



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS* RESISTENTES A FÁRMACOS, CIRCULANTES EM
SALVADOR, BAHIA, BRASIL**

RITA TEREZINHA DE OLIVEIRA CARNEIRO

**Salvador - Bahia
2020**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS RESISTENTES A FÁRMACOS, CIRCULANTES EM
SALVADOR, BAHIA, BRASIL**

RITA TEREZINHA DE OLIVEIRA CARNEIRO

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia
em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do grau de Doutora

Orientadora: Dr^a Theolis Costa Barbosa Bessa

**Salvador - Bahia
2020**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C280d Carneiro, Rita Terezinha de Oliveira.
Diversidade genética de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fármacos, circulantes em Salvador, Bahia, Brasil, Brasil./Rita Terezinha de Oliveira Carneiro. - 2020.
100 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Profª Drª Theolis Costa Barbosa Bessa, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologica.

Tese (Doutorado em em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Epidemiologia molecular. 2. Resistência microbiana. 3. *Mycobacterium tuberculosis*. I. Título.

CDU 616-002.5

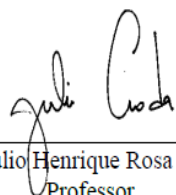
“DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
RESISTENTES A FÁRMACOS, CIRCULANTES EM SALVADOR, BAHIA, BRASIL”

RITA TEREZINHA DE OLIVEIRA CARNEIRO

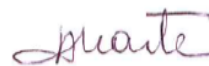
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador - Bahia, 09 de dezembro de 2020.

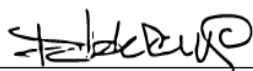
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Júlio Henrique Rosa Croda
Professor
UFMS



Dra. Tonya Azevedo Duarte
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Pablo Ivan Pereira Ramos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

A minha vó/mãe Therezinha Salvadora Carneiro (*in memoriam*);
A Maria do Carmo (Carmem) minha melhor amiga e a melhor mãe que poderia ter.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Maria do Carmo Carneiro (Carmem) por sua doação e amor que serviram como base sólida na conquista “dos nossos” sonhos; sentimentos que fortalecem e sustentam minha caminhada. Te amo de um jeito mãe que nem sei explicar. Obrigada por tudo e tanto!

A minha vó/mãe Therezinha (*in memoriam*) pelos exemplos de fé e altruísmo;

Ao meu pai e irmãos (incluído Elessandro Santana que o coração adotou) pela torcida e confiança;

A minha família e amigas, em especial aquelas que são como irmãs para mim: Cláudia Borges, Luciane Amorim, Cristiane Nascimento, Dulce Freitas, Marcielle Santos, Iris Darly e Ana Fernandes por suas orações, cuidado e carinho de sempre;

A dona Fátima pelo acolhimento, colo, casa, comida e roupa lavada nesses últimos anos. Aprendi a lhe amar como se ama a uma mãe;

A Dr^a Theolis Bessa pela confiança, parceria e amizade; especialmente na etapa final da orientação nesse doutorado. Sou sua fã Theo!

Ao grupo de Pesquisa em TB do Instituto Gonçalo Moniz: Dr^a Tonya, Sandro, Michael, Silas, Scarlet, Iza, Clarissa e Paulinha pelo companheirismo. Desejo sucesso a cada um de vocês!

Um agradecimento especial para Dr^a Joilda Nery (ISC/UFBA), Dr^a Emilyn Conceição (IMPG/UFRJ) e Msc. Erivelton Oliveira Souza (LACEN-Ba) pelo compartilhamento de dados e análises;

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina e Saúde Investigativa (PGBSMI/IGM) pelo compartilharem seus saberes;

Aos colegas de disciplinas e cursos pela parceria;

As instituições coparticipantes dessa pesquisa por suas respectivas colaborações;

Aos membros da banca por suas análises e correções nesse trabalho.

A primeira vez que visitei o Instituto Gonçalo Moniz foi em 2006, através de uma visita técnica realizada por uma disciplina da graduação pela UEFS. Nessa ocasião, algo convicentemente me dizia: “Você voltará aqui!”. E em 2016 (indo contra todas as probabilidades e minhas pretensões) ingressei como doutoranda pelo PGBSMI! Acredito que todas as coisas que ocorreram nesse intervalo de 10 anos seguiram os comandos da Mão misericordiosa de um **Deus** que é **Pai, Filho e Espírito Santo**, a quem rendo louvores pela abundância de graças concedidas. E a **Maria Santíssima** pela proteção materna e por sempre acolher minhas súplicas, é a Ela a quem me entrego totalmente (*Totus Tuu Mariae*).

“Por fim, Meu Imaculado Coração Trinará!”

Nossa Senhora
(Fátima – Portugal, 1917).

CARNEIRO, Rita Terezinha de Oliveira. Diversidade genética de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fármacos, circulantes em Salvador, Bahia, Brasil, Brasil. 2020. 100 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Tuberculose (TB) persiste como um grave problema de saúde pública mundial. A resistência aos fármacos anti-TB, adquirida evolutivamente por linhagens mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) atua como um agravante no enfretamento da doença pois prolonga, onera e dificulta seu tratamento. O Brasil se mantém como um dos países de alta carga de TB em todo o mundo e a subnotificação de suas formas resistentes impacta de maneira negativa no controle da doença em território nacional. Salvador, capital da Bahia-Brasil reporta expressiva taxa de morbimortalidade por TB e ocupa a 5ª posição entre as capitais brasileiras em número absoluto da doença, até o presente momento. **OBJETIVO:** Descrever o padrão de distribuição espacial e caracterizar genotipicamente os isolados de Mtb resistentes aos fármacos circulantes em Salvador e no estado da Bahia. **MATERIAL E MÉTODO:** Informações clínicas e sociodemográficas dos casos de TB multidroga resistente (TBMDR) registrados no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2011 foram extraídas de prontuários e analisadas por estatística descritiva. Dados de longitude e latitude das residências dos casos foram georreferenciados no programa QGis (v 2.18) e pelo software R. Os isolados de Mtb foram caracterizados por genotipagem clássica e pelo sequenciamento completo de genoma; seus perfis de resistência aos fármacos anti-TB empregados nas 1ª e 2ª linhas de tratamento foram respectivamente descritos pelos métodos de proporção e automatizado. **RESULTADOS:** Foram registradas 204 notificações de TBMDR em todo o estado da Bahia durante o período supracitado. Um percentual de 7% (N=14/204) dos casos foi caracterizado como TB extensivamente resistente (TBXDR). O perfil sociodemográfico dos pacientes com TBMDR foi constituído predominantemente por: homens; cor negra/parda; baixo nível instrucional e baixa renda *per capita*. Foi observada alta taxa de falência terapêutica (67%, N=137/204), e adicionalmente o registro de abandono ao tratamento anti-TB (41%, N=83/204) e baixa adesão ao tratamento diretamente observado (TOD) (65%, N=133/204). Confirmação de atraso na emissão dos laudos sobre perfis de resistência dos isolados de Mtb e a má qualidade na informação prestada pelos municípios sugere subnotificação dos casos de TB resistente, especialmente no interior do estado. Os casos de TBMDR apresentaram dependência espacial nos bairros periféricos e com “bolsões de pobreza” na cidade de Salvador. Análise por *core genome* MSLT dos 92 (45%, N=92/204) isolados revelou ocorrência de transmissão ativa de TBMDR em Salvador, Bahia no período em que os isolados foram coletados. Dados genotípicos identificaram dois *clusters* genéticos, os quais não apresentaram dependência espacial nos bairros de Salvador com alta carga de TB. Os isolados pertencem predominantemente às famílias: LAM e Haarlem. Destaque para presença de isolados da família/subfamília LAM-Cameroon com frequência maior aos demais registros nacionais. **CONCLUSÕES:** Os resultados reforçam a necessidade da efetivação do TOD e da urgência na adoção dos testes rápidos para caracterização de resistência das linhagens infectantes. Confirma-se o endemismo de TB na cidade de Salvador, Bahia e que a ocorrência dos casos de TBMDR registrados no período desse estudo se deve a transmissão ativa das linhagens já resistentes aos fármacos.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular, Georreferenciamento, Resistência antimicrobiana.

ARNEIRO, Rita Terezinha de Oliveira. Genetic diversity of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in Salvador, Bahia, Brazil, Brazil. 2020 100 f. Thesis (Doctorate in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Gonçalo Moniz Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2020.

SUMMARY

INTRODUCTION: Tuberculosis (TB) persists as a serious public health problem worldwide. Resistance to anti-TB drugs, acquired evolutionarily by mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) acts as an aggravating factor in control of the disease because it prolongs, burdens and makes treatment difficult. Brazil remains one of the countries with a high burden of TB worldwide and the underreporting of its resistant forms has a negative impact on the control of the disease in national territory. Salvador, capital of Bahia-Brazil reports an expressive TB morbidity and mortality rate and ranks 5th among Brazilian capitals in absolute number of the disease, until the present moment. **OBJECTIVE:** To describe the spatial distribution pattern and characterize genotypically the Mtb isolates resistant to circulating drugs in Salvador and the state of Bahia. **MATERIAL AND METHOD:** Clinical and sociodemographic information on cases of multidrug-resistant TB (MDR-TB) recorded from January 2008 to December 2011 were extracted from medical records and analyzed using descriptive statistics. Longitude and latitude data of the case residences were geo-referenced in the QGIS program (v 2.18) and by the software R. Mtb isolates were characterized by classical genotyping and by complete genome sequencing; their resistance profiles to anti-TB drugs used in the 1st and 2nd treatment lines were described by proportion and automated methods, respectively. **RESULTS:** 204 MDR-TB notifications were recorded throughout the state of Bahia during the aforementioned period. A percentage of 7% (N=14/204) of the cases was characterized as extensively resistant TB (XDR-TB). The sociodemographic profile of patients with MDR-TB was constituted predominantly by: men; not white color; low educational level and low income per capita. There was a high rate of therapeutic failure (67%, N 137/204), in addition to the record of abandoning anti-TB treatment (41%, N=83/204) and low adherence to the directly observed treatment (DOT) (65%, N=133/204). Confirmation of delay in issuing reports on resistance profiles of Mtb isolates and the poor quality of information provided by municipalities suggests underreporting of cases of resistant TB, especially in the interior of the state. MDR-TB cases showed spatial dependence in peripheral neighborhoods and with poverty status in the city of Salvador. Analysis by MSLT core genome of the 92 (45%, N=92/204) isolates revealed the occurrence of active transmission of MDR-TB in Salvador, Bahia during the period in which the isolates were collected. Genotypic data identified two genetic clusters, which did not show spatial dependence in neighborhoods in Salvador with a high TB load. The isolates predominantly belong to the families: LAM and Haarlem. Highlight for the presence of isolates from the LAM-Cameroon family/subfamily with greater frequency than other national registries. **CONCLUSIONS:** The results reinforce the need for effective DOT and the urgency in adopting rapid tests to characterize the resistance of infectious strains. TB endemism in the city of Salvador, Bahia, is confirmed, and that the occurrence of MDR-TB cases recorded during the period of this study is due to the active transmission of strains already resistant to drugs.

