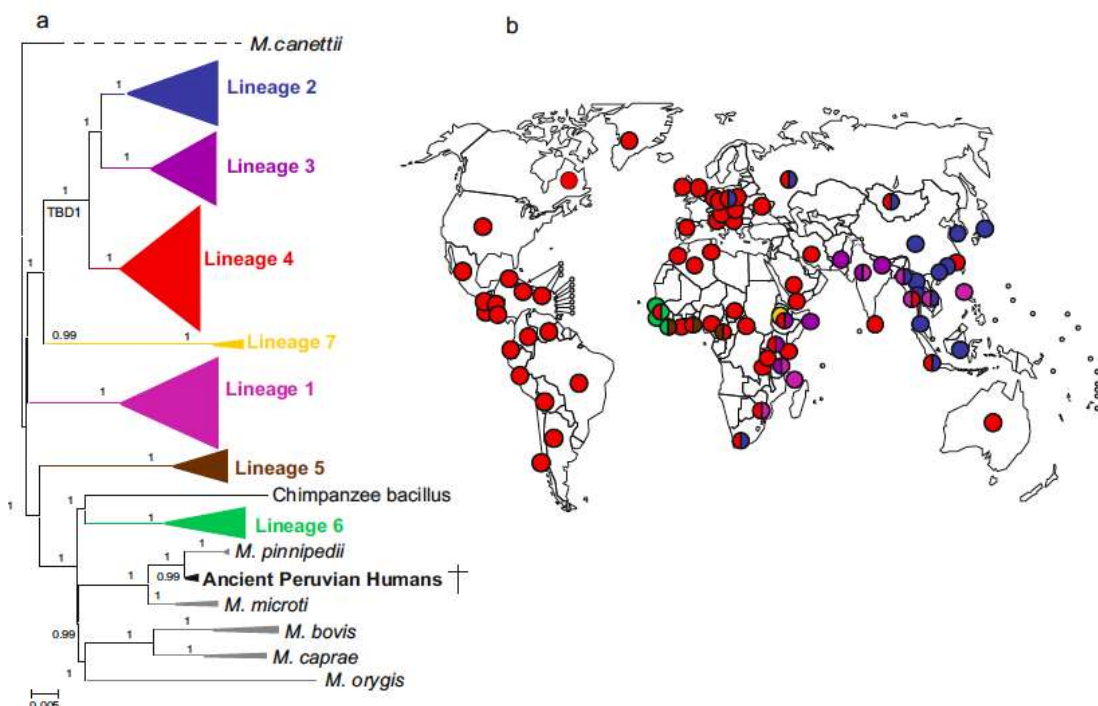
Foi inferido que essa mistura de isolados aumente a probabilidade do surgimento de resistência à isoniazida após a terapia preventiva por isoniazida em tuberculose latente (Cojin *et al.*, 2009), o que reduziria a efetividade da cobertura das vacinas que cobrem apenas um subgrupo de genótipos de *M. tuberculosis* (Cohen *et al.*, 2008).

A infecção mista também foi apontada como um fator negativo em isolados obtidos de pacientes com TB-MDR (van Rie *et al.*, 2005); outros estudos mostraram que a presença de múltiplos isolados pode resultar em um desfecho ruim para o tratamento (Theisen *et al.*, 1998; Niemann *et al.*, 2000; Baldeviano-Vidalon *et al.*, 2005).



## 1.2 Caracterização do agente etiológico

Os agentes etiológicos da TB em humanos e outros animais são um grupo de bacilos ácido-alcool resistentes intimamente relacionados que coletivamente são conhecidos como o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) (Brites & Gagneux, 2017; Malone & Gordon, 2017). Os membros do CMTB adaptados aos humanos, representados na **figura 1.5**, compreendem cinco principais linhagens filogenéticas referidas como *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* (linhagens 1-4 e 7) e duas linhagens tradicionalmente conhecidas como *Mycobacterium africanum* (linhagens 5 e 6) (de Jong *et al.*, 2010; Brites & Gagneux, 2017; Yeboah-Manu *et al.*, 2017). Desse modo, essas linhagens são apenas capazes de manter seus ciclos de vida completos, doença e transmissão aérea tendo os humanos como hospedeiros (Ernst, 2012). A dispersão geográfica destas linhagens difere nitidamente, com algumas linhagens demonstrando distribuição global e outras com restrição geográfica (Gagneux *et al.* 2006b; Gagneux & Small, 2007).



**Figura 1.5. Filogeografia global dos membros do CMTB adaptados ao homem.** Filogeografia global dos membros do CMTB adaptados ao homem. (a) Filogenia de 220 isolados do CMTB obtidas por Comas *et al.* (2013) baseado no método de máxima verossimilhança. (b) Distribuição das sete principais linhagens adaptadas ao homem. As linhagens possuem as mesmas cores de (a) e os círculos representam a linhagem ou linhagens dominantes em cada país (Gagneux & Small, 2007). Adaptado de Brites & Gagneux, 2017.

Entre os membros do CMTB adaptados aos outros animais, alguns infectam primariamente espécies de mamíferos selvagens (Malone & Gordon, 2017). Estes incluem *M. microti* (Brodin et al., 2002), *Mycobacterium pinnipedii* (Cousins et al., 2003), *Mycobacterium orygis* (van Ingen et al., 2012) e o bacilo de Dassie (Mostowy et al., 2004), *Mycobacterium mungi* (Alexander et al., 2010), *Mycobacterium suricattae* (Parsons et al., 2013) e o “chimpanzee bacillus” (Coscolla et al., 2013).

*Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium caprae*, por outro lado, são principalmente encontrados em gado e cabras, mas também são frequentemente isolados de diversos animais selvagens que agem como seus reservatórios (Malone & Gordon, 2017).

*Mycobacterium canettii* é considerado parte do CMTB baseado em sua identidade de nucleotídeos; entretanto, *M. canettii* está mais associado com a vida livre, sendo encontrado em infecções oportunistas ocasionais em humanos (Koeck et al., 2010; Supply et al., 2013).

Ao estudar o tropismo por hospedeiro, é importante diferenciar entre hospedeiros reservatórios daqueles que correspondem aos membros transversais de seu ciclo de vida completo, incluindo a transmissão aos hospedeiros secundários (Malone & Gordon, 2017). Para exemplificar, apesar do *M. tuberculosis sensu stricto* estar bem adaptado à transmissão entre a espécie humana (Brites & Gagneux, 2015), também pode, ocasionalmente, ser isolado de gado e outros animais que entraram em contato com humanos (Ameni et al., 2011; Ghodbane & Drancourt, 2013).

*M. tuberculosis* apresenta-se como um bacilo levemente curvo ou reto (com 0,2-0,6 µm de largura x 1,0-10 µm de comprimento), aeróbio estrito, não formador de esporo, não encapsulado, imóvel, com alto conteúdo de guanina e citosina (G+C, 61-71%) em seu genoma e alto teor de ácidos micólicos, o que confere às micobactérias a capacidade de álcool-ácido resistência na coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), sendo por isso denominado bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Williams & Wilkins, 1986; Koneman et al., 2001; Barrera, 2007).

O sequenciamento do genoma da cepa H37Rv foi publicado por Cole et al. em 1998. A partir desse primeiro sequenciamento foi possível identificar uma série de características importantes a respeito do *M. tuberculosis*. O genoma é único e circular com aproximadamente 4,4 Mb, conteúdo G+C relativamente constante através do genoma, rico em DNA repetitivo, em especial sequências de inserção, genes constitutivos duplicados e repertório metabólico amplo e flexível. Percebeu-se a ausência de plasmídeos e não foram encontradas evidências de transferência horizontal de genes. As regiões codificadoras de epítomos são conservadas e cerca de 10% do genoma compreende genes das famílias PE e PPE – nomes derivados de seus motivos conservados, prolina (P) e ácido glutâmico (E), encontrados na extremidade amino-terminal – que codificam antígenos associados a evasão do sistema imune. Ainda foi sugerido que a resistência aos antibióticos é mediada exclusivamente por mutações e rearranjos cromossômicos, o que posteriormente foi mostrado por diversos estudos (revisado por Warner & Mizrahi, 2006).

### **1.3 Resistência e suscetibilidade aos antimicrobianos**

A tuberculose é normalmente tratada com a combinação de medicamentos por meio de terapia observada diretamente (TDO). Como resumido por Borrell & Trauner (2017), para tuberculose suscetível aos antimicrobianos, a TDO se baseia na administração de quatro medicamentos: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), por um período de seis meses. A resistência combinada a INH e RIF, conhecida como TB-multirresistente (TB-MDR, do inglês *multi-drug-resistant-TB*) (Brasil, 2008) é uma das maiores ameaças em relação a tuberculose. O regime de tratamento de TB-MDR atualmente depende de fluoroquinolonas (FQ) e aminoglicosídeos injetáveis (AG) para desfechos favoráveis. A aquisição de resistência a essas classes de antibióticos é definida como TB extremamente resistente (TB-XDR) (WHO, 2019).

Uma terapia apropriada pode ser providenciada apenas se o padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos do agente infectante for conhecido. Um

teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) para *M. tuberculosis* pode ser executado por métodos fenotípicos ou pela detecção molecular de determinantes genéticos associados com a resistência aos antimicrobianos. Um TSA convencional baseado no crescimento micobacteriano em meios líquido e sólido consome tempo e é desafiado por dificuldades técnicas e problemas de biossegurança (Kim 2005; WHO 2012a, b; Jiang *et al.* 2013; Somoskovi & Salfinger 2015; Cirillo *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de tecnologias moleculares favoreceu a aplicabilidade de ensaios rápidos de diagnóstico emergencial para a detecção de resistência. Apesar dos avanços na tecnologia e na vasta quantidade de dados que estão sendo coletados com o sequenciamento genômico completo a respeito dos perfis de suscetibilidade e resistência, ainda não se pode abandonar completamente o TSA fenotípico (resumido por Cirillo *et al.*, 2017).

O CMTB depende de dois tipos de mecanismos de resistência: modificação do alvo e perda da ativação pró-fármaco. Mutações no alvo resultam na perda da afinidade de ligação e ocorrem em muitas classes de fármacos. Por exemplo, a RIF inibe a RNA polimerase (RNAP) e mutações na região determinante da resistência a RIF (RDRR) da subunidade b da RNAP (rpoB) diminuem a afinidade de sua interação com o antibiótico (Campbell *et al.*, 2001).

Similarmente, mutações na região determinante de resistência de quinolonas (RDRQ) da subunidade a da DNA girase (GyrA) tem o mesmo efeito na afinidade da ligação da FQ (Piton *et al.*, 2010), assim como mutações no RNA ribossomal 16S interrompem a ligação de muitos AG (Magnet & Blanchard, 2005).

Muitos antibióticos específicos para o CMTB são pró-fármacos e se tornam ativos apenas através da interação com enzimas intracelulares, ativadoras de pró-fármacos. Resistência a esse tipo de antibióticos, os quais incluem INH, PZA, etionamida (ETH) e os nitroimidazóis, frequentemente ocorrem pela modificação ou perda da ativação enzimática, mais do que pela mutação do alvo (Haver *et al.*, 2015).

O efluxo de fármacos e a modulação transcricional também ocorrem como mecanismos de resistência para bedaquilina e INH/ETH, respectivamente, mas sua frequência relativa é muito menor, possivelmente por conta de sua contribuição na resistência do CMTB tender a ser menos pronunciada (Trauner *et al.*, 2014).

O **quadro 1** resume as principais regiões genômicas envolvidas no surgimento da resistência aos antimicrobianos aos medicamentos anti-tuberculose.

**Quadro 1.1. Principais regiões associadas com resistência aos antimicrobianos em M. tuberculosis. Adaptado de Cirillo et al. 2017.**

Medicamentos	Genes contendo mutações associadas
Amikacin	rrs
Bedaquiline	mmpL5, mmpS5, Rv0678, atpE, pepQ
Capreomycin	rrs, tlyA
Clofazimine	Rv0678, pepQ
Delamanid	ddn, fgd1, fbiA, fbiB and fbiC
Ethambutol	embA, embB, embC, ubiA
Ethionamide	inhA, ndh, ethA, ethR
Fluoroquinolones	gyrA, gyrB
Isoniazid	katG, inhA, ndh, furA, kasA
Kanamycin	rrs, gidB, eis, tap, whiB7
Linezolid	rplC, rrl
Pyrazinamide	pncA, rpsA, panD
Rifampicin	rpoB
Streptomycin	rpsL, rrs, gidB, tap, whiB7

A TB resistente aos medicamentos continua um sério problema de saúde pública. Em 2018, ocorreram cerca de 500 mil novos casos de TB resistente a rifampicina (dos quais 78% eram TB multirresistente). Os três países que compartilharam a maior taxa global foram a Índia (27%), a China (14%) e a Rússia (9%). Globalmente, 3,4% dos novos casos de TB e 18% dos que foram tratados previamente apresentaram TB resistente a rifampicina e TB

multirresistente (RR-TB e MDR-TB, respectivamente), com maiores proporções em países que formavam a União Soviética (WHO, 2019).

Taxas de resistência no CMTB em países de alta renda não são representativas da frequência de isolados de TB MDR/XDR pelo mundo. Regiões com TB-MDR epidêmica são definidas como *hotspots*, onde a prevalência dos casos de TB-MDR são >5% (Blower & Chou, 2004). Apesar de sua prevalência relativamente baixa, o fato de que 36% da população mundial total viva na China e Índia representa que 50% da carga de TB-MDR está nestes dois países.

A razão da prevalência de TB-MDR variar significativamente através do globo é um resultado de muitos fatores. Estes fatores incluem programas de controle efetivos variáveis (Zignol *et al.*, 2012, Cohen *et al.*, 2014), fatores ambientais como a permanência em prisões e minas (Dalton *et al.*, 2012; Zignol *et al.*, 2016), a presença de comorbidades, que podem influenciar o surgimento e a dispersão de TB-MDR (como o HIV) (Wells *et al.*, 2007; Escombe *et al.*, 2008; Dean *et al.*, 2014) e diversos fatores relacionados ao paciente.

Em conjunto com a heterogeneidade ambiental e fatores do hospedeiro está a diversidade genética do CMTB, a qual apresenta uma discreta distribuição filogeográfica (Coscolla & Gagneux, 2014, Brites & Gagneux, 2017). É possível que as diferenças regionais da carga de resistência sejam devidas às diferenças genotípicas entre as linhagens do CMTB. Se a linhagem dominante na região foi a mais propensa a adquirir resistência quando comparada a outras, isto poderia exacerbar a carga de resistência na região. Suportando essa possibilidade está o fato de que linhagens em hotspots MDR são frequentemente similares. Rússia e China apresentam a predominância da linhagem 2, que inclui os isolados da família Beijing (Merker *et al.*, 2015); diversos relatos tem associado os isolados Beijing com uma probabilidade aumentada de TB-MDR (Munsiff *et al.*, 2003).

#### **1.4 Tipagem molecular**

Durante várias décadas, a tipagem do CMTB tem sido alvo de estudos intensivos em diversos campos e aplicações, incluindo vigilância

epidemiológica local e global, bem como a evolução do patógeno e sua interação com o hospedeiro humano. O amplo campo de aplicação da genotipagem reflete a sua importância global, a epidemiologia complexa e os múltiplos padrões de tuberculose, assim como a quantidade de questões e desafios que permanecem a serem completamente compreendidos em relação a patobiologia e a transmissibilidade do organismo, e no aprimoramento do diagnóstico.

Devido ao número de questões que ainda não estão clarificadas e fontes não identificadas da transmissão e da infecção do *M. tuberculosis*, a genotipagem pode efetivamente guiar investigações epidemiológicas, identificar os principais pontos de acesso da transmissão, principalmente em cenários ou buscas por causas da dispersão de isolados específicos de uma região ou em escala global (Merker *et al.*, 2017).

A necessidade por métodos efetivos de genotipagem do CMTB também é guiada por questões de pesquisa mais básica, como a definição da diversidade biológica e geográfica do patógeno e sua associação com as populações hospedeiras (Hirsh *et al.* 2004; Tsolaki *et al.* 2004; Brudey *et al.* 2006; Gagneux *et al.* 2006; Hershberg *et al.* 2008; Comas *et al.* 2013), a compreensão da origem do CMTB (Fabre *et al.* 2004, 2010; Gutierrez *et al.* 2005, 2006; Supply *et al.* 2013; Boritsch *et al.* 2014, 2016a), e a reconstrução da história evolutiva e a demografia do CMTB (Brosch *et al.* 2002; Mostowy *et al.* 2002; Wirth *et al.* 2008; Comas *et al.* 2013, 2015; Pepperell *et al.* 2013; Luo *et al.* 2015; Merker *et al.* 2015; Mokrousov *et al.* 2016), assim como de alguns de seus clones mais importantes em associação com a resistência a múltiplos medicamentos (Mokrousov 2013; Merker *et al.* 2015).

Esses obstáculos foram resolvidos gradualmente pelo desenvolvimento de métodos moleculares de tipagem baseados em DNA - também denominados genotipagem - de isolados de MTBC, que agora culminam com o seqüenciamento completo do genoma (WGS).

Os genomas dos isolados de *M. tuberculosis* geralmente mostram apenas um grau limitado de diversidade em suas sequências e a espécie é descrita como geneticamente monomórfica, isto é, a maior parte de seu genoma não estaria apta a sofrer alterações (Achtman, 2008). Portanto,

diversos métodos de DNA *fingerprinting* para patógenos com essas características se baseiam nos elementos genéticos móveis ou repetitivos, os quais presumivelmente possuem uma frequência mutacional intrínseca mais elevada. Assim, *Southern blotting* com elementos de DNA repetitivos como sondas que foram associadas com altos níveis de polimorfismo, como *Major Polymorphic Tandem Repeats* (MPTR), repetições diretas (DR), polimorfismo de sequências repetitivas ricas em GC (PGRS), sequências de inserção (IS) 986 e I6110 foram e são amplamente aplicadas (Schürch & van Soolingen, 2012), além do MIRU-VNTR (Supply *et al.*, 2006) (figura 1.6).

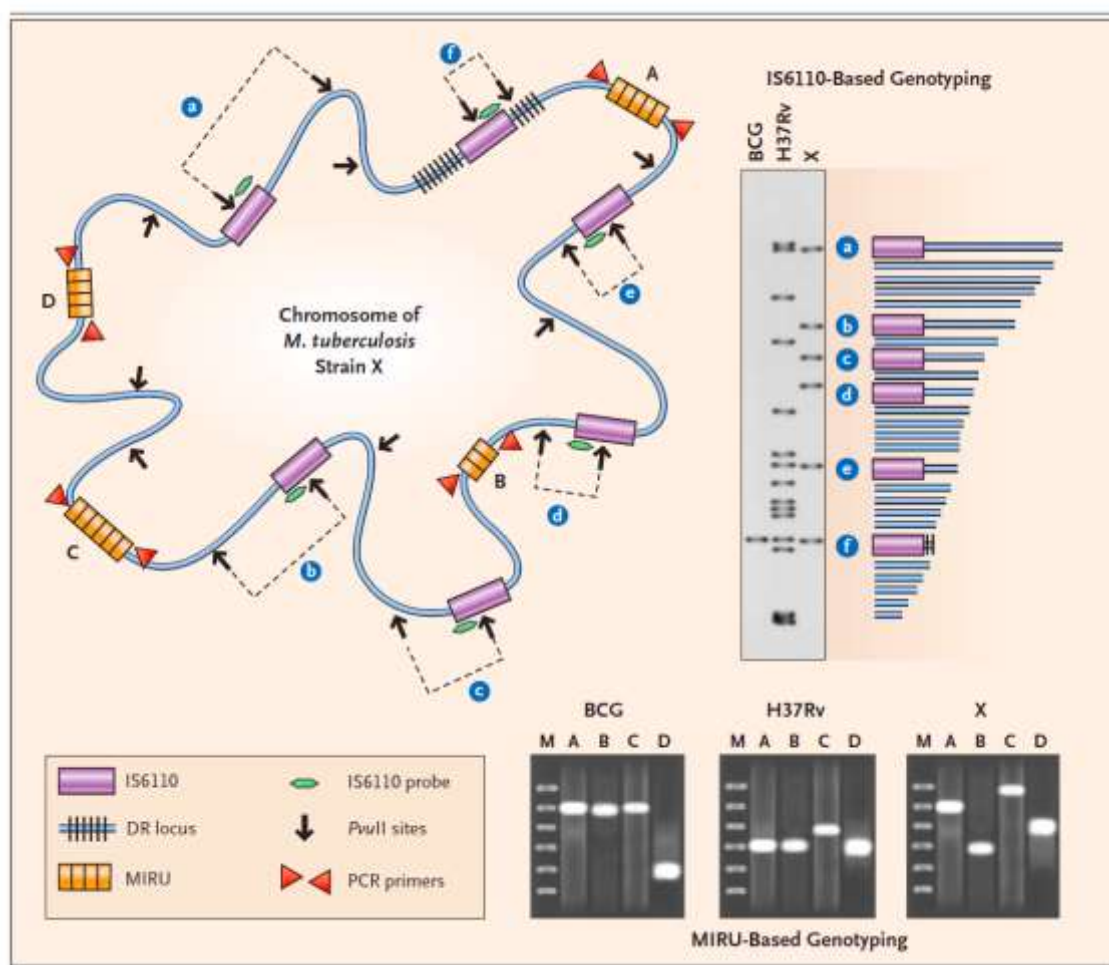


Figura 1.6. Representação esquemática do cromossomo de um isolado hipotético de *M. tuberculosis* e genotipagem de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37rv e a estirpe X com base na sequência de inserção IS6110 e MIRU. Adaptado de Barnes & Cave, 2003.

A divisão da classificação dos isolados de *M. tuberculosis* foi inicialmente baseada na prevalência e fonte geográfica de seus membros (Sola *et al.*, 2001, 2003). Os clados mais definidos pela região eram pertencentes as



linhagens modernas eram Beijing (altamente prevalente na Ásia Oriental, CAS (Ásia Central) e Harleem, X e LAM (Latin American-Mediterranean) e *M. africanum* e EAI (East African Indian) definidas como as linhagens ancestrais. Devido às comparações genômicas (Brosch *et al.*, 2001), regiões variáveis resultantes de eventos de inserção-deleção foram descobertas e um novo cenário evolutivo surgiu, graças a essas regiões denominadas regiões de diferença (RD) (Brosch *et al.*, 2002). Análises combinadas conduziram a inúmeras avaliações e permitiram a separação dos isolados de *M. tuberculosis* em diferentes clados (**tabela 1**) (Barbier & Wirth, 2016).

**Tabela 1.1.** Correspondência dos isolados de CMTB adaptados aos humanos identificados pelos principais métodos de tipagem e a última nomenclatura. Adaptada de Barbier & Wirth, 2016.

Idade evolutiva	Baseada em SNP		Sublinhagem	Spoligotype
			(associada a RD)	
Ancestral ( <i>M. tuberculosis</i> )	Indo-Oceanic	1 [RD239]	1.1 1.2	EAI3, EAI4, EAI5, EAI6 EAI2
Modernas ( <i>M. tuberculosis</i> )	East-Asian	2	2.1 (não Beijing)	MANU ancestral e perfil órfão
			2.2 (Beijing) [RD105, RD207]	Beijing
	East Africa-Indian	3 [RD750]	3.1	CAS (exceto CAS1-Delhi), CAS1-Kili, CAS2
	Euro-American	4	4.1	X1, X2, X3, T1, H1
			4.2 (Ural)	H3, H4, LAM7-TUR, T1
			4.3 (LAM)	LAM1, LAM3, LAM4, LAM9, LAM11-ZWE, T5
			4.4	S, T1, T2
			4.5 [RD122]	H3, H4, T1
			4.6 (Uganda e Cameroon)	T2-Uganda, T2, T3, LAM10-CAM
4.7			T1, T5	
	4.8 [RD219]	T1, T2, T3, T4, T5		
	4.9 (H37rv-like)	T1		
Ancestral ( <i>M. africanum</i> )	West-Africa 1	5 [RD711]		AFRI2, AFRI3
	West-Africa 2	6 [RD702]		AFRI1
Intermediária	Linhagem 7	7		

#### 1.4.1 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP)

A análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) é uma técnica na qual o DNA bacteriano é clivado por uma enzima de restrição e os fragmentos de restrição do DNA são separados em um gel de eletroforese. Em seguida, a técnica de *Southern Blotting* é usada para transferir os fragmentos de restrição para uma

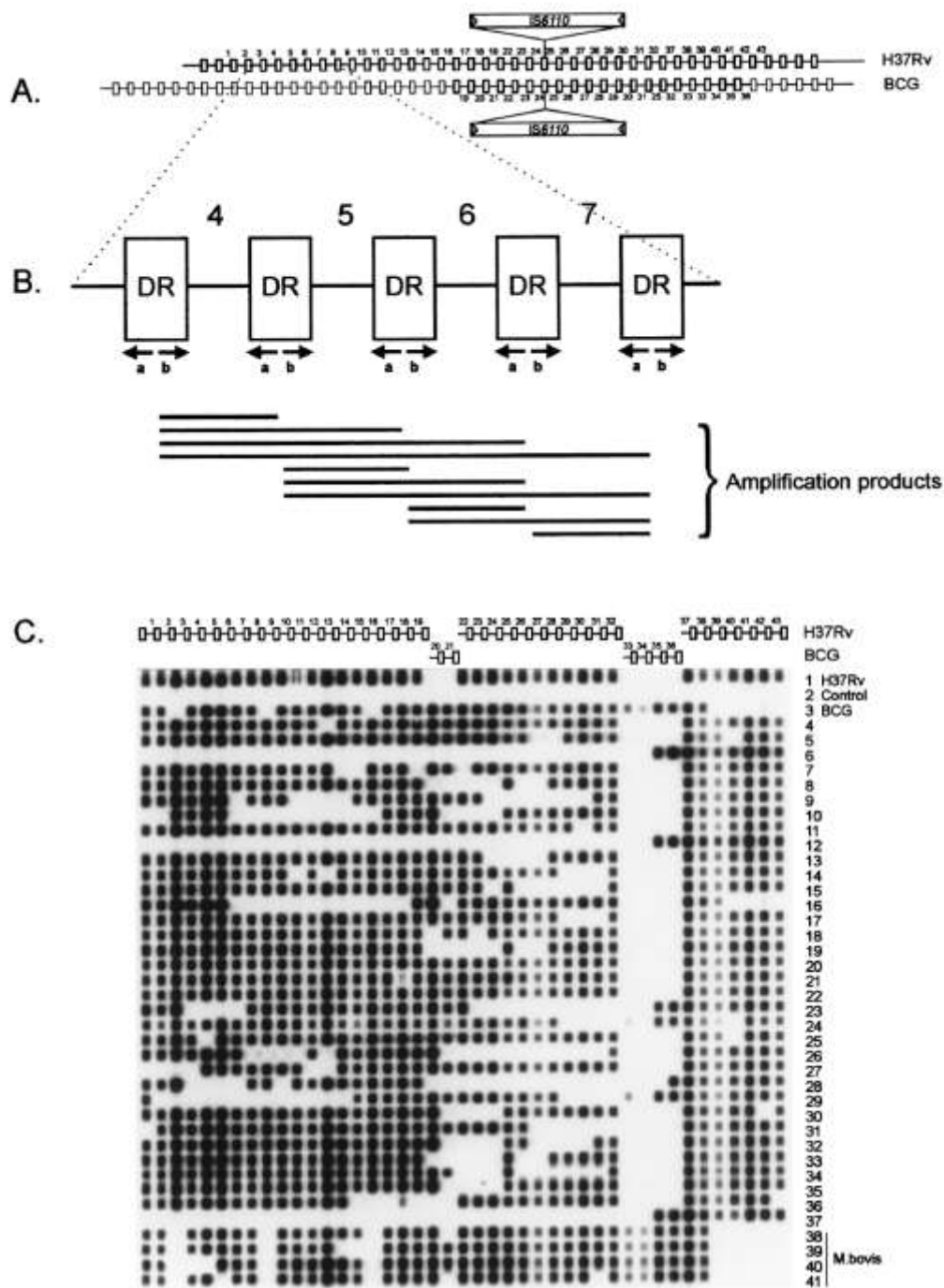
membrana. A sonda de DNA marcada é aplicada à membrana em um ensaio de hibridação, complementar às sequências repetidas de interesse.

Uma sonda que é frequentemente utilizada é específica para a sequência IS6110, que é um elemento móvel de inserção de sequência repetitiva (McAdam *et al.*, 1990). O elemento IS6110 pode se duplicar e integrar em novos locais genômicos, não necessariamente de modo aleatório (Hermans *et al.*, 1991; McHugh & Gillespie, 1998). O número de cópias de IS6110 varia de zero a cerca de 25 cópias por isolado e com a variação dos locais de inserção, a tipagem por IS6110 pode apresentar milhares de padrões de banda. Desde o início dos anos 1990 em diante, RFLP foi o padrão ouro na tipagem de *M. tuberculosis*. A aplicação deste método permitiu estudos internacionais e trouxe novos conhecimentos a respeito da epidemiologia da tuberculose (Githui *et al.*, 1999; Kremer *et al.*, 1999; Niemann *et al.*, 1999; Suffys *et al.*, 2000; Braden *et al.*, 2001; van Soolingen *et al.*, 2001). Entretanto, IS6110 RFLP apresenta problemas de reprodutibilidade, pois demanda técnicas e programas sofisticados, necessários para analisar e comparar resultados. A tipagem por IS6110 RFLP, apesar de ter um poder discriminatório maior do que do *spoligotyping* e ter a capacidade de diferenciar estirpes de CMTB, é laboriosa e consome tempo, pois pode levar semanas para crescer bactérias suficientes para se obter dois microgramas de DNA. Além disso, para isolados com um número baixo de cópias, como *M. bovis*, ou isolados desprovidos de IS6110, essa tipagem tem um poder discriminatório limitado e requer métodos de tipagem secundários (Schürch & van Soolingen, 2012).

#### **1.4.2 Spoligotyping**

*Spoligotyping* foi o primeiro método de genotipagem baseado em PCR a ser utilizado em larga escala para o CMTB (Kamerbeek *et al.*, 1997). Este método tem como alvo o locus de repetição direta DR, do inglês *Direct Repeat*) (Hermans *et al.*, 1991) que está virtualmente presente em todas as estirpes de CMTB. O locus DR é um membro da família bacteriana de loci de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) (Makarova *et al.*, 2011).

O locus contém uma série de sequências espaçadoras diferentes, variáveis entre os isolados, separados por motivos repetidos conservados chamados repetições diretas. O grupo de espaçadores presentes em um isolado é amplificado por PCR com um par de *primers* que pareiam nas repetições diretas que flanqueiam cada espaçador. Os *amplicons* obtidos são então hibridados em um *set* de referência dos 43 espaçadores – originados de *M. tuberculosis* H37rv e *M. bovis* BCG – imobilizados em uma membrana, para revelar a ausência ou presença de cada espaçador no isolado testado (**figura 1.7**). A correspondência dos sinais de ausência/presença pode ser codificada como código de barras (isso é, 0/1 ou branco/preto), propiciando um sistema que permite uma análise mais rápida e fluida (Kamerbeek *et al.* 1997; Barnes & Cave 2003).



**Figura 1.7. Estrutura do locus DR no genoma micobacteriano.** (A) Os cromossomos de *M. tuberculosis* H37rv e *M. bovis* BCG contêm 48 e 41 DRs, respectivamente (representados em retângulos), que são interpassadas com espaçadores únicos variando em comprimento de 35 a 41 pb. Os espaçadores (enumerados) utilizados correspondem a 37 espaçadores de *M. tuberculosis* H37rv e 6 de *M. bovis* BCG. O sítio de integração do elemento de inserção IS6110 está destacado. (B) Princípio da amplificação in vitro da região DR pela PCR. Qualquer DR na região de DR pode servir como um alvo para estes iniciadores, portanto, o DNA amplificado é composto por uma mistura de um grande número de diferentes tamanhos de fragmentos. A figura demonstra a combinação de fragmentos que seriam produzidos por amplificação in vitro de um alvo DR contendo apenas cinco DRs contínuas. (C) os padrões de hibridação (spoligotypes) de DNAs amplificados por micobactérias de 35 amostras para *M. tuberculosis* e 5 amostras para *M. bovis*. A ordem dos espaçadores no filme de raio-x corresponde a sua ordem no genoma. Fonte.: Kamerbeek et al. (1997).

Com o intuito de cobrir certas limitações da execução do *spoligotyping*, como o número de passos da hibridação, a variação da qualidade das membranas, possibilidade de contaminação das sondas e sinais fracos de hibridação, Cowan *et al* (2004) transpuseram o princípio da técnica para o sistema de multianálise *Luminex*, que permite uma análise mais rápida e automatizada. O sistema foi, posteriormente, adaptado para incluir a análise paralela de mutações associadas a resistência à rifampicina na região do gene *rpoB*, que foi disponibilizado em kit comercial (Gomgnimbou *et al.*, 2012). Posteriormente, foi desenvolvido um ensaio 59-plex, para a tipagem molecular por meio de *spoligotyping* e análise de mutações de resistência para rifampicina e isoniazina, nomeado TB-SPRINT (*tuberculosis-spoligo-rifampin-isoniazid typing*) (Gomgnimbou *et al.*, 2013).