Keywords: Molecular epidemiology, Georeferencing, Antimicrobial resistance.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1 Taxa mundial da incidência estimada de tuberculose por 100 mil/habitantes no ano de 2018 (FONTE: WHO, 2019) 19
- Figura 2 Mapa dos Distritos Sanitários de Salvador, Bahia, Brasil com suas respectivas populações registradas no ano de 2010 (FONTE: PMS, 2018) 20
- Figura 3 A – Dendrograma de filogenia com máxima verossimilhança entre os representantes das 7 linhagens de micobactérias inseridas no Complexo de *M. tuberculosis* (CMTB) com *M. cannetti* atuando como grupo externo. Identificação das linhagens predominantes em cada região, B – linhagens com ampla distribuição continental; C – linhagens com distribuição intermediária; D – linhagens com distribuição mais restrita (FONTE: COSCOLLA; GAGNEUX, 2014) 24
- Figura 4 Processos evolutivos de linhagens de *M. tuberculosis* sensíveis para formas resistentes aos fármacos anti-TB. (a) Linhagem sensível sofre mutações que conferem alto e baixo impacto em sua fisiologia (*biological cost*), aquelas com mutações de baixo custo são selecionadas e se perpetuam por expansão clonal. (b) Linhagem exposta a fármacos sofre mutações que impactam drasticamente em sua fisiologia ao passo que também ocorrem mutações compensatórias para fins de minimizar os efeitos causados pelas mutações que conferem resistência. (c) Linhagem que já apresenta mutações em genes de resistência está propensa a apresentar novas mutações impulsionada pelo fenômeno da epistasia positiva (FONTE: NGUYEN et al., 2018) 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos esquemas de tratamento anti-TB para TB sensível e para as formas resistentes aos fármacos	17
Tabela 2	Identificação das famílias pertencentes às linhagens ancestral e moderna do CMTB e seus respectivos locais de predominante dispersão espacial. Destaque em azul para a espécie de <i>Mybacterium africanus</i> (Maf) inseridas nas linhagens 5 e 6.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Am	amicacina
BCG	Bacilo <i>Calmette Guérin</i>
Cam	canamicina
CAS	<i>Central Asian</i>
Cs	cicloserina
Cm	capreomicina
CMTB	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
Clz	clofazimina
DS	Distrito Sanitário
E	etambutol
EAI	<i>East African-Indian</i>
Et	etionamida
H	isoniazida
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LAM	<i>Latin American-Mediterranean</i>
Lfx	levofloxacino
Lzd	linezolida
Maf	<i>Mycobacterium africanus</i>
Mfx	monofloxacino
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
Ofx	ofloxacino
PAS	ácido <i>p</i> -aminosalicílico
R	rifampicina
SAE	Serviço de Assistência Especializada
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TB	tuberculose
TBMDR	tuberculose multidroga resistente
TBXDR	tuberculose extensivamente resistente
TOD	tratamento diretamente observado
Trd	teridizona
Z	piraminazida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE	16
2.1.1	Tuberculose em Salvador, Bahia, Brasil	20
2.2	TUBERCULOSE RESISTENTE	21
2.3	DIVERSIDADE GENÉTICA EM <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
2.3.1	Processos de aquisição de resistência aos fármacos anti-TB por isolados de Mtb	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	RESULTADOS	30
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS CASOS DE TB MULTIDROGA RESISTENTE OCORRIDOS NO ESTADO DA BAHIA, E DOS CASOS DE TUBERCULOSE EXTENSIVAMENTE RESISTENTE NOTIFICADOS EM SALVADOR, ENTRE JANEIRO DE 2008 E DEZEMBRO DE 2011	31
4.2	ANÁLISE DE DISPERSÃO ESPACIAL E DESCRIÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DOS ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> MULTIDROGA RESISTENTE (TBMDR) NA CIDADE DE SALVADOR, BAHIA, BRASIL (2008 A 2011)	60
4.3	ANÁLISE DAS ANOTAÇÕES GENÔMICAS DOS ISOLADOS MULTIDROGA RESISTENTES (MDR) E EXTENSIVAMENTE RESISTENTE (XDR) AOS FÁRMACOS ANTI-TB CIRCULANTES NO ESTADO DA BAHIA E NA CIDADE DE SALVADOR, ENTRE 2008 A 2011	81
5	DISCUSSÃO	92
6	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

Em meados de 2019 a tuberculose (TB) foi confirmada como a principal causa de óbito por doença infectocontagiosa de único agente. Com notificação oficial de 10,4 milhões de novos casos e registro de 1,4 milhões de óbito em todo o mundo (WHO, 2019). A ocorrência da TB está associada às condições de vulnerabilidade econômica e aos fatores socioculturais dos indivíduos expostos ao *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), cuja circulação se intensifica em locais populosos e com pouca ventilação (ERAZO et al., 2014; GOMES et al., 2016).

O diagnóstico correto e precoce é crucial no enfrentamento da TB pois possibilita a caracterização dos isolados de Mtb e direciona os pacientes para o tratamento da doença, que consiste na administração de um mix de fármacos prescritos a partir das características clínicas dos infectados e da linhagem de Mtb infectante, por um período mínimo de 6 meses (BRASIL, 2019a). Via de regra a adesão ao tratamento anti-TB viabiliza a cura da doença. Em contrapartida, o uso irracional dos fármacos favorece a aquisição de resistência pelos isolados de Mtb dificultando o tratamento, ao passo que direciona os casos para desfechos menos favoráveis (ALIPANAH et al., 2018).

Mutações cromossômicas configuram-se como a principal causa da resistência aos fármacos anti-TB (COLE et al., 1998). Essas mutações podem ocorrer independente da exposição prévia a tais fármacos, porém, o contato intermitente (em virtude de abandono ou falência terapêutica por exemplo) favorece a seleção e fixação das linhagens de Mtb mutantes (BRITES; GAGNEUX, 2015; PERRIN, 2015). A notificação dos casos de TB resistente, especialmente da tuberculose multidroga resistente (TBMDR), caracterizada pela infecção por linhagem de Mtb capaz de resistir concomitante aos efeitos da rifampicina e isoniazida, reafirma que a TB persiste como um grave problema de saúde pública e exige a adoção urgente de medidas mitigadoras, tais como: efetivação do tratamento diretamente observado (TOD) e a implantação de testes moleculares para caracterização rápida quanto ao perfil de sensibilidade dos isolados de Mtb (CASELA et al., 2018; WHO, 2019).

O Brasil é um dos trinta países que reportam alta carga de TB no mundo. Todavia, os dados sobre as formas resistentes da doença não são corretamente caracterizados, gerando subnotificação desses casos (BARTOLHOMAY et al., 2019). Salvador, capital do estado da Bahia – Brasil ocupa a 5ª posição entre as capitais brasileiras em número absoluto de TB (BRASIL, 2019b). Todavia, até o momento não existem ou não foram encontrados estudos de georreferenciamento e de caracterização genotípica dos isolados de Mtb circulantes no estado da Bahia, nem mesmo em Salvador.

Análise genotípica possibilita descrever os isolados de Mtb presentes em determinado espaço geográfico permitindo identificar as características que lhes são inerentes e que favorecem sua adaptação em determinados locais e nos grupos populacionais infectados. Nossa hipótese de trabalho é de que os casos de TB multidroga resistentes notificados em Salvador e no estado da Bahia estão associados a características genéticas dos isolados que circulam no estado entre Janeiro de 2008 a Dezembro de 2011. O objetivo desse trabalho foi analisar a diversidade genética e a dispersão geográfica dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistentes aos fármacos anti-TB, circulantes em Salvador, Bahia no período supracitado.

Considerando as taxas de incidência e de prevalência de TB em Salvador, Bahia e em virtude da escassez de estudos de georreferenciamento e caracterização genotípica de isolados de Mtb no estado baiano, especialmente na capital, esse trabalho se justifica pelas contribuições epidemiológicas as quais poderão nortear a adoção de medidas no enfrentamento da doença na capital e nos demais municípios da Bahia de maneira mais direcionada aos locais com maiores necessidades de intervenções.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE (TB)

Tuberculose (TB) é a infecção causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) transmitida pela via aérea a partir da tosse, fala ou espirro do paciente bacilífero positivo. No organismo humano o Mtb coloniza preferencialmente os pulmões (TB pulmonar), mas pode infectar todos os demais órgãos do corpo (TB extrapulmonar). A TB pulmonar e a laríngea são as formas clínicas capazes de alimentar a cadeia de transmissão da doença (BRASIL, 2019a).

A circulação dos isolados de Mtb tende a se intensificar em ambientes populosos, com infraestrutura inadequada e ventilação restrita ou inexistente (bolsões de pobreza) (ERAZO et al., 2014) e no sistema prisional (MOREIRA et al., 2019). A concentração dos casos de TB em população submetida às condições de vulnerabilidade social evidencia que o controle e a erradicação da doença são árduas tarefas que perpassam pelas esferas social, econômica e política (GOMES et al., 2016).

Um único indivíduo portador de TB ativa, *i.e.*: quando manifesta a sintomatologia da doença, pode contaminar em média até 15 pessoas com as quais mantém algum tipo de contato no intervalo de um ano (BRASIL, 2019a). O diagnóstico da doença, quando realizado de forma correta e precocemente atua como elemento-chave em seu controle já que possibilita o início do tratamento anti-TB, o que por sua vez interrompe o ciclo de transmissão (ALIPANAH et al., 2018). O diagnóstico e caracterização da TB fundamentam-se na história clínica do paciente (sinais e sintomas); em achados radiológicos (exame de raio X do tórax) e nos resultados dos testes fenotípicos (cultura, baciloscopia e sensibilidade às drogas anti-TB) e moleculares (testes rápidos) (CASELA et al., 2018).

No Brasil o tratamento da TB é ofertado gratuita e universalmente pelos serviços que configuram atenção básica de saúde, e ocasionalmente pelos Serviços de Assistência Especializada (SAE) quando há confirmação de alguma comorbidade (co-infecção HIV-TB por exemplo). A terapia anti-TB consiste na administração de um mix de fármacos prescritos a partir da caracterização clínica da doença; dos aspectos fisiológicos do paciente e do perfil de resistência da linhagem de *M. tuberculosis* infectante (Tabela 1) (BRASIL, 2019a; 2013).

Tabela 1: Descrição dos esquemas de tratamento anti-TB para TB sensível e para as formas resistentes aos fármacos

ESQUEMA DE TRATAMENTO			REGIME DO TRATAMENTO		FÁRMACO ANTI-TB
			FASE (DURAÇÃO)	MIX DE FÁRMACOS ^c	
BÁSICO ^a			Intensiva (2 meses)	RHZE	Grupo 1: orais de 1ª linha
			Manutenção (4 meses)	RH	rifampicina (R)
TB RESISTENTE ^b	Mono	rifampicina	Intensiva (2 meses)	HLfxEZCm ₅	isoniazida (H)
			Manutenção (10 meses)	HLfxEZ	pirazinamida (Z)
		rifampicina com histórico de tratamento prévio (pré-MDR)	Intensiva (8 meses)	LfxTrdEZCm ₃	etambutol (E)
			Manutenção (10 meses)	LfxTrdE	Grupo 2: injetáveis
		Isoniazida	Intensiva (2 meses)	RLfxZE	amicacina (Am)
			Manutenção (7 meses)	RLfx	canamicina (C)
	Poli	isoniazida + estreptomicina	Intensiva (2 meses)	RLfxZE	capreomicina (Cm)
			Manutenção (7 meses)	RLfx	Grupo 3: fluoroquinolonas
		isoniazida + etambutol + estreptomicina	Intensiva (2 meses)	RLfxZCm ₅	ofloxacino (Ofx)
			Manutenção (7 meses)	RLfx	levofloxacino (Lfx)

Cont.

ESQUEMA DE TRATAMENTO			REGIME DO TRATAMENTO		FÁRMACO ANTI-TB
			FASE (DURAÇÃO)	MIX DE FÁRMACOS ^c	
TB RESISTENTE ^b	Poli	isoniazida + etambutol + piraminazida + estreptomicina	Intensiva (2 meses)	RLfxTrdCm ₅	monofloxacino (Mfx)
			Manutenção (10 meses)	RLfxTrd	Grupo 4: orais de 2ª linha
		isoniazida + piraminazida + estreptomicina	Intensiva (2 meses)	RLfxECm ₅	ácido <i>p</i> -aminosalicílico (PAS)
			Manutenção (7 meses)	RLfxE	cicloserina (Cs)
		rifampicina + etambutol + piraminazida + estreptomicina	Esquema TB MDR + H		etionamida (Et)
	teridizona (Trd)				
	MDR	esquema padronizado para resistência à R + H	Intensiva (8 meses)	LfxTrdEZCm ₃	Grupo 5: fármacos usados para tratar casos com resistência aos demais
			Manutenção (10 meses)	LfxTrdE	Amoxicilina
		esquema padronizado para resistência à R + H + E + Z	Intensiva (8 meses)	LfxTrdEtZCm ₃	Calvulonato
			Manutenção (10 meses)	LfxTrdEt	Claritromina
		esquema individualizado	Dependente do resultado do teste de sensibilidade aos fármacos de 1ª linha		clofazimina (Clz)
	XDR	esquema padronizado	8 meses	MfxLzdClzPASHAm ₃	linezolida (Lzd)
			4 meses	MfxLzdClzPASH	
			6 meses	MfxLzdCfzPAS	
esquema individualizado		Dependente do resultado do teste de sensibilidade aos fármacos de 2ª linha		Tiocetazona	

^acasos novos ou retratamento em adultos e adolescentes (≥10 anos de idade) para todas as apresentações clínicas sensíveis (exceto TB meningocéfálica e osteoarticular); ^bem casos de comprovação da resistência aos fármacos anti-TB; ^cdose (mg) e quantidade de comprimidos dependem do peso do paciente (FONTE: BRASIL, 2011, 2019a).