Apesar de suas vantagens, *spoligotyping* não possui resolução ao nível de estirpe, apenas providencia informação em nível de família ou subfamília, por ser baseado na conservação de alguns espaçadores típicos (Kremer *et al.*, 1999; Brosch *et al.*, 2002; Brudey *et al.*, 2006). Devido ao seu poder discriminatório limitado, spolityping não pode ser utilizado como o único método para averiguar conexão epidemiológica entre casos de tuberculose (Barnes & Cave, 2003), pois, como se espera de um marcador molecular de um locus, já foi mostrado que possui um nível significativo de homoplasia (semelhança não relacionada a ancestralidade comum) e evolução convergente que interfere na análise filogenética (Comas *et al.*, 2009).

### **1.4.3 MIRU-VNTR**

A tipagem molecular baseada em PCR dos isolados de CMTB é principalmente realizada por meio da tipagem de MIRU-VNTR. Este método analisa múltiplos loci genômicos, sobretudo em regiões intergênicas, que contém números variáveis de repetições de DNA *em tandem*. Os tamanhos das unidades de repetição variam de 50 a 110 pb; os loci, portanto, mostram uma estrutura similar de regiões minissatélite em genomas de eucariotos superiores (Supply *et al.*, 2000).

Esta genotipagem é executada pela amplificação das regiões alvo, usando *primers* que se anelam às regiões flanqueadoras, seguida da análise do tamanho dos fragmentos amplificados. A partir dos comprimentos das unidades repetidas nos diferentes marcadores, que já são bem definidos, os números das unidades para cada alvo podem ser simplesmente deduzidos a partir do tamanho dos *amplicons*, simplesmente comparando com a tabela de alelos padrão. O resultado é um código numérico (sendo o padrão de 24 números), que permite fácil comparação dos resultados entre os experimentos e laboratórios, facilitando o estabelecimento de sistemas de nomenclatura e análise padrão baseados em rede como MIRU-VNTR*plus* ([www.miru-vntrplus.org](http://www.miru-vntrplus.org)).

Para facilitar o uso uniforme de vigilância molecular global, o formato de 24 loci, incluindo o subconjunto discriminatório de 15 loci com as maiores taxas de evolução, foi padronizado internacionalmente em 2006 (Supply *et al.*, 2006). O conjunto padrão de loci foi selecionado baseado na análise por amostragem global de 824 isolados selecionados para testar a robustez da técnica, reprodutibilidade e equilíbrio apropriado entre o poder discriminatório de distinguir os isolados das principais linhagens e a estabilidade clonal nos diferentes conjuntos de isolados longitudinais de pacientes cronicamente infectados ou de cadeias de transmissão confirmadas, assim como entre colônias de isolados cultivados individualmente (Supply *et al.*, 2006).

Kits comerciais (Genoscreen) estão disponíveis e espera-se que facilitem a implementação e uso robusto. O maior rendimento alcançado é através de analisadores de DNA automatizados com até 96 capilares e PCR multiplex baseada em múltiplos corantes, com análise de fragmentos e chamada de alelos semi-automatizados (Allix *et al.*, 2004; Cowan *et al.*, 2005; Supply *et al.*, 2006).

O quadro geral, após a análise em diversas populações, era que a tipagem por MIRU-VNTR, por si só ou em combinação com *spoligotyping*, tem um poder discriminatório similar ao IS6110 RFLP, e geralmente está de acordo com as descobertas das investigações de *clusters* ou fatores de risco, fazendo dele um método adequado para sistemas de vigilância de tuberculose, pelo menos como uma alternativa ao IS6110 RFLP (van Deutekom *et al.* 2005;

Oelemann *et al.* 2007; Allix-Beguec *et al.* 2008a, 2008c; Alonso-Rodriguez *et al.* 2009; Bidovec-Stojkovic *et al.* 2011; Roetzer *et al.* 2011; de Beer *et al.* 2013).

No entanto, MIRU-VNTR 15 ou 24 loci carecem de poder de resolução para discriminar de forma acurada clones intimamente relacionados que podem ser predominantes em cenários com alta incidência, como clones circulando em comunidades de humanos confinados residindo nas regiões Árticas (Lee *et al.* 2015a,b; Bjorn-Mortensen *et al.* 2016), ou os clones da linhagens Beijing que prevalecem na Rússia e Ásia Oriental (Kremer *et al.* 2005b; Nikolayevskyy *et al.* 2006; Iwamoto *et al.* 2007; Wada *et al.* 2007; Mokrousov *et al.* 2008; Roetzer *et al.* 2011; Luo *et al.* 2014a).

Consistente com sua base multilocus, mesmo analisando os loci separadamente pode-se ver os padrões de evolução homoplásicos (Supply *et al.*, 2000; Comas *et al.*, 2009), a informação filogenética carregada pelos perfis de MIRU-VNTR 24 loci é menos propensa a homoplasia do que spoligotyping (Wirth *et al.*, 2008; Comas *et al.*, 2009; Cardoso-Oelemann *et al.*, 2011).

#### **1.4.4 Sequenciamento de genoma completo**

O sequenciamento de genoma completo (WGS, do inglês *Whole Genome Sequencing*) fornece a fonte mais abrangente de informação em relação ao conteúdo do genoma de um dado isolado clínico, que pode então ser usado para definir precisamente seu conjunto de posições de sequências variáveis, quando comparado com a estirpe referência (H37rv). Esta variação pode então ser examinada por diversas questões, desde a predição de resistência para virtualmente todos os marcadores de resistência (resistoma) (Niemann & Supply, 2014; Walker *et al.*, 2015; Pankhurst *et al.*, 2016) à definição de alta resolução dos clusters da transmissão da tuberculose (Comas, 2017).

O fluxo de trabalho padrão para a análise de WGS de isolados de CMTB, como revisado por Meehan *et al.*, em 2019, envolve o cultivo de espécimes isolados de escarro em meio líquido ou sólido, extração de DNA das células, preparo da biblioteca e sequenciamento utilizando as tecnologias de

*reads* curtas (por exemplo, plataforma *Illumina*) (WHO, 2018 guide). A análise de WGS do CMTB envolve diversos passos fundamentais, como a validação dos dados do *input* e controle de qualidade seguido do mapeamento a um genoma referência (geralmente *M. tuberculosis* H37rv) e detecção de variantes genômicas como SNPs e inserções ou deleções (*indels*). Essas análises são organizadas em *pipelines*, que consistem organização desses elementos em cadeia de modo que a saída de um elemento seja a entrada do elemento seguinte. Numerosas *pipelines* de resequenciamento estão disponíveis para CMTB, mas nenhum como padrão ouro até o momento. Estas abordagens tipicamente excluem ~10% do genoma por conta de mapeamentos errôneos em certas regiões os quais resultam em falsas chamadas de variantes – como famílias dos genes PE e PPE, elementos genéticos móveis e outros genes repetitivos (Cole *et al.*, 1998) e aplicar vários critérios, como a profundidade das *reads*, qualidade da base e o *strand bias* (fitas positiva e negativa com diferenças significativas no genótipo), para filtrar as variantes falsas positivas. Por fim, com base nas variantes detectadas, diversas tarefas podem ser executadas, incluindo (mas não limitadas a) predição dos perfis de resistência e susceptibilidade aos antimicrobianos, tipagem de isolados e identificação de clusters de transmissão.

A resolução maior frequentemente permite discriminar isolados agrupados em clusters por genotipagem clássica, desse modo, permite uma resolução mais precisa de surtos, principalmente em locais ou condições onde a diversidade genética é baixa (Merker *et al.*, 2017). Além do mais, dados da análise do WGS também podem possibilitar estimar escalas temporais da tuberculose epidêmica depois do cálculo das taxas de evolução do genoma e datar os ancestrais das populações de isolados estudados, baseado na reconstrução de filogenias baseadas em SNPs (Roetzer *et al.* 2013; Walker *et al.* 2013, 2014; Luo *et al.* 2014b; Niemann & Supply 2014; Cohen *et al.* 2015; Eldholm *et al.* 2015; Merker *et al.* 2015).

WGS possibilitou a diferenciação retrospectiva entre infecção recidiva e reinfecção (Bryant *et al.*, 2013), a reconstrução de cadeias de transmissão e a predição de casos superespalhadores e casos em potencial não diagnosticados (Gardy *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2013).



O método de análise de dados de WGS para fins epidemiológicos e para diversos estudos evolutivos dos isolados de CMTB tem sido baseado em mapear as *reads* sequenciadas e a detecção de sequências variantes em relação a uma determinada sequência genômica de referência (Comas *et al.* 2010, 2013; Gardy *et al.* 2011; Biek *et al.* 2012; Roetzer *et al.* 2013; Supply *et al.* 2013; Walker *et al.* 2013a, 2014; Luo *et al.* 2014b; Niemann & Supply 2014; Cohen *et al.* 2015; Eldholm *et al.* 2015; Merker *et al.* 2015; Stucki *et al.* 2015, 2016b; Boritsch *et al.* 2016a). O arcabouço conservado e altamente clonal dos genomas do CMTB (Boritsch *et al.*, 2016b) favorece esta abordagem de comparação à uma referência comum sobre abordagens de montagem *de novo* que são computacionalmente exigentes.

Uma classificação dos isolados das sete linhagens associadas à infecções humanas, muitas das associadas aos outros animais e suas sublinhagens pode ser derivada diretamente da chamada de variantes usando listas de SNPs definidos às linhagens (Homolka *et al.*, 2012; Coll *et al.*, 2014; Lipworth *et al.*, 2019). Essa abordagem é importante para a compreensão da estrutura populacional e potenciais diferenças genotípicas entre as linhagens (Brown *et al.*, 2010) e para a comparação dos isolados em nível global (Comas *et al.*, 2013; Merker *et al.*, 2015).

Perfis de suscetibilidade e resistência aos antimicrobianos podem ser determinados com alta acurácia para muitos medicamentos usados no tratamento da tuberculose através da comparação da chamada das variantes com listas de alta confiabilidade das variantes que conferem resistência. As listas foram estabelecidas, primariamente, usando associações do genótipo com o fenótipo identificadas de análises estatísticas de grandes conjuntos de dados de WGS clínicos (Coll *et al.*, 2015; Miotto *et al.*, 2017; Meehan *et al.*, 2019).

Os dados genômicos para um conjunto de isolados podem também ser utilizados para vigilância e investigação de transmissão. Para isso, a abordagem mais comum é usar um método de agrupamento baseado em um limite de SNPs, apresentando resultados similares a tipagem de sequência multilocus (MLST) (Meehan *et al.*, 2018, Kohl *et al.*, 2018). O ponto de corte dos SNPs é definido através da construção de uma lista de alta confiança de

SNPs inequívocos encontrados em cada isolado, frequentemente excluindo *indels* e regiões relacionadas a resistência aos antimicrobianos. Esses filtros são importantes quando o limite da distância dos SNPs é pré-definida para ser utilizado na definição de clusters de estirpes e definir cadeias de transmissão recente (Meehen *et al.*, 2019).

Dada a baixa diversidade genética do CMTB, apesar de alguns estudos terem utilizado uma variação de 0 a 50 SNPs (Clark *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Guthrie *et al.*, 2018), os limites de SNPs de 5 a 12 SNPs são utilizados frequentemente para sugerir conexões epidemiológicas, apesar destes limites terem sido calibrados para cenários com baixa incidência com uma população diversa (Walker *et al.*, 2013). Ainda não está claro se um único limite pode ser usado para detectar e ligar os casos epidemiologicamente em todos os períodos temporais e contextos. O uso de WGS tem apresentado uma performance melhor no rastreamento de contatos e com maior resolução do que as abordagens clássicas como MIRU-VNTR (Gröschel *et al.*, 2018; Jajou *et al.*, 2018; Koster *et al.*, 2018; Meehan *et al.*, 2018; Wyllie *et al.*, 2018).

A detecção de subpopulações e diversidade dentro do hospedeiro permanece um desafio. Entretanto, variantes de baixa frequência que não são devidas aos artefatos técnicos podem indicar a presença de infecções mistas ou microevolução levando a subpopulações intimamente relacionadas, ou, ainda, heterorresistência (Streicher *et al.*, 2012; Lieberman *et al.*, 2016; Trauner *et al.*, 2017). Diversos *pipelines* foram resumidos por Meehan *et al.* (2019), que demonstram um alcance de 10% a 70% de limites de detecção das subpopulações e são fortemente influenciados pela profundidade das *reads*.

Abordagens de modelagem matemática tem sido desenvolvidas para identificar infecções mistas. Gan *et al.* (2016) apresentaram um método baseado em filogenia de análise profunda do sequenciamento com uma sensibilidade de até 0,64% do isolado minoritário na amostra. Sobkowiak *et al.* (2018) desenvolveram dois métodos baseados na chamada de bases heterozigotas, que avalia a frequência de variação dos alelos identificados com profundidade maior do que 10 (isso é, pelo menos 10 *reads* com a presença da variante).



## **2 . OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral:**

Compreender a importância da infecção mista em pacientes diagnosticados com TB.

### **2.2 Objetivos específicos:**

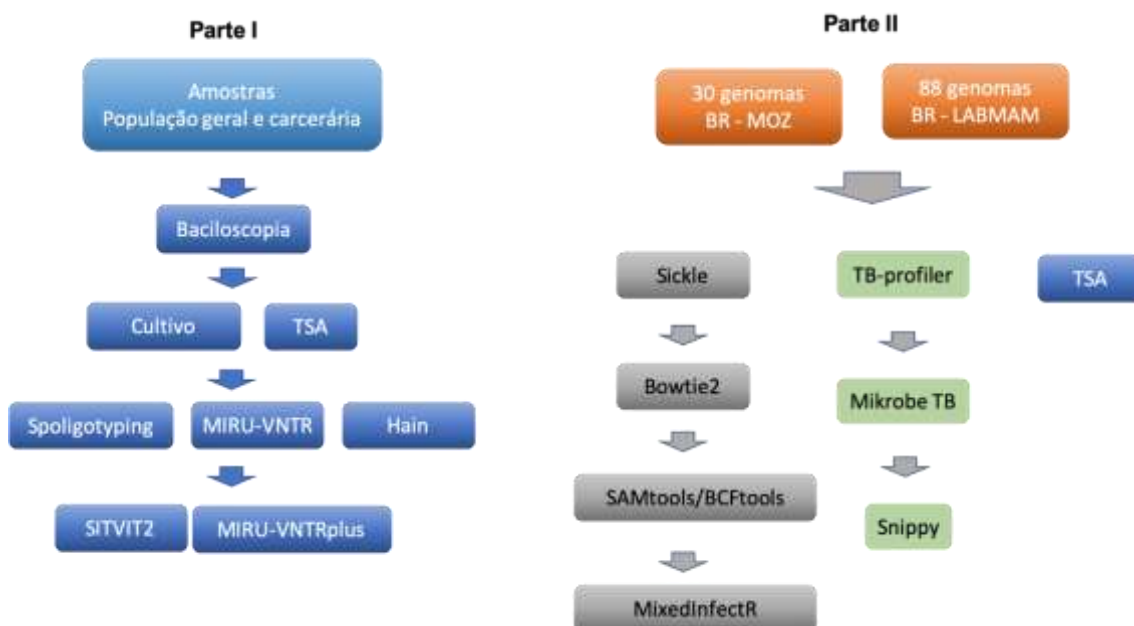
- Descrever a ocorrência de infecção mista em amostras provenientes de pacientes com TB e identificação molecular por *spoligotyping*, MIRU-VNTR e WGS;
- Analisar a associação de infecção mista em TB com dados clínicos e epidemiológicos;
- Caracterizar as mutações genéticas relacionadas à resistência às principais drogas anti-TB;
- Avaliar a associação de determinadas linhagens de *M. tuberculosis* à ocorrência de casos de infecção mista;

## 3 . METODOLOGIA

### 3.1. Desenho de estudo, pacientes e amostras

Esse estudo foi dividido em duas partes e dois fluxos de trabalho, como mostrado na **figura 3.1**. A primeira se baseia na identificação molecular de isolados de *M. tuberculosis* utilizando *spoligotyping* e MIRU-VNTR em uma coorte do estado de Rondônia. Esse estudo faz parte de um projeto que inclui esta tese e uma dissertação de mestrado (Gonçalves, 2017). Na dissertação em questão, foram executados e apresentados os dados de baciloscopia, cultivo, sensibilidade aos antimicrobianos e os padrões de *spoligotyping*. Nesta tese, foi refeita a análise dos padrões de *spoligotyping* em um banco de dados atualizado (SITVIT2), foi feito o MIRU-VNTR, identificação das mutações associadas à resistência através da fita *Hain GenoType MTBDRplus* e todas as análises a partir desses dados.

A segunda parte se baseia em análises de bioinformática em dois grupos distintos de genomas de micobactérias, sendo 30 genomas publicados por Feliciano *et al.* 2018 e 88 genomas, da coleção do nosso laboratório, publicados por Brynildsrud *et al.* (2018). Essa parte utiliza de programas de acesso livre para identificar suas linhagens, polimorfismos associados à resistência e SNPs em geral, e buscamos detectar infecções mistas. Esses genomas foram analisados por testes de suscetibilidade aos antimicrobianos anteriormente a este estudo (quadro em azul na parte II da **figura 3.1**). O *pipeline* consiste, para a parte cinza, na retirada dos adaptadores provenientes do sequenciamento e dos fragmentos de baixa qualidade através do uso de *Sickle*. *Bowtie2* mapeou os fragmentos e montou o genoma a partir do genoma de referência. As variantes (SNPs) foram identificados e compilados usando *SAMtools/BCFtools*. Por fim, o *script MixedInfectR* definiu a presença e proporção de infecções mistas.



**Figura 3.1. Fluxo de desenvolvimento das partes I e II.** Parte I. experimentos relativos as amostras submetidas ao TSA, *spoligotyping*, MIRU-VNTR e fita Hain consequentemente analisadas pelas ferramentas de dois bancos de dados, SITVIT2 e MIRU-VNTR*plus*. Parte II. Em laranja, dois grupos de genomas utilizados. Em cinza, programas utilizados para a detecção de infecções mistas. Em verde, programas para a identificação das linhagens e SNPs.

Trata-se de um estudo transversal, onde foram analisadas 756 amostras de escarro de indivíduos adultos do sexo masculino na faixa etária de 18 a 60 anos de idade admitidos nas três maiores unidades prisionais da capital de Rondônia no período de janeiro de 2014 a junho de 2015. As unidades selecionadas para o estudo foram: Casa de Detenção Dr. José Mário Alves da Silva - Urso Branco, Penitenciária Estadual Ênio dos Santos Pinheiro e Penitenciária Estadual Edvan Mariano Rosendo – Panda.

Para fins comparativos, a pesquisa analisou 1.260 amostras de escarro de indivíduos adultos de ambos os sexos na faixa etária de 18 a 60 anos de idade atendidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Rondônia (LACEN/RO) no período de janeiro de 2014 a junho de 2015.

### **3.1.1 Critérios de Inclusão**

Foram incluídos na pesquisa indivíduos adultos do sexo masculino na faixa etária de 18 a 60 anos reclusos nos presídios participantes do estudo que se encontravam sintomáticos respiratórios ou como contatos de casos de tuberculose, assim como indivíduos adultos da população geral de ambos os sexos na faixa etária de 18 a 60 anos atendidos pelo Laboratório de Tuberculose do LACEN/RO.

### **3.1.2 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos da pesquisa os indivíduos que não aceitaram participar e aqueles cujas amostras foram insuficientes para os testes em laboratório.

### **3.1.3 Aspectos éticos**

Os participantes da pesquisa preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa pelas Faculdades Integradas Aparício Carvalho (FIMCA), sob o número do parecer nº 1.671.793/2016.

## **3.2 Cultura de micobactérias, armazenamento e extração de DNA**

Para a análise das amostras de escarro, realizou-se baciloscopia. Simultaneamente à baciloscopia, realizou-se a cultura para micobactérias do escarro no meio de cultura de Löwenstein-Jensen, conforme orientação do Programa Nacional do Controle da Tuberculose (MS, 2008). Para a extração de DNA de *M. tuberculosis* foi utilizado o *kit QIAprep® Spin Miniprep e PureLink® Genomic DNA*. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotômetro *NanoDrop2000*.

### **3.3 Fenótipos e genótipos associados a resistência aos antimicrobianos**

O teste de suscetibilidade fenotípico foi executado por meio do kit BD BACTEC MGIT 960 SIRE como procedimento qualitativo de *M. tuberculosis* em cultura, à estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol.

As mutações associadas a resistência às drogas foram identificadas através do *Hain GenoType MTBDRplus tapes* (Genotype MTBDR; Hain-Life Science, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante, esses experimentos foram executados no Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios em Micobactérias (Lab Bact/INI).

### **3.4. Genotipagem**

#### **3.4.1 *Spoligotyping***

Realizou-se a caracterização dos isolados pela técnica *Spoligotyping* com Protocolo de Hibridização (TB-SPRINT) da Beamedex® (Gomgnimbou *et al.*, 2013). Esta tipagem molecular é baseada na detecção da presença ou ausência de sequências espaçadoras entre as repetições diretas (DR) através da hibridização dos fragmentos amplificados em microesferas com sondas específicas para cada um dos 43 espaçadores.

Os resultados geraram um código binário, que foram introduzidos em uma tabela de Excel e os perfis observados foram comparados com o banco de dados internacional de *Spoligotyping*, SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/index.jsp>) para a obtenção do SIT (*Shared International Type*).



### 3.4.2 MIRU-VNTR

Foram avaliados 24 loci de MIRU-VNTR para os isolados identificados por *Spoligotyping* seguindo as recomendações do manual (Supply, 2005) com modificações. O multiplex PCR foi realizado de acordo as condições descritas abaixo. De acordo com o protocolo, são realizadas reações de PCR contendo três pares de oligonucleotídeos marcados com fluoróforos diferentes em um total de 8 reações *triplex*. Foi utilizado o MyTaq® Mix (Bioline) para a amplificação dos *loci* e a eletroforese foi feita no aparelho 3130xl *Genetic Analyzer* da plataforma de análise de fragmentos do IOC/Fiocruz (RPT01D). O número de cópias de cada *loci* foi determinado utilizando o *software GeneMapper 4.0* (Applied Biosystems, Thermo Fisher) para análise de picos de alelos.

### 3.4.3 Análises de *spoligotyping* e MIRU-VNTR

Os números de repetições dos 24 loci de MIRU-VNTR e perfis de *spoligotyping* obtidos foram compilados em uma planilha com modelo pré-definido pelo banco de dados e submetidos ao MIRU-VNTR*plus* (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/>). Árvores de similaridades foram construídas utilizando o algoritmo *Neighbor Joining* a partir de uma matriz de distâncias e de acordo com o princípio da evolução mínima. Foi definido como um *cluster* (agrupamento) um grupo de duas ou mais amostras que tiveram perfis com distância máxima dos loci de 0,3.

Os perfis de *spoligotyping* que não foram encontrados no SITVIT2 foram identificados pela ferramenta de identificação por similaridade disponível no banco de dados, não tendo sido considerados resultados com a distância maior do que 0,25.

Os genótipos, sendo spoligotipos ou 24-MIRUs, foram introduzidos em formato Excel em *BioNumerics* versão 6.5 (Applied Maths, Bélgica) para a construção de *minimum spanning tree* (MST) – outra forma de representar os isolados em um gráfico selecionada para avaliarmos a dispersão dos isolados e a formação de agrupamentos dos mesmos. A MST é calculada pelos genótipos dos isolados e utiliza a contagem do número de locus variáveis. Nesse estudo,

utilizamos o MIRU-VNTR com uma distância máxima de 2 *loci* para formar complexos clonais (CC) pelas diferenças em seus genótipos respeitando a distância selecionada.

### 3.5 Análise de sequencias genômicas

Foram utilizados dois grupos de genomas. O primeiro é formado por 30 genomas de *M. tuberculosis*, 17 genomas de *M. tuberculosis* isolados de pacientes brasileiros e 13 genomas de *M. tuberculosis* isolados de pacientes de Moçambique, que foram publicados por Feliciano et al. 2018. As sequências do genoma completo foram depositadas no *European Nucleotide Archive* e estão disponíveis através do número de acesso: PRJEB23648.

O segundo grupo é formado por 88 genomas de *M. tuberculosis* isolados de uma coorte do Brasil que pertencem a coleção no nosso laboratório e cujo sequenciamento foi realizado por Brynildsrud *et al.* (2018).

O sequenciamento do genoma inteiro foi realizado em DNA obtido usando kits de extração de uma varredura de múltiplas colônias de culturas sólidas para todas as amostras, usando a Illumina MiSeq Sequencing System MiSeqV2-500 cycles (Illumina, San Diego, CA, USA) gerando 2 x 250 leituras paired-end de 500 pares de base. A biblioteca de DNA foi preparada utilizando o Nextera XT library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA).

#### 3.5.1 Tipagem molecular digital e identificação de polimorfismos de resistência a partir de genomas

Foram utilizados três programas, *KvarQ*, *Mykrobe Predictor TB* e *TB-profiler*, para uma análise acurada das mutações presentes nos genomas.

O *KvarQ* escaneia arquivos fastq com variantes conhecidas (Steiner, A, 2014). O código fonte pode ser baixado em (<http://github.com/kvarq/kvarq/releases>). O catálogo de resistência inclui variantes localizadas dentro dos genes *gyrA*, *rpoB*, *katG* e *pncA*.

O *Mykrobe Predictor TB*, desenvolvido no *Wellcome Trust Center for Human Genetics* (Universidade de Oxford), foi projetado para uma previsão rápida de resistência à antibióticos e identificação de linhagens a partir de dados WGS de *M. tuberculosis* (Bradley, 2015). Este programa é de livre acesso e pode ser obtido via GitHub (<https://github.com/iqbal-lab/Mykrobe-predictor/releases>), utilizando apenas dados gerados pelo sequenciamento da plataforma Illumina. O painel de resistência consiste em mutações nos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, *rrs*, *embB*, *rpsL* e *eis*. A detecção de mutações relacionada a PZA não está incluída. *Mykrobe Predictor TB* é projetado especificamente para detectar mutações de resistência de baixa frequência, tendo potencial para detectar heterorresistência.

O *TB-profiler* é um servidor *online* que reporta previsões de resistência para 11 antibióticos e identifica linhagens de *M. tuberculosis* (<http://tbd.r.lshmi.ac.uk/>). Sua produção inclui informações sobre as mutações de resistência em questão e mutações adicionais em 22 genes candidatos (Coll, 2015).

### **3.5.2 Identificação de infecção policlonal através de análise de sequência de genoma**

Entre os trabalhos utilizando abordagens de análise profunda de genomas para detecção de populações mistas de *M. tuberculosis* destacamos o do Sobkowiak *et al.* (2018), devido a capacidade de identificar misturas policlonais ou não, definir a proporção dos isolados e ter uma execução simples, quando comparado aos outros métodos publicados. Este trabalho usa basicamente dois tipos de ferramentas, divididas entre a função de chamada das bases variantes dentro dos genomas (*SAMtools/BCFtools*) e o uso de estatística (*script* em R, *MixInfectR*) a partir do arquivo obtido na primeira fase.

#### **3.5.2.1 Variant Call**

As leituras sequenciadas foram verificadas em relação à sua qualidade usando FastQC e aparadas para remover sequências de adaptadores e leituras de baixa qualidade usando *Sickle*. As leituras foram mapeadas em

relação ao genoma da cepa referência de *M. tuberculosis* H37Rv (Genbank no.: NC000962.3) utilizando *Bowtie2* (versão 2.3.4.3). A *variant call* foi conduzida usando SAMtools/BCFtools (versão 1.9), com variantes de baixa qualidade (escore de Phred Q <20, profundidade combinada DP <10) removidas e a chamada de heterozigotos foi habilitada – função que permite, em genomas diplóides, a identificação de mutações heterozigotas – para permitir a detecção da presença de alelos distintos dentro da amostra.

### **3.5.2.2 Caracterizando chamadas de bases heterozigotas**

Chamadas de base heterozigotas foram consideradas informativas para a determinação de infecções mistas. Em amostras de infecções mistas, as sequências mapeadas nesses locais serão uma combinação de leituras de uma cepa portadora de um SNP nessa posição e serão lidas de uma ou mais cepas adicionais que não o possuem, resultando em mais de uma chamada de alelo. Enquanto a presença destas assim chamadas bases heterozigóticas pode ser indicativa de mistura de cepas, estas chamadas também podem estar presentes na saída variante de amostras clonais não misturadas em locais sob forte seleção, ou em regiões de alta variabilidade. Além disso, para distinguir entre heterogeneidade clonal e verdadeiras infecções mistas, apenas amostras com > 10 locais heterozigotos serão consideradas como potenciais infecções mistas em análises posteriores. Esta estimativa foi calculada em trabalhos anteriores com as amostras do Malawi, com até 10 SNPs presentes entre indivíduos em cadeias de transmissão ou encontrados dentro de indivíduos evoluindo ao longo do tempo (Assunção Guerra *et al.*, 2015).

### **3.5.2.3 Detecção de infecção mista usando as chamadas de bases heterozigotas**

A abordagem para detectar infecções mistas se baseou no uso de linguagem R e o número de chamadas de bases heterozigotas em todo o genoma para estabelecer um limite mínimo para distinguir misturas (denominado como o “método de locais heterozigotos”). Este método simples permite a identificação rápida de misturas potenciais em grandes conjuntos de

dados sem requerer a interrogação mais complexa das leituras de sequência para calcular frequências alélicas em locais heterozigotos.

O limiar a partir do qual as amostras foram consideradas misturas foi determinado utilizando as amostras misturadas *in vitro*, cuja análise foi cega para a proporção de mistura conhecida de cada amostra, para determinar se um corte eficaz poderia ser estabelecido a partir de apenas uma variante. O *script* para isso, intitulado *MixInfectR*, foi publicado por Sobkowiak *et al.* (2018) e está disponível em Github (<https://github.com/bensobkowiak/MixInfect>); esse *script* precisa de um arquivo VCF com os campos *genotype* (GT), *read depth* (DP) e *allele frequency* DEPTH (AD), obtido por *SAMtools/BCFtools*.

### 3.6 Análises estatísticas e produção de gráficos

Os gráficos foram construídos, em sua maioria, utilizando o pacote *ggplot2* do software *Rstudio*. Dados relacionados a proporção dos genótipos, baciloscopia e resistência foram submetidos à algumas análises estatísticas com GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Os dados foram expressos com medianas aritméticas. Teste-T ou teste *Mann-Whitney* foram usados para avaliar a significância das diferenças observadas, de acordo com a análise prévia de normalidade dos dados. Um valor p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 4 . RESULTADOS

### 4.1 Pacientes e amostras

O presente estudo é a continuidade de uma dissertação de mestrado (Gonçalves, 2017) que inclui amostras de *M. tuberculosis* coletadas no período de janeiro de 2014 a junho de 2015 no estado de Rondônia, as quais são provenientes de uma população de 2.016 casos sugestivos de TB e que foram encaminhados ao LACEN-RO para investigação da carga de tuberculose nesta população. Essa tese partiu da repetição do *spoligotyping* e reanálise dos casos positivos, bem como a execução de outras técnicas de tipagem molecular (MIRU-VNTR) para uma caracterização mais acurada dos isolados obtidos, além do uso da fita Hain para identificar mutações associadas a resistência a rifampicina e isoniazida.

Dentre as amostras da população geral, 166 (20%) foram positivas para *M. tuberculosis*; enquanto da população carcerária foram 58 (5,5%), das unidades prisionais – Casa de Detenção Dr. José Mário Alves da Silva - Urso Branco, Penitenciária Estadual Ênio dos Santos Pinheiro e Penitenciária Estadual Edvan Mariano Rosendo – Panda – sendo 170 do ano de 2014 e 54 do ano de 2015. A maior parte das amostras da população geral pertence a Porto Velho, seguida de Guajará-Mirim e Ji-Paraná (**tabela 4.1**). Em relação ao *status* HIV/AIDS dos pacientes, 118 eram soronegativos, 13 soropositivos e 93 não possuíam informações relacionadas ao *status* HIV.

**Tabela 4.1. Cidades/Locais dos pacientes, número e frequência.**

LOCAL	N	%
Ariquemes	5	2,2
BR 364 km 88	1	0,45
Cacoal	2	0,9
Candeias	1	0,45
Espigão do Oeste	1	0,45
Guajará-Mirim	15	6,7
Humaitá	1	0,45
Itapuã do Oeste	2	0,9
Jaru	1	0,45
Ji-Paraná	14	6,2
Ouro Preto do Oeste	2	0,9
Pimenta Bueno	1	0,45

Porto Velho	86	38,4
Presidente Médici	1	0,45
Rolim de Moura	1	0,45
São Francisco do Guaporé	1	0,45
Seringueiras	1	0,45
Sítio 2 irmãos/linha 665	1	0,45
Teixeirópolis	1	0,45
Vilhena	4	1,8
Não informado	24	10,7
Presídio	58	25,9
Total	224	100

## 4.2 Faixa etária e sexo

Dos 224 pacientes, foi possível verificar a idade de 191 (**figura 4.1**). Destes, 43 (22,5%) pertencem à a faixa-etária dos 21-30 anos; 61 (31,9%) dos 31-40 anos 44 (23%) dos 41-50 anos; 29 (15,2%) dos 51-60 anos; 9 (4,8%) dos 61-70 anos; 4 (2,1%) dos 71-80 anos e 1 (0,5%) dos 81-90 anos. Assim, (77,4%) concentraram-se entre os 21-50 anos de idade. Em relação ao sexo dos indivíduos, dentre a população geral, 42/144 (29,2%) indivíduos pertenciam ao sexo feminino, 102/144 (70,8%) ao masculino e 22 não informaram.