O manejo do paciente com TB e seu respectivo tratamento devem ser supervisionados (Tratamento Diretamente Observado – TOD) pela equipe de saúde e/ou por sua família, com o intuito de garantir a eficácia terapêutica. Adesão à terapia anti-TB contribui para a cura, ao passo que o uso irracional dos fármacos (abandono ao tratamento, por exemplo) favorece o agravamento da doença e a ocorrência de desfechos menos favoráveis (ALIPANAH et al., 2018).

Em 2018, foram oficialmente registrados 10 milhões de casos novos de TB em todo o mundo, reafirmando que a doença persiste como um grave e urgente problema de saúde pública. Nesse mesmo ano, a mortalidade mundial atribuída exclusivamente à TB foi descrita em 1,4 milhões de casos, configurando-a como a principal causa de óbito por doença infectocontagiosa de único agente até aquele momento (WHO, 2019).

O Brasil se insere entre os 30 países com alta carga de TB em todo o mundo (Figura 1), ocupando a 20ª posição no tocante à carga da doença e o 19º lugar no quantitativo de pacientes coinfectados com HIV-TB. Em 2018, o país registrou incidência de 45 mil casos por 100 mil habitantes e a notificação de 72.788 casos novos da doença (BRASIL, 2019a; 2019b; WHO, 2019).

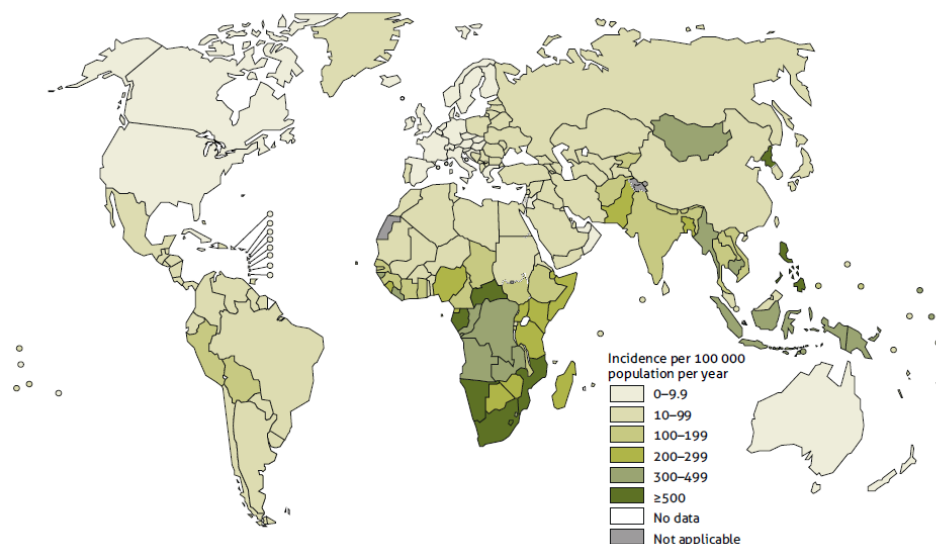


Figura 1: Taxa mundial da incidência estimada de tuberculose por 100 mil/habitantes no ano de 2018 (FONTE: WHO, 2019).

No contexto nacional a macrorregião do Nordeste ocupa a 2ª posição em registro de casos novos (N=19.075) e em coeficiente de óbito por TB (2,6/100mil hab./2018). A região nordestina também registra o 3º maior coeficiente nacional de incidência da doença (33,1/100mil hab./2018) (BRASIL, 2019b). O estado da Bahia assumiu e se mantém na 2ª posição no Nordeste brasileiro e na 5ª colocação nacional em registro de casos novos de TB (N=4.241) no ano de 2018 (BRASIL, 2019b).

2.1.1 Tuberculose em Salvador, Bahia, Brasil

Salvador, capital do estado da Bahia apresenta extensão territorial de 692,8 km². É a 3ª capital mais populosa do Brasil, em 2019 sua população estimada foi de 2.872.374 pessoas e densidade demográfica igual a 3.859,44 hab./km² (IBGE, 2020). Para fins de organização política-administrativa a cidade de Salvador é subdividida em 12 Distritos Sanitários (DS), responsáveis por atender as demandas de saúde para suas respectivas populações (Figura 2) (PMS, 2018).

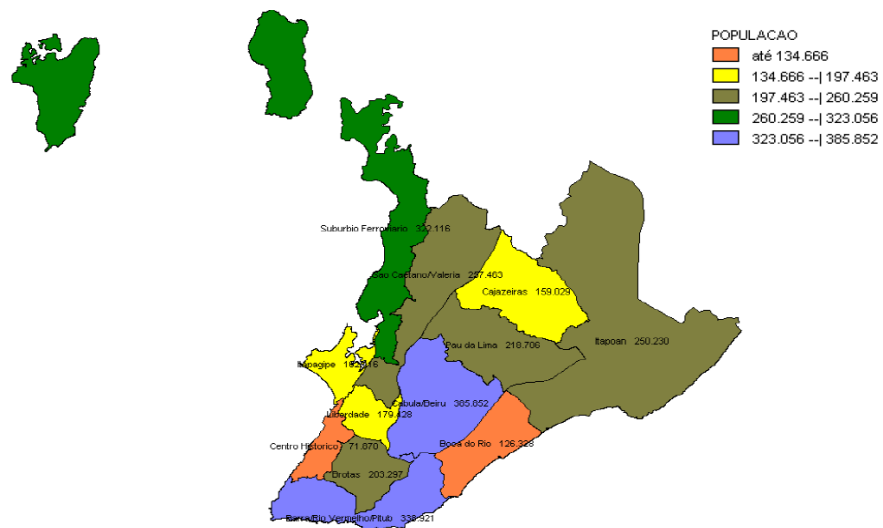


Figura 2: Mapa dos Distritos Sanitários de Salvador, Bahia, Brasil com suas respectivas populações registradas no ano de 2010 (FONTE: PMS, 2018).

Historicamente a cidade de Salvador reporta alta carga de TB. Na década de 90 o município registrou 10% de todos os casos novos da doença relatados no Brasil, e metade dos óbitos notificados em todo o estado baiano ocorreu na referida cidade (ABREU; FIGUEREDO, 2013; XAVIER; BARRETO, 2007).

No período da realização deste estudo (2008 a 2011) foram registrados aproximadamente 2.000 casos novos de TB, com média de incidência anual de 69 casos/100mil hab. no município (SOUZA, 2012). Na atualidade, Salvador ocupa a 5ª posição entre as capitais brasileiras em número absoluto de TB com notificação de 1.380 casos novos e coeficiente de incidência de 48,3 casos/100mil hab./2018 (BRASIL, 2019b). Os casos de TB se concentram em bairros mais populosos da cidade e/ou nos locais com precárias condições de moradias e saneamento (ERAZO et al., 2014; PMS, 2018).

As características prevalentes no perfil de pacientes com TB em Salvador são: gênero masculino; pessoas negras ou pardas; faixa etária entre 20-50 anos; com até 9 anos de escolaridade; residentes em casa com até 2 pessoas por quarto; que apresentam baixa renda *per capita* e dependem de benefícios social oferecidos por programas governamentais (Bolsa Família, por exemplo) (ANDRADE et al., 2019; SOUZA et al., 2015).

2.2 TUBERCULOSE RESISTENTE

Tuberculose resistente é a uma forma clínica de TB causada pela infecção por linhagem de *Mtb* capaz de neutralizar os efeitos de um ou mais fármacos utilizados no tratamento da doença (BRASIL, 2019a). A causa primordial da resistência é atribuída às mutações que ocorrem no genoma micobacteriano, independentemente da exposição prévia aos fármacos (resistência primária/natural) (COLE et al., 1998; DALCOMO; ANDRADE; PICON, 2007). Não obstante, a má condução da terapia anti-TB (*i.e.*: abandono ou falha terapêutica) constitui-se como um meio propício à evolução e seleção das linhagens resistentes (resistência secundária/adquirida) (BRITES; GAGNEUX, 2015; PERRIN, 2015).

O perfil de resistência dos isolados clínicos de *Mtb* é descrito a partir dos resultados de testes fenotípicos conduzidos *in vitro* contra as drogas empregadas nas 1ª e 2ª linhas de tratamento contra a TB (BRASIL, 2008). Testes genotípicos (sondas moleculares) foram introduzidos mais recentemente na caracterização laboratorial dos isolados e oferecem vantagem por gerar dados mais robustos com rapidez e acurácia (CASELA et al., 2018; CHANG et al., 2012).

O tipo de resistência é determinado a partir da quantidade e do tipo de fármaco que o isolado de *Mtb* se torna resistente. Portanto, existem isolados: *i*) monorresistente, que resiste apenas à ação de um fármaco anti-TB; *ii*) polirresistente, capaz de neutralizar a ação de dois ou mais fármacos; *iii*) multidroga resistente (MDR) que resiste à ação combinada de isoniazida e rifampicina e *iv*) extensivamente resistente (XDR), quando o isolado MDR adquire resistência adicional à fluoroquinolona e aos fármacos injetáveis de segunda linha (amicacina e capreomicina, por exemplo) (BRASIL, 2019a). A tuberculose multidroga resistente (TBMDR) é a forma clínica que mais prevalece nos registros mundiais de TB resistente. Em 2018 foram confirmados 186.772 casos de TBMDR em todo o mundo (WHO, 2019).

O tratamento da TB resistente também é gratuito e ofertado em unidades de saúde com serviço de atenção terciária, nos quais atuam profissionais especializados no manejo complexo desse paciente. O regime de tratamento inicialmente proposto é padronizado (Tabela 1). Contudo, se constatada a resistência a um ou mais dos fármacos e/ou na ocorrência de reação adversa severa aos fármacos prescritos o regime terapêutico será adequadamente individualizado (BRASIL, 2019a).

A resistência aos fármacos anti-TB representa um grande entrave no controle da TB haja vista que prolonga, onera e dificulta seu tratamento; ao passo que contribui para ocorrência de desfechos menos favoráveis (BRASIL, 2019a; WHO, 2019). Somente em 2018 foram notificados aproximadamente 484.000 de casos novos de TB resistente em todo o mundo. Nesse universo, foi observado que 18% dos registros eram provenientes de casos não tratados de TB sensível e apenas 3,5% foram de fato casos novos de TB resistente (WHO, 2019).

No contexto nacional foram diagnosticados 246 casos novos de TB monorresistente, 80 casos de TB polirresistente, 713 registros de TBMDR e apenas 2 casos de tuberculose com resistência extensiva aos fármacos anti-TB (TBXDR) no ano de 2017 (BRASIL, 2019a). Em virtude de sua baixa carga, o Brasil não é considerado prioritário no tratamento de TB resistente. Todavia, o país encontra dificuldades na geração de dados sobre as formas resistentes da doença, sugerindo subnotificação desses casos (BARTOLHOMAY et al., 2019)

2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA EM *M. tuberculosis* (Mtb)

A relação ecológica bem sucedida com o *Homo sapiens* pode ter ocorrido pela interação com um ancestral comum de *Mycobacterium tuberculosis* há mais de 70.000 anos. O deslocamento continental de pessoas para fins de migração, conquistas territoriais e comércio

iniciado a partir da África (transição Neolítica) contribuiu para a dispersão das linhagens de *Mtb*. Ao passo que o processo adaptativo das linhagens de *Mtb* em localidades específicas ocorreu por meio de eventos simpátricos (CARDONA; CATALÁ; PRATS, 2020; COMAS et al., 2013). A co-evolução de ambas as espécies se mantém dinâmica e pode ser evidenciada por meio dos dados de morbidade da doença e pelo aumento no número de linhagens resistentes aos fármacos anti-TB (BRITES; GAGNEUX, 2015; PERRIN, 2015).

O Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) é constituído por 7 linhagens de *Mtb*, identificadas pelos números de 1 a 7 (Figura 3), responsáveis pela transmissão da TB em humanos. Essas linhagens são caracterizadas filogeneticamente por: *i*) dispersão continental; *ii*) capacidade de adaptação ao grupo populacional hospedeiro; *iii*) *fitness* biológico e *iv*) pelos mecanismos de virulência e resistência aos fármacos (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014; NGUYEN et al., 2018).

A ocorrência de deleção no gene *TbD1* é o marco evolutivo e classificatório das linhagens do CMTB, diferenciando-as em: linhagens ancestrais (linhagens 1, 5, 6 e 7) nas quais a deleção está ausente e formam grupos parafiléticos com outras espécies de micobactérias (Ver Figura 3); e linhagens modernas (linhagens 2, 3 e 4) que integram um grupo monofilético devido ao compartilhamento da deleção no gene *TbD1* (BRITES; GAGNEUX, 2015; COSCOLLA; GAGNEUX, 2014).

Análises de polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNPs) revelam a existência de variações específicas entre as linhagens do CMTB. Essas variações apresentam significado funcional na sobrevivência dessas linhagens e ajudam no entendimento a respeito da capacidade adaptativa diferenciada entre elas (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014; FORD et al., 2013; NGUYEN et al., 2018).

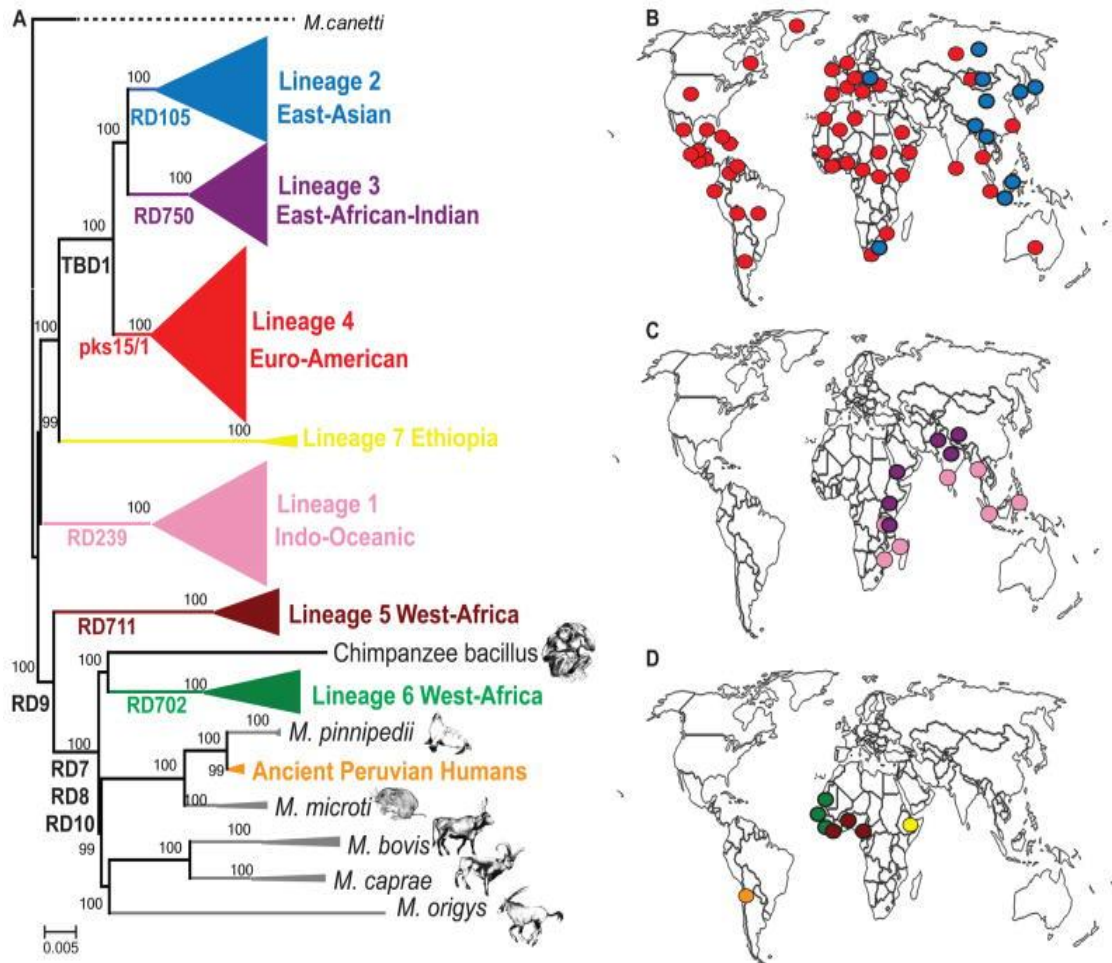


Figura 3: A – Dendrograma de filogenia com máxima verossimilhança entre os representantes das 7 linhagens de micobactérias inseridas no Complexo de *M. tuberculosis* (CMTB) com *M. canettii* atuando como grupo externo. Identificação das linhagens predominantes em cada região, B – linhagens com ampla distribuição continental; C – linhagens com distribuição intermediária; D – linhagens com distribuição mais restrita (FONTE: COSCOLLA; GAGNEUX, 2014).

Isolados pertencentes às linhagens 2 e 4 são mais virulentos e propensos à aquisição de resistência aos fármacos, sua presença é recorrente em surtos mundiais de TB (sensível e resistente) (AJAWATANAWONG et al., 2019; BRYNILDSRUD et al., 2018; RUTAIHWA et al., 2019; SAELENS; VISWANATHAN; TOBIN, 2019). A ampla dispersão geográfica dessas linhagens evidencia sua capacidade de adaptação aos diversos grupos populacionais que migraram com elas ao longo dos diferentes continentes e períodos (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014; BRYNILDSRUD et al., 2018).

A linhagem 3 apresenta dispersão limitada no continente asiático e na parte leste da África, supostamente devido às mutações linhagens-específicas que apresentam. Tal como as demais linhagens modernas, a linhagem 3 é vinculada às características clínicas de alta virulência e com resistência aos fármacos anti-TB (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014; MALLA

et al., 2012; WAMPANDE et al., 2019). Até o momento são descritas três sublinhagens, a saber: CAS-Delhi (Índia e Arábia Saudita); CAS-Kili (Tanzânia) e CAS2/CAS em ordem crescente de prevalência nos registros (WAMPANDE et al., 2019).

Isolados pertencentes à linhagem 1 apresentam capacidade restrita de adquirir resistência aos fármacos e apresentam baixo poder de transmissibilidade (DUARTE et al., 2017; PALITTAPONGARNPIM et al., 2018). A dispersão dessa linhagem é endêmica em 11 dos 30 países que apresentam alta carga da doença e em cada localidade se observa uma sublinhagem predominante (CHEN et al., 2017; PALITTAPONGARNPIM et al., 2018). Estudos genéticos com representantes da família EAI identificaram presença de perfis “órfãos” revelando a necessidade de mais estudos voltados na caracterização dos representantes da linhagem 1 (CONCEIÇÃO et al., 2019; DUARTE et al., 2017; PALITTAPONGARNPIM et al., 2018).

Os isolados de *Mycobacterium africanus* (Maf) são endêmicos e responsáveis por aproximadamente metade de todos os casos de TB em humanos registrados no oeste da África. No entanto, existem poucos estudos sobre essa micobactéria, que sozinha integra as linhagens 5 e 6 do CMTB (OTCHERE et al., 2018). O que já se tem descrito é que os isolados das linhagens 5 e 6 apresentam baixa virulência, especialmente quando comparados aos isolados de Mtb (BENTLEY et al., 2012).

Análises filogenéticas inserem a linhagem 7 entre as linhagens ancestral 1 e a moderna 2, e que apresenta dispersão mais restrita entre as demais linhagens do CMTB (FIRDESSA et al., 2013). Dados clínicos da infecção por seus isolados revelam tempo maior na ativação da doença (TB latente) e até o momento não foi relatada sua evolução para formas clínicas resistente (COMAS et al., 2015). A Tabela 2 descreve outras informações sobre as linhagens ancestral e moderna do CMTB.

Estudos genotípicos realizados anteriormente no Brasil revelam predominância dos isolados pertencentes a linhagem 4 e inclusos nas famílias *Haarlen* (H) e *Latin American-Mediterranean* (LAM) (DANTAS et al., 2015; LUIZ et al., 2013; SOARES et al., 2013), as quais foram introduzidas no país em virtude do processo de colonização pelos europeus (LAGOS et al., 2016; LUIZ et al., 2013).

Tabela 2: Identificação das famílias pertencentes às linhagens ancestral e moderna do CMTB e seus respectivos locais de predominante dispersão espacial. Destaque em azul para a espécie de *Mybacterium africanus* (Maf) inseridas nas linhagens 5 e 6.

ID da linhagem	Famílias	Continente*/país	Autoria (ano)
Linhagens ancestrais			
1 (<i>Indo-Oceanic</i>)	<i>East African-Indian</i> (EAI)	África (leste*), Ásia (sudeste*)	Chen et al. (2017); Conceição et al (2019); Coscolla e Gagneux (2014); Duarte et al. (2017); Palittapongarnpim et al. (2018).
5 (<i>West Africa 1</i>)	<i>M. africanus</i>	África (leste*)	Brites e Gagneux (2015); Coscolla e Gagneux (2014); Otchere et al. (2018);
6 (<i>West Africa 2</i>)	<i>M. africanus</i>	África (ocidental*)	Bentley et al. (2012); Brites e Gagneux (2015); Coscolla e Gagneux (2014); Otchere et al. (2018);
7 (<i>Ethiopian</i>)	<i>Ethiopian</i>	Etiópia	Brites e Gagneux (2015); Comas et al. (2015); Coscolla e Gagneux (2014); Firdessa et al (2013).
Linhagens modernas			
2 (<i>East-Asian</i>)	<i>Beijing</i>	África (sul*), Ásia e Rússia	Ajawatanawong et al. (2019); Brites e Gagneux (2015); Coscolla e Gagneux (2014); Rutaihua et al. (2019); Saelens, Viswanathan e Tobin (2019).
3 (<i>Central Asian</i>)	CAS-Delhi; CAS-Kili e CAS2/CAS	África e Ásia (sudeste*)	Brites e Gagneux (2015); Coscolla e Gagneux (2014); Malla et al. (2013); Wampande et al. (2019).
4 (<i>Euro-American</i>)	<i>Cameroon; Ghana; Haarlen</i> (H); <i>Latin American-Mediterranean</i> (LAM); <i>Uganda I e II</i> (U) e X	África, América e Europa	Brites e Gagneux (2015); Brynildsrud et al. (2018); Coscolla e Gagneux (2014); Saelens, Viswanathan e Tobin (2019).

*região.

2.3.1 Processos de aquisição de resistência aos fármacos anti-TB por isolados de Mtb

Alterações no genoma bacteriano é o cerne do processo evolutivo que confere resistência aos fármacos anti-TB. Em Mtb particularmente, essas alterações se resumem aos eventos mutacionais que ocorrem no cromossomo (BRITES; GAGNEUX, 2015). Fenômenos de recombinação genética (conjugação, transdução e transformação) em linhagens de Mtb são pouco relatados (COLE et al., 1998; NGUYEN et al., 2018).

A não adesão ao tratamento com fármacos anti-TB estabelece condições propícias para selecionar e fixar linhagens mutantes que desenvolveram estratégias favoráveis à sua sobrevivência na presença destes fármacos, e que perpetuam essas mutações ao longo de gerações através da expansão clonal (WARNER; KOCH; MIZRAHI, 2015).

A inovação e facilidade de acesso às técnicas de sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* – NGS) associadas às ferramentas de bioinformática revolucionaram os estudos genômicos, proporcionando uma ampla e rica caracterização das mutações presentes em Mtb (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014; GYGLI et al., 2019). Por sua vez, a análise do genoma micobacteriano evidenciou ocorrência de mutações compensatórias (*i.e.*: mutações secundárias que minimizam os impactos fisiológicos negativos advindos das mutações que conferem resistência aos fármacos), e da epistasia (interação entre genes) no direcionamento do *fitness* biológico em linhagens mutantes de Mtb (BRITES; GAGNEUX, 2015; BORREL et al., 2013; NGUYEN et al., 2018). A Figura 4 ilustra os processos de aquisição de resistência mencionados acima.

Em tempo ressalva-se que as linhagens de Mtb apresentam baixa taxa de mutação, registrada em aproximadamente 2×10^{-10} mutações/bp/geração, bem como os SNPs que se diferem entre si com até 5 modificações durante o intervalo de 3 anos. Adicionalmente, destaca-se o processo de formação de clones como via de reprodução estabelecida pelas linhagens de micobactérias (NGUYEN et al., 2018).