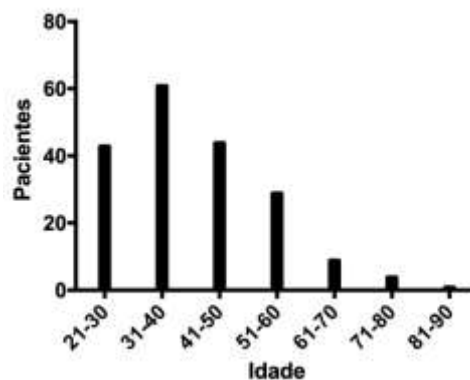


Figura 4.1. Idade dos pacientes.

## 4.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O resultado de TSA realizado para os 224 isolados de *M. tuberculosis* pode ser observado na **tabela 4.2**. Dentre os 166 isolados da população geral,

138 (83,1%) apresentaram sensibilidade e 28 (12,7%) algum tipo de resistência aos antibióticos. Quanto às 58 estirpes da população carcerária, 6,9% foram monorresistentes à estreptomicina.

**Tabela 4.2. Resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos 224 isolados de *M. tuberculosis*.**

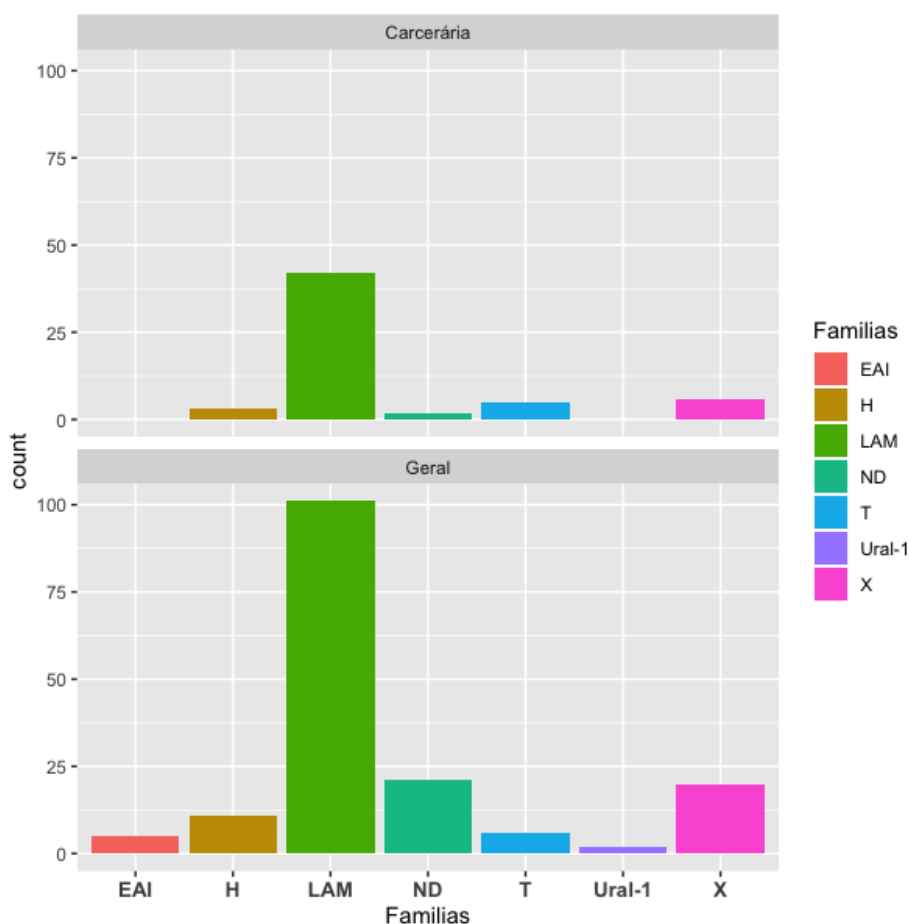
TSA	Geral		Carcerária	
	N	%	N	%
I <sup>a</sup> , S <sup>b</sup> , E <sup>c</sup> , R <sup>d</sup>	2	1,2	-	-
I, S, R	4	2,4	-	-
I, R	1	0,6	-	-
I, S	4	2,4	-	-
S, E	1	0,6	-	-
R	1	0,6	-	-
S	14	8,4	4	6,9
S, E	1	0,6		-
Sensíveis I,S,E,R	138	83,2	54	93,1
<b>Total</b>	<b>166</b>	<b>100</b>	<b>58</b>	<b>100</b>

a: (I) isoniazida, b: (S) estreptomicina, c: (E) etambutol, d: (R) rifampicina.

#### 4.4 Tipagem molecular por *spoligotyping*

A distribuição da variabilidade de famílias dos 224 isolados de *M. tuberculosis* por *Spoligotyping* é melhor visualizada através dos gráficos na **figura 4.2**. A família Latino American & Mediterranean (LAM) foi a mais frequente tanto na população geral (60,8%) quanto na carcerária (72,4%) totalizando 63,8% de todas as amostras do estudo. Ela foi seguida pela linhagem europeia X (11,6%, 26/224), com 12,8% na população geral e 10,3% na carcerária, pela família H (6,3%, 14/224) com 6,6% na população geral e 5,2% na carcerária e finalmente pela família T, com 3,6% da população geral e 8,6% da população carcerária, em um total de 4,9% das amostras. Foi possível identificar apenas dois isolados com o perfil Ural-1 na população geral. A família EAI (East African Indian) apareceu exclusivamente entre a população geral representando 3% dos casos. Novos perfis, no total, representaram 10,3% dos isolados analisados, sendo 12,8% da população geral e 3,5% da população carcerária.





**Figura 4.2. Gráficos com a distribuição das famílias definidas por Spoligotyping entre as populações (Geral e Carcerária).**

A descrição das subfamílias identificadas dentre as seis famílias (LAM, X, T, H, EAI e Ural) pode ser observada na **figura 4.3**. Na população geral, dentro da família LAM, houve predomínio da subfamília LAM 9 (35,5%), seguido de LAM 6 (10,3%), LAM 5 (6,7%), LAM 1 (2,4%), LAM 3 (2,4%), LAM 11-ZWE com 1,2% e LAM 2 com 0,6%. Já os isolados da população carcerária apresentaram LAM 9 (56,9%), LAM 1 (6,9%), LAM 6 (5,2%), LAM5 (3,5%) e LAM 4 (1,8%), não apresentando três subfamílias que foram identificadas na população geral: LAM 2, LAM 3 e LAM11-ZWE. A segunda família com maior número de isolados foi a X, sendo X3 (9,8% do total, 9,6% na população geral e 10,2% na carcerária), X1 e X2 (0,9% do total, cada), encontradas apenas na população geral representando 1,2%, cada. As subfamílias da família H, H1, H2 e H3 foram detectadas em 2,4%, cada dentro da população geral, e H2 e H3 com 1,7%, cada, entre os isolados dos indivíduos privados de liberdade.

Todos os isolados pertencentes a família EAI foram identificados entre a população geral, sendo EAI5 com 6,7% e EAI6-BGD1 0,6%.

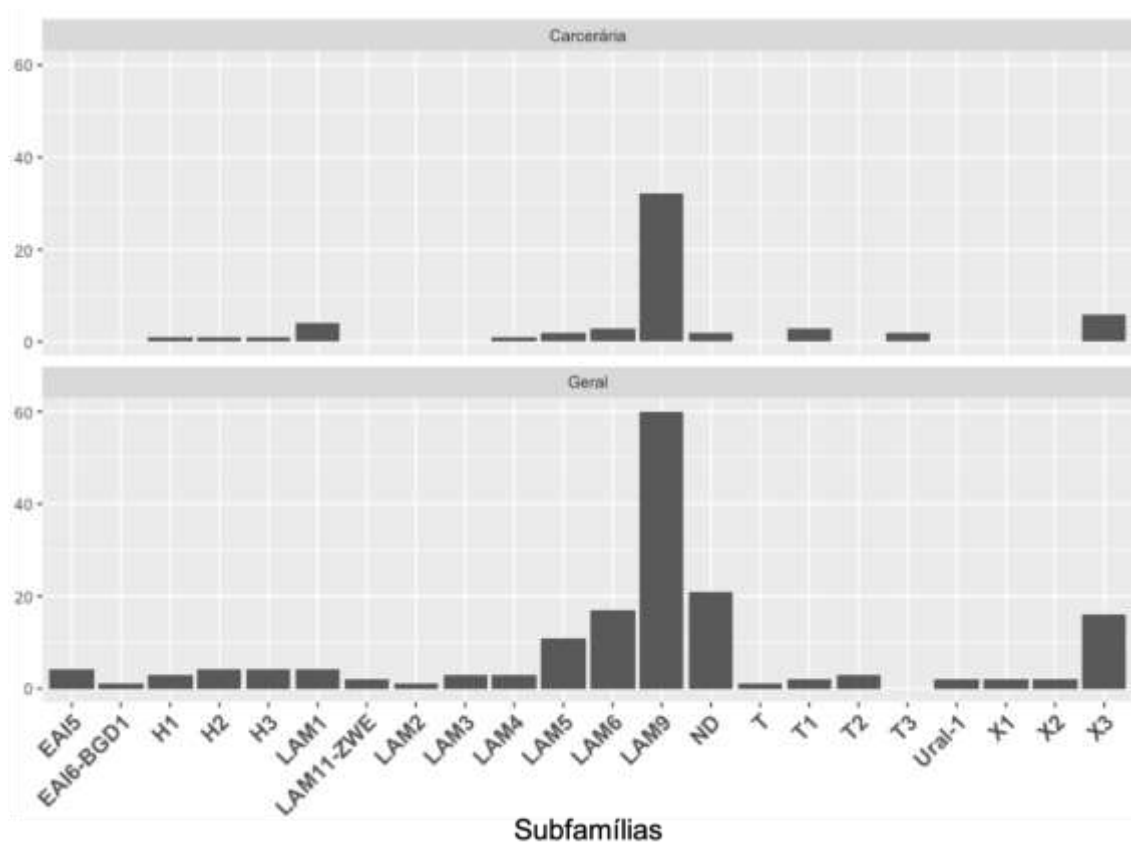
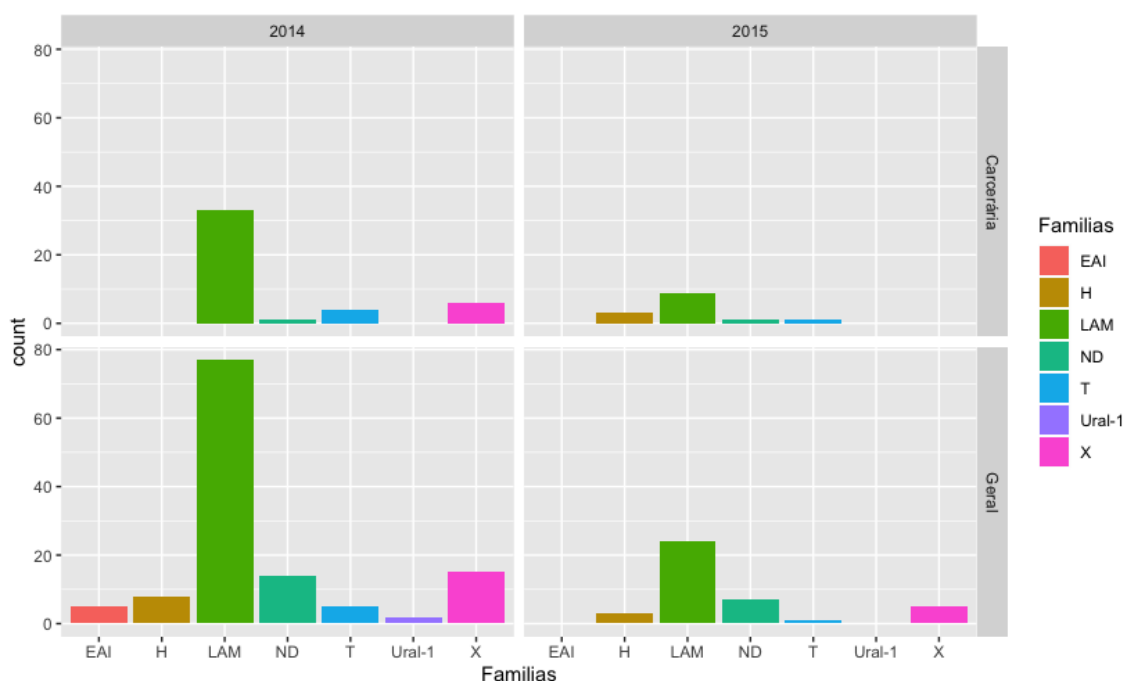


Figura 4.3. Distribuição de 167 isolados por Spoligotyping da população geral e 56 isolados da população carcerária.

A fim de obter mais dados da dinâmica da dispersão das famílias em relação ao tempo e a população analisamos a porcentagem de cada família em cada população de acordo com o ano de obtenção da amostra. No gráfico (figura 4.4), podemos observar que a família LAM se manteve em mais de 60% em cada população. Os perfis não encontrados no banco de dados aumentaram 5-6% entre os anos de 2014 e 2015 em ambas populações.

O oposto foi visto para a família T, reduzindo aproximadamente 2%. A família X foi identificada na população carcerária em 2014, mas não em 2015. Entre a população geral, 12% das amostras apresentaram o perfil X nos dois períodos. A família H não foi vista na população carcerária em 2014, mas representou 21% das amostras em 2015 desta população, sendo 6,4% e 7,5%

na população geral em 2014 e 2015, respectivamente. Por fim, a família Ural foi observada apenas na população geral em 2014 em duas amostras.



**Figura 4.4. Distribuição das famílias nos anos 2014 e 2015 entre a população geral e carcerária.**

Identificamos a presença de 50 SITs diferentes na população geral e carcerária, além de perfis novos (que não estão presentes no banco de dados). Os SITs mais frequentes foram SIT 42 (73//224; 32,65%), Novo/Órfão (22/224; 9,8%), SIT 92 (19/224; 8,5%), SIT 150 (12/224; 5,4%), SIT 64 (10/224; 4,5%) e SIT 216 (9/224; 4%). Esses e os outros SITs que compreendem de um a seis isolados estão na **tabela 4.3**.

**Tabela 4.3. SITs de acordo com o banco de dados internacional SITVIT2**

Subfamília	SIT <sup>a</sup>	n	Subfamília	SIT	n	Subfamília	SIT	n
LAM9	42	73	X1	1080	2	ND	402	1
ND	NOVO	22	ND	1491	2	LAM9	452	1
X3	92	19	LAM9	1758	2	T1	453	1
LAM9	150	12	LAM9	2263	2	T3	565	1
LAM6	64	10	T1	2499	2	EAI6-BGD1	702	1
LAM5	216	9	Ural-1	2503	2	LAM1	753	1
LAM1	20	6	H3	3	1	T2	1664	1
LAM6	95	6	ND	4	1	LAM9	1671	1
H2	2	5	LAM2	17	1	LAM1	1803	1



alguns parâmetros para essa análise. Assim, uma cruz (+) foi definida como 20 bacilos, duas cruces (++) como 100 bacilos e três cruces (+++) como 500 bacilos e, para as negativas foi dado o número 0 (zero).

Foi possível notar que a família LAM, além de apresentar o maior número de isolados e de subfamílias também apresentou uma distribuição diversa da quantidade de bacilos encontrados na amostra. Apesar de aparentes diferenças entre as medianas obtidas, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Por conta de sua diversidade, analisamos as subfamílias LAM em relação a baciloscopia dessas amostras. Foi possível notar que a concentração de amostras com +++ foi principalmente na subfamília LAM9 (SIT 42), ainda que sua mediana seja próxima com as outras subfamílias. Pode-se notar que apenas duas medianas ficaram maiores do que o restante, LAM1 (SIT 20) e LAM5 (SIT 216). De modo geral, não houve relevância estatística entre esses dados, exceto entre LAM9 (SIT 42) e LAM 5 ( $p = 0,0342$ ).

## 4.6 MIRU-VNTR

Obtivemos resultados de MIRU-VNTR para 176 amostras deste estudo (135 da população geral e 41 da carcerária). A análise dos perfis de MIRU-VNTR e *spoligotyping* dos isolados de *M. tuberculosis* no banco de dados MIRU-VNTR<sub>plus</sub> conduziu a seguinte classificação: 126/224 (56,3%) pertencendo a família LAM, 19/224 (8,5%) família H, 13/224 (5,85) família X e as famílias com apenas um representante estão resumidas na **tabela 4.4**.

**Tabela 4.4. Classificação baseada na combinação de MIRU-VNTR e spoligotyping.**

Família	n	%
LAM	126	76,9
H	19	11,6
X	13	7,9
Cameroon	1	0,6
EAI	1	0,6
Ghana	1	0,6
NEW-1	1	0,6
S	1	0,6
Ugandal	1	0,6
	164	100

### 4.6.1 *Mininum Spanning Tree (MST)*

Para avaliar a relação evolutiva entre os isolados, MST foram construídas a partir dos perfis de MIRU-VNTR-15 apresentados. Como pode ser observado na **figura 4.5**, 22 complexos clonais foram formados. A família LAM compôs, exclusivamente, 12 destes complexos e compôs outros 5 complexos e conjunto com isolados de outras famílias. O maior complexo formado é composto por isolados LAM, T, Ural, H e 4 não identificados.

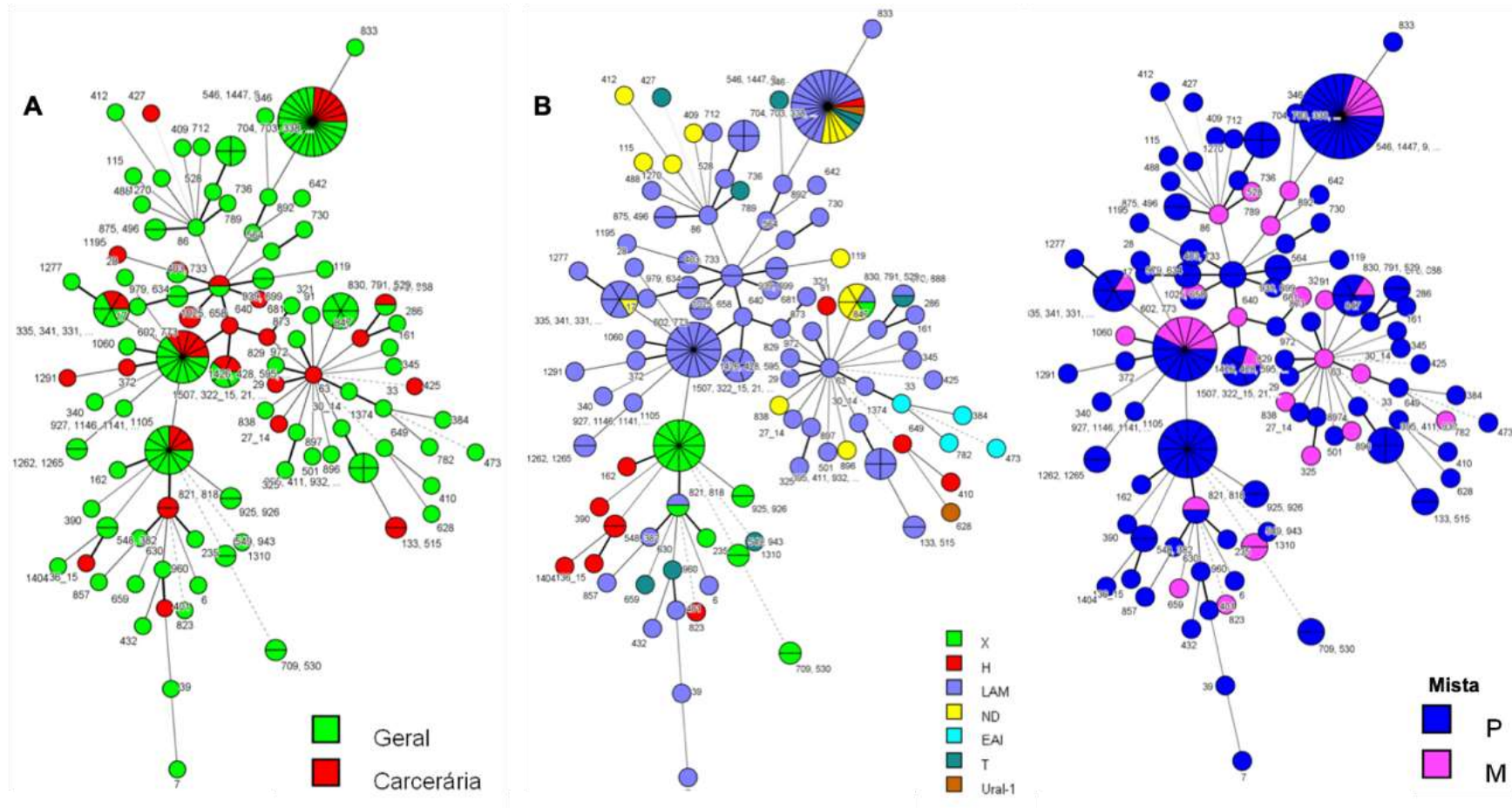
A família X se concentrou em uma ramificação da árvore e formou 4 complexos puros, isso é, compostos apenas por isolados unicamente de uma família. Houve a formação de dois outros complexos que incluem isolados da família X, mas em conjunto com outras famílias.

Os isolados da família EAI, apesar de não formarem um complexo, foram reunidos juntos em uma ramificação mais distante do centro da árvore. Os dois únicos isolados Ural desse estudo foram dispostos com grande distância e em braços diferentes.

A família T não apresentou agrupamento de seus isolados, que ficaram dispersos pela árvore, bem como os isolados não identificados, os quais foram dispostos ao longo da árvore em associação com isolados LAM.

Os isolados da população geral e carcerária se dispersam de forma a não divergirem, sugerindo que há transmissão entre as duas populações.

Quanto a dispersão da infecção mista, pareceu ser disseminada por toda as ramificações, entretanto, foi possível notar que esteve mais presente em complexos compostos por mais de uma família, exceto para os grupos formados exclusivamente por LAM.



**Figura 4.5. Minimum Spanning Tree baseada nos resultados de MIRU-VNTR-15. A.** Análise baseada na população de origem da amostra. **B.** Análise a partir das famílias identificadas. **C.** Distribuição das infecções mistas. P: isolado puro. M: isolados mistos.



#### 4.6.2 SUGESTÃO DE INFECÇÃO MISTA

Dos 176 (geral 135, carcerária 41) resultados de MIRU-VNTR que obtivemos, 34 amostras apresentaram bandas duplas, isso é, dois alelos, para pelo menos um dos marcadores (**anexo I**). Denominaremos estas amostras como mistas.

Identificamos 19,3% (34/176) de infecção mista nesta população – incluindo amostras policlonais, sendo 25/176 (14,2%) mistas entre a população geral e 9/176 (5%) na carcerária. Avaliando a presença de misturas proporcionalmente, observamos que a frequência de isolados mistos na população geral foi de 18,5% (25/135) e de 22% (9/41) na carcerária. Dentre as subfamílias presentes entre estas infecções mistas, a maior taxa foi da LAM9 representando 41% (14/34).

Avaliando a disposição dos isolados mistos quanto ao resultado de TSA, apenas três, todos entre a população geral, apresentaram resistência (como pode ser visto no **anexo I**), um para rifampicina, o segundo para estreptomicina e o terceiro MDR. Proporcionalmente, dentro de cada grupo, 8% (3/34) de infecções mistas resistentes e 20,4% (29/142) de infecções puras resistentes.

##### 4.6.2.1 investigando os isolados mistos

Quando analisamos os picos diferentes dentro das amostras, mantivemos os picos mais altos para o isolado principal ou majoritário e substituímos esses picos altos pelos menores (entre parênteses), nomeando este como segundo isolado ou minoritário. Entretanto, cabe dizer que essa foi uma medida inferida, não necessariamente afirma ser uma medida de quantificação absoluta. Abaixo segue o exemplo de como foi feito (**tabela 4.5**). A partir disso, construímos uma árvore para verificar a distância entre elas.

**Tabela 4.5. Exemplo do esquema de separação dos picos duplos.**

MIRU (#)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Amostra	2	4(+2)	2	2	1	4(+2)	1(+3)	3	2	3	4	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	8	3	2
Majoritário	2	4	2	2	1	4	1	3	2	3	4	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	8	3	2
Minoritário	2	2	2	2	1	2	3	3	2	3	4	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	8	3	2

Embora na relação entre os isolados majoritário e minoritário tenhamos observado uma similaridade genética, com base no *spoligo*typing e MIRU-VNTR, as distâncias calculadas entre as mesmas foi suficiente para distingui-las (**figura 4.6**). Ainda assim, duas amostras chamaram a atenção, 333 e 331, pois ficaram muito separadas de seus pares, sugerindo uma infecção mista por isolados diferentes e não provenientes do processo de microevolução.

Em relação a 331, algo mais interessante pode ser notado. Sua distância não só foi maior, mas também, quando comparadas por similaridade no MIRU-VNTR<sub>plus</sub>, dentre os isolados distintos na amostra 331, um se assimilou apenas a LAM, mas o segundo bateu com LAM e H, e seu perfil de *spoligo*typing não foi encontrado no banco de dados.

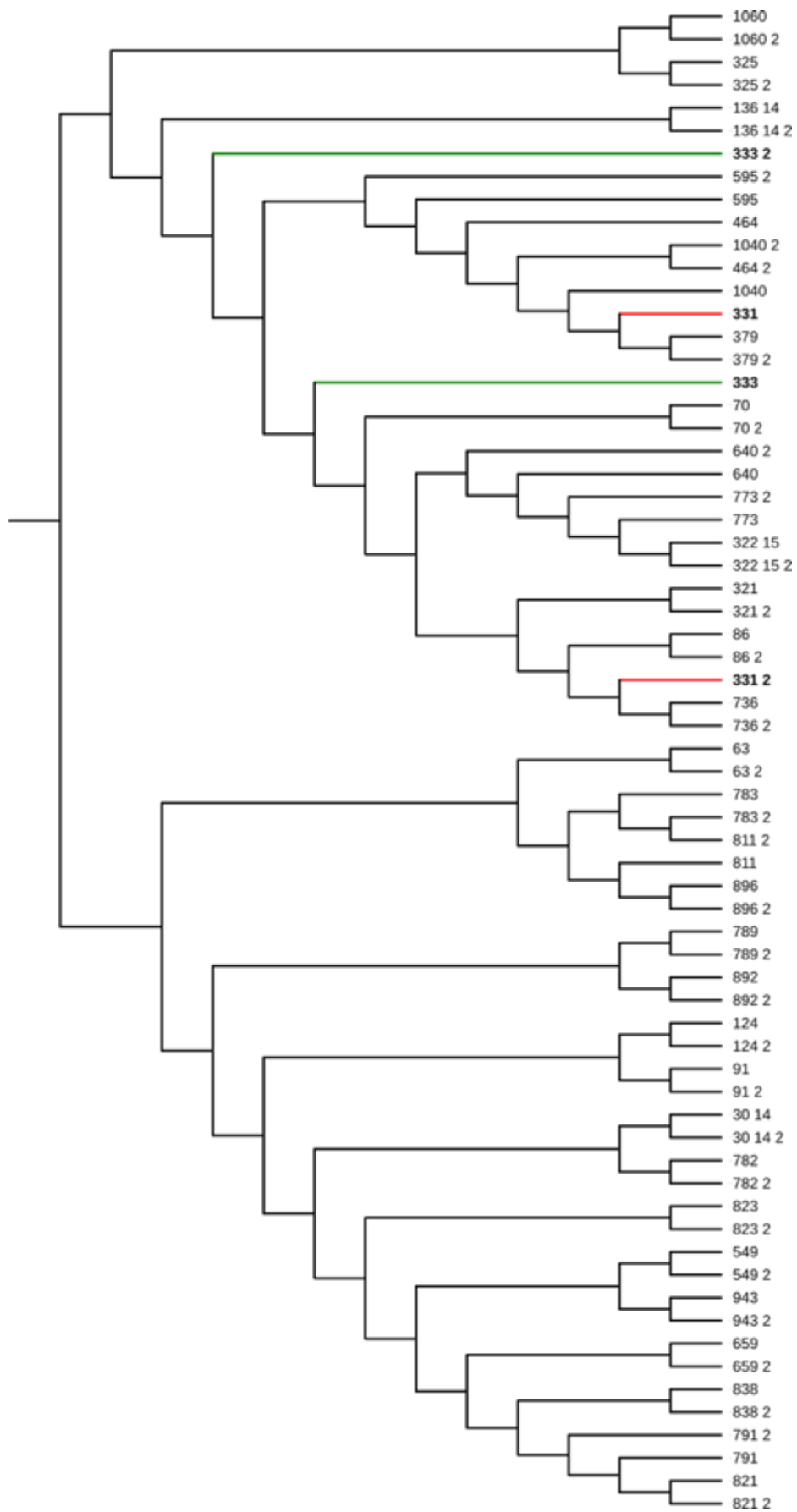


Figura 4.6. NeighborJoining tree da variação por amostra.

#### **4.6.3 Caracterização dos padrões de *spoligotyping* ausentes no banco de dados**

Durante a identificação dos isolados através de seus perfis de *spoligotyping* no SITVIT2, 17 não foram encontrados no banco de dados, e 6 apresentavam apenas o SIT. Desse modo, submetemos os resultados do MIRU-VNTR 24-loci ao MIRU-VNTR*plus*, onde excluímos as que não tinham pelo menos 15 marcadores devidamente amplificados.

Assim, tivemos 15 amostras que cumpriam os requisitos que foram submetidos a uma análise de NJ com o banco de dados MIRUVNTR*plus*, com apenas os resultados do MIRU ou com estes somados ao *spoligotyping*, em proporções diferentes (MIRU: *spoligotyping*; 1:1).

Em quase todas as análises 13 amostras foram agrupadas com a família LAM em três braços diferentes da árvore e duas foram agrupadas no braço Cameroon-Uganda II. Na proporção 1:1, o perfil da maioria se repetiu, mas quatro amostras foram agrupadas em um braço divergente. Neste, duas amostras formaram uma ramificação com uma amostra Uganda I, a terceira amostra foi colocada sozinha em uma ramificação que forma um grupo com as duas primeiras, 10 isolados Beijing, quatro H e um Cameroon, enquanto a quarta amostra formou uma ramificação separada com cepas H (**anexo II**).

#### **4.7 Isolados de *M. tuberculosis* provenientes de amostras clínicas do mesmo paciente coletadas em diferentes momentos**

No intuito de buscar compreender a dinâmica da infecção nos pacientes, comparamos amostras diferentes do mesmo paciente – coletadas em momentos diferentes entre os anos de 2014 e 2015 -- baseadas na identificação molecular por *spoligotyping*. De 22 pacientes, 50 amostras apresentaram crescimento para *M. tuberculosis* conforme descrito na (**tabela 4.6**), de acordo com sua ordem de coleta para cada paciente.

Comparamos os resultados de *spoligotyping* desses isolados. A amostra proveniente do paciente número 1 apresentou a linhagem X1 (SIT 1080) na primeira coleta e X2 (SIT 185) na segunda coleta. Em uma amostra do paciente número 10 foi identificada a classe LAM9 (SIT 150) e na outra LAM9 (SIT 42) e,

as duas amostras do paciente número 15 também foram classificadas na classe LAM9, uma pertencente ao SIT 150 e a outra ao SIT 42. As duas amostras do paciente 14 foram classificadas na classe X3, uma pertencente ao SIT 92 e a outra ao SIT 1751. As amostras do paciente número 17 foram identificadas como classe LAM9 SIT 42 e SIT 150; o paciente número 19 apresentou um perfil novo na primeira amostra com a ausência dos espaçadores 2 e 15 quando comparado com a segunda amostra que apresentou o perfil LAM9 (42). As amostras do paciente número 20 foram classificadas como LAM1 (SIT 20) e LAM9 (SIT 42). Quando analisamos as três amostras do paciente número 21, as amostras colhidas no primeiro e no segundo momento foram identificadas como LAM9 (SIT 42); no entanto, no terceiro momento a amostra foi caracterizada como pertencente a classe LAM9 (SIT 150); por fim, identificamos as classes X1 (SIT 1080) e X2 (SIT 185) para o paciente número 22. O restante dos isolados não apresentou diferenças.

Quanto aos perfis TSA, amostras de cinco pacientes apresentaram isolados com resultados diferentes. O paciente 2 com o primeiro isolado sensível para os quatro medicamentos, mas com o segundo isolado resistente para isoniazida. O primeiro isolado do paciente 4 apresentou resistência aos quatro antibióticos, o segundo isolado apresentou sensibilidade ao etambutol e o terceiro isolado apresentou o mesmo perfil do primeiro isolado. O caso seguinte, paciente 6, com sensibilidade total no isolado um, mas com resistência a isoniazida e estreptomicina no isolado 2. Para as 3 amostras do paciente 7, tivemos os seguintes perfis: resistência a estreptomicina nos isolados um e dois, e resistência adicional ao etambutol no terceiro. A sensibilidade a estreptomicina foi vista na segunda amostra do paciente 13, enquanto na primeira amostra havia sido detectado um perfil de resistência.