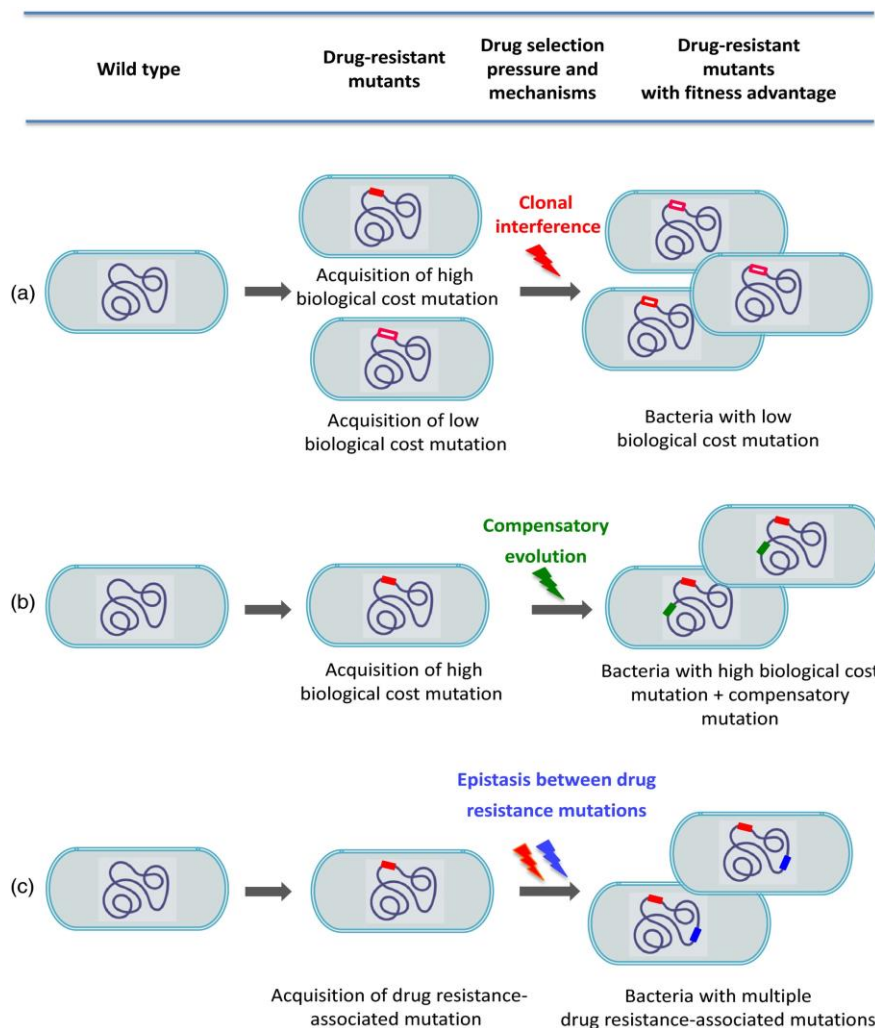


Figura 4: Processos evolutivos de linhagens de *M. tuberculosis* sensíveis para formas resistentes aos fármacos anti-TB. (a) Linhagem sensível sofre mutações que conferem alto e baixo impacto em sua fisiologia (*biological cost*), aquelas com mutações de baixo custo são selecionadas e se perpetuam por expansão clonal. (b) Linhagem exposta a fármacos sofre mutações que impactam drasticamente em sua fisiologia ao passo que também ocorrem mutações compensatórias para fins de minimizar os efeitos causados pelas mutações que conferem resistência. (c) Linhagem que já apresenta mutações em genes de resistência está propensa a apresentar novas mutações impulsionada pelo fenômeno da epistasia positiva (FONTE: NGUYEN et al., 2018).

Fatores externos (aspectos do meio ambiente, qualidade na oferta dos serviços de saúde, características sociodemográficas e clínicas do paciente por exemplos) devem ser considerados no processo de aquisição de resistência aos fármacos, haja vista a interferência

desses fatores na condução da terapia anti-TB (BRITES; GAGNEUX, 2015; WARNER; KOCH; MIZRAHI, 2015).

O abandono, a falha terapêutica e a realização de múltiplos tratamentos por quaisquer motivos proporcionam ocorrência de mutações nos isolados de Mtb que se tornam resistentes (resistência secundária) (PERRIN, 2015), a má condução na terapia também favorece a transmissão ativa desses isolados (ZHANG; YEW, 2015)

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a diversidade genética e a dispersão geográfica dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistentes aos fármacos anti-TB, circulantes em Salvador e na Bahia no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2011.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Caracterizar os casos de TBMDR notificados na Bahia e os de TBXDR notificados em Salvador, entre janeiro de 2008 e dezembro de 2011;

3.2.2 Georreferenciar os casos de TBMDR e TBXDR nos bairros de Salvador-Bahia, com maior carga de TB no período supracitado;

3.2.3 Identificar família/subfamília dos isolados de Mtb resistente predominante no grupo populacional analisado;

3.2.4 Verificar a existência de *cluster* genético entre os isolados, e sua dependência espacial nos bairros de Salvador, Bahia, Brasil.

4 RESULTADOS

Os resultados desse trabalho estão apresentados em forma de dois artigos, produzidos para fins de atender os objetivos propostos e divulgar os dados alcançados.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS CASOS DE TB MULTIDROGA RESISTENTE OCORRIDOS NO ESTADO DA BAHIA, E DOS CASOS DE TUBERCULOSE EXTENSIVAMENTE RESISTENTE NOTIFICADOS EM SALVADOR, ENTRE JANEIRO DE 2008 E DEZEMBRO DE 2011.

Neste artigo intitulado "**Laboratory-based study of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs among multidrug-resistant tuberculosis isolates: The first report of extensively drug-resistant tuberculosis in Bahia, Brazil**" foram descritos os aspectos sociodemográficos dos pacientes diagnosticados com TBMDR em todo o estado da Bahia, e dos casos de TBXDR notificados em Salvador, Bahia no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2011. Esse trabalho configura-se como o primeiro relato de TBXDR no estado da Bahia e foi submetido no periódico BMJ Open.

“Laboratory-based study of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs among multidrug-resistant tuberculosis isolates: The first report of extensively drug-resistant tuberculosis in Bahia, Brazil”

Erivelton de O. Sousa *, Rita Terezinha de O. Carneiro*, Fátima C. O. F. Montes, Emilyn C. Conceição, Patricia Bartholomay, Jamocyr M. Marinho, Karla V. B. Lima, Marcio S. Natividade, Wildo N. de Araújo, Eliana D. Matos, Theolis Barbosa

Laboratory-based study of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs among multidrug-resistant tuberculosis isolates: The first report of extensively drug-resistant tuberculosis in Bahia, Brazil

Erivelton de O. Sousa ^{1,2*}, Rita Terezinha de O. Carneiro ^{2*}, Fátima C. O. F. Montes³, Emilyn C. Conceição ⁴, Patricia Bartholomay ⁵, Jamocyr M. Marinho ⁶, Karla V. B. Lima ⁷, Marcio S. Natividade ⁸, Wildo N. de Araújo ⁵, Eliana D. Matos ⁶, Theolis Barbosa ^{2,9**}

¹ Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA), Salvador, Bahia, Brazil. oliveira.lacenbahia@gmail;

² Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brazil, ritaterezinha@gmail.com;

³ Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Referência Professor Hélio Fraga, Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, fatima.fandinho@fiocruz.br;

⁴ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, emilyncosta@gmail.com;

⁵ Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, patricia.bartholomay@gmail.com; wildo74@gmail.com

⁶ Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública, Faculdade de Medicina, Salvador, Bahia, Brasil, jamocyr@hotmail.com; elianadmatos@gmail.com

⁷ Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil, karlalima@iec.gov.br;

⁸ Universidade Federal da Bahia, Instituto de Saúde Coletiva, Salvador, Bahia, Brazil, marcio.natividade@outlook.com;

⁹ Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, theolis.bessa@fiocruz.br.

*Shared first authorship.

**Corresponding author: Dr. Theolis Barbosa Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, 40296-710 Salvador, Bahia, Brasil. Tel. +55 71 3176-2295; fax +55 71 3176-2272, e-mail theolis.bessa@fiocruz.br.

Abstract

Objectives: to characterize the drug resistance profile of this collection of *Mycobacterium tuberculosis* multidrug-resistant (MDR-TB) isolates, as well as describe the socio-demographic, epidemiological and clinical characteristics of the patients from which they originated, and, finally, identify strains presenting resistance to second line anti-TB drugs compatible with an XDR-TB profile. **Design:** retrospective cohort. **Setting:** isolates of MDR-TB maintains a collection of drug-resistant isolates obtained from sputum cultures used to diagnose drug resistance among patients referred to or diagnosed with multidrug-resistant tuberculosis at Octavio Mangabeira hospital in Salvador, Bahia, Brazil. **Participants:** multidrug-resistant tuberculosis patients residing in Salvador, Bahia, Brazil. **Interventions:** we describe the clinical, epidemiological, laboratory and genetic profiles of 11 XDR-TB isolates from a collection of 204 cultured MDR-TB specimens obtained between January 2008 to December 2011, obtained from the reference laboratory for TB drug resistance diagnosis in the state of Bahia, Brazil. **Results:** the corresponding TB cases were predominantly male, median age of 43 years, who failed treatment prior to MDR-TB diagnosis (suggesting delayed identification of drug resistance). They frequently had a history of intermittent treatment (4/11) and many died from TB (5/11). Two cases of primary drug resistance were confirmed. Four isolates showed resistance to all first- and second-line anti-TB drugs evaluated. Most isolates successfully genotyped by spoligotyping and MIRU-VNTR 12-loci (n=10/11) belonged to the Latin-American Mediterranean (LAM) Family. An elevated proportion of LAM10-Cameroon (3/10) subfamily bacilli were found, in contrast to previous reports of a prevalence below 5%. **Conclusions:** Our findings highlight the need for early detection of TB drug resistance and the avoidance of treatment discontinuation to prevent the emergence of resistant forms.

Keywords: Drug resistance; Genotyping; Molecular Epidemiology; Tuberculosis.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is responsible for significant infectious disease morbimortality worldwide. In 2018 alone, 10 million new TB cases and 1.4 million deaths were estimated, in spite of the fact that this disease is considered highly curable. TB is presently among the leading causes of death by infectious disease arising from a single agent. This major health impact highlights tremendous gaps in successful disease treatment and inadequate prevention of TB dissemination. Moreover, the prevalence of resistant TB forms has been gradually increasing due to accumulations in mutations that interfere with the action of anti-TB drugs. This worldwide phenomenon threatens to derail the current goal of eliminating this disease by 2035¹, especially in the light of the expected hindrances in caring for TB patients resulting from the COVID-19 pandemic in middle and low income settings².

Strains of TB presenting combined resistance to at least the main first-line anti-TB drugs, R and H, are termed multidrug-resistant (MDR). MDR-TB therapy entails a longer, more aggressive and more expensive course of treatment involving the use of second-line drugs

associated with more frequent and severe side effects. MDR-TB has been reported to lead to higher rates of death and disability. Additionally, forms of MDR-TB presenting additional resistance to a fluoroquinolone combined with an injectable second-line anti-TB drug, termed extensively drug-resistant TB (XDR-TB), have been associated with an even poorer prognosis and more challenging therapeutic management ³.

The emergence of MDR/XDR-TB has been associated with inadequate disease treatment, mostly secondary to multiple, irregular and/or incomplete treatment regimens ⁴. Treatment strategies adopted without prior knowledge of strain resistance to anti-TB drugs contribute to treatment failure and the development of further resistance ^{5, 6}. In addition, primary MDR/XDR-TB transmission has been increasingly reported in endemic regions, further aggravating this already bleak scenario ⁷.

Brazil is among the 30 countries the World Health Organization (WHO) considers a priority for TB control, especially regarding TB-HIV co-infection. Nonetheless, the prevalence of drug-resistant TB remains unknown, since laboratory confirmation of drug resistance has only been performed in a limited proportion of cases ¹. The incidence of TB in Brazil was estimated at 34.8 cases/100,000 inhabitants in 2018. The city of Salvador (Bahia) reported 48.3 cases and 3.7 deaths/100,000 inhabitants in 2018, placing it fifth among the Brazilian state capitals in terms of total number of confirmed TB cases, slightly behind Fortaleza (Ceara) ⁸. A hospital-based study performed from July 2001 to July 2003 was the first attempt to estimate the prevalence of MDR-TB resistance in Salvador; the authors found that 14% of all TB cases diagnosed in those settings were classified as MDR-TB ⁹.

Previous studies have established the spatial relationship between an increase in the occurrence of TB cases and poor living conditions in Salvador, including housing, income, basic sanitation and education ¹⁰. These characteristics have been associated with TB dissemination and may also be associated with the development and spread of drug-resistant strains ¹¹.

A collection of MDR-TB isolates was obtained from the state reference laboratory, the governmental unit solely responsible for reporting resistance to first line anti-TB drugs in Bahia until 2017. This laboratory provides support for the state reference service responsible for treating complicated TB cases (including MDR-TB), which until recently was the only

health care facility to provide MDR-TB treatment in the state of Bahia. Here we aim to characterize the drug resistance profile of this collection of MDR-TB isolates, as well as describe the socio-demographic, epidemiological and clinical characteristics of the patients from which they originated, and, finally, identify strains presenting resistance to second line anti-TB drugs compatible with an XDR-TB profile, based on spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) typing method based on 12 loci.

MATERIAL AND METHODS

Study setting

The Professor Goncalo Moniz Public Health Central Laboratory (LACEN-BA), the reference diagnostic laboratory for the state of Bahia, located in northeastern Brazil, performed all phenotypic testing for first-line anti-TB drug resistance (R, H, ethambutol (E)), as well as resistance to streptomycin (S), during the study period. This laboratory maintains a collection of drug-resistant isolates obtained from sputum cultures used to diagnose drug resistance among patients referred to, or diagnosed at, the Octavio Mangabeira hospital, the state reference institution for the treatment of complicated TB cases. Until recently, it was the only health care unit responsible for providing care to patients diagnosed with MDR-TB.

Culturing of isolates and phenotypic anti-TB drug resistance testing

M. tuberculosis isolates (N=392) obtained from January 2008 to December 2011 were considered for analysis. Biochemical species identification, susceptibility to first line anti-TB drugs, as well as resistance to S, had been established prior to storage. Mycobacterial species was determined by culture in Lowenstein-Jensen solid medium (LJ) containing p-nitrobenzoic acid (500ug/ml) and tiophene-2-carboxylic acid hydrazide (2ug/ml), a niacin test, and phenotypic colony characteristics¹².

Drug sensitivity to H, R, E, and S was determined according to the proportions method established by Canetti¹³ at concentrations of 0.2µg/ml, 40µg/ml, 2µg/ml and 4µg/ml, respectively. All isolates from the LACEN-BA bacteria archive were kept frozen at -20°C in Middlebrook 7H9 medium supplemented with glycerol. For the present study, prior to analysis, the selected isolates were expanded in LJ solid medium tubes, and each isolate was cultured in two tubes. Of the isolates, 34% (134/392) did not grow under the culturing

conditions and were thusly excluded. In a fraction of the patients sampled, multiple isolates (13%, N=52/392) were obtained by serial testing. In these cases, we opted to solely analyze the most recently obtained isolate from each patient, resulting in a total of 204 analyzed isolates.

One tube of each of the isolate cultures was sent to the National Reference Laboratory, Professor Hélio Fraga Reference Center (CRPHF/ENSP-FIOCRUZ), Rio de Janeiro/Brazil, where phenotypic drug sensitivity testing of first and second-line anti-TB drug resistance was performed using the BACTEC MGIT960 automated liquid culture system (Becton Dickinson Diagnostic Systems, MD). The first-line anti-TB drugs tested were the same as those previously assessed at LACEN-BA, while the second-line anti-TB drugs were ofloxacin (Ofx), kanamycin (Km), amikacin (Am) and capreomycin (Cm). Isolates with discordant susceptibility to the first-line anti-TB drugs when comparing solid culture and liquid culture test results were then retested by liquid culture; these results were ultimately considered for analysis.

Sociodemographic, epidemiological and clinical data

Standardized sociodemographic, epidemiological and clinical information on MDR-TB patients was collected from governmental compulsory notification databases: SINAN (<http://portalsinan.saude.gov.br/>), the national registry for mandatory notifiable diseases ¹⁴, and SITE-TB (<http://sitetb.saude.gov.br/>), the national registry containing relevant information regarding the application of special TB therapy regimens, with details exclusive to TB cases resistant to at least one anti-TB drug ¹⁵.

Additional information regarding reported contacts, previous treatment outcomes prior to the year 2012 and information missing from the compulsory notification databases were obtained from the reference hospital medical records. The variables analyzed were: sex; age; self-reported race/ethnicity ¹⁶; home address; years of schooling; drugs employed in previous TB treatment(s), treatment period and outcome – defaulted from therapy, failure, cure, death; known contact with an MDR-TB patient; primary or secondary resistance notification; reported comorbidities, including HIV test status and results, diabetes, mental illness(es), drug and/or alcohol abuse; extent of pulmonary disease; duration and outcome of the treatment administered at the time of isolate obtainment.

This study complied with the ethical principles expressed in the Helsinki declaration, as well as with the Brazilian legislation in force at the time of sample and data collection (Resolution 196/96)¹⁷. This investigation was approved by the Institutional Review Board of the Gonçalo Moniz Research Center (CEP-CPqGM/FIOCRUZ) under CAAE registry no. 0006.0.225.000-11.

Georeferencing using home address information

The spatial distribution of the MDR-TB cases considered the 417 municipalities comprising the territory of the state of Bahia. MDR-TB cases were georeferenced based on residential addresses using Google Earth Pro software. Cases of MDR-TB were plotted in a shape file containing the vectorized political map of the state of Bahia, provided by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), using ArqGis 2.18 software. The municipalities in which MDR-TB cases were notified during the study period were highlighted according to the number of occurrences (strata considered: zero, one, or two or more occurrences). XDR-TB cases were marked using the coordinates corresponding to the geometric center of each municipality.

DNA extraction and genotypic characterization of XDR-TB isolates

DNA was obtained from one to two loops of bacterial mass grown in a duplicate tube containing LJ medium as described above, according to the protocol described by Van Embden¹⁸. Spoligotyping was performed following the protocol by Cowan¹⁹. Cultures of the H37Rv *M. tuberculosis* and *M. bovis* reference strains were used as positive controls. The patterns of positivity for each of the 43 alleles were compared to the reference patterns available in the SITVIT2 database (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>)²⁰, allowing for the identification of Mycobacterial lineages, sublineages and Shared International Types (SITs).

In parallel, MIRU-VNTR 12-loci typing was performed according to Supply²¹ and Kremer²² using previously extracted DNA. The 12 loci investigated were: MIRU02, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU26, MIRU27, MIRU31 and MIRU39. Negative and positive controls were used as described above. The molecular weight marker LIZ1200 (GeneScan™ LIZ1200®, Applied Biosystems) was added to each product. Capillary electrophoresis was performed using an ABI 3130 sequencing platform (Applied Biosystems, Foster City, EUA). GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) software

was used for fragment analysis. The MIRU-VNTRplus analysis tool (www.miru-vntrplus.org) was used for tree-based lineage identification by similarity (constructed using the unweighted pair group method with arithmetic mean - UPGMA algorithm) and to obtain a dendrogram of the XDR-TB isolates.

Statistical analyses

Categorical variables are described as absolute and relative frequencies. Means, standard deviation and 95% confidence intervals (95% CI) were reported for all quantitative variables with normal distribution. Medians and interquartile range were used to describe non-normally distributed variables. Proportions were compared using the chi-squared test. Central measures were compared using Student's t-test for parametric variables and the Mann-Whitney test for non-parametric variables. All tests considered an alpha error of 5% to distinguish significant differences.

RESULTS

Approximately two thirds of the 204 MDR-TB isolates (66%; 135/204) were found to be resistant to anti-TB drugs other than R and H; additional resistance to both E and S was observed (40%; 55/135). Over one third (37%; 50/135) were resistant to at least one second-line anti-TB drug and were therefore considered pre-XDR TB patients²³. Seven percent (14/204) were classified as XDR-TB (two isolates were resistant to both ofloxacin and capreomycin, one was resistant to ofloxacin, kanamycin and amikacin and eleven were resistant to ofloxacin, capreomycin, kanamycin and amikacin).

Death due to TB was the final outcome for one fifth of the studied patients (Table 1). Patients with strains that exhibited resistance to at least one second-line anti-TB drug were more likely to die from TB. All patients coinfecting with HIV (2%; 5/204) died; four (4/5, 80%) died from TB.

In all groups, the majority of patients were male (65%; 132/204), with a maximum of seven years of primary education (60%; 80/132). The socio-demographic and epidemiological characteristics of the studied patients are described in Table 1. The median age was also similar for all studied groups: approximately 40 years of age. Patient medical records frequently showed previous treatment failure and default. While the frequency of intermittent

treatment was not different among the groups, patients with strains resistant to at least one second-line anti-TB drug failed treatment more often than the other MDR-TB cases.

Among the comorbidities observed, the most frequent were alcohol abuse and diabetes, followed by smoking and mental disorders. Notably, directly observed treatment (DOT) was implemented in less than half of all cases, and in only 3/22 (14%) cases in which alcohol abuse and/or mental disorders were reported.

While less than 5% of the patients were confirmed to be coinfecting with human immunodeficiency virus (HIV), a significant proportion were never tested (31%; 64/204). Lack of HIV test results was found more often among patients with strains sensitive to all second-line anti-TB drugs. The proportion of HIV-coinfecting patients was significantly higher among XDR-TB patients compared to other patient groups (prevalence ratio of 6.00, [1.09-32.91] 95% confidence interval, p-value=0.039). No information regarding test refusal by the studied subjects was available.

Table 1: Sociodemographic characteristics of MDR-TB cases from Bahia, Brazil with viable isolates obtained between January/2008 and

VARIABLES	Strains susceptible to all second-line anti-TB drugs ¹ MDR-TB (n=140)	Strains resistant to at least one second-line anti-TB drug ²		TOTAL (n=204)	Patients with resistant ² vs. susceptible ¹ strains Prevalence ratio [CI 95%] ⁶
		Pre-XDR TB (n=50)	XDR-TB (n=14)		
Male	72% (101/140)	58% (29/50)	71% (10/14)	65% (132/204)	0.84 [0.68-1.05]
Age [min. - max.] ³	36 [18 - 71]	39 [18-65]	43 [20 - 72]	38 [18 - 72]	
Comorbidities ⁴					
Not reported	52% (73/140)	40% (20/50)	29% (4/14)	48% (97/204)	
Unknown	26% (37/140)	8% (4/50)	0%	20% (41/204)	
Reported	21% (30/140)	52% (26/50)	71% (10/14)	32% (66/204)	2.62 [1.79-3.85]***
Mental disorders	17% (5/30)	11% (3/26)	30% (3/10)	17% (11/66)	2.62 [0.83-8.29]
Diabetes	43% (13/30)	27% (7/26)	20% (2/10)	33% (22/66)	1.51 [0.68-3.36]
Alcohol abuse	67% (20/30)	38% (10/26)	50% (5/10)	53% (35/66)	1.64 [0.90-2.99]
Smoking	20% (6/30)	19% (5/26)	10% (1/10)	18% (12/66)	2.19 [0.73-6.52]
Drug addiction ⁵	17% (5/30)	3% (1/26)	20% (2/10)	12% (8/66)	1.31 [0.32-5.33]
HIV test					
Not performed/unknown.	38% (54/140)	20% (10/50)	0%	31% (64/204)	0.41 [0.22-0.74]**
Performed	61% (86/140)	80% (40/50)	100% (14/14)	69% (140/204)	
Positive	1% (1/86)	5% (2/40)	14% (2/14)	4% (5/140)	4.78 [0.51-44.77]
Negative	99% (85/86)	95% (38/40)	86% (12/14)	96% (135/140)	
Death	10% (14/140)	40% (20/50)	50% (7/14)	20% (41/204)	4.22 [2.37-7.49]***
Municipality of residence					
Salvador	60%(84/140)	70% (35/50)	79% (11/14)	64% (130/204)	1.20 [0.98- 1.47]
Other	40% (56/140)	30% (15/50)	21% (3/14)	36% (74/204)	
December/2011.					
Directly observed treatment (DOT)					
Not performed	61%(85/140)	78% (39/50)	64% (9/14)	65% (133/204)	1.24 [1.02-1.50]**
Performed	18% (25/140)	8% (4/50)	36% (5/14)	17%(34/204)	

Unknown	21% (30/140)	14% (7/50)	0%	18% (37/204)	
Past treatment failure					
Yes	61% (85/140)	76% (38/50)	100% (14/14)	67% (137/204)	1.34 [1.12-1.60]**
No	18% (26/140) ³	14% (7/50)	0%	16% (33/204)	
Unknown	21% (29/140)	10% (5/50)	0%	17% (34/204)	
Past treatment default					
Yes	37% (52/140)	50% (25/50)	43% (6/14)	41% (83/204)	1.30 [0.94-1.82]
No	42% (59/140)	40% (20/50)	57% (8/14)	43% (87/204)	
Unknown	21% (29/140)	10% (5/50)	0%	17% (34/204)	

¹Susceptible to ofloxacin (Ofx), kanamycin (Km), amikacin (Am) and capreomycin (Cm). ²Resistant to at least one of the drugs listed previously. ³Years. ⁴Patients for which at least one comorbidity was reported. ⁵Abuse of injectable and/or non-injectable drugs. ⁶*P-value<0.05; **p-value<0.01; ***p-value<0.0001

The studied patients resided in 45/417 municipalities of the state of Bahia (Fig. 1). The state capital, Salvador, was where two-thirds of the cases were concentrated (130/204), while all other individual municipalities accounted for less than 10% of the total number of cases. The municipalities of Feira de Santana (10 cases), Paulo Afonso (7 cases) and Jequié (4 cases) had the highest number of cases after Salvador. Almost 80% of the XDR-TB cases were detected in the state capital, compared to all other municipalities together, corresponding to a prevalence ratio of 2.09 ([0.60-7.24] 95% IC, p-value=0.2464).