Com o intuito de avaliar o impacto da diferença desses perfis nessas amostras, analisamos a presença de polimorfismos associados à resistência a rifampicina e isoniazida através da fita Hain *GenoType MTBDRplus*. A maioria das amostras apresentou o perfil da fita compatível com o TSA, incluindo as MDR, exceto duas delas. Estas amostras, 649 e 546, tiveram TSA com perfil de resistência a isoniazida, mas apresentaram perfil sensível na fita Hain. Interessante ressaltar que a amostra 649 pertence ao paciente que demonstrou

um aumento na baciloscopia de acordo com o tempo (negativa na primeira amostra e +++ na segunda).







#### 4.7.1 MIRU-VNTR das amostras do mesmo paciente

Utilizamos o número de repetições dos MIRU-VNTR a fim de compreender a dinâmica da infecção de isolados do mesmo paciente, principalmente a infecção mista. A presença de mais de um pico por marcador indicaria fragmentos com números de repetições diferentes, ou seja, duas populações diferentes. Do grupo de 22 pacientes com mais de uma amostra, apenas as amostras de quatro destes não apresentaram diferenças nos MIRUs identificados, como pode-se notar na **tabela 4.7**.

Dentre os marcadores, três se destacaram em relação ao número de pacientes que apresentaram diferenças entre suas amostras, são eles VNTR 43, discrepante nas amostras de nove pacientes, ETR-A e QUB-26, com oito pacientes cada um. Todos os marcadores apresentaram diferenças nos perfis nos pacientes, tendo em média variado em cinco pacientes.

Apenas o MIRU 40 não apresentou nenhuma diferença entre os isolados. Nove MIRUs do painel apresentaram mais de um pico em pelo menos uma amostra, 424 apresentou dois picos em três amostras, MIRU 16 e VNTR 47 com dois picos em duas amostras, cada.

As amostras dos pacientes 4 e 16 apresentaram 15 e 14 MIRUs com perfis diferentes, respectivamente, seguidos pelo paciente 18 com 12 e o paciente 3 com nove. Foram três pacientes com sete MIRUs, seis com dois MIRUs e o restante com 1, 3 e 6. Cinco pacientes tiveram suas amostras apresentando picos duplos entre o MIRUs analisados, indicando uma população diversa. Quando analisamos as repetições diferentes ou mistas, nos pacientes 3, 19, 20, 21 e 22, podemos identificar pelo menos 3 populações diferentes em cada paciente, levando em consideração todas as amostras para cada um.

Dentre essas 50 amostras e 22 pacientes, 9 apresentaram SITs diferentes. Destes, 3 não apresentaram qualquer diferença no painel de MIRU-VNTR. Entretanto, 6 apresentaram diferenças no número de repetições comparados com as amostras do mesmo paciente bem como metade destas apresentaram picos duplos.

A amostra 331, que não pode ser identificada no banco de dados em relação ao perfil de *spoligotyping* encontrado, apresentou um número alto de variação, não só em relação a segunda amostra desse paciente, mas também pelo número de MIRU com picos duplos.

**Tabela 4.7. Número de repetições do MIRU-VNTR entre as amostras dos mesmos pacientes.**

COD	Amostra	SIT	MIRU 02 (154)	VNTR 42 (424)	VNTR 43 (577)	MIRU 04 (580)	MIRU 40 (802)	MIRU 10 (960)	MIRU 16 (1644)	1955	MIRU 20 (2059)	QUB-11b (2163b)	ETRA (2165)	VNTR 46 (2347)	VNTR 47 (2401)	VNTR 48 (2461)	MIRU 23 (2531)	MIRU 24 (2687)	MIRU 26 (2996)	MIRU 27 (3007)	VNTR 49 (3171)	MIRU 31 (3192)	VNTR 52 (3690)	QUB-26 (4052)	VNTR 53 (4156)	MIRU 39 (4348)
1	530	X1 (1080)	2	2	3	2	3	4	3	4	2	3	4	5	4	2	5	1	5	3	3	3	4	9	2	2
	709	X2 (185)	2	2	3	2	3	4	3	4	-	3	4	5	4	2	5	1	5	3	3	3	4	9	2	2
2	410	H1 (151)	2	2	2	2	3	5	3	3	2	3	3	2	3	2	3	1	5	3	3	3	3	5	4	2
	649	H1 (151)	2	2	2	2	3	4	3	3	2	3	3	2	3	2	3	1	5	3	3	3	2	5	4	2
3	86	LAM9 (42)	2	4(+2)	2	2	1	3	2(+3)	3	-	4	4	-	1(+2)	-	6	1	4(+2)	3	-	-	2(+4)	1	3	2(+3)
	1025	LAM9 (42)	2	4	4	2	-	3	2	3	2	4	2	4	1	1	6	1	4	3	5	2	2	6	3	2
4	17	LAM9 (42)	2	4	4	2	1	3	2	4	2	4	2	4	1	1	6	1	4	3	5	2	2	6	3	2
	161	LAM9 (42)	2	4	3	2	3	5	3	4	2	3	2	4	1	2	6	1	4	3	3	4	2	1	3	2
	875	-	2	4	2	2	1	3	2	3	3	4	4	4	1	1	6	2	4	1	5	2	2	6	3	2
5	830	LAM6 (95)	1	3	5	3	-	4	3	2	1	5	2	-	1	-	3	1	-	3	-	3	2	2	4	2
	857	LAM6 (95)	2	3	5	3	-	5	2	2	2	5	2	-	1	-	6	-	-	2	-	-	2	2	3	-
6	1447/14	ND (1491)	2	3	2	-	-	4	3	3	2	3	2	4	2	2	6	1	-	3	1	3	1	4	3	2
	546/15	ND (1491)	2	3	2	2	4	4	3	3	2	3	2	4	2	2	6	1	5	3	1	3	1	4	3	2
7	395	LAM5 (216)	1	3	5	2	-	-	-	3	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	3	2	7	4	2
	411	LAM5 (216)	1	3	5	2	-	-	-	3	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	3	2	-	4	2
	1374	LAM5 (216)	1	3	5	2	7	4	3	2	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	3	2	7	4	2
8	925	X3 (92)	2	4	3	2	-	4	3	2	2	3	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	3	2	2	2
	926	X3 (92)	2	4	3	2	4	4	3	2	2	3	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	3	2	2	2
	927	X3 (92)	2	4	3	2	-	-	-	2	2	2	3	4	-	2	5	1	5	-	3	-	-	3	-	2
9	372	LAM6 (64)	1	4	4	2	-	-	-	4	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	4	3	2
	1291	LAM6 (64)	1	4	2	2	3	4	3	4	2	2	4	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	4	3	2
10	703	LAM9 (150)	2	1	2	2	1	2	3	3	-	4	4	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	11	3	2
	704	LAM9 (42)	2	1	2	2	1	2	3	3	2	4	4	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	11	3	2
11	335	LAM9 (42)	2	4	2	2	1	4	1	3	2	3	4	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	8	3	2
	1426	LAM9 (42)	2	4	4	2	1	4	1	-	0	-	2	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	-	3	2

12	979	LAM9 (42)	1	1	4	2	-	4	3	3	2	2	2	2	4	1	2	6	1	4	3	3	3	2	7	4	2
	1195	LAM9 (42)	1	1	3	2	5	4	3	3	2	2	2	2	4	1	2	6	1	4	3	3	3	1	7	4	2
13	340	LAM9 (2263)	2	4	3	2	1	4	1	3	2	3	2	4	4	1	6	1	5	3	4	3	5	8	-	2	
	341	LAM9 (2263)	2	4	2	2	1	4	1	3	2	3	4	4	1	1	6	1	5	3	5	-	2	8	3	2	
14	1141	X3 (92)	2	4	3	2	4	4	3	2	2	2	3	4	4	2	5	1	5	3	3	-	3	3	2	2	
	1146	X3 (1751)	2	4	3	2	4	4	3	2	2	2	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	3	3	3	2	2
15	403	LAM9 (150)	2	1	4	2	-	-	-	3	2	4	2	-	1	-	6	1	4	3	5	-	2	-	-	2	
	602	LAM9 (42)	2	1	4	2	1	2	3	3	2	4	2	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	1	3	2	
16	6	LAM6 (64)	2	3	2	2	2	4	3	2	1	1	4	2	3	1	6	8	3	2	3	2	4	3	2	5	
	7	LAM6 (64)	1	3	2	2	2	4	3	6	2	2	4	4	1	2	8	1	3	3	3	2	2	5	3	2	
17	939	LAM9 (42)	2	1	4	2	-	2	3	3	2	4	2	1	-	1	6	1	5	3	5	3	-	11	-	2	
	972	LAM9 (150)	2	1	4	2	1	2	3	2	2	4	2	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	-	3	2	
18	1105	LAM6 (95)	1	3	5	2	-	-	-	5	2	2	2	4	1	2	6	1	5	2	3	-	2	2	-	2	
	1262	LAM6 (95)	1	3	2	2	2	4	3	5	2	2	2	5	4	1	2	6	1	5	2	3	2	2	2	3	2
	1265	LAM6 (95)	1	3	2	2	2	4	3	5	2	2	2	5	4	1	2	6	1	5	2	3	2	2	2	3	2
	1277	LAM6 (95)	2	4	2	2	2	4	1	3	2	3	3	4	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	8	3	2
19	331	Novo	2	4(+2)	2	2	1	4(+2)	1(+3)	3	2	3	4	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	8	3	2	
	428	LAM9 (42)	2	4	4	2	1	4	1	3	2	1(+2)	2	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	3	3	2	
20	640	LAM1 (20)	2	1	4(+3)	2	-	-	-	3	2	4	2	4	1(+4)	1	6	1	5	3	5(+3)	3	2	3	3	2	
	658	LAM9 (42)	2	4	4	2	1	3	2	3	2	4	2	4	1	1	6	1	4	3	5	2	2	6	3	2	
21	1507/14	LAM9 (42)	2	1(+2)	2(+3)	2	1	2	3	2	2	4	4(+3)	4	1	1	6	1	3	3	5	3	2	11	3	2	
	321/15	LAM9 (42)	2	1	4	2	1	2	3	4	2	-	2	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	3	3	2	
	322/15	LAM9 (150)	2	1	4	2	1	2	3	4	2	4	2	4	1	1	6	1	5	3	5	3	2	1(+2)	3	2	
22	549	X2 (185)	-	1	1(+3)	2	3	4	3	2	2	6	4	-	4	-	-	1	5	3	-	3	7	9	-	-	
	943	X1 (1080)	2	1	4	2	-	-	-	2	2	6	1(+3)	1	-	2	5	1	5	3	3	-	-	-	-	2	

## PARTE II

### 4.8 Análises genômicas

Estratégias de novos diagnósticos rápidos e acurados para a resistência aos antibióticos são urgentemente necessárias para garantir que os pacientes sejam diagnosticados precocemente e possam iniciar a terapia apropriada para melhorar o desfecho e prevenir a dispersão das bactérias resistentes aos medicamentos.

Uma das aplicações clínicas mais importantes do sequenciamento genômico de isolados de *M. tuberculosis* é a predição de fenótipo de resistência aos antibióticos. De qualquer modo, a confiança destas predições é feita de acordo com o nosso conhecimento da associação entre o fenótipo e o genótipo. Diversos estudos tem investigado a utilidade do WGS como uma ferramenta para TSA (13, 33, 35, Feliciano *et al.*, 2018).

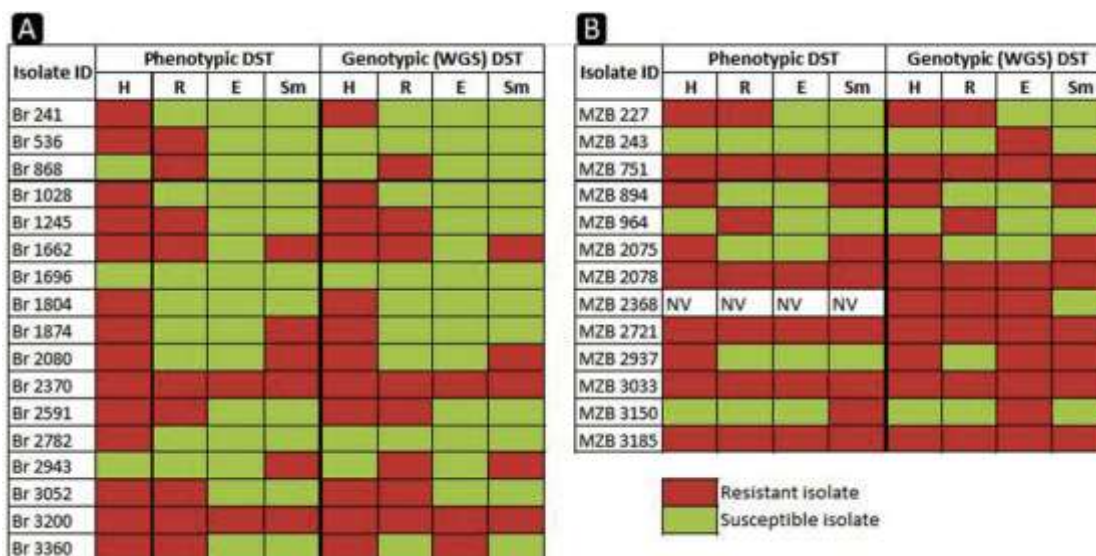
#### 4.8.1. Infecção mista por sequenciamento genômico em amostras com fenótipo de resistência

Feliciano e colaboradores (2018), em um estudo seccional, avaliaram 30 isolados de pacientes com TB-RD de São Paulo, Brasil, e da província Sofala, Moçambique (Feliciano *et al.*, 2018). As amostras foram avaliadas quanto a sensibilidade aos antimicrobianos, fenotipicamente (MGIT-SIRE) e genotipicamente (Xpert-MTB/RIF, MTBDRplus™, and MTBDRsl). Em seguida foram submetidos ao sequenciamento genômico.

Os dados apresentados pelos autores reforçaram o potencial do WGS para ser utilizado como preditor de DR. Entretanto, houve uma discrepância entre o WGS e o TSA para resistência a rifampicina (**figura 4.7**). Em dois isolados, TSA apresentou resistência sem que mutações associadas fossem detectadas no WGS e em outro isolado o oposto foi observado. Os autores sugerem que isso pode estar relacionado a presença de mais de uma cepa na mesma amostra clínica.

Dentre essas amostras, oito apresentaram fenótipo MDR entre as amostras do Brasil e seis entre as de Moçambique. Os isolados Br 536, Br

1874, Br 2782, Br 2943, Br 3360, MZB 243, MZB 2937 e MZB 3150 apresentaram discrepâncias entre o fenótipo e o genótipo (TB-Profiler).



**Figura 4.7. Comparação dos perfis de resistência entre TSA fenotípico e WGS.** Cor vermelha indica resistência ao antimicrobiano e cor verde indica suscetibilidade. H: isoniazida; R: rifampicina; E: etambutol; Sm: estreptomicina; NV: teste fenotípico não validado. Br: isolados do Brasil, MZB: isolados de Moçambique (Retirado de Feliciano *et al.*, 2018).

Portanto, buscando compreender as causas relacionadas a essa discrepância, utilizamos uma metodologia no ambiente R que se baseia na análise da profundidade do sequenciamento para identificar SNPs, diferenciando *reads* de cepas/clones distintos.

Após a análise, 80% (24/30) foram identificadas como infecção mista, com dois isolados em cada e com uma média de 174,6 SNPs heterozigotos (96-992) em uma média de 1166,8 (612-2629) dos SNPs totais em relação a referência.

Das 14 amostras com perfil MDR/XDR, seis apresentaram infecção com dois isolados distintos entre as amostras do Brasil, enquanto três das seis amostras MDR/XDR de Moçambique foram identificadas como infecção mista, como pode ser visto na **tabela 4.8**, totalizando 64,3% (9/14) de infecção mista entre os isolados MDR/XDR. Além disso, foi possível notar que seis das oito amostras que apresentaram discrepância foram definidas como infecção mista através das análises em R. Especificamente na amostra MZB 2937, foi detectada uma mistura de cepas pertencentes as linhagens 3 e 4, a proporção

de infecção mista foi similar nas duas análises, sendo de 89% (889/102) no TB-profiler (não mostrado na tabela) e de 84% no *MixedInfectR* (na **tabela 4.8**).

**Tabela 4.8. Relação das amostras com infecção mista entre os genomas do Brasil e Moçambique obtidos com *MixedInfectR*.**

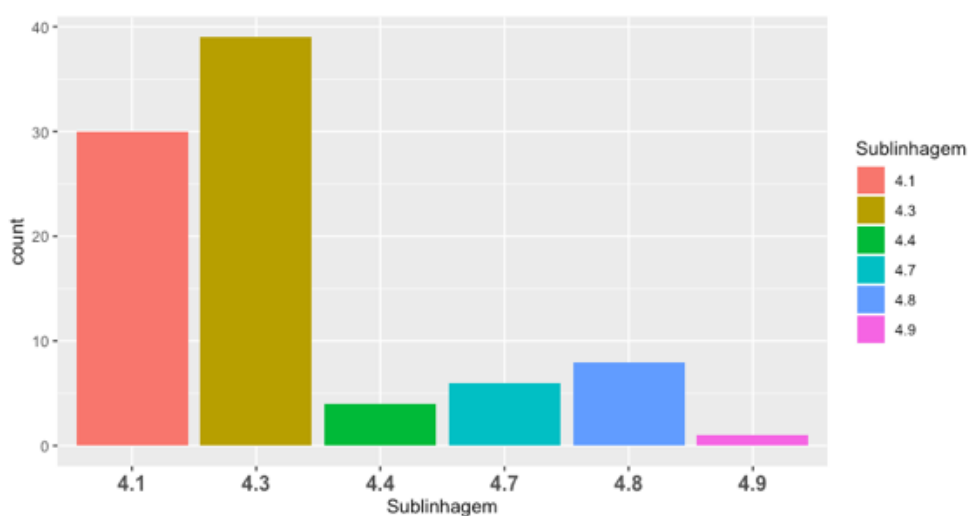
	SNPs mistos	Total SNPs	Proporção het/total	Número de isolados	Proporção da majoritária	Linhagem (TB-profile)	Fen/Gen <sup>1</sup>	
Br 241	61	920	6,63	2	64%	4.3		
Br 536	144	1560	9,23	2	69%	2.2	SIM	MDR
Br 868	59	573	10,30	2	75%	4.8		
Br 1028	72	925	7,78	2	71%	4.1		
Br 1245	139	1155	12,03	2	69%	4.1		MDR
Br 1662	116	1078	10,76	2	71%	4.1		MDR
Br 1696	72	642	11,21	2	67%	4.8		
Br 1804	68	891	7,63	2	74%	4.3		
Br 1874	133	1107	12,01	2	72%	4.3	SIM	
Br 2080	101	975	10,36	2	71%	4.3		
Br 2370	76	947	8,03	2	71%	4.3		XDR
Br 2591	65	913	7,12	2	70%	4.3		MDR
Br 2782	94	865	10,87	2	68%	4.1	SIM	
Br 3200	141	1113	12,67	2	69%	4.1		XDR
MZB 227	114	1010	11,29	2	70%	4.3		MDR
MZB 243	189	2386	7,92	2	68%	1.1	SIM	
MZB 751	80	938	8,53	2	64%	4.3		XDR
MZB 894	75	721	10,40	2	71%	4.3		
MZB 964	131	1533	8,55	2	70%	2.2		
MZB 2075	81	874	9,27	2	73%	4.3		
MZB 2368	75	922	8,13	2	72%	4.3		ND
MZB 2721	78	848	9,20	2	70%	4.1		XDR
MZB 2937	882	1639	53,81	2	84%	3 e 4	SIM	
MZB 3150	120	2272	5,28	2	67%	1.1	SIM	

Fen/Gen: se existe discrepância entre o fenótipo e o genótipo de resistência.

## 4.8.2 Genomas de uma coorte do Brasil

Depois de investigar a presença de infecção mista em 17 genomas de amostras do Brasil, conforme mostrado anteriormente, ampliamos a nossa amostragem no intuito de: (1) estudar genomas próprios da nossa coleção, sobre os quais possuímos maiores informações, (2) obter a proporção de infecção mista em uma coorte maior e exclusivamente brasileira, (3) buscar relação da infecção mista com os perfis de resistência e suscetibilidade, (4) identificar se a infecção pode influenciar em resultados divergentes entre os TSA fenotípico e genotípico, além de (5) verificar a presença de mutações correspondentes a TB-XDR. Então, selecionamos 88 genomas de *M. tuberculosis* da nossa coleção no laboratório.

Com o objetivo de buscar relação entre as linhagens e a presença ou ausência de infecções mistas, identificamos as linhagens desses genomas utilizando o software TB-profiler, que apresenta resultados em nível de sublinhagens (por exemplo, 4.1, 4.3), diferente dos outros programas que apresentam apenas grandes divisões (por exemplo, EA, EAI ou 1, 2 e 3). Todas as amostras pertenciam a linhagem 4 e obtivemos os seguintes perfis, a sublinhagem 4.3 representou 44,3% (38/88), sublinhagem 4.1 com 34,1% (30/88), sublinhagem 4.4 com 4,6% (4/88), sublinhagem 4.7 com 6,8% (6/88), sublinhagem 4,8 com 9,1% e um isolado da sublinhagem 4,9 (**figura 4.8**) e a relação completa pode ser vista no **anexo III**.



**Figura 4.8. Sublinhagens identificadas nos 88 genomas.**



Submetemos esses genomas à análise dos perfis de resistência em relação ao painel de SNPs associados a resistência contidos no Mykrobe-TB e Kvarq, adotando o primeiro como o padrão e o segundo para confirmar casos divergentes. Na **tabela 4.10**, comparamos a frequência entre o fenótipo e o genótipo de resistência. Foi visto que houve uma frequência maior de fenótipos de resistência quando comparados com os genótipos, pois 46,6% não apresentou resistência no TSA e 59% não apresentaram SNPs amplamente associados. Essa diferença foi vista tanto nas amostras com resistência apenas à isoniazida (13,6% no genótipo e 6,8% no fenótipo) como nas MDR (35,2% e 20,5%, respectivamente, fenótipo e genótipo). O oposto foi visto em relação a resistência à rifampicina, pois observamos uma porcentagem maior no genótipo (6,8%) do que no fenótipo (4,6%). Além disso, 6,8% dos genomas apresentaram evidências de XDR. Entretanto, cabe ressaltar que 65 genomas (73%) apresentaram SNPs que já foram citados em pelo menos um trabalho como estando relacionados à alguma resistência.

**Tabela 4.9. Fenótipo e genótipo de resistência.**

	Fenótipo (TSA)		Genótipo (Mykrobe TB)	
	n	%	n	%
Sensíveis	41	46,6	52	59,1
Isoniazida	12	13,6	6	6,8
Rifampicina	4	4,6	6	6,8
MDR	31	35,2	18	20,5
XDR	-	-	6	6,8

Identificamos 40 polimorfismos associados a resistência entre esses genomas. O mais comum entre os ligados ao fenótipo de resistência a rifampicina foi o S450L no gene *rpoB*, presente em 51,4% (18/35) dos genomas com esse perfil; destes, seis em associação com alterações no gene *rpoC* (**anexo III**). Em relação a resistência à isoniazida, 34 SNPs foram identificados, a substituição S315T no gene *katG* foi observada em 58,1% (25/43) dos genomas. Quanto aos outros antimicrobianos, foram identificados SNPs no seguinte número de genomas: 16 em relação ao etambutol, nove para estreptomicina, oito para quinolonas, 20 para pirazinamida e quatro para amicacina, capreomicina e canamicina.

Em relação aos isolados com genótipo XDR, não foi possível identificar por limitação do teste de sensibilidade executado (resultados para apenas 5 antimicrobianos), mas seis apresentaram polimorfismos associados a resistência a quase todos os antibióticos utilizados no tratamento como pode ser visto no **quadro 4.2**. Cabe ressaltar que um destes apresentou perfil no TSA de resistência apenas a isoniazida.

**Quadro 4.2. Perfil de resistência de isolados XDR em análises moleculares.**

Amostra	Resistência/Mutação						
	RIF	INH	EMB	PZA	STR	QR	A/C/K
BRZ-66	R	R	S	S	NA	NA	NA
	rpoB D435X	katG S315X	embB M306X	NA	rpsL K88R	gyrA S91X	rrs A1401X
	rpoB H445Y	-	-	-	-	-	-
BRZ-110	R	R	R	R	NA	NA	NA
	rpoB D435X, S450X	katG S315X	embB M306X	NA	rpsL K43R	-	rrs A1401X
	rpoB S450L	katG S315T	embB M306V	pncA M1L	rpsL K43R	-	rsK S467S
BRZ-111	R	R	S	S	NA	NA	NA
	rpoB M434X	katG S315X	embB M306X	NA	-	gyrA D94X	rrs A1401X
	rpoB S450L, rpoC V483G	katG S315T	embB M306V	pncA F58V	-	gyrA D94G	rrsK.S467 S
BRZ-75	R	R	R	S	NA	NA	NA
	rpoB Q429X	katG S315X	embB M306X	NA	-	gyrA D94X	rrs A1401X
	-	-	-	-	-	-	-
BRZ-84	S	R	S	S	NA	NA	NA
	rpoB Q429X, S450X	katG S315X	-	NA	-	gyrA S91X	rrs A1401X
	rpoB S450L	katG S315T	embB M306I	pncA Y41C	rrsS S164S	-	-
BRZ-76	R	R	S	S	NA	NA	NA
	rpoB S450X	katG S315X	-	NA	rrs C516X	gyrA A90X	rrs A1401X
	-	-	-	-	-	-	-

RIF: rifampicina, INH: isoniazida, EMB: etambutol, PZA: pirazinamida, STR: estreptomicina, QR: quinolonas, A/C/K: amicacina, capreomicina e canamicina. NA: não avaliado.

TSA: AZUL; Mykrobe TB: VERDE; Kvarq: AMARELO

Observando a distribuição desses perfis de acordo com a linhagem (**figura 4.9**), foi visto que a linhagem 4.1 teve o mesmo número de casos para MDR e sensíveis (13, cada), a linhagem 4.3 teve 12 casos MDR e 17 sensíveis.

Interessantemente, a linhagem 4.7 apresentou um número maior de MDR do que sensíveis, com 5 e 1, respectivamente.

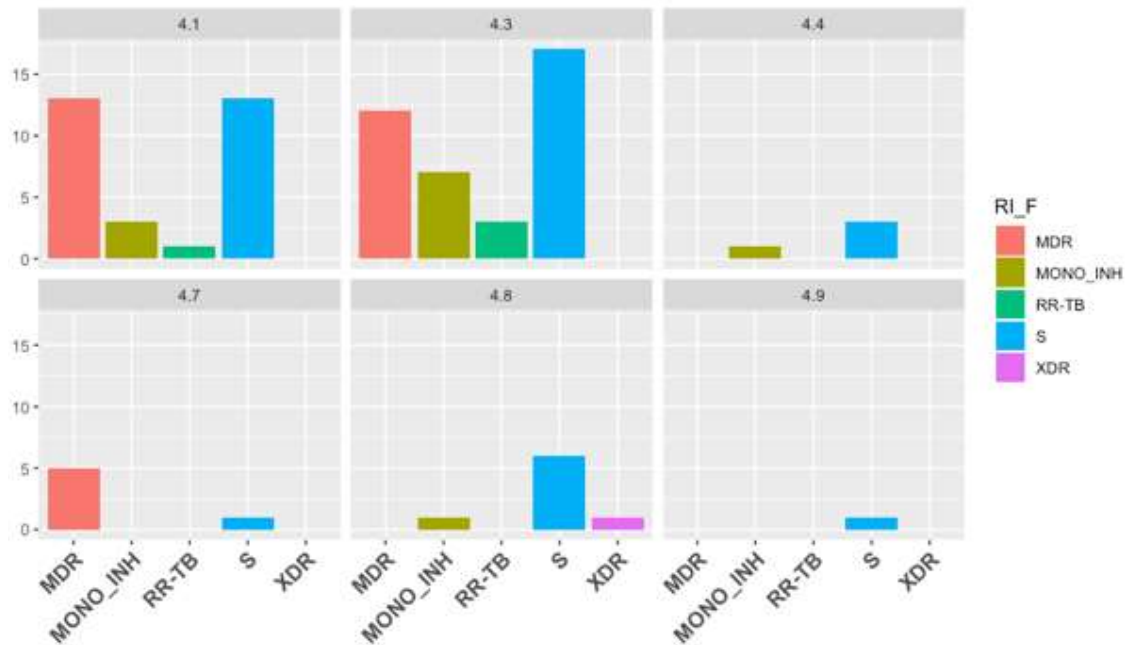


Figura 4.9. Distribuição dos fenótipos de resistência de acordo com as linhagens.

Na figura 4.12, pode-se notar que a proporção de sensíveis aumentou em relação aos resistentes, mas o número de XDR também aumentou. A relação MDR-sensíveis se manteve na linhagem 4.7, tendo como diferença um isolado que teve o perfil fenótipo MDR apresentando um genótipo XDR.

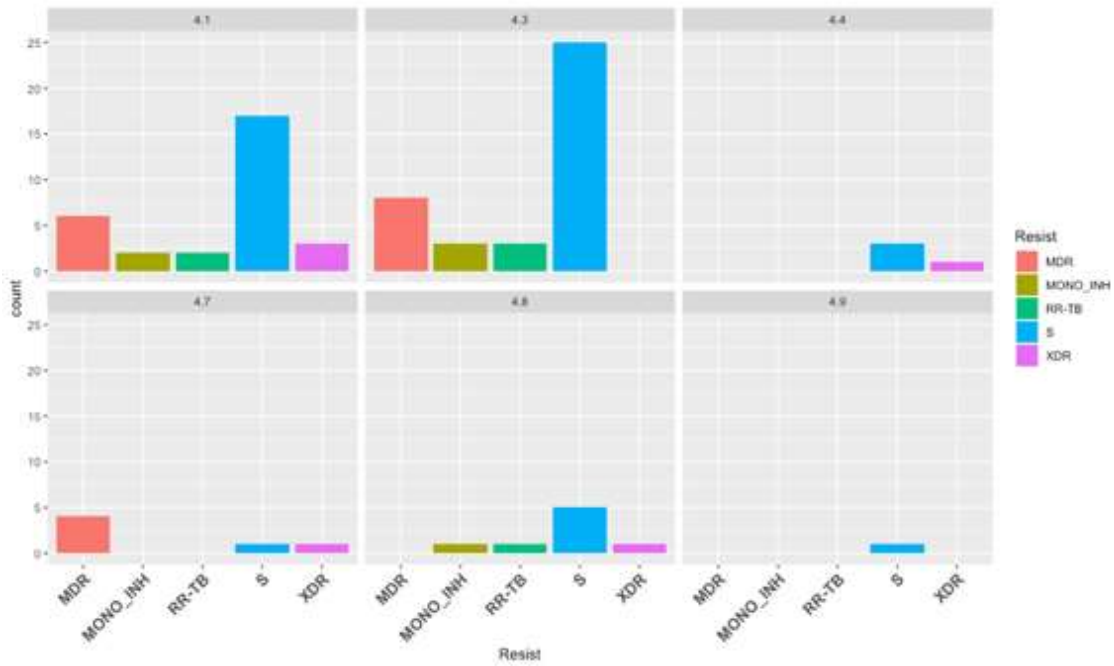
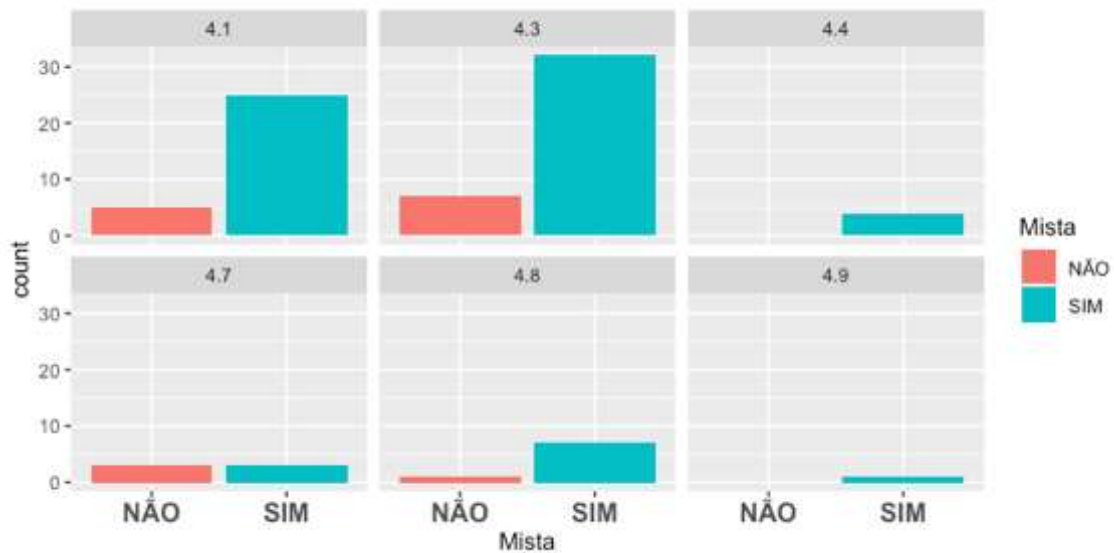


Figura 4.10. Distribuição dos genótipos de resistência de acordo com as linhagens.