The present study was focused on the analysis of XDR-TB cases originating from Salvador. In all of these cases, ethnicity was reported as non-white. Four (36%) had less than four years of formal schooling, and only two (18%) were formally employed. Family income was not registered in the notification databases or on medical records.

All studied XDR-TB patients had pulmonary TB, and bilateral cavitary disease was diagnosed in most (72%; 8/11). Table 2 lists further details regarding the clinical and epidemiological characteristics of these studied subjects. Two-thirds were male, and approximately half were aged less than 45 years (54%; 6/11). Mental disorders, HIV co-infection (all of these patients had been tested) and alcohol and/or drug abuse were the most frequently reported comorbidities. DOT was administered in a small proportion of these subjects (18%; 2/11). Death due to TB was the final outcome in 5/11 patients (45%), including both patients with HIV co-infection.

Table 2: Individual characteristics of XDR-TB patients from Salvador, Bahia, Brazil.

Case	Sex	Age	Primary infection	N Prev. treatments regist. ¹	Hospitalized	Treatment default	Treatment failure	Relapse	HIV+	Other comorbidities	DOT	Outcome (year)
1	M	27	Yes	1	Yes	No	No	No	Yes	IDU, MDIS	Yes	Death (2010)
2	M	24	No	4	No	Yes	Yes	Yes	No	(--)	No	Treatment default (2011)
3	M	54	No	8	No	No	Yes	Yes	No	HTLV, MDIS, AH	No	Completed treatment (2013)
4	M	43	No	6	Yes	Yes	Yes	Yes	No	IDU, AA	No	Cure (2016)
5	M	46	No	3	Yes	No	Yes	No	No	AA	No	Cure (2016)
6	M	37	No	5	No	No	Yes	No	No	(--)	Yes	Cure (2013)
7	M	72	No	3	Yes	Yes	Yes	No	No	DM	No	Death (2009)
8	F	46	No	7	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Leprosy	No	Death (2013)
9	F	31	No	5	No	No	Yes	No	No	Hepatopathy	No	Death (2010)
10	F	69	No	3	No	Yes	Yes	No	No	(--)	No	Cure (2016)
11	F	20	Yes	1	Yes	No	Yes	No	No	Drug intolerance	No	Death (2014)

Patients presenting treatment default (45%; 5/11) had undergone more than one course of standard first-line anti-TB treatment. The interval between standard treatment completion or interruption and the beginning of a new treatment course varied from the day immediately after completion to approximately 1.8 years (median duration of 83 days, interquartile range of 1-245 days, Fig. 2). Two patients (18%, 2/11) were considered as TB relapse cases, defined by presenting sputum-positive TB after one registered completion of a standard treatment course²⁴. In 6/11 (54%) patients, the treatment regime was changed prior to completing the MDR-TB treatment course. In 5/6 (83%) of these patients, the treatment regime was changed prior to receiving a diagnosis of XDR-TB. Of these six patients, four (4/6, 67%) evolved to cure or completed treatment, while 2/6 (33%) failed treatment or died.

With regard to ethambutol resistance, 9/11 (81%) XDR-TB patients demonstrated resistance while receiving ethambutol as part of their treatment regime. Six patients with strains that presented resistance to ethambutol continued to receive this drug in their treatment regimens, and three (50%) died. Of the other three that changed to a ethambutol-free drug regimen, one died due to drug intolerance. The prevalence ratio of death considering these two groups of patients was 1.50 ([0.25-8.98] 95% IC, p-value=0.6569). Two cases with primary XDR-TB died from the disease, one prior to initiating MDR-TB treatment and the other after being on an MDR-TB regime for 38 months.

Genotyping was successful in 10/11 (91%) of the isolates (Fig. 3). Two (22%) belonged to the Haarlem H3 subfamily, SIT 50, while all others belonged to the Latin-American Mediterranean family, subfamilies 3, 9 and 10, the latter being the most frequent (33%; 4/10). The LAM10 isolates grouped within the SIT 61 clade (Cameroon), which was also identified in two other XDR-TB patients from municipalities outside Salvador (data not shown). MIRU-VNTR revealed three clusters consistent with the obtained spoligotype profile. Out of 12 loci, only one locus (MIRU10) was different in case 9 compared to cases 4, 7 and 11. Of the two patients in Salvador with primary XDR-TB (cases 1 and 11), one isolate was successfully genotyped and belonged to the LAM3 SIT 376 clade (Fig. 3). Another isolate obtained from his aunt (case 8) was identified as a Haarlem H3 SIT 50 strain, which differed significantly from the only other Haarlem H3 SIT 50 isolate (case 5) at the MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU20, MIRU23 and MIRU39 loci (Fig. 3). This precludes the possibility of intra-family transmission in these cases.

DISCUSSION

Resistance to drugs other than R and H was a frequent feature in the MDR-TB mycobacterial collection obtained from the Bahia state reference laboratory. The majority of patients from which these isolates were obtained were male, most younger than 45 years of age. Comorbidities, unknown HIV status, lack of DOT and previous treatment failure were all clinical characteristics associated with MDR-TB.

In the present study, over one-fourth of the investigated cases were resistant to both E and S, two drugs that comprise part of the standard regimen for MDR-TB treatment in Brazil in that time. All TB treatment in Brazil is provided free of charge by the Brazilian Health System and monitored by public health care facilities following a single consensus guideline. Ethambutol was added to the course of standard TB treatment in 2009²⁵. The standardized regimen to treat MDR-TB was established in 2002 and consists of an initial intensive 6-month phase involving S, a fluoroquinolone (levofloxacin or Ofx), E, pyrazinamide (Z) and terizidone (Trd), followed by a maintenance phase lasting at least 12 months entailing the use of E, fluoroquinolone and Trd²⁶.

The proportion of patients with strains resistant to E was higher than that reported by studies conducted elsewhere in Brazil^{27, 28}. We highlight that we used the agar proportion drug susceptibility test, considered the conventional reference method for this drug²⁹. It is important to note that susceptibility testing for Z was discontinued during our analysis. As detailed in other reports in the literature, inconsistent results have been obtained depending on the culture conditions involved³⁰ or the underlying genetic basis of clinical resistance to this drug³¹.

It is important to note that drug-susceptibility testing is often either unavailable or not solicited at the time of treatment initiation, and that E and (less often) S have been recommended to achieve improved MDR-TB treatment results^{27, 32}. However, we observed that more than half of the cases studied herein hosted strains that were resistant to E, and approximately half of the patients that continued to receive this drug in their therapeutic regime died. Accordingly, it follows that the use of E to treat MDR patients, regardless of their resistance profile, may likely negatively impact therapeutic outcome. Among the three patients whose drug regime changed to an ethambutol-free scheme, only one died due to drug intolerance, an adverse event that often complicates MDR-TB treatment²⁷.

Additional resistance to a second-line drug (pre-XDR and XDR combined) was present in one-third of the MDR-TB cases in our study, which stands in agreement with the fact that drug resistance in TB is often progressive due to accumulated drug resistance mutations ⁹. This feature was also associated with death, an outcome that occurred in a high proportion of the MDR-TB patients studied. While therapeutic success rates have improved in southeastern Brazil, poor treatment outcomes continue to persist in the northeastern region in which Bahia is located ²⁷. Cure rates in São Paulo have improved as a result of the implementation of specialized services, specific training of multidisciplinary health care teams, rapid drug resistance screening and the on-time delivery of test results ³³.

Our findings raise concerns that MDR-TB may well become more increasingly difficult to treat in northeastern Brazil. Retreatment and treatment failure were frequent among the studied subjects, and both are associated with the increased risk of adverse events and the development of drug resistant TB ²⁷. We further noted that changes to the treatment regime prior to receiving the result of the drug susceptibility testing for second-line anti-TB drugs were also very frequent. Notably, the use of only partially effective drug regimens in the absence of information on a patient's drug susceptibility profile may favor the development of further resistance ⁶. The fact that drug susceptibility testing is performed less consistently in the Brazilian northeast raises additional concerns regarding the potential risk of provoking a more worrisome scenario in the coming years. In the early 2000s, TB strains resistant to at least four drugs represented less than 2% of all drug-resistant strains in the first attempt to estimate the prevalence of drug resistance in Salvador ²⁴. We therefore highlight the importance of performing drug-susceptibility testing as essential to the design of effective treatment regimes.

Most MDR-TB patients are males with low levels of education; both characteristics have been associated with TB treatment default ³² and MDR-TB ³⁴ in other studies conducted in Brazil. These reports have also described an average patient age of 38-39 years, which is compatible with the epidemiological profile of TB cases throughout the country, as well as with our findings.

The most highly prevalent comorbidities among the MDR-TB cases in this study were alcohol abuse and diabetes; both have been linked to MDR-TB in other Brazilian studies ³⁴, despite the fact that a single study reported an inverse association between alcohol

dependence and anti-TB drug resistance in Salvador ²⁵. Diabetes has been previously associated with poorer MDR-TB treatment outcome in Brazil ²⁷. Alcohol abuse and smoking (which was also prevalent) may favor TB transmission, and could interfere with treatment efficacy ^{35, 36}. The use of illicit drugs was reported less frequently in our study population. Although this proportion stands in agreement with previous findings ⁴, it has been associated with treatment default in other studies ³⁴. Over 10% of the studied cases reported mental disorders, which may also impact negatively treatment outcomes ³⁷.

Directly observed treatment (DOT) regimens contribute to treatment adherence and have been associated with improved cure rates ⁴. We observed that a minor proportion of patients received DOT, in contrast with proportions reported in other Brazilian states ⁸. Patients under DOT present lower rates of unfavorable treatment outcomes, such as treatment default and death due to TB. In fact, patients with co-morbidities, such as alcohol abuse or mental disorders, were found to be more likely to receive DOT in Brazil ³⁸, yet this was not the case in our study population.

The proportion of HIV-positive MDR-TB cases herein was low. This is similar to results obtained by Matos et al. ⁹ yet stands in contrast to previous reports in Brazil detailing an association between MDR-TB and HIV coinfection ³⁹. A significant proportion of the MDR-TB cases were not tested for HIV, which directly contradicts current Brazilian TB management guidelines ²⁵, as well as the conduct reported in other settings around the country. Nonetheless, the proportion of patients that were not tested remains similar to the national average ⁸. The cause(s) for this discrepancy must be elucidated. One hypothesis is that MDR-TB diagnosis may be occurring too late, i.e. close to death, which reduces timeliness in conducting HIV diagnosis. The disastrous effects of TB-HIV co-infection have been thoroughly documented in the literature, and this condition has been associated with progressively more resistant forms of TB ⁴⁰. Of note, all HIV-positive patients in our setting died. There is an increased risk of adverse events and death among HIV-infected TB patients, especially for those who do not undergo antiretroviral treatment ⁴¹. Drug intolerance has been shown to further contribute to therapeutic failure ⁴².