#### 4.8.2.1 Infecções mistas

Após submeter esses genomas ao *MixedInfectR*, encontramos 81,8% (72/88) dos genomas com 2 a 3 isolados na mesma amostra (a relação das proporções de cada infecção mista pode ser vista no **anexo III**). Todas as sublinhagens apresentaram uma taxa maior de infecção mista do que pura, com exceção da 4.7 que apresentou o mesmo número para ambas e todas as 4 amostras da sublinhagem 4.4 também foram mistas (**figura 4.11**).



**Figura 4.11. Infecção mista de *M. tuberculosis* de acordo com a sublinhagem.**

Foi feita, então, a comparação das infecções mistas entre o fenótipo e o genótipo de resistência (**figura 4.12 A e B**). Foi visto que a proporção de mistas foi maior entre o fenótipo (21,6%) do que o genótipo (12,5%) em relação aos isolados com perfil MDR, quando levamos em conta números absolutos. Entretanto, proporcionalmente, a porcentagem de mistas exclusivamente nos isolados MDR, foi de 61,3% (genótipo) e 61,1% (fenótipo).

Ao avaliar a proporção das infecções mistas apenas entre os genomas com fenótipo mono-INH (12,5% do total), os genomas com essas mutações representaram 5,7% das infecções mistas. Dentre a combinação infecção mista com mono-INH, observamos que 91,7% (1/12) dos genomas continham dois ou três isolados.

Quando avaliamos os unicamente resistentes a rifampicina (RR-TB), ambos apresentaram 4 isolados mistos, mas dois genótipos puros foram vistos também. Por fim, a proporção de mistas e não mistas foi similar nos dois testes, mesmo que o número de isolados sensíveis tenha sido maior nas análises moleculares.

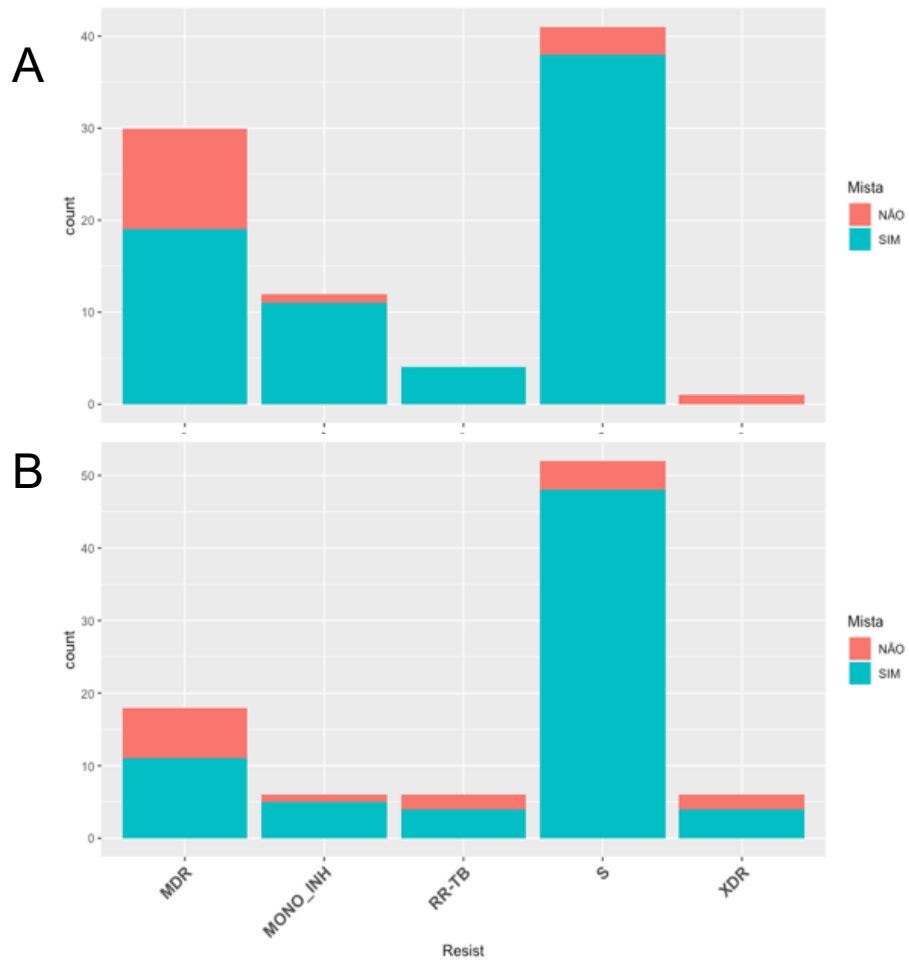


Figura 4.12. Proporção de infecção mista de acordo com o perfil de resistência. A. fenotípico. B. genotípico.

#### 4.8.2.2 Número de isolados presentes por amostra nas diversas sublinhagens

Na **figura 4.13**, pode-se observar que as sublinhagens 4.1 e 4.8 tiveram um número maior, proporcionalmente, de amostras com a presença de dois isolados, enquanto a 4.3 teve não apenas um número elevado de amostras com dois isolados, como também com três isolados. Mais uma vez a divisão na sublinhagem 4.7 se manteve equilibrada. Além disso, a amostra (no **anexo III**, BRZ-84) que possui perfil no TSA de morresistência a isonizida, mas perfil XDR no genótipo, apresentou infecção por pelo menos três isolados diferentes.

Em relação ao número de isolados e a sensibilidade aos antimicrobianos, 53% das amostras com dois isolados (49 amostras) apresentaram algum tipo de resistência e 32% do total MDR/XDR, enquanto para as amostras com três isolados (23 amostras) foi visto que 34% estavam relacionados com resistência e 13% destes eram de MDR/XDR. Quanto as amostras puras (16 amostras), 81% teve relação com algum fenótipo de resistência e 75% com MDR.

Analisando apenas entre os genomas com TSA sensível para todos os antimicrobianos testados, 56,1% (23/41) continham dois isolados e 36,6% (15/41) com três isolados. Observamos o mesmo perfil ao comparar o genótipo com 57,7% (30/52) e 34,6% (18/52) para genomas com dois e três isolados, respectivamente, enquanto a representação de amostras puras foi de 7,7% e 7,3%, para o genótipo e o fenótipo, respectivamente.

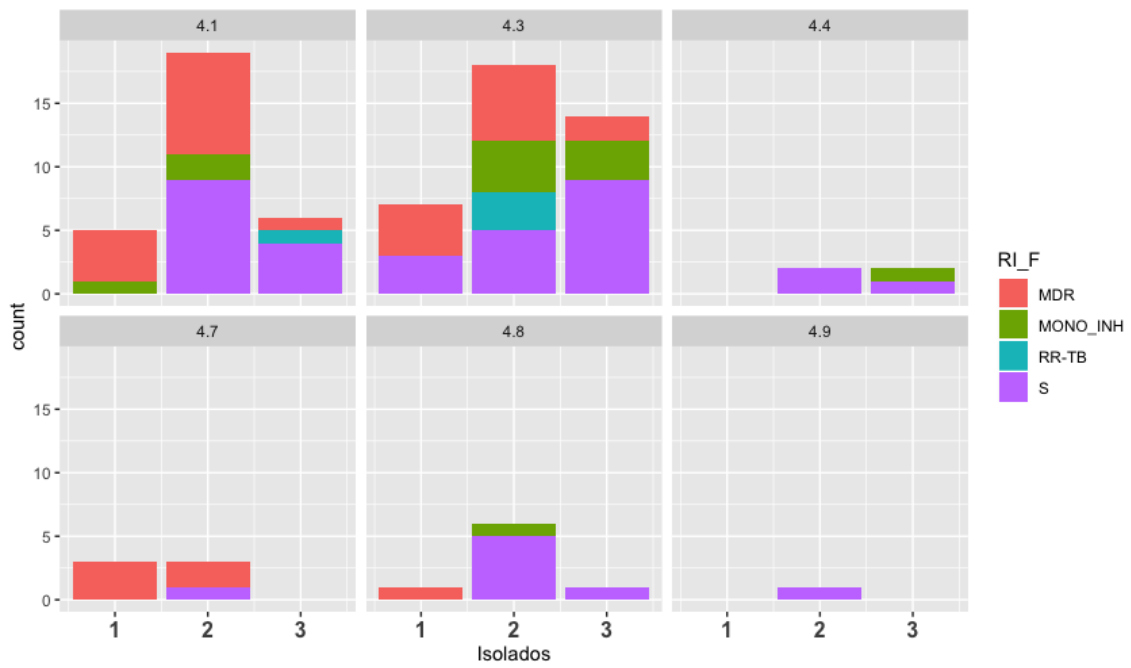


Figura 4.13. Relação do número de isolados detectados na infecção mista em suas respectivas sublinhagens e perfis de resistência.



## 5 5. DISCUSSÃO

Atualmente, técnicas moleculares têm sido utilizadas para identificar cepas de *M. tuberculosis* (Sreevatsan *et al.* 1997). Mesmo em ambientes com baixa incidência de TB, estudos de epidemiologia molecular demonstraram uma alta proporção de transmissão recente da doença (Alland *et al.* 1994; Small *et al.* 1994). Diversos estudos demonstram que a associação do diagnóstico molecular com o tratamento pode ser responsável pela interrupção da cadeia de transmissão do microrganismo na comunidade (WHO, 2014).

Os indivíduos podem ter características biológicas (imunodeficiência genética ou adquirida) e/ou sofrerem a ação de fatores de riscos ambientais ou adquiridos (deficiência nutricionais, diabetes ou alcoolismo), que os tornam mais favoráveis ao desenvolvimento do quadro clínico de tuberculose após a infecção e a falha terapêutica, sendo esta última a razão para que muitos pacientes não alcancem a cura e/ou venham a sofrer recidiva (Cohen *et al.* 2012).

A compreensão acerca destes cenários, através de estudos de coorte em países com altas taxas de TB, pode nos levar a novas perspectivas de tratamento e ao desenvolvimento de vacinas (Gomes *et al.* 2004).

A taxa de incidência anual estimada e a fração atribuível à população mostram que um melhor controle de tuberculose nas prisões pode potencialmente proteger os presos e os funcionários da propagação de TB dentro da prisão e reduzir significativamente a carga nacional da TB (Baussano *et al.*, 2010).

A ocorrência de TB em prisões vem sendo descrita como um alarmante problema de saúde pública em muitos países. A prevalência mundial de TB entre detentos possui uma média 26,4 vezes maior do que a da população geral, podendo chegar até 61,8 vezes maior do que as médias nacionais (WHO, 2007; Baussano *et al.*, 2010).

A população carcerária possui grande vulnerabilidade para a TB, em decorrência de um conjunto de fatores, incluindo aqueles relacionados às características desta população e do confinamento, como também do acesso aos serviços de saúde e condutas para controle de infecções (CDC, 2006;

Baussano, 2010). As prisões representam um reservatório para a transmissão da doença à comunidade em geral, de acordo com a literatura. A infecção por TB pode se espalhar para a população em geral através de funcionários da prisão, visitantes e contatos próximos de prisioneiros libertos (Niveau, 2006). A dinâmica de transmissão entre as populações geral e carcerária tem sido hipotetizada para desempenhar um papel fundamental na condução da incidência, prevalência e mortalidade da TB na população em geral (Stuckler *et al.*, 2008).

Pessoas de todas as idades são afetadas por TB, mas as maiores taxas estão entre homens adultos (WHO, 2019) que contabilizaram 57% de todos os casos no mundo. Dentre a população geral deste estudo, 70,8% são homens e 54,4% tinham idade entre 21-40 anos (**figura 4.1**).

De acordo com a OMS (WHO, 2019), a TB-MDR permanece como uma grande preocupação de saúde pública em muitos países. Entre os 37 países com alta carga de TB ou alta carga de TB-MDR, no ano de 2019, o Brasil consta entre os quatro países que não possuem dados nacionais em relação ao número de casos MDR.

Estima-se que em 2018, 3,4% dos novos casos mundiais e 18% dos casos previamente tratados apresentavam TB-MDR ou TB-RR (WHO, 2019). Dentre os casos identificados entre a população de Rondônia por este trabalho, apenas três casos já tinham sido tratados previamente, o que pode sugerir uma transmissão ativa de isolados resistentes entre esta população, principalmente resistência primária.

Na população estudada, os casos com resistência por TSA a pelo menos um dos medicamentos foi de 28%, enquanto para TB-MDR/RR foi 4,8% (**tabela 4.2**). Entre os estudos brasileiros, houve grande variabilidade de resultados, dadas as características de cada população estudada, variando de 9,4% a 19,2% e para TB-MDR variou de 3,4% a 15% (Brito *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2015; Fregona *et al.*, 2017).

Na população de Rondônia incluída no presente estudo, houve a predominância de resistência à estreptomicina na população geral, sendo esta

a única resistência encontrada entre os privados de liberdade, seguida pela resistência à isoniazida e então à rifampicina. Para os casos TB-MDR, a maior frequência foi a resistência combinada de isoniazida, rifampicina e estreptomicina.

De forma divergente, outros estudos brasileiros (nos estados do Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) observaram uma predominância de resistência a isoniazida seguida por estreptomicina e, em casos TB-MDR, maior frequência de isoniazida em conjunto com rifampicina (Braga *et al.*, 2003; ; Souza *et al.*, 2006; Brito *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2012; Fregona *et al.*, 2017). Fregona *et al.* (2017) argumentam que esses perfis de resistência podem estar relacionados às políticas de notificação, mas também foi sugerido que perfis de resistência podem ser diferentes de acordo com a região ou a coorte estudada (Dalcolmo *et al.*, 2007; Basit *et al.*, 2014).

### **Famílias por spoligotyping**

Evidências apontam que a migração humana tem influência na composição genética e variabilidade de *M. tuberculosis* associada à região (Mokrousov, 2007; Brites & Gagneux, 2017).

As principais famílias encontradas neste estudo foram LAM, X, H e T (63,8%, 11,6%, 6,3% e 4,9%, respectivamente), que representam 86,6% dos isolados estudados (**figura 4.2**). Destas famílias, LAM, H e T são as mais frequentes na África, América Central, Europa e América do Sul (Brudey *et al.*, 2006). Outros estudos do Brasil, que não incluem Rondônia, apontam as famílias LAM, H e T como as predominantes, mas com uma baixa frequência da família X (Miranda *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012; Ritacco *et al.*, 2012; Furlaneto *et al.*, 2013; Dantas *et al.*, 2015).

A família H tem sido associada à TB-MDR, e a associação deste genótipo com surtos de cepas resistentes demonstra claramente seu potencial epidêmico (Mardassi *et al.*, 2005; Farnia *et al.*, 2006). Entretanto, o oposto foi visto entre os 14 isolados de H identificado neste estudo, pois foram observados apenas três com resistência no TSA, sendo um deles TB-MDR.

Cinco isolados foram identificados como pertencentes a família EAI, representando 3% das amostras desse estudo (**figura 4.2**). A família EAI está entre as mais frequentes na população paraense, também na região norte do Brasil; no entanto é raramente relatada na América do Sul (Miranda *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012; Conceição *et al.*, 2017). Duarte *et al.* (2017) sugerem, após reunir dados de diversos estudos que incluem amostras de 10 estados brasileiros entre os anos 1995-2011, que a família EAI pode ser endêmica, mas de baixa frequência no Brasil; sua presença no território brasileiro pode ter relação com a migração entre o leste africano e o Brasil durante o período de tráfico de escravos (Conceição *et al.*, 2019).

Identificamos dois isolados da família Ural, ambos Ural-1 (SIT 2503), entre as amostras da população geral (**figura 4.2**). Essa família tem sido descrita circulando principalmente no Norte da Europa e da Ásia, na Rússia e em países que formavam a União Soviética, com isolados esporádicos em outras localidades (Mokrousov, 2012, 2015). Ambos apresentaram resistência no TSA (**anexo I**), um isolado apenas a RIF e o segundo isolado sendo MDR (INH, RIF e STP). Estudos recentes de diferentes partes do leste europeu (Moldova, Lituânia, noroeste da Rússia) relataram um aumento na circulação de isolados MDR de Ural, alguns como XDR ou pré-XDR (resistência a INH e RIF, incluindo a FQ ou a um agente injetável de segunda linha, mas não ambos) (Barnejee *et al.*, 2008; Crudu *et al.*, 2014; Morrousov, 2015; Vyazovaya *et al.*, 2015). Sinkov *et al.* (2018) caracterizaram um *cluster* de Ural associado a pré-XDR e suas mutações características associadas à resistência. Esses dados, somados a frequência, ainda que baixa, de 0,1 a 1,2% (representando de 1 a 5 isolados por estudo), dos isolados circulantes no Brasil (Nogueira *et al.*, 2016; Conceição *et al.*, 2017; Medeiros *et al.*, 2018), demonstram importância para serem investigados e acompanhados.

A população carcerária apresentou 8,6% (5/56) de família T – em maior proporção do que a população geral que foi de 3,6% -- sendo 5,3% (3/56) T1 e 3,6% (2/56) T3 (**figura 4.3**). A família T não é bem definida levando a convergência e a uma classificação não real dos isolados.

Foi possível observar que, apesar da sobreposição da distribuição das subfamílias entre as duas populações, algumas delas foram vistas apenas em

uma população e/ou ano específico, como pode ser visto nas **figuras 4.3 e 4.4**. Isto indica que, apesar da existência dessa sobreposição sugerir que ambas as populações tem cadeias de transmissão em comum, ainda existem cadeias de transmissão específicas para cada população.

Em relação às subfamílias encontradas apenas na população geral, identificamos 10: EAI5 e EAI6, LAM2, LAM3, LAM11-ZWE, T, T2, Ural-1, X1 e X2. Destas, todas as pertencentes à família EAI e os dois isolados Ural-1 só foram identificados no ano de 2014, o que sugere que a presença desses isolados específicos pode estar sujeita a algum evento específico que ocorreu apenas nessa população.

Na população carcerária foram encontradas duas subfamílias não detectadas na população geral, as subfamílias T3 e X3. A presença exclusiva destas duas indica que existe uma cadeia de transmissão ocorrendo e se mantendo nesse cenário, o que reforça a importância de identificar e tratar os casos no interior das unidades prisionais que podem servir de reservatórios.

A família X é altamente prevalente nas Américas do Norte e Central e pode estar ligada a uma ascendência anglo-saxã, sendo encontrada em áreas colonizadas pelos ingleses, como no Reino Unido, EUA, Austrália, África do Sul e no Caribe (Brudey *et al.*, 2006a). Neste estudo a família X apresentou as subfamílias X1, X2 e X3, com maior proporção do SIT92 de distribuição universal, o qual também foi encontrado por Malaspina *et al.* (2008) em Ribeirão Preto/SP, por David (2007) em Portugal e por Cafrune *et al.* (2009) em Porto Alegre em seus estudos. Diversos estudos em coortes brasileiras detectaram baixa frequência ou nenhum isolado dessa família (Gomes *et al.*, 2012; Kuhleis *et al.*, 2012; Perizzolo *et al.*, 2012; Luiz *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013; Vinhas *et al.*, 2013; Huber *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2014; Vasconcellos *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2016; Conceição *et al.*, 2017) divergindo do que foi encontrado neste estudos, pois foi observada uma frequência de 11,6% (**figura 4.2**), especialmente com a subfamília X3 (**figura 4.3**).

Os *spoligotypes* mais frequentes neste estudo foram: 42, 92, 150, 64 e 216 (**tabela 4.3**). Amplamente distribuídos, os *spoligotypes* SIT42 (LAM9) agruparam o maior número de amostras, englobando 33,6% (73/224) de todos

os casos deste estudo, seguido por 22/224 (9,8%) de *spoligotypes* não descritos no banco de dados, fato que pode sugerir que ambos são mais facilmente transmitidos e possivelmente mais adaptados.

Na população em geral, observaram-se 20 subfamílias (**figura 4.3**) enquanto na população prisional, 11 subfamílias. Assim, nos presídios se identificou um menor número de famílias, portanto, uma menor diversidade encontrada quando comparadas com a população geral, fato que já era esperado visto que o tamanho populacional das prisões é menor e/ou devido a transmissão recente entre essa população.

Foram descritos 18 SIT observados pela primeira vez no Brasil que podem estar relacionados à questão das movimentações populacionais, em que existe forte movimento de migração, conforme proposto por Gomes *et al.* (2011). Um destes perfis (código octal 577737607760700, **quadro 4.1**) foi identificado em seis pacientes e parece ser exclusivo do Brasil (Couvin *et al.*, 2018), sugerindo uma elevada adaptação desse genótipo no Brasil.

Um estudo recente mostrou uma associação entre uma maior virulência e a carga bacteriana elevada dos escarros antes do tratamento (Tram *et al.*, 2018). Também relacionaram menor virulência em isolados da linhagem 4 (Euro-American) do que a linhagem 2 (East Asian/Beijing). Neste estudo, foi possível comparar os resultados da baciloscopia com as famílias e subfamílias identificadas. Apesar das limitações deste trabalho, foi possível observar uma sutil diversidade nas cargas bacterianas em relação as subfamílias LAM, principalmente entre LAM9 (SIT 42) e LAM 5 (SIT 216), mas será preciso aumentar a amostragem, refinar os critérios e selecionar outras formas de medição para investir profundamente essa questão.

## **MIRU-VNTR**

A combinação de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR tem sido proposta como um novo padrão molecular para estudos epidemiológicos (Supply *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2011). Bem como para a definição de clusters e indicação potencial de transmissão (Merker *et al.*, 2017).

Desse modo, submetemos os isolados já identificados por *spoligotyping*, ao MIRU-VNTR 24 loci, especialmente quando foi possível coletar mais de uma

amostra, em momentos diferentes, para cada paciente. Os perfis das famílias identificadas, de modo geral, não foram discrepantes com e sem a associação do *spoligotyping* com o MIRU-VNTR, exceto para a superfamília T, que foi agrupada entre as estirpes da família H no banco de dados MIRU-VNTR<sub>plus</sub>. Essas diferenças na classificação através dessas duas técnicas foram descritas primeiramente por Vasconcellos *et al* (2014) e, mais recentemente, foram novamente apontadas por Salvato *et al* (2019).

Delineamos MST para resumir as prováveis relações entre os perfis de MIRU-VNTR-15 em nosso estudo (**figura 4.5**). A família LAM foi disposta em todos os braços da MST, como esperado para uma família tão diversa composta por tantas subfamílias neste estudo. Alguns isolados de outras famílias apresentaram fracas ligações em outros ramos, e houve uma representação central e superior de isolados LAM e uma ramificação abaixo reunindo exemplares das famílias X, H e alguns T. Resultados similares foram vistos em outros estudos (Gomes *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2016; Medeiros *et al.*, 2018). Esses resultados reforçam que os eventos de transmissão entre as populações estão intimamente relacionados e ocorrendo de forma simultânea.

Interessantemente, os dois isolados Ural-1 foram dispostos em pontos distantes da MST, o que sugere que esses casos possam não estar ligados a mesma cadeia de transmissão. Isto, além do fato de ter sido identificada por outros autores em isolados do Brasil (Nogueira *et al.*, 2016; Conceição *et al.*, 2017; Medeiros *et al.*, 2018) levantam a possibilidade de que a prevalência dessa subfamília possa estar ocorrendo de forma subnotificada.

Os isolados EAI, pertinentes apenas a população geral, foram dispostos em um braço mais distante da árvore, como esperado por pertencerem a linhagem 1 que é relativamente distante das outras famílias do estudo que compõem a maioria da árvore, como a linhagem 4 (Comas *et al.*, 2013; Coll *et al.*, 2014; Stucki *et al.*, 2016).

Ainda, na porção superior da MST (**figura 4.5 B**), formou-se um *cluster* composto por isolados das famílias LAM, X, Ural, T e quatro perfis novos, agrupando tanto amostras da população geral quanto da carcerária. Interessantemente, também inclui isolados mistos – todos provenientes da população carcerária e isolados das famílias LAM e X. Esse agrupamento

ressalta a proximidade da transmissão destas populações e poderia sugerir que a ocorrência de infecção mista estaria associada a um cenário onde existe presença de diversas estirpes e não apenas por casos de reinfecção da mesma estirpe.

### **Sugestão de infecção mista**

Entre as abordagens moleculares, MIRU-VNTR atualmente é o método mais utilizado para a detecção de infecções policlonais ou mistas (Oelemann *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2008). A infecção mista na tuberculose pode ocorrer especialmente em países com alta carga da doença (Chatterjee & Mistry, 2013). Existem diversos relatos sobre a determinação de infecções mistas em países com carga mediana (Cohen *et al.*, 2012). Infecções mistas são uma das razões que podem levar a falha na terapia da tuberculose, mas a frequência das infecções mistas frequentemente não é conhecida. Desse modo, a determinação destas infecções policlonais é crucial para o controle da tuberculose nas populações (van Rie *et al.*, 2005).

Alguns autores definem infecção mista utilizando o MIRU-VNTR, quando por exemplo um isolado apresenta mais de uma amplificação para dois ou mais loci, e a amplificação múltipla de um único locus como uma representação de evolução clonal (Cohen *et al.*, 2012, Hajimiri *et al.*, 2016). Por outro lado, outros autores consideram infecção mista quando pelo menos um locus apresenta mais de um alelo (Fang *et al.*, 2008; Mokrousov *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2011).

Através do uso do MIRU-VNTR-24 loci, detectamos 19,3% (34/176) de infecção mista em nossas populações de estudo, seja por casos de reinfecção pela mesma estirpe (com apenas um locus de diferença) ou por isolados correspondentes a estirpes divergentes (dois ou mais loci diferentes). Essa taxa está de acordo com as taxas que foram encontradas em diversos estudos. Um estudo com pacientes do Irã demonstrou a existência de infecções mistas em 26,6% das amostras (Hajimiri *et al.*, 2016); alguns países da Ásia e da África apresentaram uma frequência de até 19% (Warren *et al.*, 2004; Rigouts, 2006; Fang *et al.*, 2008; Mokrousov *et al.*, 2009; Dickman *et al.*, 2010). Em Malawi e Taiwan, as taxas foram de 2,8% e 11,3% de infecções mistas,



respectivamente (Huang *et al.*, 2010; Mallard *et al.*, 2010). No Quirguistão foram detectados 13,7% dos pacientes com tuberculose com infecções mistas (Mokrousov *et al.*, 2009). No Vietnã a prevalência foi de 3,1% (Huyen *et al.*, 2012), enquanto para a África do Sul e Uganda, as taxas foram de 9% e 7% respectivamente (Dickman *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2011). Esses resultados reforçam a linha de que cenários onde as cargas da doença são maiores favorecem a ocorrência das infecções mistas, e o Brasil é um dos 30 países com as maiores cargas de tuberculose (WHO, 2019).

Alguns autores buscaram associar a presença da infecção mista à alguma linhagem ou família específica. Hanekom *et al.* (2013) indicaram as famílias Beijing (linhagem 2) e H (Harleem, linhagem 4) como mais prováveis de ocorrerem em infecções mistas, sugerindo, ainda, que possa existir uma adaptação de determinadas estirpes às populações que costumam infectar.

Huang *et al.* (2010) não apenas avaliaram as infecções mistas como apontaram que estas influenciam nos perfis de suscetibilidade, onde a presença de infecção mista (Beijing + não-Beijing) estava mais associada a presença de pelo menos uma resistência – incluindo MDR, enquanto estirpes puras da família Beijing estavam mais associadas aos casos unicamente MDR, e estirpes puras não-Beijing apresentavam maior frequência de suscetibilidade.

Como pode ser verificado no **anexo I**, 33 infecções mistas identificadas nesse estudo pertencem a linhagem 4 e uma EAI (linhagem 1), e apenas 3 destas apresentaram resistência no TSA (1 MDR, 1 RIF e 1 STP), essas últimas pertencem a família LAM. Essa proporção de mistura associada à linhagem 4 era esperada por conta do número de isolados pertencentes a mesma e principalmente da família LAM. Portanto, apesar do grande número de LAM9 (SIT42) compondo infecções mistas, o número de amostras deste estudo é um fator limitante para essa associação. Entretanto, foi possível observar uma taxa proporcional de mais do que o dobro de infecções puras resistentes do que infecções mistas com esse perfil (20,4% para os isolados puros e 8% para os mistos).

Ainda com base nos resultados de MIRU-VNTR, buscamos investigar mais profundamente essas infecções mistas, através da definição do que seria o isolado majoritário e o minoritário. Partimos do ponto em que aquele que

estaria em maior concentração na amostra apresentaria uma amplificação maior e, conseqüentemente, um pico mais alto nas análises para todos os alelos de cada amostra. Como pode ser visto na **figura 4.6**, a maior parte dos isolados foi disposta próxima aos seus pares, como é de se esperar em um cenário com endemia típica de determinadas famílias. Entretanto, as distâncias dos isolados das amostras 331 e 333 foram suficientes para que estes fossem dispostos em braços diferentes e distantes das árvores, sugerindo que existe uma relação mais dinâmica entre as estirpes e a ocorrência de infecção mista por isolados de diferentes estirpes.

Foi feita uma análise por similaridade a fim de verificar se esses isolados se diferenciavam a ponto de pertencerem a famílias, subfamílias ou mesmo linhagens diferentes. Apenas a amostra 331 apresentou uma diferença significativa, pois a majoritária possui o perfil LAM, e a minoritária possui a mesma similaridade para duas subfamílias distintas, LAM e H, sugerindo uma infecção por pelo menos 3 isolados ou algum conflito na classificação. Chatterjee & Mistry (2013) relataram um caso similar, em que uma infecção mista seria a responsável por um conflito na classificação, com subfamílias caracterizadas por esses perfis mistos corroborando o nosso resultado, pois a amostra 331 apresentou um perfil de *spoligotyping* não registrado no banco de dados, enquanto a amostra 333, nesta divisão, apresentou perfil LAM para ambas.

Durante a identificação das amostras por *spoligotyping*, 22 amostras apresentaram perfis não identificáveis no SITVIT2, portanto utilizamos os resultados de MIRU-VNTR para ampliar a resolução de sua identificação. Através da análise por similaridade e construção de uma árvore NJ (**anexo II**), foi possível inferir que 13 isolados podem fazer parte da cadeia evolutiva da família LAM, enquanto outras foram aproximadas de estirpes identificadas como Ugandal, Beijing, H e Cameroon. Esse resultado indica que é preciso levar em consideração a evolução das estirpes pertencentes as famílias endêmicas. Além disso, sugere que na circulação de outras estirpes com baixa predominância no Brasil, estas podem apresentar variações em suas taxas evolutivas ao ponto de seus perfis de *spoligotyping* serem alterados e não identificáveis.

Utilizamos os perfis de *spoligotyping* para investigar a dinâmica das populações de *M. tuberculosis* nesses pacientes. Obtivemos mais de uma amostra para 22 pacientes, em momentos diferentes. Destes pacientes, nove apresentaram diferenças de SIT entre suas amostras (**tabela 4.6**), sendo cinco com a ausência de um ou mais espaçadores da DR numa amostra coletada em um segundo ou terceiro momento, em relação a primeira amostra coletada desse paciente. O oposto também ocorreu, ou seja, a segunda ou terceira amostra do paciente com a presença de um ou mais espaçadores em relação a primeira amostra. Então, é possível inferir alguns cenários, baseados no que sugere a literatura em relação a infecções mistas (Mclvor *et al.*, 2017; Ley *et al.*, 2019):

Para as amostras que “perderam” espaçadores, (1) isto poderia ser devido a uma microevolução dentro do hospedeiro ou (2) devido a uma cadeia de infecção onde os eventos aconteceram dentro de uma população restrita ou (3) por uma superinfecção com ambos os perfis onde houve seleção durante a coleta do escarro (ou durante o cultivo). Quanto as amostras que “ganham” espaçadores, (1) reinfecção por outro isolado ou (2) recidiva de uma infecção anterior ou (3) superinfecção com ambos os perfis e, conseqüentemente, seleção na coleta e/ou cultivo.

Apesar da existência da infecção mista por *M. tuberculosis* ser aceita de modo geral (Alonso *et al.*, 2012; Chatterjee & Mistry, 2013; Bidovec-Stojkovič *et al.*, 2014), estudos abrangentes sobre seu impacto no tratamento ainda são raros. Infecções policlonais de *M. tuberculosis* podem ter impacto negativo no TSA tanto por métodos fenotípicos quanto genotípicos (Zheng *et al.*, 2012; Zetola *et al.*, 2014). Isto representa um outro problema para o diagnóstico e tratamento de pacientes com TB, cuja heterorresistência é mais difícil de detectar pelo método TSA típico (Hofmann-Thiel *et al.*, 2014).

Ao analisar os dados de *spoligotyping*, TSA e fita Hain dessas amostras (**tabela 4.6**), foi possível observar que todas as diferenças de resistência desta amostragem estavam presentes entre os pacientes que não apresentaram diferenças nos perfis de *spoligotyping* de suas amostras. Entretanto, cabe ressaltar que isolados de dois pacientes que inicialmente foram sensíveis no TSA e que foram confirmados como resistentes em um segundo momento,

foram os mesmos que contiveram discrepância entre o TSA e a fita Hain, com essa última não detectando mutações associadas a resistência, o que reforça a ocorrência de resistência sem a presença das mutações já caracterizadas.

Por conta da não associação dos resultados de *spoligotyping* com heterorresistência, investigamos se a os perfis de MIRU-VNTR, sugerindo infecção mista ou apenas a diferença de alelos entre os isolados do mesmo paciente, poderiam servir de indicadores. Entre os cinco pacientes que apresentaram discrepâncias de resistência em suas amostras, apenas o paciente 6 apresentou infecção monoclonal pelo MIRU-VNTR, enquanto os outros quatro pacientes não apresentaram infecções mistas, apenas diferenças entre os alelos. O caso com a maior diferença foi o do paciente 4 que continha 14 loci diferentes. Os isolados desse paciente demonstraram a presença de resistência a SIRE no primeiro momento, sensibilidade à estreptomicina na segunda coleta e, novamente, perfil SIRE. Isso pode sugerir tanto uma competição entre esses isolados heterorresistentes quanto a seleção pelos métodos de análise.

Ainda temos o exemplo do paciente 7, cujos dois primeiros isolados possuíam perfil suscetível no TSA e sem diferença nos MIRU; o último isolado, porém, continha um locus diferente dos outros dois e resistência a dois antimicrobianos, etambutol e estreptomicina. Esse resultado sugere uma microevolução que levou ao surgimento da resistência. Outro cenário foi visto com o paciente 13, que previamente era resistente a estreptomicina e, depois, com três alelos diferentes, totalmente suscetível, esse evento estaria associado à uma reinfecção por outra estirpe.

A avaliação de infecções mistas é importante por diversas razões: diagnóstico acurado da doença, tratamento efetivo dos pacientes e controle populacional da tuberculose (Cohen *et al*, 2012); estes tipos de infecções terão mais impacto caso haja perfis de heterorresistência (Hajimiri *et al.*, 2016). Deste modo, a dinâmica das infecções mistas e microevolução pode implicar em resultados discordantes entre TSA fenotípico e genotípico, mudança de perfis de resistência e suscetibilidade e heterorresistência se mostrando ser ainda mais complexa do que mostra a literatura.

## Evidências de infecção mista em WGS

A inovação do sequenciamento de genoma completo (WGS) trouxe desenvolvimentos significativos ao nosso entendimento das dinâmicas de doenças bacterianas, incluindo a transmissão de patógenos e a dispersão de resistência aos antimicrobianos.

Abordagens baseadas em WGS estão deixando de ser utilizadas exclusivamente em laboratórios de pesquisa, passando para o atendimento clínico e outras aplicações de saúde pública, ainda que esse processo esteja em um ritmo baseado na redução do custo dos aparelhos e das reações. A OMS já está utilizando o WGS para a vigilância de resistência aos antimicrobianos (Zignol *et al.*, 2018) e uma avaliação das tecnologias de sequenciamento para a rotina de TSA genotípico está programada (WHO, 2018).

As análises genômicas mapeiam, a partir da referência, variantes como SNPs e inserções ou deleções. Assim, com base nas variantes detectadas, pode-se inferir resistência aos antimicrobianos, genotipagem, etc. Entretanto, essas análises de variantes podem identificar mais de um alelo em um único locus, resultando em uma chamada de base heterozigota em genomas bacterianos haplóides. Estas chamadas heterozigotas ou SNPs mistos podem ser biologicamente relevantes e indicar a presença de infecção mista (Mallard *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 2012; Eyre *et al.*, 2013).

Dado que o *M. tuberculosis* é haploide, a existência de um amplo número de variantes heterozigotas de alta qualidade pode sugerir infecção mista (Guerra-Assunção *et al.*, 2015). Por exemplo, Koser *et al.* identificaram 209 SNVs de um cultivo prévio e proveniente de um paciente que estava infectado com dois isolados Beijing relativamente distantes (Koser *et al.*, 2013). Chan e colaboradores aplicaram análises metagenômicas a uma amostra de múmia de 215 anos e identificaram 398 SNVs heterozigotos depois de mapear os dados de sequenciamento em relação ao genoma de H37rv, o que sugere que o indivíduo estava com infecção mista de *M. tuberculosis* (Chan *et al.*, 2013).

Entretanto, devido a interferência de erros de sequenciamento, a chamada de bases heterozigotas de alta qualidade normalmente precisa de grande abundância do isolado minoritário (>30%) na infecção mista (Koser *et al.*, 2013; Guerra-Assunção *et al.*, 2015). Além disso, através dos métodos que eram utilizados até então, apenas infecções mistas causadas por isolados relativamente distantes (isso é, com diferença genômica >100 SNVs) poderiam ser detectadas de forma inequívoca por estes métodos. Quando apenas um pequeno número de SNVs é detectado, a acurácia será menor em afirmar que sua heterogeneidade é causada por isolados mistos ou microevolução após a infecção (Guerra-Assunção *et al.*, 2015).

Abordagens filogenéticas que utilizavam SNPs heterogêneos para criar ramificações divergentes nas sequências dos genomas e, assim, diferenciar dois ou mais genomas, foram bem-sucedidas em detectar infecção mista na tuberculose (Gan *et al.*, 2016), apesar deste método poder ser limitado pela robustez da árvore evolutiva e pela reconstrução do ancestral.

Levando tudo isso em consideração, utilizamos dados de WGS para investigar a frequência das infecções mistas a partir de populações distintas. A primeira análise foi a respeito de genomas publicados por Feliciano *et al* (2018) em um trabalho que demonstrou a divergência entre o TSA fenotípico e genotípico (**figura 4.7**). Os próprios autores sugeriram a possibilidade de uma infecção mista como um dos fatores que poderiam estar influenciando esses resultados.

Sendo assim, após submetemos esses genomas ao *MixedInfectR*, obtivemos 80% (24/30) das amostras com infecção mista, tendo a média de 174,6 SNPs heterozigotos (96-992) (**tabela 4.7**). Gan *et al* (2016) encontraram proporções similares em suas análises para chamadas heterozigotas com a média de 222 SNPs (61-625) e Sobkowiak *et al* (2018) encontraram de 6 a 609 chamadas heterozigotas.

O estudo que desenvolveu o método utilizado nesse trabalho analisou 1963 amostras e encontrou 9,9% de infecção mista no Malawi (Sobkowiak *et al.*, 2018). Em diversos países foram encontradas altas taxas de infecção mista, como por exemplo de 57,1% no Uzbequistão (Hofmann-Thiel *et al.*, 2009), taxas de 55,3% - 55,95% no Irã (Farmanfarmaei *et al.*, 2017; Kamakoli

*et al.*, 2017; Sadegh *et al.*, 2017) e 29,4% na África do Sul (Cohen *et al.*, 2016); esses resultados, porém, foram baseados em MIRU-VNTR-24 locus. Devido ao fato de que essas técnicas são mais indicadas para diferenciar isolados relativamente mais distantes (de Boer *et al.*, 2000), é provável que as taxas de infecção mista sejam maiores do que foram descritas.

Dentre os 30 genomas (**figura 4.7**), 14 apresentaram perfil fenotípico MDR/XDR; destas, 64,3% (9/14) com infecção mista e seis das oito discrepâncias também foram mistas (**tabela 4.8**). Esses resultados estão de acordo com o que mostraram outros trabalhos, que associaram infecção mista à resistência e divergência de resultados (Cohen *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2012; Zetola *et al.*, 2014; Hajimiri *et al.*, 2016).

## Genomas exclusivamente do Brasil

Devidos aos resultados obtidos nas análises dos 30 genomas na seção anterior, definimos uma amostragem maior e com genomas que já estávamos analisando, desde a execução do TSA às análises de SNPs relacionados à resistência, no intuito de verificar se as taxas de infecção mista e seu padrão se mantêm.

Inicialmente, genotipamos esses genomas utilizando TB-profile e a relação pode ser vista na **figura 4.8**. Como era esperado, todos pertencem a linhagem 4, que é a predominante no Brasil (Stucki *et al.*, 2016; Brites & Gagneux, 2017) com grande representação das sublinhagens 4.1 (X e H) e 4.3 (LAM), enquanto as outras sublinhagens (4.4, 4.7, 4.8 e 4.9) pertencem a superfamília T e suas divisões, o que está de acordo com a literatura (Gomes *et al.*, 2012).

Em seguida, analisamos, por meio de Mykrobe TB, os SNPs associados a resistência aos antimicrobianos para sua comparação com o fenótipo. Este resultado pode ser visto na **tabela 4.10**, a qual mostra que a análise do genótipo não correspondeu ao resultado de TSA, com menor sensibilidade em relação a MDR e INH e menor especificidade a RIF. Resultados similares foram vistos por Feliciano *et al* (2018), diferentemente de Coll *et al* (2015) que encontraram alta sensibilidade e especificidade, bem como Walker *et al* (2015), que sugere que é necessária uma relação completa dos determinantes de resistência, ou seja, um mapeamento completo das mutações. Esses resultados podem estar relacionados a heterorresistência ou mutações diferentes conferindo resistência.

A maioria dos isolados resistentes a rifampicina (51,4%) apresentou mutações no gene *rpoB*, cuja mutação mais frequente foi S450L como demonstrado em outros estudos (Ramaswamy & Musser, 1998; Brossier *et al.*, 2017; Feliciano *et al.*, 2018). Apesar da base molecular da resistência à isoniazida ser mais complexa, a mutação S315 no gene *KatG* foi a mais encontrada (58,1%), como relatado na literatura, incluindo outro estudo no Brasil (Bollela *et al.*, 2016, Feliciano *et al.*, 2018)



Seis genomas apresentaram mutações que conferem o perfil XDR, mas esses isolados não continham informação sobre antimicrobianos de segunda linha no TSA, mas sim MDR ou MDR mais alguma resistência. Isso pode ser devido a limitação do TSA, por ter sido executado apenas para cinco antimicrobianos (outros estão em andamento) ou verdadeira divergência entre os testes. De qualquer modo, quatro desses genomas foram definidos como infecção mista (**anexo III**) e também foram identificadas mutações divergentes entre os programas (**quadro 4.2**), o que reforça a evidência de infecção mista, mas precisa ser visto com cuidado por conta das diferenças de análises feitas por esses programas, sendo necessária a utilização de critérios bem definidos.

Foi vista uma alta frequência de MDR entre as linhagens 4.1 (43%, 13/30) e 4.3 (30,8%, 12/39) (**figura 4.9**), o que é preocupante, dado que essas são as linhagens mais comuns circulantes no país. Apesar da literatura mostrar que a linhagem 2 está mais associada a maior virulência e o surgimento de resistência do que a linhagem 4 (Borrell & Trauner, 2017), a ocorrência das infecções mistas pode influenciar nesses resultados.

Uma alta taxa de infecção mista (81,8%) também foi vista nessa amostragem (**figura 4.11**), em especial entre as linhagens mais frequentes desse estudo, 4.1 (83,3%, 25/30) e 4.3 (82,1%, 32/39), perfil similar ao que foi visto nos resultados anteriores (**tabela 4.8**) e que já foram discutidos acima.

Apesar das divergências entre os TSA fenotípico e genotípico, não foi possível observar diferenças na proporção da ocorrência de infecção mista (**figura 4.12**).

De acordo com a análise do número de isolados em uma amostra (**figura 4.13**), a linhagem 4.1 estava relacionada com a frequência de dois isolados por amostra, enquanto a linhagem 4.3 apresentou frequências similares para dois e três isolados. Esse resultado traz uma nova informação para a dinâmica da infecção, sugerindo, apesar da necessidade em ampliar essa investigação, que fatores associados a linhagem podem influenciar em sua capacidade de competir com outras estirpes ou linhagens dentro do hospedeiro.

Foi vista uma relação maior das infecções mistas nos genomas com perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, com pouco mais de 56% tanto para o teste genotípico quanto fenotípico para os genomas com dois isolados e mais de 34% para os genomas com três isolados, enquanto os genomas com apenas um isolado totalizaram pouco mais de 7% das amostras suscetíveis.

Ao analisar apenas os genomas com perfis de resistência, o padrão se manteve, dentre os genomas puros 81% apresentaram resistência enquanto entre os genomas com dois e três isolados foram observadas frequências de 53% e 34%, respectivamente.

Esses dois últimos resultados, diferentemente do que esperado, relacionaram infecções mistas com perfil de suscetibilidade e infecção pura com perfil de resistência.

## 6 . CONCLUSÕES

Essa foi a primeira caracterização de isolados de *M. tuberculosis* provenientes das populações geral e carcerária de Rondônia com a combinação de *spoligotyping* e MIRU-VNTR. Essa classificação filogenética demonstrou uma composição genética bacteriana com predominância das famílias LAM, X, H e T; com particularidades a serem mencionadas. Foi observada a frequência de 11,6% das famílias X, genótipo de baixa frequência no Brasil e dois isolados de Ural-1, incomum e associado, na literatura, com a resistência aos antimicrobianos.

Em relação à **população carcerária**, foi verificada a presença de isolados de *M. tuberculosis* que apresentavam os mesmos genótipos detectados na população geral, indicando cadeias de transmissão compartilhadas. Entretanto, a presença de subfamílias específicas exclusivamente na população carcerária, sugere a presença também de uma cadeia de transmissão independente da população geral. Vale destacar, no entanto, que a obtenção das datas das coletas seria importante para reforçar essa conclusão.

Foram descritos novos perfis observados pela primeira vez, ampliando o conhecimento sobre a diversidade dos isolados circulantes nesta região do Brasil. Além disso, apesar das limitações deste estudo, esses dados reforçam a importância do uso de análises moleculares a fim de acompanhar a distribuição e dispersão das famílias circulantes entre as populações no intuito de buscar também a distribuições que podem estar relacionadas com os genótipos, como perfis de resistência.

O uso do MIRU-VNTR para a detecção de infecções mistas foi satisfatório permitiu identificar que 19,3 % dos pacientes sofreu de **infecção mista**. Permitindo algumas conclusões em relação, principalmente, às amostras provenientes do mesmo paciente, como as amostras 331 e 333 confirmaram, através da distância evolutiva, a infecção mista por isolados distintos. Amostras coletadas em diferentes momentos de nove pacientes apresentaram diferenças nas famílias genotipadas. Das 33 infecções mistas, apenas três apresentaram alguma resistência no TSA. Esses dados evidenciam que existe diversidade populacional de *M. tuberculosis* dentro de cada paciente e a presença de

infecção mista não teve relação com resistência nessa coorte de Rondônia. Entretanto, ampliar a amostragem e definir um número maior de amostras por pacientes seria necessário para uma melhor compreensão dessa dinâmica.

Quando analisamos o perfil de **resistência aos antimicrobianos** da presente população de estudo, observamos que a taxa de resistência a pelo menos um medicamento foi de 12,7%, sendo 4,8% MDR. Entretanto, não foram detectados casos MDR ou com monorresistência a isoniazida ou rifampicina nas unidades prisionais, sugerindo que existe uma relação da dispersão de clones resistentes com a transmissão entre a população geral nesta coorte. Identificar a dinâmica de dispersão é importante para acompanhar esses casos e verificar e tratar os contatos de modo a controlar e eliminar a dispersão desses isolados resistentes.

Houve mudança no perfil TSA dos pacientes ao passar do tempo, tanto para resistente (três casos) quanto sensível (dois casos), sugerindo que processos microevolutivos podem estar associados ao surgimento de resistência, principalmente, ao etambutol e à estreptomicina. Além disso, pacientes com divergência de lóci entre duas ou mais amostras apresentaram diferenças no TSA, sugerindo heterorresistência. A capacidade de identificar a presença de heterorresistência pode representar uma melhora no tratamento ao se identificar um possível isolado resistente, evitando sua proliferação no paciente e, conseqüente, dispersão entre os contatos do mesmo.

Em conjunto com dados da **análise dos genomas**, ainda concluímos que dentre 88 genomas do Brasil houve predominância das sublinhagens 4.1 e 4.3, com a frequência de MDR nestas duas linhagens de 43% e 30,8%, respectivamente. Ainda que esses resultados tenham apresentado dados interessantes é recomendado aumentar a amostragem para uma análise mais abrangente.

Análises de WGS demonstraram 80% de infecção mista e linhagens 4.1 e 4.3 com a respectivas taxas de infecção mista de 83,3% e 82,1%. A infecção mista na coorte Brasil-Moçambique (30 genomas publicados por Feliciano *et al.*, 2018) foi associada aos casos MDR/XDR (64,3%), oposto ao restante do estudo, pois entre a coorte de 88 genomas exclusivamente brasileiros não houve associação entre infecção mista e divergências de TSA, entretanto,

houve maior taxa de infecção mista nos casos suscetíveis. A divergência entre TSA fenotípico e genotípico foi vista em uma frequência de 64,3% em conjunto com infecção mista na população Brasil-Moçambique; sendo que este fenômeno ocorreu também principalmente entre MDR e monoINH. Por fim, infecções mistas ocorreram com maior frequência entre divergência MDR (fenótipo) x XDR (genótipo), sugerindo que a presença da infecção mista pode ter importância clínica de acordo com a população.

## 7 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achtman, M., 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 53–70.

Al-Hajoj SAM, Akkerman O, Parwati I, Al-Gamdi S, Rahim Z, van Soolingen D, van Ingen J, Supply P, van der Zanden AGM. 2010. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis patient. *J Clin Microbiol* 48:3813–3816. <https://doi.org/10.1128/JCM.00556-10>.

Alexander, K. A., Laver, P. N., Michel, A. L., Williams, M., van Helden, P. D., Warren, R. M., et al. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen. *M. mungi*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1296–1299. doi: 10.3201/eid1608.100314

Alonso M. et al.. Real-time molecular epidemiology of tuberculosis by direct genotyping of smear-positive clinical specimens. *J Clin. Microbiol.* 50, 1755–7 (2012).

Andrews JR, Hatherill M, Mahomed H, et al. The dynamics of QuantiFERON-TB gold in-tube conversion and reversion in a cohort of South African adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191:584–91.

Andrews JR, Morrow C, Walensky RP, Wood R. Integrating social contact and environmental data in evaluating tuberculosis transmission in a South African township. *J Infect Dis* 2014; 210:597–603.

Andrews JR, Morrow C, Walensky RP, Wood R. Integrating social contact and environmental data in evaluating tuberculosis transmission in a South African township. *J Infect Dis* 2014; 210:597–603.

Andrews JR, Morrow C, Wood R. Modeling the role of public transportation in sustaining tuberculosis transmission in South Africa. *Am J Epidemiol* 2013; 177:556–61.

Andrews JR, Morrow C, Wood R. Modeling the role of public transportation in sustaining tuberculosis transmission in South Africa. *Am J Epidemiol* 2013; 177:556–61.

b Sakula A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax.* 1982;37(4):246–51 (<https://www.ncbi.nlm.nih>).

Baldeviano-Vidalon GC, et al. 2005. Multiple infection with resistant and sensitive *M. tuberculosis* strains during treatment of pulmonary tuberculosis patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9:1155–1160.

Bamrah S, Yelk Woodruff RS, Powell K, Ghosh S, Kammerer JS, Haddad MB. Tuberculosis among the homeless, United States, 1994–2010. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17:1414–9.

Banerjee R, Allen J, Westenhouse J, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis in California, 1993-2006. *Clin Infect Dis*. 2008;47(4):450–457. doi:10.1086/590009

Banerjee R, Allen J, Westenhouse J, Oh P, Elms W, Desmond E, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis in California, 1993-2006. *Clin Infect Dis*. 2008;47:450–7.

Barbour V, Clark J, Jones S, Veitch E; PLoS Medicine Editors. The health crisis of tuberculosis in prisons extends beyond the prison walls. *PLoS Med*. 2010;7:e1000383. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1000383>

BARRERA, L. The basics of Clinical bacteriology. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*. Cap. 3, p. 93-112. Disponível em: <<http://www.tuberculosis textbook.com>>. Acesso em: 6/2/2011.

Barry CE 3rd, Boshoff HI, Dartois V, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:845–55.

Basit A, Ahmad N, Khan AH, Javaid A, Sulaiman SAS, Afridi AK, et al. Predictors of two months culture conversion in multidrug-resistant tuberculosis: findings from a retrospective cohort study. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e93206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093206>

Basu S, Stuckler D, McKee M. Addressing institutional amplifiers in the dynamics and control of tuberculosis epidemics. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:30–7. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0472>

Bates JH, Stead WW, Rado TA. Phage type of tubercle bacilli isolated from patients with two or more sites of organ involvement. *Am Ver Respir Dis* 1976;114:353–358.

Baussano I, Williams BG, Nunn P, Beggiato M, Fedeli U, Scano F. Tuberculosis incidence in prisons: a systematic review. *PLoS Med* 2010; 7:e1000381.

Bidovec-Stojkovič U., Seme K., Žolnir-Dovč M. & Supply P. Prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* from fresh clinical samples. *PloS One* 9(10), e109547 (2014).

Biek R, O'Hare A, Wright D, Mallon T, McCormick C, Orton RJ, McDowell S, Trewby H, Skuce RA, Kao RR (2012) Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of *Mycobacterium bovis* in sympatric cattle and badger populations. *PLoS Pathog* 8(11):e1003008. doi:10.1371/journal.ppat.1003008

Blower SM, Chou T (2004) Modeling the emergence of the 'hot zones': tuberculosis and the amplification dynamics of drug resistance. *Nat Med* 10:1111–1116

Bollela VR, Namburete EI, Feliciano CS, et al. Detection of katG and inhA mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2016;20(8):1099–104.

Boritsch EC, Frigui W, Cascioferro A, Malaga W, Etienne G, Laval F, Pawlik A, Le Chevalier F, Orgeur M, Ma L, Bouchier C, Stinear TP, Supply P, Majlessi L, Daffé M, Guilhot C, Brosch R (2016a) pks5-recombination-mediated surface remodelling in *Mycobacterium tuberculosis* emergence. *Nat Microbiol* 1:15019

Boritsch EC, Khanna V, Pawlik A, Honore N, Navas VH, Ma L, Bouchier C, Seemann T, Supply P, Stinear TP, Brosch R (2016b) Key experimental evidence of chromosomal DNA transfer among selected tuberculosis-causing mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(35):9876–9881. doi:10.1073/pnas.1604921113

Borrell S, Trauner A. Strain Diversity and the Evolution of Antibiotic Resistance. In: *Advances in experimental medicine and biology*. 2017. p. 263–79.

Bourdillon PM, Gonçalves CC, Pelissari DM, et al. Increase in tuberculosis cases among prisoners, Brazil, 2009-2014(1). *Emerg Infect Dis* 2017; 23:496–9.

Bourdillon PM, Gonçalves CC, Pelissari DM, et al. Increase in Tuberculosis Cases among Prisoners, Brazil, 2009-2014<sup>1</sup>. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(3):496–499. doi:10.3201/eid2303.161006

Braden CR, Morlock GP, Woodley CL, Johnson KR, Colombel AC, Cave MD, Yang ZH, Valway SE, Onorato IM, Crawford JT. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis* 2001;33:E42–E47.

Braga JU, Barreto AMW, Hijjar MA. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-1997, IERDTB. Parte III: principais resultados. *Bol Pneumol Sanit*. 2003;11(1):76-81.

Brasil. Manual Nacional de VIGILÂNCIA LABORATORIAL da TUBERCULOSE e outras MICOBACTÉRIAS. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008. 265–285 p.

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasil livre da tuberculose. Plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017 [citado 2018 mar 8]. 52 p. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/0B0CE2wqdEaR-eVc5V3cyMVFPcTA/view>.

Brasil. Ministério da Saúde. Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas. *Boletim Epidemiológico*. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Volume 49, Nº 11, Mar. 2018. ISSN 2358-9450



Brites, D., and Gagneux, S. (2017). The nature and evolution of genomic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1019, 1–26. doi: 10.1007/978-3-319-64371-71

Brito RC, Mello FCQ, Andrade MK, Oliveira H, Costa W, Matos HJ, et al. Drug-resistant tuberculosis in six hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14(1):24-33.

Brodin, P., Eiglmeier, K., Marmiesse, M., Billault, A., Garnier, T., Niemann, S., et al. (2002). Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect. Immun.* 70, 5568–5578. doi: 10.1128/IAI.70.10.5568-5578.2002

Broekmans JF, Migliori GB, Rieder HL, et al.; World Health Organization, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, and Royal Netherlands Tuberculosis Association Working Group. European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence. Recommendations of the World Health Organization (WHO), International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) and Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV) Working Group. *Eur Respir J* 2002; 19:765–75.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3684–3689 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.052548299>.

Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol* 9:452–458 [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02131-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02131-X).

Brossier F, Sougakoff W, Aubry A, et al. Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Mal Infect* 2017;47(5):340–8.

Brown, T., Nikolayevskyy, V., Velji, P. & Drobniowski, F. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* strains and phenotypes. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 272–280 (2010).

Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, Kremer K, van Hijum SA, Siezen RJ, Borgdorff M, Bentley SD, Parkhill J, van Soolingen D (2013) Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis* 13(1):110. doi:10.1186/1471-2334-13-110

Bryant, J. M. et al. Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study. *Lancet Respir. Med.* 1, 786–792 (2013).

Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104:901–912

Casali N, Broda A, Harris SR, Parkhill J, Brown T, Drobniewski F. 2016. Whole genome sequence analysis of a large isoniazid-resistant tuberculosis outbreak in London: a retrospective observational study. *PLoS Med* 13:e1002137. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002137>.

Centres for Disease Control and Prevention. Prevention and Control of Tuberculosis in Correctional and Detention Facilities: Recommendations from CDC. Atlanta(GA): Centres for Disease Control and Prevention; 2006. (Recommendations and Reports, 55). Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5509.pdf>

Chan JZ, Sergeant MJ, Lee OY, Minnikin DE, Besra GS, Pap I, et al. Metagenomic analysis of tuberculosis in a mummy. *N Engl J Med*. 2013; 369(3):289–90. doi: 10.1056/NEJMc1302295 PMID: 23863071.

Chapman JS, Dyerly MD. Social and other factors in intrafamilial transmission of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1964; 90:48–60.

Chatterjee A, Mistry N. MIRU-VNTR profiles of three major Mycobacterium tuberculosis spoligotypes found in western India. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013;93(2):250–256. doi:10.1016/j.tube.2012.10.004

Cirillo DM, Miotto P, Tortoli E. Evolution of Phenotypic and Molecular Drug Susceptibility Testing. In: *Advances in experimental medicine and biology*. 2017. p. 221–46.

Clark, T. G. et al. Elucidating emergence and transmission of multidrug-resistant tuberculosis in treatment experienced patients by whole genome sequencing. *PLOS ONE* 8, e83012 (2013).

Coelho AGV, Zamarioli, LA, Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA. A study of multidrug-resistant tuberculosis in risk groups in the city of Santos, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(6):760-6. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000600009>

Cohen KA, Abeel T, Manson McGuire A, Desjardins CA, Munsamy V, Shea TP, Walker BJ, Bantubani N, Almeida DV, Alvarado L, Chapman SB, Mvelase NR, Duffy EY, Fitzgerald MG, Govender P, Gujja S, Hamilton S, Howarth C, Larimer JD, Maharaj K, Pearson MD, Priest ME, Zeng Q, Padayatchi N, Grosset J, Young SK, Wortman J, Mlisana KP, O'Donnell MR, Birren BW, Bishai WR, Pym AS, Earl AM (2015) Evolution of extensively drug-resistant tuberculosis over four decades: whole genome sequencing and dating analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates from KwaZulu-Natal. *PLoS Med* 12(9):e1001880. doi:10.1371/journal.pmed.1001880

Cohen T, Chindelevitch L, Misra R, Kempner ME, Galea J, Moodley P, et al. Within-host heterogeneity of Mycobacterium tuberculosis infection is associated

with poor early treatment response: a prospective cohort study. *J Infect Dis* 2016;213(11):1796e9.

Cohen T, Jenkins HE, Lu C, Mclaughlin M, Floyd K, Zignol M (2014) On the spread and control of MDR-TB epidemics: an examination of trends in antituberculosis drug resistance surveillance data. *Drug Resist Updat* 17:105–123

Cohen T, Wilson D, Wallengren K, Samuel EY, Murray M. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections among patients dying in a hospital in KwaZulu-Natal, South Africa. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(1):385-8.

Cohen, T. et al. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections and the implications for tuberculosis treatment and control. *Clin Microbiol Rev* 25, 708-719 (2012).

Cohen, T., Colijn, C. & Murray, M. Modeling the effects of strain diversity and mechanisms of strain competition on the potential performance of new tuberculosis vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008).

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998 Jun;393(6685):537–44.

Colijn, C., Cohen, T. & Murray, M. Latent coinfection and the maintenance of strain diversity. *Bulletin of Mathematical Biology* 71, 247-263 (2009).

Coll, F. et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat. Commun.* 5, 4812 (2014). This study reports the now standard sublineage typing scheme using SNP- based information for MTBC.

Coll, F. et al. Rapid determination of anti- tuberculosis drug resistance from whole- genome sequences. *Genome Med.* 7, 51 (2015).

Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, Ernst JD, Gagneux S (2010) Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet* 42(6):498–503. doi:10.1038/ng.590

Comas I. Genomic Epidemiology of Tuberculosis. In: *Advances in experimental medicine and biology*. 2017. p. 79–93.

Conceição EC, Rastogi N, Couvin D, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Pará, Brazil, reveals a higher frequency of ancestral strains than previously reported in South America. *Infect Genet Evol.* 2017;56:62–72. doi:10.1016/j.meegid.2017.10.021

Conceição EC, Rastogi N, Couvin D, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Pará, Brazil, reveals a higher frequency of ancestral strains than previously reported in South America. *Infect Genet Evol.* 2017;56:62–72. doi:10.1016/j.meegid.2017.10.021

Conceição EC, Refregier G, Gomes HM, et al. Mycobacterium tuberculosis lineage 1 genetic diversity in Pará, Brazil, suggests common ancestry with east-African isolates potentially linked to historical slave trade. *Infect Genet Evol.* 2019;73:337–341. doi:10.1016/j.meegid.2019.06.001

Corbett EL, Bandason T, Cheung YB, et al. Epidemiology of tuberculosis in a high HIV prevalence population provided with enhanced diagnosis of symptomatic disease. *PLoS Med* 2007; 4:e22.

Corbett EL, Steketee RW, ter Kuile FO, Latif AS, Kamali A, Hayes RJ. HIV-1/AIDS and the control of other infectious diseases in Africa. *Lancet* 2002; 359:2177–87.

Coscolla M, Gagneux S (2014) Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis. *Semin Immunol* 26:431–444

Coscolla, M., Lewin, A., Metzger, S., Maetz-Rennsing, K., Calvignac-Spencer, S., Nitsche, A., et al. (2013). Novel Mycobacterium tuberculosis complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 969–976. doi: 10.3201/eid1906.121012

Cousins, D. V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., et al. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1305–1314. doi: 10.1099/ijs.0.02401-0

Crudu V, Romancenco E, Noroc E, Alexandru S, Niemann S, Lange C, Garfein R, Catanzaro A. Beijing and H4/Ural genotypes of M tuberculosis are predominating among M/XDR-TB patients in Moldova. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014;18:S157

Dalcolmo MP, Andrade MKN, Picon PD. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. *Rev Saude Publica.* 2007;41Supl 1:34-42. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102007000800006>

Dalton T, Cegielski P, Akksilp S et al (2012) Prevalence of and risk factors for resistance to second-line drugs in people with multidrug-resistant tuberculosis in eight countries: a prospective cohort study. *Lancet* 380:1406–1417

Dantas NG, Suffys PN, Carvalho Wda S, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. *BMC Infect Dis.* 2015;15:306. Published 2015 Aug 1. doi:10.1186/s12879-015-1057-y

de Boer AS, Kremer K, Borgdorff MW, de Haas PE, Heersma HF, van Soolingen D. Genetic heterogeneity in Mycobacterium tuberculosis isolates reflected in IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns as low-intensity bands. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4478–84.

de Jong, B. C., Antonio, M., and Gagneux, S. (2010). Mycobacterium africanum—review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl. Trop Dis.* 4:e744. doi: 10.1371/journal.pntd.0000744

Dean AS, Zignol M, Falzon D, Getahun H, Floyd K (2014) HIV and multidrug-resistant tuberculosis: overlapping epidemics. *Eur Respir J* 44:251–254

Dharmadhikari AS, Mphahlele M, Venter K, et al. Rapid impact of effective treatment on transmission of multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18:1019–25.

Dickman KR, Nabyonga L, Kateete DP, et al. Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis*. 2010;10:349. Published 2010 Dec 10. doi:10.1186/1471-2334-10-349

Dobbs TE, Kimmerling ME. *Mycobacterium tuberculosis*. In *AIDS Therapy*

Dowdy DW, Azman AS, Kendall EA, Mathema B. Transforming the fight against tuberculosis: targeting catalysts of transmission. *Clin Infect Dis* 2014; 59:1123–9.

Duarte TA, Nery JS, Boechat N, et al. A systematic review of East African-Indian family of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2017;21(3):317–324. doi:10.1016/j.bjid.2017.01.005

Eldholm V, Monteserin J, Rieux A, Lopez B, Sobkowiak B, Ritacco V, Balloux F (2015) Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. *Nat Commun* 6:7119. doi:10.1038/ncomms8119

Eldholm V, Norheim G, von der Lippe B, Kinander W, Dahle UR, Caugant DA, Mannsåker T, Mengshoel AT, Dyrhol-Riise AM, Balloux F. 2014. Evolution of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from a susceptible ancestor in a single patient. *Genome Biol* 15:490. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0490-3>.

Ernst JD (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 12(8):581-591. Doi: 10.1038/nri3259

Escombe AR, Huaroto L, Ticona E, et al. Tuberculosis transmission risk and infection control in a hospital emergency department in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14:1120–6.

Escombe AR, Moore DA, Gilman RH, Pan W, Navincopa M, Ticona E, Martinez C, Caviedes L, Sheen P, Gonzalez A, Noakes CJ, Friedland JS, Evans CA (2008) The infectiousness of tuberculosis patients coinfecting with HIV. *PLoS Med* 5:e188

Esmail H, Barry CE 3rd, Young DB, Wilkinson RJ. The ongoing challenge of latent tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369:20130437.

Esmail H, Lai RP, Lesosky M, et al. Characterization of progressive HIV-associated tuberculosis using 2-deoxy-2-[(18)F]fluoro-D-glucose positron emission and computed tomography. *Nat Med* 2016; 22:1090–3.

Eyre DW, Cule ML, Griffiths D, Crook DW, Peto TEA, Walker AS, et al. Detection of mixed infection from bacterial whole genome sequence data allows assessment of its role in *Clostridium difficile* transmission. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(5):e1003059.

Fang R, Li X, Li J, et al. Mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients in Shanghai, China. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008;88(5):469–473. doi:10.1016/j.tube.2008.02.002

Fang R, Li X, Li J, Wu J, Shen X, Gui X, DeRiemer K, Liu L, Mei J, Gao Q. 2008. Mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients in Shanghai, China. *Tuberculosis (Edinb)* 88:469–473. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.02.002>.

Fang, Z., N. Morrison, B. Watt, C. Doig, and K. J. Forbes. 1998. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Bacteriol*. 180:2102-2109.

Farmanfarmaei G, Kamakoli MK, Sadegh HR, Masoumi M, Abdolrahimi F, Fateh A, et al. Bias in detection of *Mycobacterium tuberculosis* polyclonal infection: use clinical samples or cultures? *Mol Cell Probes* 2017;33:1e3.

FARNIA, P.; MASJEDI, M. R.; MIRSAEIDI, M.; MOHAMMADI, F.; JALLALEDDIN-GHANA VI; VINCENT, V.; BAHADORI, M.; VELAYATI, A. A. Prevalence of Haarlem I and Beijing types of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Iranian and Afghan MDR-TB patients. *J Infect*. 53(5): 331-62, 2006.

Fennelly KP, Jones-Lpez EC, Ayakaka I, et al. Variability of infectious aerosol produced during coughing by patients with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:450–7.

France AM, Grant J, Kammerer JS, Navin TR. A field-validated approach using surveillance and genotyping data to estimate tuberculosis attributable to recent transmission in the United States. *Am J Epidemiol* 2015; 182:799–807.

Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM (2006b) Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):2869–2873. doi:10.1073/pnas.0511240103

Gagneux S, Small PM (2007) Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 7(5):328–337. doi:10.1016/S1473-3099(07)70108-1

Gan M, Liu Q, Yang C, Gao Q, Luo T. Deep whole-genome sequencing to detect mixed infection of *mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2016;11(7):1–14.

Gan, M., Liu, Q., Yang, C., Gao, Q. & Luo, T. Deep whole- genome sequencing to detect mixed infection of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* 11, e0159029 (2016).

Garcia de Viedma D, Marin M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá L, Bouza E. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *J Infect Dis* 2003;187:695–699.

Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJ, Brinkman FS, Brunham RC, Tang P (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 364(8):730–739. doi:10.1056/NEJMoa1003176

Gardy, J. L. et al. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N. Engl. J. Med.* 364, 730–739 (2011).

Garrido MS, Buher-Sékula S, Souza AB, Oliveira GP, Antunes IA, Mendes JM, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in the Amazonas State, Brazil, 2000-2011. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015;19(5):531-6. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0291>

Gomes HM, Elias AR, Oelemann MA, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol.* 2012;12(4):649–656. doi:10.1016/j.meegid.2011.08.027

Gröschel, M. I. et al. Pathogen- based precision medicine for drug- resistant tuberculosis. *PLOS Pathog.* 14, e1007297 (2018).

Guerra-Assuncao JA, Houben RMGJ, Crampin AC, Mzembe T, Mallard K, Coll F, et al. Recurrence due to Relapse or Reinfection With *Mycobacterium tuberculosis*: A Whole-Genome Sequencing Approach in a Large, Population-Based Cohort With a High HIV Infection Prevalence and Active Follow-up. *J Infect Dis.* 2015; 211(7):1154–63. doi: 10.1093/infdis/jiu574. WOS:000354697500017. PMID: 25336729

Guthrie, J. L. et al. Genotyping and whole- genome sequencing to identify tuberculosis transmission to pediatric patients in British Columbia, Canada, 2005–2014. *J. Infect. Dis.* 218, 1155–1163 (2018).

Hajimiri ES, Masoomi M, Ebrahimzadeh N, et al. High prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* mixed infection in the capital of moderate tuberculosis incidence country. *Microb Pathog.* 2016;93:213–218. doi:10.1016/j.micpath.2016.02.015

Hanekom M, Streicher EM, Van de Berg D, et al. Population structure of mixed *Mycobacterium tuberculosis* infection is strain genotype and culture medium dependent. *PLoS One.* 2013;8(7):e70178. Published 2013 Jul 30. doi:10.1371/journal.pone.0070178.

Haver HL, Chua A, Ghode P, Lakshminarayana SB, Singhal A, Mathema B, Wintjens R, Bifani P (2015) Mutations in genes for the F420 biosynthetic pathway and a nitroreductase enzyme are the primary resistance determinants in spontaneous in vitro-selected PA-824-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5316–5323

Hermans S, Boulle A, Caldwell J, Pienaar D, Wood R. Temporal trends in TB notification rates during ART scale-up in Cape Town: an ecological analysis. *J Int AIDS Soc* 2015; 18:20240.

Hermans S, Horsburgh CR Jr, Wood R. A century of tuberculosis epidemiology in the Northern and Southern hemisphere: the differential impact of control interventions. *PLoS One* 2015; 10:e0135179.

Hermans, P.W., van Soolingen, D., Bik, E.M., de Haas, P.E., Dale, J.W., van Embden, J.D., 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 59, 2695–2705.

Herranz M, Pole I, Ozere I, Chiner-Oms Á, Martínez-Lirola M, Pérez-García F, Gijón P, Serrano MJR, Romero LC, Cuevas O, Comas I, Bouza E, Pérez-Lago L, García-de-Viedma D. 2017. *Mycobacterium tuberculosis* acquires limited genetic diversity in prolonged infections, reactivations and transmissions involving multiple hosts. *Front Microbiol* 8:2661. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02661>.

Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, May H, Lee OY, Feldman M, et al. Tuberculosis origin: the Neolithic scenario. *Tuberculosis*.

Hofmann-Thiel S. et al.. Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of *Mycobacterium tuberculosis* in Tashkent, Uzbekistan. *Eur. Respir. J* 33, 368–374 (2009).

Homolka, S. et al. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains based on single nucleotide polymorphisms. *PLOS ONE* 7, e39855 (2012).

Huang HY, Tsai YS, Lee JJ, et al. Mixed infection with Beijing and non-Beijing strains and drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4474–4480. doi:10.1128/JCM.00930-10

Huyen MN, Kremer K, Lan NT, Cobelens FG, Buu TN, Dung NH, et al. Mixed tuberculosis infections in rural South Vietnam. *Journal of clinical microbiology.* 2012;50(5):1586-92.

Huyen MN, Kremer K, Lan NT, et al. Mixed tuberculosis infections in rural South Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2012;50(5):1586–1592. doi:10.1128/JCM.00434-12

Jajou, R. et al. Epidemiological links between tuberculosis cases identified twice as efficiently by whole genome sequencing than conventional molecular typing: A population- based study. *PLOS ONE* 13, e0195413 (2018). This study shows the advantage of WGS approaches over mycobacterial interspersed repetitive unit variable- number tandem repeat genotyping for detection of transmission clusters.

Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med* 2008; 5:e152.



Jiang GL, Chen X, Song Y, Zhao Y, Huang H, Kam KM(2013) First proficiency testing of second-line antituberculosis drug susceptibility testing in 12 provinces of China. *Int J Tuberc Lung Dis* 17(11):1491–1494

Johnstone-Robertson S, Lawn SD, Welte A, Bekker LG, Wood R. Tuberculosis in a South African prison - a transmission modelling analysis. *S Afr Med J* 2011; 101:809–13.

Kamakoli MK, Sadegh HR, Farmanfarmaei G, Masoumi M, Fateh A, Javadi G, et al. Evaluation of the impact of polyclonal infection and heteroresistance on treatment of tuberculosis patients. *Sci Rep* 2017;7:41410.

Kasaie P, Mathema B, Kelton WD, Azman AS, Pennington J, Dowdy DW. A novel tool improves existing estimates of recent tuberculosis transmission in settings of sparse data collection. *PLoS One* 2015; 10:e0144137.

Kim SJ (2005) Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J* 25(3):564–569

Koch, Robert. 1882. Die Aetiologie der Tuberculose von Dr. Robert Koch. Ausw: Berliner Klinische Wochenschrift, Band 19 (1882) [The etiology of tuberculosis by Dr. Robert Koch. From the Berliner Klinische Wochenschrift, Volume 19 (1882)]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1982;251(3):287–296.

Koeck, J. L., Fabre, M., Simon, F., Daffe, M., Garnotel, E., Matan, A. B., et al. (2010). Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli “*Mycobacterium canettii*” infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1013–1019. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03347.x

Koenig SP, Rouzier V, Vilbrun SC, et al. Tuberculosis in the aftermath of the 2010 earthquake in Haiti. *Bull World Health Organ* 2015; 93:498–502.

Kohl, T. A. et al. Harmonized genome wide typing of tubercle bacilli using a web- based gene- by-gene nomenclature system. *EBioMedicine* 34, 131–138 (2018).

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W. C.. Diagnóstico microbiológico: Texto e atlas colorido. 5. Ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001, p. 913-916.

Kontsevaya I, Nikolayevskyy V, Kovalyov A, Ignatyeva O, Sadykhova A, Simak T, et al. Tuberculosis cases caused by heterogeneous infection in Eastern Europe and their influence on outcomes. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017;48:76-82.

Koser CU, Bryant JM, Becq J, Torok ME, Ellington MJ, Marti-Renom MA, et al. Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *N Engl J Med*. 2013; 369(3):290–2. doi: 10.1056/NEJMc1215305 PMID: 23863072; PubMed Central PMCID: PMC3836233.

Koster, K. J. et al. Genomic sequencing is required for identification of tuberculosis transmission in Hawaii. *BMC Infect. Dis.* 18, 608 (2018).

Kritzing FE, den Boon S, Verver S, et al. No decrease in annual risk of tuberculosis infection in endemic area in Cape Town, South Africa. *Trop Med Int Health* 2009; 14:136–42.

Lee, R. S. et al. Reemergence and amplification of tuberculosis in the Canadian arctic. *J. Infect. Dis.* 211, 1905–1914 (2015).

Lieberman TD, Wilson D, Misra R, Xiong LL, Moodley P, Cohen T, Kishony R. 31 October 2016. Genomic diversity in autopsy samples reveals within-host dissemination of HIV-associated *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* <https://doi.org/10.1038/nm.4205>.

Lieberman, T. D. et al. Genomic diversity in autopsy samples reveals within-host dissemination of HIV-associated *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 22, 1470–1474 (2016).

Lin HH, Ezzati M, Murray M. Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2007; 4:e20.

Lipworth, S. et al. SNP-IT tool for identifying subspecies and associated lineages of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 482–488 (2019).

Lönnroth K, Williams BG, Stadlin S, Jaramillo E, Dye C. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis - a systematic review. *BMC Public Health* 2008; 8:289.

Luo T, Yang C, Peng Y, Lu L, Sun G, Wu J, Jin X, Hong J, Li F, Mei J, DeRiemer K, Gao Q (2014b) Whole-genome sequencing to detect recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in settings with a high burden of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 94(4):434–440. doi:10.1016/j.tube.2014.04.005

Macmillan, 1961.

Magnet S, Blanchard JS (2005) Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Ver* 105:477–498

Mallard K, McNerney R, Crampin AC, et al. Molecular detection of mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* strains in sputum samples from patients in Karonga District, Malawi. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4512–4518. doi:10.1128/JCM.01683-10

Mallard K, McNerney R, Crampin AC, Houben R, Ndlovu R, Munthali L, et al. Molecular detection of mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* strains in sputum samples from patients in Karonga District, Malawi. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4512–8.

Malone, K. M., Farrell, D., Stuber, T. P., Schubert, O. T., Aebersold, R., Robbe-Austerman, S., et al. (2017). Updated reference genome sequence and annotation of *Mycobacterium bovis* AF2122/97. *Genome Announc* 5:e00157-17. doi: 10.1128/genomeA.00157-17

Mankiewicz E, Liivak M. Phage Types of Mycobacterium tuberculosis in Cultures Isolated from Eskimo Patients 1, 2. *American Review of Respiratory Disease*. 1975;111(3):307-12

MARDASSI, H.; NAMOUCHI, A.; HALTITI, R.; ZARROUK, M.; MHENNI, B.; KARBOUL, A.; KHABOUCHE, N.; GEY van PITTIUS, N. C.; STREICHER, E. M.; RAUZIER, J.; GICQUEL, B.; DELLAGI, K.. Tuberculosis due to resistant Haarlem strain, Tunisia. *Emerg Infect Dis*. 11: 957-961, 2005.

Marques M, Cunha EAT, Ruffino-Netto A, Andrade SMO. Perfil de resistência de Mycobacterium tuberculosis no estado de Mato Grosso do Sul, 2000-2006. *J Bras Pneumol*. 2010;36(2):224-31. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132010000200011>

Mathema B, Andrews JR, Cohen T, Borgdorff MW, Behr M, Glynn JR, et al. Drivers of Tuberculosis Transmission. *J Infect Dis*. 2017;644(6):216. 1934:611–8.

McAdam, R.A., Hermans, P.W., van Soolingen, D., Zainuddin, Z.F., Catty, D., van Embden, J.D., Dale, J.W., 1990. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol. Microbiol*. 4, 1607–1613.

McHugh, T.D., Gillespie, S.H., 1998. Nonrandom association of IS6110 and Mycobacterium tuberculosis: implications for molecular epidemiological studies. *J. Clin. Microbiol*. 36, 1410–1413.

Meehan CJ, Goig GA, Kohl TA, Verboven L, Dippenaar A, Ezewudo M, et al. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis: current standards and open issues. *Nat Rev Microbiol*. 2019;

Meehan, C. J. et al. The relationship between transmission time and clustering methods in Mycobacterium tuberculosis epidemiology. *EBioMedicine* 37, 410–416 (2018).

Menon S, Rossi R, Nshimyumukiza L, Wusiman A, Zdraveska N, Eldin MS. Convergence of a diabetes mellitus, protein energy malnutrition, and TB epidemic: the neglected elderly population. *BMC Infect Dis* 2016; 16:361.

Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, Blum M, Rusch-Gerdes S, Mokrousov I, Aleksic E, Allix-Beguec C, Antierens A, Augustynowicz-Kopec E, Ballif M, Barletta F, Beck HP, Barry CE 3rd, Bonnet M, Borroni E, Campos-Herrero I, Cirillo D, Cox H, Crowe S, Crudu V, Diel R, Drobniewski F, Fauville-Dufaux M, Gagneux S, Ghebremichael S, Hanekom M, Hoffner S, Jiao WW, Kalon S, Kohl TA, Kontsevaya I, Lillebaek T, Maeda S, Nikolayevskyy V, Rasmussen M, Rastogi N, Samper S, Sanchez-Padilla E, Savic B, Shamputa IC, Shen A, Sng LH, Stakenas P, Toit K, Varaine F, Vukovic D, Wahl C, Warren R, Supply P, Niemann S, Wirth T (2015) Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat Genet*. doi:10.1038/ng.3195

Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Freboung N, Lecher S, Willery E, Blum M, Rusch-Gerdes S, Mokrousov I, Aleksic E, Allix-Beguec C, Antierens A, Augustynowicz-Kopec E, Ballif M, Barletta F, Beck HP, Barry CE 3rd, Bonnet M, Borroni E, Campos-Herrero I, Cirillo D, Cox H, Crowe S, Crudu V, Diel R, Drobniewski F, Fauville-Dufaux M, Gagneux S, Ghebremichael S, Hanekom M, Hoffner S, Jiao WW, Kalon S, Kohl TA, Kontsevaya I, Lillebaek T, Maeda S, Nikolayevskyy V, Rasmussen M, Rastogi N, Samper S, Sanchez-Padilla E, Savic B, Shamputa IC, Shen A, Sng LH, Stakenas P, Toit K, Varaine F, Vukovic D, Wahl C, Warren R, Supply P, Niemann S, Wirth T (2015) Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage. *Nat Genet.* doi:10.1038/ng.3195

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença. *Boletim epidemiológico* n° 09, volume 50, 20 março 2019. 2019;50.

Miotto, P. et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 50, 1701354 (2017). This was the first study to use a score system to classify mutations for clinical interpretation.

Mokrousov I, Valcheva V, Sovhozova N, Aldashev A, Rastogi N, Isakova J. Penitentiary population of Mycobacterium tuberculosis in Kyrgyzstan: exceptionally high prevalence of the Beijing genotype and its Russia-specific subtype. *Infect Genet Evol.* 2009;9(6):1400–1405. doi:10.1016/j.meegid.2009.07.007

Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95 Suppl 1:S167–S176. doi:10.1016/j.tube.2015.02.031

Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Genet Evol.* 2012;12(4):619–629. doi:10.1016/j.meegid.2011.09.026

Mostowy, S., Cousins, D., and Behr, M. A. (2004). Genomic interrogation of the *Mycobacterium tuberculosis* complex reveals it as a unique RD1 mutant within the Mycobacterium tuberculosis complex. *J. Bacteriol.* 186, 104–109. doi: 10.1128/JB.186.1.104-109.2003

Munsiff SS, Nivin B, Sacajiu G, Mathema B, Bifani P, Kreiswirth BN (2003) Persistence of a highly resistant strain of tuberculosis in New York City during 1990-1999. *J Infect Dis* 188:356–363

Murray EJ, Marais BJ, Mans G, et al. A multidisciplinary method to map potential tuberculosis transmission 'hot spots' in high-burden communities. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:767–74.

Navarro Y, Herranz M, Pérez-Lago L, et al. Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization

of the isolates involved. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4131–4137. doi:10.1128/JCM.05203-11

Navarro Y, Pérez-Lago L, Sislema F, Herranz M, de Juan L, Bouza E, García-de-Viedma D. 2013. Unmasking subtle differences in the infectivity of microevolved *Mycobacterium tuberculosis* variants coinfecting the same patient. *Int J Med Microbiol* 303:693– 696. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.10.002>.

Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S, Schlaak M, Greinert U. 2000. Double infection with a resistant and a multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Infect. Dis.* 6:548 –551.

Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S, Schlaak M, Greinert U. Double infection with a resistant and a multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* 2000;6:548–551.

Niemann S, Supply P (2014) Diversity and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: moving to whole-genome-based approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4(12):a021188. doi:10.1101/cshperspect.a021188

Odhiambo J, Borgdorff M, Kiambih F, et al. Tuberculosis and the HIV epidemic: increasing annual risk of tuberculous infection in Kenya, 1986–1996. *Am J Public Health* 1999; 89:1078–82.

Oelemann MC, Diel R, Vatin V, et al. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):691–697. doi:10.1128/JCM.01393-06

OLIVEIRA HB de, CARDOSO JC. Tuberculose no sistema prisional de Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev. Panam. SaludPubl.* 2004;15(3):194-9.

Pankhurst LJ, Del Ojo EC, Votintseva AA, Walker TM, Cole K, Davies J, Fermont JM, Gascoyne-Binzi DM, Kohl TA, Kong C, Lemaitre N, Niemann S, Paul J, Rogers TR, Roycroft E, Smith EG, Supply P, Tang P, Wilcox MH, Wordsworth S, Wyllie D, Xu L, Crook DW (2016) Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. *Lancet Respir Med* 4(1):49–58. doi:10.1016/S2213-2600(15)00466-X

Parsons, S. D., Drewe, J. A., Gey van Pittius, N. C., Warren, R. M., and van Helden, P. D. (2013). Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 2004–2007. doi: 10.3201/eid1912.130268

Pepperell CS, Casto AM, Kitchen A, Granka Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, Del Ojo EC, Bradley P, Iqbal Z, Feuerriegel S, Niehaus KE, Wilson DJ, Clifton DA, Kapatai G, Ip CL, Bowden R, Drobniowski FA, Allix-Beguec C, Gaudin C, Parkhill J, Diel R, Supply P, Crook DW, Smith EG, Walker AS, Ismail N, Niemann S, Peto TE (2015) Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective

cohort study. *Lancet Infect Dis*. doi:10.1016/S1473-3099(15)00062-6 Wang W, Mathema B, Hu Y, Zhao Q, Jiang

Pereira AGL, Medronho RdA, Escosteguy CC, Valencia LIO, Magalh.es MdAFM. Spatial distribution and socioeconomic context of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista de saude publica* 2015; 49:1–8.

Pérez-Lago L, Borlado AIR, Comas I, Herranz M, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, et al. Subtle genotypic changes can be observed soon after diagnosis in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *International Journal of Medical Microbiology*. 2016;306(6):401-5.

Pérez-Lago L, Comas I, Navarro Y, González-Candelas F, Herranz M, Bouza E, García-de-Viedma D. 2014. Whole genome sequencing analysis of inpatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *J Infect Dis* 209: 98–108. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit439>.

Pérez-Lago L, Navarro Y, Herranz M, Bouza E, García-de-Viedma D. 2013. Differences in gene expression between clonal variants of *Mycobacterium tuberculosis* emerging as a result of microevolution. *Int J Med Microbiol* 303:674–677. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.09.010>.

Piton J, Petrella S, Delarue M, André-Leroux G, Jarlier V, Aubry A, Mayer C (2010) Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. *PLoS One* 5:e12245

Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998;79(1):3–29.

Rieder HL. Epidemiologic basis of tuberculosis control. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1999.

Riley RL, Mills CC, Nyka W, et al. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: a two-year study of contagion in a tuberculosis ward. *Am J Hyg* 1959; 70:185–96.

Riley RL, Mills CC, O'Grady F, Sultan LU, Wittstadt F, Shivpuri DN. Infectiousness of air from a tuberculosis ward. Ultraviolet irradiation of infected air: comparative infectiousness of different patients. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85:511–25.

Riley RL, O'Grady F. Airborne infection: transmission and control. New York, NY:

Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Ruckert C, Nubel U, Blom J, Wirth T, Jaenicke S, Schuback S, Rusch-Gerdes S, Supply P, Kalinowski J, Niemann S (2013) Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Med* 10(2):e1001387. doi:10.1371/journal.pmed.1001387

Sacchi FP, Pra.a RM, Tatara MB, et al. Prisons as reservoir for community transmission of tuberculosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2015; 21:452–5.

Sadegh H, Kamakoli MK, Farmanfarmaei G, Masoumi M, Abdolrahimi F, Fateh A, et al. Pros and cons of direct genotyping on tuberculosis clinical samples. *Microb Pathog* 2017;103:135e8.

SANCHEZ A, MASSARI V, GERHARDT G, ESPINOLA AB, SIRIWARDANA M, CAMACHO LA, LAROUZE B. X ray screening at entry and systematic screening for the control of tuberculosis in a highly endemic prison. *BMC Public Health*. 2013;13: 983

Shamputa IC, Jugheli L, Sadradze N, et al. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir Res*. 2006;7(1):99. Published 2006 Jul 17. doi:10.1186/1465-9921-7-99

Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330:1703–9.

Sobkowiak B, Glynn JR, Houben RMGJ, Mallard K, Phelan JE, Guerra-Assunção JA, et al. Identifying mixed *Mycobacterium tuberculosis* infections from whole genome sequence data. *BMC Genomics*. 2018;19(1):1–15.

Sobkowiak, B. et al. Identifying mixed *Mycobacterium tuberculosis* infections from whole genome sequence data. *BMC Genomics* 19, 613 (2018).

Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N. 2003. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 3:125–133 [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348\(03\)00011-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00011-X).

Sola C, Filliol I, Legrand E, Mokrousov I, Rastogi N. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6100, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. *J Mol Evol* 53:680–689 <http://dx.doi.org/10.1007/s002390010255>.

Sola, C., I. Filliol, M. C. Gutierrez, I. Mokrousov, V. Vincent, and N. Rastogi. 2001b. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg. Infect. Dis*. 7:390-396

Somoskovi A, Salfinger M (2015) The race is on to shorten the turnaround time for diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol* 53(12):3715–3718

Souza MB, Antunes CMF, Garcia GF. Perfil de sensibilidade e fatores associados à resistência do *Mycobacterium tuberculosis*, em centro de

referência de doenças infecto-contagiosas de Minas Gerais. J Bras Pneumol. 2006;32(5):430-7. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132006000500010>

Souza MB, Antunes CMF, Garcia GF. Perfil de sensibilidade e fatores associados . resist.ncia do Mycobacterium tuberculosis, em centro de refer.ncia de doen.as infecto-contagiosas de Minas Gerais. J Bras Pneumol. 2006;32(5):430-7. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132006000500010>

Streicher, E. M. et al. Mycobacterium tuberculosis population structure determines the outcome of genetics- based second- line drug resistance testing. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 2420–2427 (2012).

Stucki D, Ballif M, Bodmer T, Coscolla M, Maurer AM, Droz S, Butz C, Borrell S, Langle C, Feldmann J, Furrer H, Mordasini C, Helbling P, Rieder HL, Egger M, Gagneux S, Fenner L (2015) Tracking a tuberculosis outbreak over 21 years: strainspecific single-nucleotide polymorphism typing combined with targeted whole-genome sequencing. J Infect Dis 211(8):1306–1316. doi:10.1093/infdis/jiu601

Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M et al (2016b) Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. Nat Genet 48(12):1535–1543. doi:10.1038/ng.3704

Stýblo K, Meijer J, Sutherland I. The transmission of tubercle bacilli: its trend in a human population. Bull World Health Organ 1969; 41:137–78.

Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsç-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. Journal of clinical microbiology. 2006;44(12):4498- 305

Supply, P., Marceau, M., Mangenot, S., Roche, D., Rouanet, C., Khanna, V., et al. (2013). Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of Mycobacterium tuberculosis. Nat. Genet. 45, 172–179. doi: 10.1038/ng.2517

Telisinghe L, Fielding KL, Malden JL, et al. High tuberculosis prevalence in a South African prison: the need for routine tuberculosis screening. PLoS One 2014; 9:e87262

Theisen A, et al. 1995. Mixed-strain infection with a drug-sensitive and multidrug-resistant strain of Mycobacterium tuberculosis. Lancet 345: 1512. doi:10.1016/S0140-6736(95)91073-5.

Tram TTB, Nhung HN, Vijay S, et al. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Is Associated With Sputum Pre-treatment Bacterial Load, Lineage, Survival in Macrophages, and Cytokine Response. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:417. Published 2018 Nov 27. doi:10.3389/fcimb.2018.00417



Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S (2014) Evolution of drug resistance in tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy. *Drugs* 74:1063–1072

Trauner, A. et al. The within- host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* vary with treatment efficacy. *Genome Biol.* 18, 71 (2017).

Turner RD, Bothamley GH. Cough and the transmission of tuberculosis. *J Infect*

Valença MS, Scaini JL, Abileira FS, Gonçalves CV, von Groll A, Silva PE. Prevalence of tuberculosis in prisons: risk factors and molecular epidemiology. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19:1182–7.

Valway SE, Greifinger RB, Papania M, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in the New York State prison system, 1990–1991. *J Infect Dis* 1994; 170:151–6.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31:406–9.

van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, van Der Zeijst BA, Schouls LM. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol.* 2000;182(9):2393–2401. doi:10.1128/jb.182.9.2393-2401.2000

van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M. J., Simeone, R., Brosch, R., et al. (2012). Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 653–655. doi: 10.3201/eid1804.110888

van Rie A, Victor TC, Richardson M, Johnson R, Van Der Spuy GD, Murray EJ, et al. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2005;172(5):636-42.

Vyazovaya A, Mokrousov I, Solovieva N, Mushkin A, Manicheva O, Vishnevsky B, Zhuravlev V, Narvskaya O. Tuberculous spondylitis in Russia and prominent role of multidrug-resistant clone *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:2349–57.

Walker TM, Lalor MK, Broda A, et al. Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in Oxfordshire, UK, 2007-12, with whole pathogen genome sequences: an observational study. *Lancet Respir Med* 2014; 2:285–92.

Walker, T. M. et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect. Dis.* 13, 137–146 (2013).

Warner DF, Mizrahi V. Tuberculosis Chemotherapy: the Influence of Bacillary Stress and Damage Response Pathways on Drug Efficacy. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul 1;19(3):558 LP – 570.

Warren RM, Streicher EM, Sampson SL, et al. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J Clin Microbiol.* 2002;40(12):4457–4465. doi:10.1128/jcm.40.12.4457-4465.2002

Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, Gey van Pittius NC, van Helden PD. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:610–614.

Warren, R. M., S. L. Sampson, M. Richardson, G. D. van der Spuy, C. J. Lombard, T. C. Victor, and P. D. van Helden. 2000. Mapping of IS6110-flanking regions in clinical isolates of *M. tuberculosis* demonstrates genome plasticity. *Mol. Microbiol.* 37:1405-1416.

Wells CD, Cegielski JP, Nelson LJ, Laserson KF, Holtz TH, Finlay A, Castro KG, Weyer K (2007) HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm. *J Infect Dis* 196(Suppl 1): S86–107

W. F. WELLS, ON AIR-BORNE INFECTION: STUDY II. DROPLETS AND DROPLET NUCLEI., *American Journal of Epidemiology*, Volume 20, Issue 3, November 1934, Pages 611–618, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118097>

WILLIAMS & WILKINS. Section 16 The Mycobacteria. In *Systematic Bacteriology*. 2:1435-1457,1986.

Wobudeya E, Lukoye D, Lubega IR, Mugabe F, Sekadde M, Musoke P. Epidemiology of tuberculosis in children in Kampala district, Uganda, 2009–2010; a retrospective cross-sectional study. *BMC public health* 2015; 15:967.

Wood R, Morrow C, Barry CE 3rd, et al. Real-time investigation of tuberculosis transmission: developing the respiratory aerosol sampling chamber (RASC). *PLoS One* 2016; 11:e0146658.

World Health Organization (2012a) Tuberculosis laboratory biosafety manual. WHO, Geneva. ISBN 978 92 4 150463 8

World Health Organization (2012b) Summary of outcomes from WHO expert group meeting on drug susceptibility testing. 4th annual GLI meeting 17 April 2012

World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2015. Geneva, Switzerland: WHO, 2015.

World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. WHO <https://www.who.int/tb/publications/globalreport/archive/> (2018).

World Health Organization. The end TB strategy [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [cited 2018 Feb 14]. 16 p. Available in: <http://www.who.int/tb/post2015strategy/en/>.

World Health Organization. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. WHO <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274443> (2018). This guide is the first step towards validation of WGS as a tool for MTBC clinical and public healthwork.

Wyllie, D. H. et al. A quantitative evaluation of MIRUVNTR typing against whole-genome sequencing for identifying *Mycobacterium tuberculosis* transmission: a prospective observational cohort study. *EBioMedicine* 34, 122–130 (2018).

Yang C, Luo T, Shen X, et al. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China: a retrospective observational study using whole-genome sequencing and epidemiological investigation. *Lancet Infect Dis* 2017; 17:275–84

Yates TA, Khan PY, Knight GM, et al. The transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in high burden settings. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:227–38.

Yates TA, Khan PY, Knight GM, Taylor JG, McHugh TD, Lipman M, et al. The transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in high burden settings. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):227–38.

Yeboah-Manu, D., de Jong, B. C., and Gehre, F. (2017). The biology and epidemiology of *Mycobacterium africanum*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1019, 117–133. doi: 10.1007/978-3-319-64371-76

Yuen CM, Kurbatova EV, Click ES, Cavanaugh JS, Cegielski JP. Association between *Mycobacterium tuberculosis* complex phylogenetic lineage and acquired drug resistance. *PLoS One* 2013; 8:e83006.

Zetola N. M. et al.. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *J Clin Microbiol* 52(7), 2422–9 (2014).

Zheng C, Li S, Luo Z, Pi R, Sun H, He Q, et al. Mixed infections and rifampin hetero-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2015;JCM. 03507

Zheng C. et al.. Mixed Infections and Rifampin Heteroresistance among *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *J Clin. Microbiol.* 53(7), 2138–47 (2015).

Zignol M, Dean AS, Alikhanova N et al. (2016) Population-based resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project. *Lancet Infect Dis*

Zignol M, Van Gemert W, Falzon D, Sismanidis C, Glaziou P, Floyd K, Raviglione M (2012) Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007–2010. *Bull World Health Organ* 90:111–119d

Zignol, M. et al. Genetic sequencing for surveillance of drug resistance in tuberculosis in highly endemic countries: a multi- country population- based surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* 18, 675–683 (2018).











ANEXO I (Conotinação)

ID	INH	SM	EMB	RMP	Fita Hain	Gênero	Nasc	Bac.	Origem	HIV/AIDS
782	S	S	S	S		Masculino	08/06/1980	+++	Porto Velho	neg
1579	S	S	S	S		Masculino	18/05/1982		Guajará Mirim	neg
33	S	S	S	S		Feminino	25/12/1976	+++	Porto Velho	neg
384	S	S	S	S		Masculino	04/07/1984	++	Porto Velho	NR
473	S	S	S	S		Masculino	10/07/1968	neg	Porto Velho	pos
91	S	S	S	S	S	Masculino	09/02/1962	+	Porto Velho	NR
823	S	S	S	S	S	Masculino	25/07/1952	+++	Porto Velho	neg
596	S	S	S	S		Masculino	22/02/1991	+	Presídio	NR
1464	S	S	S	S		Feminino	18/05/1996	neg	Porto Velho	NR
542	S	S	S	S		Masculino	14/07/1991	6 bacilos	Presídio	neg
382	S	S	S	S		Feminino	10/01/1973	5bacilos	Porto Velho	neg
649	R	S	S	S	S	Feminino	01/03/1994	+++	NA	NR
410	S	S	S	S	S		01/03/1994	neg	Guajará Mirim	NR
13615	S	R	S	S		Masculino	02/06/1976	+	Presídio	NR
548	S	S	S	S		Masculino		neg	Guajará Mirim	neg
1404	S	S	S	S		Feminino	05/06/1986	+++	Ji-Paraná	pos
390	S	S	S	S		Masculino	25/02/1965	neg	NA	NR

162	R	R	S	R		Masculino	30/08/1966	++	Presidente Medici	neg
9	S	S	S	S		Feminino	07/09/1984	neg	Porto Velho	pos
640	S	S	S	S			25/12/1983	+++	Presídio	NR
70	S	R	S	S	S	Feminino	23/09/1970	++	Rolim de Moura	neg
892	S	S	S	S		Masculino	22/04/1959		Ji-Paraná	neg
1040	S	S	S	S		Masculino	29/03/1981	+	Porto Velho	NR
1060	S	S	S	S		Feminino	25/11/1992		Ji-Paraná	neg
789	S	S	S	S		Masculino	11/03/1956	neg	Porto Velho	neg
3014	S	S	S	S	S	Masculino	10/05/1986	+	Porto Velho	pos
86	R	S	S	R	rpoB MUT3 (S531L/S450L); katG MUT1 (S315T1)	Feminino	03/10/1973	++	Porto Velho	NR
428	S	S	S	S			18/02/1991	+	Presídio	NR
321	S	S	S	S	S	Feminino	12/02/1962	++	Ariquemes	neg
63	S	S	S	S		Masculino	22/01/2014	neg	Presídio	NR
595	S	S	S	S		Feminino	21/10/1986	++	Presídio	NR
773	S	S	S	S		Masculino	15/05/1975	++	Presídio	NR
821	S	S	S	S		Feminino	21/10/1986	+	Presídio	NR
13614	S	S	S	S		Masculino	27/09/1984		Presídio	NR
325	S	S	S	S		Feminino	24/03/1941	neg	Porto Velho	neg
333	S	S	S	S	S	Masculino	27/11/1995	neg	Porto Velho	neg
464	S	S	S	S		Masculino	09/06/1965	++	Porto Velho	neg
783	S	S	S	S		Masculino	13/07/1977	++	Porto Velho	neg
32215	S	S	S	S	S		12/02/1962	neg	Ariquemes	neg
379	S	S	S	S		Masculino	26/02/1995	neg	Ji-Paraná	neg
848	S	S	S	S		Masculino	03/07/1976	neg	Presídio	NR
1120	S	S	S	S		Masculino	12/12/1955		Ji-Paraná	neg

587	S	S	S	S	Feminino	28/10/1985	+	Porto Velho	neg
1138	S	S	S	S	Feminino	25/07/1975	+++	Espigão do oeste	NR
1313	S	S	S	S	Masculino	12/12/1988	neg	Presídio	NR
1400	S	S	S	S	Feminino	27/09/1962		Ouro Preto do Oeste	NR
392	S	S	S	S	Masculino	03/09/1988	neg	Presídio	NR
591	S	S	S	S	Masculino	21/04/1966	neg	Presídio	NR
1252	S	S	S	S	Masculino	05/04/1989	+++	Presídio	neg
1311	S	S	S	S	Masculino	16/09/1975	neg	Presídio	NR
1351	S	S	S	S	Masculino	14/05/1983	+	Presídio	neg
1352	S	S	S	S	Masculino	20/05/1989	+++	Presídio	NR
1415	S	S	S	S	Masculino	02/05/1992	neg	Presídio	NR
1597	S	S	S	S		20/03/1976	+++	Presídio	NR
1117	S	S	S	S	Masculino	25/11/1988	neg	Ji-Paraná	neg
1278	S	S	S	S	Feminino	02/10/1989	++	Porto Velho	NR
1316	S	S	S	S	Masculino	23/09/1988		Porto Velho	neg
1329	S	S	S	S	Masculino	07/08/1965	+++	Ouro Preto do Oeste	neg
1333	S	S	S	S	Feminino	23/04/1980	neg	Porto Velho	neg
1336	S	S	S	S	Masculino	27/05/1983	+	Jaru	NR
1337	S	S	S	S	Masculino	13/01/1977	++	Porto Velho	neg
1342	S	S	S	S	Masculino	22/07/1979	++	Porto Velho	neg
1422	S	S	S	S	Masculino	07/10/1985	++	NA	NR
1423	S	S	S	S	Masculino	14/12/1984	+	Porto Velho	pos
1485	S	S	S	S	Masculino	21/11/1989	+++	Porto Velho	neg
1534	S	S	S	S	Feminino	12/12/1971		Porto Velho	neg
504	S	S	S	S	Masculino	25/06/1979	+++	Presídio	neg

510	S	S	S	S		Masculino	18/02/1983	++	Presídio	NR
650	S	S	S	S		Masculino	21/06/1984	+	Porto Velho	neg
1421	S	S	S	S		Masculino	30/09/1956	++	NA	NR
681	S	S	S	S		Feminino	29/03/1989	neg	Presídio	NR
847	S	S	S	S		Masculino	28/05/1990	2bacilos	Presídio	neg
286	S	S	S	S		Feminino	21/12/1993	+++	Porto Velho	neg
488	S	S	S	S		Masculino	12/09/1978	++	Porto Velho	NR
501	S	S	S	S		Masculino	24/02/1970	+++	Vilhena	neg
67	S	S	S	S	S	Masculino	20/08/1945	neg	NA	NR
897	S	S	S	S		Masculino	26/06/1944		Seringueiras	neg
443	S	S	S	S		Feminino	05/05/1956	++	Porto Velho	NR
833	S	S	S	S		Masculino	22/11/1973	+	BR 364 km 88	neg
432	R	R	S	S		Masculino	15/04/1991	neg	Pimenta Bueno	neg
401	S	S	S	S		Masculino	10/12/1989	++	Presídio	neg
345	S	S	S	S		Masculino	06/01/1970	++	Vilhena	neg
564	S	S	S	S		Masculino	07/10/1984	++	Humaita	neg
730	S	S	S	S		Feminino	13/05/1953	++	Porto Velho	neg
395	S	R	S	S	S	Masculino	27/03/1997	+++	Porto Velho	neg
411	S	R	S	S	S		27/03/1977	+++	NA	NR
1133	S	R	S	S		Masculino	12/12/1978	+++	Porto Velho	NR
1374	S	R	R	S			27/03/1977	+++	NA	NR
133	S	S	S	S		Masculino	11/04/1981	neg	Presídio	NR
829	S	S	S	S		Masculino	30/07/1992	+++	Porto Velho	neg
932	S	S	S	S		Masculino	12/12/1951	+	Porto Velho	neg
956	S	S	S	S		Masculino	29/05/1977	++	Porto Velho	pos

515	S	S	S	S		Masculino	12/09/1988	++	Presídio	NR
1176	S	R	S	S		Feminino	01/02/1989	neg	Porto Velho	neg
372	S	S	S	S		Masculino	10/09/1977	++	Presídio	neg
1291	S	S	S	S		Masculino	10/09/1977	++	Presídio	NR
6	S	S	S	S	S	Feminino	19/03/1983	+++	Porto Velho	neg
7	S	S	S	S	S		19/03/1983	+++	NA	NR
39	S	S	S	S	S	Feminino	30/04/1985	neg	NA	NR
950	S	S	S	S		Feminino	15/03/1939		Guajará Mirim	neg
962	S	S	S	S		Masculino	19/03/1968	++	Porto Velho	neg
830	S	S	S	S	S	Masculino	11/11/1965	+	são francisco do guaporé	neg
857	S	S	S	S	S		11/11/1965	neg	Porto Velho	NR
1105	S	S	S	S	S	Feminino	07/08/1976	++	Guajará Mirim	neg
1262	S	S	S	S	S		07/08/1976		NA	NR
1265	S	S	S	S	S		07/08/1976		NA	NR
1277	S	S	S	S	S		07/08/1976	+	NA	NR
695	S	S	S	S		Masculino	07/05/1965	neg	Porto Velho	neg
1025	R	S	S	R	rpoB MUT3 (S531L/S450L); katG MUT1 (S315T1)		03/10/1973	neg	Porto Velho	NR
979	S	R	S	S		Masculino	24/07/1982	+	Presídio	NR
1195	S	R	S	S			04/07/1982	neg	Presídio	NR
28	S	R	S	S	S	Masculino	04/09/1987	+	Porto Velho	neg
634	S	R	S	S		Masculino	17/08/1992	++	Porto Velho	neg
873	S	R	S	S		Masculino	12/11/1988	+++	Porto Velho	NR
3015	S	R	S	S	S	Masculino	17/11/1983	neg	Porto Velho	neg
704	S	S	S	S	S		28/01/1979	++	NA	NR
335	S	S	S	S	S	Feminino	15/07/1991	+	Porto Velho	neg

1426	S	S	S	S			15/07/1991	++	Porto Velho	NR
602	S	S	S	S			11/09/1972	++	Presídio	NR
939	S	S	S	S	S	Feminino	07/09/1976	neg	Porto Velho	pos
658	S	S	S	S	S	Masculino	25/12/1983	+++	Porto Velho	neg
1507	S	S	S	S			12/02/1962	+++	Ariquemes	NR
21	S	S	S	S		Masculino	27/04/1989	+	Presídio	neg
29	S	S	S	S		Masculino	31/08/1987	++	Presídio	neg
88	S	S	S	S		Masculino	29/12/1978	++	Presídio	NR
240	S	S	S	S		Masculino	25/12/1985	neg	Presídio	NR
323	S	S	S	S		Masculino	22/06/1991	++	Presídio	neg
490	S	S	S	S		Masculino	20/10/1989	neg	Presídio	neg
576	S	S	S	S		Masculino	16/12/1983	+++	Presídio	neg
2714	S	S	S	S	S	Masculino	27/12/1989	neg	Presídio	neg
32214	S	S	S	S		Masculino	20/11/1985	+++	Presídio	NR
107	S	S	S	S	S	Masculino	30/11/1985	++	Porto Velho	neg
222	S	S	S	S		Masculino	25/11/1990	++	Porto Velho	neg
251	S	S	S	S		Masculino	06/01/1977	++	Porto Velho	neg
292	S	S	S	S		Masculino	23/08/1977	++	NA	NR
293	S	S	S	S		Masculino	18/04/1969	+	Guajará Mirim	neg
465	S	S	S	S		Masculino	18/01/1959	neg	Porto Velho	NR
466	S	S	S	S		Masculino	11/07/1984	+++	Guajará Mirim	NR
496	S	S	S	S		Feminino	12/06/1994	neg	Porto Velho	neg
528	S	S	S	S		Masculino	16/08/1987	+	Ji-Paraná	neg
642	S	S	S	S		Masculino		neg	Porto Velho	NR
699	S	S	S	S		Masculino	09/07/1979	++	Porto Velho	neg

870	S	S	S	S		Masculino	19/03/1964	+	sitio 2 irmãos/linha 665	pos
2715	S	S	S	S		Feminino	17/01/1989	++	Candeias	neg
1182	R	R	S	S		Masculino	09/03/1954	neg	Porto Velho	pos
161	R	R	S	R	rpoB MUT3 (S531L/S450L); katG MUT1 (S315T1)	Masculino	10/11/1965	++	Porto Velho	NR
17	R	R	R	R			10/11/1963	+	Porto Velho	neg
875	R	R	R	R			10/11/1965	++	Porto Velho	NR
733						Masculino	05/02/1982	+++	Porto Velho	neg
123	S	R	S	S	S	Feminino	02/09/1970	+	Porto Velho	neg
703	S	S	S	S	S	Masculino	28/01/1976	++	Porto Velho	neg
403	S	S	S	S		Masculino	11/09/1972	+++	Presídio	NR
972	S	S	S	S			07/09/1976	neg	Presídio	NR
338	S	S	S	S		Masculino	23/08/1971	+	Porto Velho	neg
555	S	S	S	S		Masculino	26/09/1980	neg	Porto Velho	pos
712	R	R	S	R		Masculino	20/10/1987	neg	Vilhena	neg
280	S	S	S	S		Masculino	04/06/1990	++	NA	NR
425	S	S	S	S		Masculino	09/10/1986	+++	Presídio	neg
676	S	S	S	S		Masculino	20/09/1992	++	Presídio	neg
630	S	S	S	S		Feminino	27/10/1995	neg	Cacoal	neg
340	S	S	S	S	S	Masculino	29/06/1973	+	Porto Velho	neg
341	S	S	S	S	S		29/06/1973	+	NA	NR
838	S	S	S	S		Masculino	24/01/1957	+++	Porto Velho	neg
331	S	S	S	S		Masculino	18/02/1991	+++	Presídio	neg
791	S	S	S	S		Masculino	29/07/1985	++	Guajará-Mirim	neg
896	S	S	S	S		Masculino	13/03/1998		Ji-Paraná	neg
1455	S	S	S	S		Masculino	02/09/1959		Guajará Mirim	neg

1567	S	S	S	S		Masculino	28/02/1953		Porto Velho	neg
722	S	S	S	S		Masculino	24/05/1975	++	Porto Velho	NR
1118	S	S	S	S		Masculino	11/08/1970		Ji-Paraná	neg
1304	S	S	S	S		Feminino	28/01/1967		Cacoal	neg
1403	S	S	S	S		Feminino	21/10/1995	+++	Ji-Paraná	neg
1568	S	S	S	S		Feminino	19/05/1963	++	Itapuã do Oeste	NR
1270	R	R	S	S		Masculino	28/04/1995		Guajará Mirim	neg
1447	S	S	S	S	S		10/07/1974		Guajará Mirim	NR
546	R	R	S	S	S		19/10/1974	neg	Guajará Mirim	pos
119	S	R	S	S	S	Masculino	18/02/1972	+++	Porto Velho	neg
412	S	R	S	S		Masculino	07/06/1988	4 bacilos	Porto Velho	neg
304	S	S	S	S		Masculino	20/08/1958	neg	Presídio	neg
115	S	S	S	S	S	Masculino	02/02/1987	neg	Guajará Mirim	NR
409	S	S	S	S		Masculino		neg	NA	NR
529	S	S	S	S		Masculino	08/06/1979	++	NA	NR
710	S	S	S	S		Masculino	04/01/1964	neg	Ji-Paraná	neg
711	S	S	S	S		Masculino	14/07/1980	neg	Ji-Paraná	neg
1056	S	S	S	S		Feminino	18/06/1995		Teixeropolis	neg
811	S	S	S	S		Masculino	28/05/1992	++	Presídio	NR
736	S	S	S	S	S	Masculino	10/08/1966	+++	Porto Velho	neg
659	S	S	S	S		Masculino	11/07/1960	++	Porto Velho	neg
1405	S	S	S	S		Feminino	24/05/1962	+++	Ji-Paraná	pos
1203	S	S	S	S		Masculino	19/01/1965	++	Presídio	neg
1087	S	R	S	S		Masculino	25/10/1982	neg	Presídio	NR
888	S	S	S	S		Masculino	04/06/1987	+++	Presídio	NR



1310	S	R	S	S		Masculino	25/03/1957	+++	Ariquemes	Neg
346	S	S	S	S		Masculino	17/07/1962	+	Vilhena	NR
960	S	S	S	S		Masculino	06/08/1976	neg	Porto Velho	NR
427	S	S	S	S		Masculino	02/01/1981	neg	Presídio	neg
124	S	S	S	R	rpoB MUT3 (S531L/S450L); katG MUT1 (S315T1)	Masculino	09/09/1972	++	Porto Velho	neg
628	R	R	S	R		Feminino	<u>24/01/1986</u>	+++	Porto Velho	neg
943	S	S	S	S	S		07/02/1933	neg	Guajará Mirim	neg
549	S	S	S	S	S	Masculino	07/02/1933	neg	Guajará Mirim	NR
1143	S	S	S	S		Masculino	11/09/1976	+++	Presídio	neg
1493	S	S	S	S		Masculino	18/05/1988	++	Presídio	neg
1131	S	S	S	S		Feminino	04/11/1965	++	Porto Velho	neg
1432	S	S	S	S		Masculino	30a	neg	Porto Velho	NR
1305	S	S	S	S		Masculino	15/11/1974	+++	Porto Velho	neg
530	S	S	S	S	S		16/07/1980	+++	Ji-Paraná	NR
709	S	S	S	S	S	Feminino	16/07/1980	neg	NA	NR
925	S	S	S	S			28/04/1976	+++	Itapuã do Oeste	neg
926	S	S	S	S			28/04/1976	+++	NA	NR
927	S	S	S	S	S	Masculino	28/04/1976	+++	NA	NR
1141	S	S	S	S	S	Masculino	19/01/1987	+++	NA	NR
369	S	S	S	S		Masculino	12/11/1986	+++	Presídio	NR
599	S	S	S	S		Masculino	03/01/1994	+++	Presídio	neg
818	S	S	S	S		Masculino	23/11/1994	neg	Presídio	NR
158	S	S	S	S	S	Masculino	10/10/1975	+	Porto Velho	NR
206	S	S	S	S		Feminino	25/05/1979	++	NA	NR
235	S	S	S	S		Masculino	29/05/1970	+	Porto Velho	NR

525	S	S	S	S	Masculino	11/01/1964	neg	Ariquemes	neg
589	S	S	S	S	Masculino	07/03/1991	+	Porto Velho	neg
639	S	S	S	S	Masculino	23/10/1990	neg	NA	neg
728	S	S	S	S	Feminino	27/11/1985	+++	Porto Velho	NR
930	S	S	S	S	Masculino	28/07/1986	neg	Porto Velho	pos
1146	S	S	S	S		19/01/1987	+++	Presídio	neg
705	S	S	S	S	Feminino	27/07/1967	++	Porto Velho	neg



# 10 ANEXO III

Dados das amostras					TSA						MixInfectR					Mykrobe TB (perfil e evidências)															
Amostras	Número	NIPHName	Year	StudyIdentifier	Sublinhagem	RIF F	INH F	PZA F	EMB F	RIF	RIFPLUS	Mixed SNPs	Total SNPs	Proportion het/total SNPs	Isolados	Mistura	Major strain proportion	Linhagem	RI F	IN H	EM B	STRE Q	P	Resist	RIFEvideMKTB	INHEvideM KTB	EMBevideM KTB	STRevideM KTB	QEvideMK TB	KANAMYCINCAPREOMYCINAMIKAC INMKTB	
DF105	41	BRZ-41	2006	BrazilBRZ-412006	4.9	S	S	S	S	S	S	340	648	52,4691358	2	M	78%	EA	S	S	S			S	S431X in gene rpoB						
7928	110	BRZ-110	2010	BrazilBRZ-1102010	4.8	R	R	R	R	MDR	MDR+E				1	O	NÃ	EA	R	R	R	S	R	XDR	D435X, S450X in gene rpoB	S315X in gene katG	M306X in gene embB	K43R in gene rpsL	A1401X in gene rrs		
SP20715	16	BRZ-16	2004	BrazilBRZ-162004	4.8	S	S	S	S	S	S	177	823	21,5066829	2	M	72%	EA	S	S	S			S							
SP25616	17	BRZ-17	2004	BrazilBRZ-172004	4.8	S	S	S	S	S	S	357	972	36,7283951	2	M	77%	EA	S	S	S			S							
SP22527	22	BRZ-22	2004	BrazilBRZ-222004	4.8	S	S	S	S	S	S	188	689	27,2859216	2	M	73%	EA	S	S	S			S							
DF20528	28	BRZ-28	2005	BrazilBRZ-282005	4.8	S	S	S	S	S	S	270	874	30,8924485	2	M	77%	EA	S	S	S			S	C513X in gene rrs						
DF0553	53	BRZ-53	2007	BrazilBRZ-532007	4.8	S	S	S	S	S	S	614	1192	51,5100671	3	M	67%	EA	S	S	S			S	A451X in gene rpoB						
SP20034	21	BRZ-21	2004	BrazilBRZ-212004	4.8	S	S	S	S	S	S	300	882	34,0136054	2	M	81%	EA	R	S	S			RR-TB	L430X in gene rpoB, H445X in gene rpoB						
DF32542	42	BRZ-42	2006	BrazilBRZ-422006	4.8	S	R	S	S	MONOI NH	MONOI NH	539	1085	49,6774194	2	M	84%	EA	S	R	S			MONOI NH	S315X in gene katG						
8398	111	BRZ-111	2010	BrazilBRZ-1112010	4.7	R	R	S	S	MDR	MDR				1	O	NÃ	EA	R	R	R	R	S	XDR	M434X in gene rpoB	S315X in gene katG	M306X in gene embB	D94X in gene gyrA	A1401X in gene rrs		
SP20013	20	BRZ-20	2004	BrazilBRZ-202004	4.7	S	S	S	S	S	S	432	1009	42,814668	2	M	79%	EA	S	S	S			S	S315X in gene katG						
6518	104	BRZ-104	2010	BrazilBRZ-1042010	4.7	R	R	S	S	MDR	MDR				1	O	NÃ	EA	R	R	S	S	S	MDR	S450X in gene rpoB	S315X in gene katG					
7596	106	BRZ-106	2010	BrazilBRZ-1062010	4.7	R	R	S	R	MDR	MDR+E				1	O	NÃ	EA	R	R	R			MDR	S450X in gene rpoB	S315X in gene katG	M306X in gene embB				
6402	88	BRZ-88	2010	BrazilBRZ-882010	4.7	R	R	S	R	MDR	MDR+E	278	895	31,0614525	2	M	72%	EA	R	R	R	S	R	MDR	Q429X, S450X in gene rpoB	S315X in gene katG	M306X in gene embB	K43R in gene rpsL	H87X in gene gyrA		
6415	93	BRZ-93	2010	BrazilBRZ-932010	4.7	R	R	S	S	MDR	MDR	293	870	33,6781609	2	M	77%	EA	R	R	R			MDR	F433X, S450X in gene rpoB	S315X in gene katG	M306X in gene embB	D94X in gene gyrA			
3047	84	BRZ-84	2008	BrazilBRZ-842008	4.4	S	R	S	S	MONOI NH	MONOI NH	388	1234	31,4424635	3	M	50%	EA	R	R	S	R	S	XDR	Q429X, S450X in gene rpoB	S315X in gene katG		S91X in gene gyrA	A1401X in gene rrs		
SP21970	19	BRZ-19	2004	BrazilBRZ-192004	4.4	S	S	S	S	S	S	321	1185	27,0886076	2	M	78%	EA	S	S	S			S	H85X in gene gyrA						

DF262	29	BRZ-29	200	BrazilBRZ-292005	4.4	S	S	S	S	S	S	105	SI	204	6	19,3181818	2	M	78%	EA	S	S	S	S	S315X in gene katG	
SP250	61	BRZ-72	200	BrazilBRZ-722008	4.4	S	S	S	S	S	S	122	SI	374	8	30,4560261	3	M	58%	EA	S	S	S	S	S450X in gene rpoB	
DF435	44	BRZ-44	200	BrazilBRZ-442006	4.3	R	S	S	S	RR-TB	RR-TB	121	SI	274	6	22,5328947	2	M	70%	EA	S	S	S	S		
DF75	61	BRZ-61	200	BrazilBRZ-612007	4.3	R	S	S	S	RR-TB	RR-TB	120	SI	329	4	27,3255814	2	M	68%	EA	S	S	S	S	Q432X e N438X in gene rpoB	
3304	83	BRZ-83	200	BrazilBRZ-832008	4.3	R	R	S	S	MDR	MDR	155	SI	761	0	49,0967742	2	M	83%	EA	S	S	S	S		
SP236	85	BRZ-18	200	BrazilBRZ-182004	4.3	S	S	S	S	S	S	108	SI	142	4	13,099631	2	M	70%	EA	S	S	S	S		
SP229	39	BRZ-23	200	BrazilBRZ-232004	4.3	S	S	S	S	S	S		NÃ								EA	S	S	S	S	
SP199	24	BRZ-24	200	BrazilBRZ-242004	4.3	S	S	S	S	S	S	125	SI	335	6	26,6719745	2	M	78%	EA	S	S	S	S		
SP236	25	BRZ-25	200	BrazilBRZ-252005	4.3	S	S	S	S	S	S		NÃ								EA	S	S	S	S	
DF199	27	BRZ-27	200	BrazilBRZ-272005	4.3	S	S	S	S	S	S	107	SI	155	2	14,4589552	2	M	72%	EA	S	S	S	S		
DF242	35	BRZ-35	200	BrazilBRZ-352006	4.3	S	S	S	S	S	S	106	SI	152	1	14,3261074	3	M	60%	EA	S	S	S	S	S450X in gene rpoB	
DF263	37	BRZ-37	200	BrazilBRZ-372006	4.3	S	S	S	S	S	S	101	SI	171	6	16,8307087	2	M	78%	EA	S	S	S	S	G426X in gene rpoB	
DF230	38	BRZ-38	200	BrazilBRZ-382006	4.3	S	S	S	S	S	S		NÃ								EA	S	S	S	S	G442X in gene rpoB
DF257	43	BRZ-43	200	BrazilBRZ-432006	4.3	S	S	S	S	S	S	125	SI	383	8	30,445151	3	M	55%	EA	S	S	S	S	T444X in gene rpoB	
DF131	45	BRZ-45	200	BrazilBRZ-452006	4.3	S	S	S	S	S	S	125	SI	423	6	33,6783439	3	M	67%	EA	S	S	S	S	H85X in gene gyrA	
DF215	48	BRZ-48	200	BrazilBRZ-482006	4.3	S	S	S	S	S	S	119	SI	442	0	37,1428571	3	M	66%	EA	S	S	S	S	A451X in gene rpoB	
DF25	49	BRZ-49	200	BrazilBRZ-492006	4.3	S	R	S	S	MONOI	MONOI	125	SI	356	1	28,4572342	3	M	59%	EA	S	S	S	S	Q436X in gene rpoB	
DF445	52	BRZ-52	200	BrazilBRZ-522006	4.3	S	S	S	S	S	S	108	SI	220	1	20,3515264	3	M	58%	EA	S	S	S	S		
DF07	54	BRZ-54	200	BrazilBRZ-542007	4.3	S	S	S	S	S	S	134	SI	500	4	37,202381	3	M	67%	EA	S	S	S	S	A451X in gene rpoB	
DF09	62	BRZ-62	200	BrazilBRZ-622007	4.3	S	R	S	S	MONOI	MONOI	130	SI	413	3	31,696086	2	M	76%	EA	S	S	S	S		
DF01	63	BRZ-63	200	BrazilBRZ-632007	4.3	S	S	S	S	S	S	120	SI	295	3	24,5220283	3	M	69%	EA	S	S	S	S		
DF125	65	BRZ-65	200	BrazilBRZ-652007	4.3	S	R	S	S	MONOI	MONOI	262	SI	115	22,7430556	2		71%	EA	S	S	S	S			

C517X in gene rrs



										embB		gyrA												
3299	75	BRZ-75	200	BrazilBRZ-752008	4.1	R	R	S	R	MDR	MDR+E	185	SI	80%	EA	R	R	R	XDR	Q429X in gene rpoB	S315X in gene katG	M306X in gene embB	D94X in gene gyrA	A1401X in gene rrs
2961	76	BRZ-76	200	BrazilBRZ-762008	4.1	R	R	S	S	MDR	MDR	173	SI	78%	EA	R	R	S	XDR	S450X in gene rpoB	S315X in gene katG	C516X in gene rrs	A90X in gene gyrA	A1401X in gene rrs
6798	101	BRZ-101	201	BrazilBRZ-1012010	4.1	R	R	S	R	MDR	MDR+E		NÄ		EA	S	S	S	S					
DF203	26	BRZ-26	200	BrazilBRZ-262005	4.1	R	R	S	S	MDR	MDR	133	SI	75%	EA	S	S	S						
DF94	30	BRZ-30	200	BrazilBRZ-302005	4.1	R	S	S	S	RR-TB	RR-TB	107	SI	57%	EA	S	S	S		M434X in gene rpoB;		M306X in gene embB;	D94X in gene gyrA	
SP208	30	BRZ-30	200	BrazilBRZ-302004	4.1	S	R	S	S	MONOI	MONOI	161	SI	78%	EA	S	S	S		P86X in gene gyrA, G88X in gene gyrA				
DF471	34	BRZ-34	200	BrazilBRZ-342006	4.1	S	S	S	S	S	S	111	SI	60%	EA	S	S	S						
DF217	36	BRZ-36	200	BrazilBRZ-362006	4.1	S	S	S	S	S	S	108	SI	77%	EA	S	S	S		A451X in gene rpoB, L452X in gene rpoB;			G88X in gene gyrA	
DF469	40	BRZ-40	200	BrazilBRZ-402006	4.1	S	S	S	S	S	S	127	SI	72%	EA	S	S	S		D435X in gene rpoB				
DF433	51	BRZ-51	200	BrazilBRZ-512006	4.1	S	S	S	S	S	S	136	SI	61%	EA	S	S	S		Q429X, Q436X, H445X in gene rpoB			D94X in gene gyrA	
DF11	56	BRZ-56	200	BrazilBRZ-562007	4.1	S	S	S	S	S	S	154	SI	64%	EA	S	S	S						
DF12	57	BRZ-57	200	BrazilBRZ-572007	4.1	S	S	S	S	S	S	147	SI	71%	EA	S	S	S						
DF13	58	BRZ-58	200	BrazilBRZ-582007	4.1	S	S	S	S	S	S	145	SI	77%	EA	S	S	S					G515X in gene rrs	
DF15	59	BRZ-59	200	BrazilBRZ-592007	4.1	S	S	S	S	S	S	163	SI	80%	EA	S	S	S		S441X in gene rpoB				
DF16	60	BRZ-60	200	BrazilBRZ-602007	4.1	S	S	S	S	S	S	144	SI	51%	EA	S	S	S				C517X in gene rrs	H85X in gene gyrA	
DF18	64	BRZ-64	200	BrazilBRZ-642007	4.1	S	S	S	S	S	S	144	SI	74%	EA	S	S	S						
DF22	68	BRZ-68	200	BrazilBRZ-682007	4.1	S	S	S	S	S	S	151	SI	72%	EA	S	S	S		D94X in gene gyrA				
3149	77	BRZ-77	200	BrazilBRZ-772008	4.1	S	S	S	S	S	S	178	SI	80%	EA	S	S	S		R: F433X in gene rpoB, Q: D89X in gene gyrA				
3143	79	BRZ-79	200	BrazilBRZ-792008	4.1	S	S	S	S	S	S	133	SI	72%	EA	S	S	S		F433X in gene rpoB		C517X in gene rrs	A1401X in gene rrs	
6943	102	BRZ-102	201	BrazilBRZ-1022010	4.1	R	R	S	S	MDR	MDR		NÄ		EA	R	S	S	S	RR-TB	D435X in gene rpoB		A514X in gene rrs	D94X in gene gyrA

6221	91	BRZ-91	201	BrazilBRZ-912010	4.1	R	R	S	R	MDR	MDR+E	711	4	41,9716647	2	M	79%	EA	R	S	R	RR-TB	S450X in gene rpoB	M306X in gene embB					
8409	87	BRZ-87	201	BrazilBRZ-872010	4.1	R	R	S	S	MDR	MDR	515	3	36,4472753	3	M	63%	EA	S	R	S	MONOI NH		S315X in gene katG					
DF153	31	BRZ-31	200	BrazilBRZ-312005	4.1	S	R	S	S		MONOI NH							EA	S	R	S	MONOI NH	Q436X in gene rpoB, H445X in gene rpoB	S315X in gene katG					
7751	107	BRZ-107	201	BrazilBRZ-1072010	4.1	R	R	S	S	MDR	MDR							EA	R	R	S	MDR	S428X in gene rpoB	S315X in gene katG	H85X in gene gyrA				
7846	108	BRZ-108	201	BrazilBRZ-1082010	4.1	R	R	S	S	MDR	MDR							EA	R	R	S	MDR	S450X in gene rpoB	S315X in gene katG					
3050	81	BRZ-81	200	BrazilBRZ-812008	4.1	R	R	S	S	MDR	MDR	567	8	35,9315589	2	M	78%	EA	R	R	S	R	R	MDR	D435X in gene rpoB	S315X in gene katG	K88R in gene rpsL	A90X in gene gyrA	A1401X in gene rrs
3223	82	BRZ-82	200	BrazilBRZ-822008	4.1	R	R	S	S	MDR	MDR	514	8	34,5430108	2	M	77%	EA	R	R	S		MDR	M434X E S450X in gene rpoB	S315X in gene katG				
6479	95	BRZ-95	201	BrazilBRZ-952010	4.1	R	R	S	S	MDR	MDR	355	1	27,2867025	2	M	74%	EA	R	R	S	S	S	MDR	H445X in gene rpoB	S315X in gene katG			
6269	90	BRZ-90	201	BrazilBRZ-902010	4.1	S	R	S	S		MONOI NH	712	3	42,0555227	2	M	79%	EA	R	R	S	S	S	MDR	H445X in gene rpoB	S315X in gene katG			