While MDR-TB cases were reported in 11% of the municipalities of the state of Bahia, two-thirds of the case notifications originated from residents in the municipality of Salvador. In contrast, a nationwide data registry of TB cases indicated the presence of disease in more

than half of all Brazilian cities ¹⁴. Our analysis of the current scenario in Salvador and the municipalities of Bahia, together with the enormous discrepancies in access to health care, as well as variability in quality of health care services provided among diverse Brazilian capitals and their corresponding state municipalities, leads us to hypothesize that MDR-TB is very inefficiently detected in the municipalities throughout Bahia compared to the state capital. These municipalities may indeed be more affected by insufficient training of health care teams, high mobility of health care personnel, excessive workloads in those responsible for health care management, and reduced governmental health care funding ⁴³. While it is possible that the distribution of MDR-TB cases reflects differences in the frequency of test requisitions between the capital and other state municipalities, we were unable to verify this information. As XDR-TB detection was expected and found to be even more concentrated in Salvador, we therefore focused our analyses on studying the characteristics of XDR-TB cases detected in the state capital in an effort to circumvent potential bias.

To the best of our knowledge, the present report represents the first detection of XDR-TB in Bahia, Brazil. In fact, XDR-TB represented 7% of the MDR-TB cases studied, a proportion similar to what was reported in other Brazilian states ⁴⁴⁻⁴⁶. All XDR-TB cases analyzed herein were of non-white ethnicity, a characteristic previously associated with poorer MDR-TB treatment outcome ²⁷.

We emphasize that several factors, a low educational level, poor socioeconomic conditions and the frequent occurrence of alcohol and drug abuse, as well as mental disorders, raise further issues regarding treatment compliance among XDR-TB cases. Death due to TB occurred in almost half of the studied cases, and half of those deaths were associated with HIV co-infection; indeed, all patients co-infected with HIV died. As we observed a high proportion of MDR-TB individuals who had not been tested for HIV co-infection, it is plausible that the late diagnosis of this comorbidity may have negatively impacted disease outcome.

The discrepancies observed regarding the treatment regimens adopted and individual drug susceptibility profiles clearly indicates that laboratory results need to be made available in a more timely manner to provide effective management of XDR-TB patients in our setting. It is also of concern that primary MDR/XDR-TB drug resistance may not always be recognized, leading to an ineffective initial treatment regime and possibly undetected disease

transmission. In this regard, the low genetic diversity of the isolates obtained from the XDR-TB patients in this collection is remarkable.

In accordance with previous studies from Brazil, we found that LAM9 SIT 42 and Haarlem H3 SIT 50 were frequent among the drug-resistant strains⁴⁷⁻⁵¹. Two previous studies have^{46, 49} reported LAM10 SIT 61 (Cameroon), albeit at a very low prevalence. This clade originates from Africa and has been associated with drug resistance in Cameroon⁵². Its occurrence in our setting may be related to recent transmission due to migration from Africa, but other evidence links the occurrence of African TB strains in Brazil to the slave trade. In fact, we recently demonstrated the occurrence of an EAI strain in Bahia, potentially related to strains isolated in Pará, Brazil⁵³, suggesting a common ancestry with strains from Eastern Africa⁵⁴.

Our study is limited in some respects: 1) We were only able to conduct 12-loci evaluations, which is insufficient to reliably detect more recent MDR/XDR-TB transmission; however, classical epidemiological data strengthen this hypothesis; 2) A high degree of incompleteness was observed with respect to some important variables in secondary databases (SINAN & SITE-TB). During the study period (and continuing to the present day), a considerable proportion of MDR-TB resistance remains undiagnosed due to the lack of culture testing not being solicited. Nonetheless, we stress that all patients who did receive a diagnosis of MDR-TB in the state of Bahia during this period were referred to the reference hospital, and sputum cultures were appropriately performed by the state reference laboratory and stored in their collection for surveillance purposes.

Interestingly, none of our data is suggestive of an outbreak of any particular XDR-TB strain, as we identified only one epidemiologic link between patients 1 and 10, a nephew and his aunt, who respectively presented with distinct strains. Our data raise concerns that the active transmission of MDR/XDR-TB may be occurring at a higher rate than previously estimated, and/or biological differences among the circulating strains in our setting may impact the genetic distribution of *M. tuberculosis* and consequently favor resistance within some clades. In this regard, the Cameroon family has been described as presenting genetic features that may cause alterations in pathogenic behavior, e.g. changes in metabolic pathways due to insertion elements (IS) in genes involved in physiological processes⁵⁴. The possibility that such changes may confer a selective advantage, which could compensate for an eventual

reduction in biological fitness in the process of acquiring resistance to anti-mycobacterial drugs, deserves further investigation.

CONCLUSION

Here we report the first cases of XDR-TB in Bahia, the state with the fifth highest number of TB cases in Brazil. The presence of XDR-TB presents a challenge to TB control efforts in our setting, as affected individuals frequently present alcohol and substance abuse, as well as mental disorders, which may hinder treatment adherence. Moreover, the laboratory diagnosis of HIV coinfection and MDR/XDR TB may not be performed in a timely fashion, which hinders the proper management of patients, who may undergo several treatment courses leading to therapeutic failure as a result, potentially increasing TB death rates. Our genetic findings suggest that the transmission of MDR/XDR-TB strains may occur at higher rates than previously suspected, which raises further concern regarding the control measures that should be put in place to mitigate the increasing multidrug resistance seen in our setting.

Author Contributions Erivelton de Oliveira Sousa – Conceptualization; Methodology; Investigation; Writing – original draft; Rita Terezinha de Oliveira Carneiro – Data curation; Methodology; Investigation; Formal analysis; Writing – review and editing; Visualization; Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes – Methodology; Investigation; Emilyn Costa Conceição – Methodology; Investigation; Patricia Bartholomay – Methodology; Data curation; Investigation; Jamocyr Moura Marinho – Methodology; Resources; Data curation; Supervision; Karla Valéria Batista Lima – Methodology; Investigation; Supervision; Marcio Santos Natividade – Methodology; Investigation; Supervision; Wildo Navegantes de Araújo – Methodology; Investigation; Supervision; Eliana Dias Matos – Conceptualization; Data curation; Supervision; Theolis Barbosa – Conceptualization; Resources; Investigation; Writing – original draft; Writing – review and editing; Visualization; Supervision; Project administration; Funding acquisition

References

- 1 World Health Organization. WHO | *Global tuberculosis report 2019*. Geneva: World Health Organization; 2019. Available in: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- 2 World Health Organization. WHO. *Information Note Tuberculosis and COVID-19. COVID-19: Considerations for tuberculosis (TB) care*. Geneva: World Health Organization; 2020. Available in: <https://www.who.int/docs/default-source/documents/tuberculosis/infonote-tb-covid-19.pdf>

3 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Plan to combat extensively drug-resistant tuberculosis: recommendations of the Federal Tuberculosis Task Force*. MMWR Recomm Rep 2009;58:1–43.

4 Alipanah N, Jarlsberg L, Miller C, Linh NN, Falzon D, Jaramillo E, *et al*. Adherence interventions and outcomes of tuberculosis treatment: A systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *PLoS Med* 2018;15. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002595>.

5 Bonin CR, Fochat RC, Leite ICG, Pereira TV, Fajardo M de O, Pinto CPG, *et al*. Analysis of anti-tuberculosis drug resistance and sociodemographic and clinical aspects of patients admitted in a referral hospital. *Einstein (São Paulo)* 2020;18:eAO4620. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO4620.

6 Shin SS, Keshavjee S, Gelmanova IY, Atwood S, Franke MF, Mishustin SP, *et al*. Development of Extensively Drug-resistant Tuberculosis during Multidrug-resistant Tuberculosis Treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:426–32. <https://doi.org/10.1164/rccm.200911-1768OC>.

7 Dheda K, Gumbo T, Maartens G, Dooley KE, McNerney R, Murray M, *et al*. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir Med* 2017. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30079-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30079-6).

8 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Epidemiológico Tuberculose - Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença* 2019, 50. Available in: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/22/2019-009.pdf>

9 Matos ED, Lemos ACM, Bittencourt C, Mesquita CL. Anti-tuberculosis drug resistance in strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in a tertiary hospital in Bahia. *Braz J Infect Dis* 2007;11:331–8. <https://doi.org/10.1590/s1413-86702007000300007>.

10 Erazo C, Pereira SM, Costa M da CN, Evangelista-Filho D, Braga JU, Barreto ML. Tuberculosis and living conditions in Salvador, Brazil: a spatial analysis. *Rev Panam Salud Publica* 2014;36:24–30.

11 Brites D, Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunol Rev* 2015;264:6–24. <https://doi.org/10.1111/imr.12264>.

12 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e*

- outras *Micobactérias*, 2008. Available in: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf
- 13 Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerová M, Mahler HT, *et al.* Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ* 1963;29:565–78.
- 14 Oliveira GP, Torrens A, Bartholomay P, Barreira D. Tuberculosis in Brazil: last ten years analysis – 2001–2010, *The Brazilian Journal of Infectious Disease*, 2013;17(2):218-233. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.01.005>
- 15 Bartholomay P, Pinheiro RS, Pelissari DM, Arakaki-Sanchez D, Dockhorn F, Rocha JL, *et al.* Special Tuberculosis Treatment Information System (SITE-TB) in Brazil: background, description and perspectives. *Epidemiol Serv Saude* 2019;28:e2018158. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742019000200002>.
- 16 Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Características étnico-raciais da população: classificações e identidades*. 2013. Available in: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv63405.pdf>
- 17 Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional Resolução 196/96 1996. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/1996/res0196_10_10_1996.html (accessed December 13, 2019).
- 18 van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406–9.
- 19 Cowan LS, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig TV, *et al.* Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 2005;43:688–95. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.688-695.2005>.
- 20 Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, *et al.* SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 2012;12:755–66. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.004>.
- 21 Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome: Tandem repeat variability in mycobacteria. *Molecular Microbiology* 2002;36:762–71. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x>.

- 22 Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutierrez MC, Haas WH, Panaiotov S, *et al.* Discriminatory Power and Reproducibility of Novel DNA Typing Methods for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:5628–38. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5628-5638.2005>.
- 23 Singhal P, Dixit P, Singh P, Jaiswal I, Singh M, Jain A. A study on pre-XDR & XDR tuberculosis & their prevalent genotypes in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in north India. *Indian J Med Res* 2016;143:341–7. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.182625>.
- 24 Harries AD, Hargreaves NJ, Kwanjana JH, Salaniponi FM. Recurrent tuberculosis: definitions and treatment regimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:851–4.
- 25 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil*, 2ª edição, 2019:366. Disponível in: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf
- 26 Castelo Filho A, Kritski AL, Barreto ÂW, Lemos ACM, Netto AR, Guimarães CA, *et al.* II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004;30:S57–86. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132004000700002>.
- 27 Bastos ML, Lan Z, Menzies D. An updated systematic review and meta-analysis for treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 2017;49:1600803. <https://doi.org/10.1183/13993003.00803-2016>.
- 28 Dalcomo, MP, Andrade, MK de N, PICON, PD. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. *Rev Saúde Pública* 41(Supl 1):34-42 2007.
- 29 López-Roa P, Ruiz-Serrano MJ, Alcalá L, García-Escribano Ráez N, García de Viedma D, Bouza E. Susceptibility testing to second-line drugs and ethambutol by Genotype MTBDRsl and Bactec MGIT 960 comparing with agar proportion method. *Tuberculosis* 2012;92:417–21. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.05.005>.
- 30 Salfinger M. Drug-resistant tuberculosis: Inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing-reply. *JAMA* 1995;273:917–917. <https://doi.org/10.1001/jama.1995.03520360030023>.
- 31 Wabale, J. Pyrazinamide drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a minireview. *Bacteriol Mycol Open Access*. 2016;3(2):203-205. DOI: 10.15406/jbmoa.2016.03.00054.

- 32 Gayoso R, Dalcolmo M, Braga JU, Barreira D. Predictors of mortality in multidrug-resistant tuberculosis patients from Brazilian reference centers, 2005 to 2012. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2018;22:305–10. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.07.002>.
- 33 Bollela VR, Puga FG, Moya MJ, Andrea M, Oliveira M de LV. A decade trend of multidrug resistant tuberculosis in São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2016;58. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658077>.
- 34 Arroyo LH, Ramos ACV, Yamamura M, Berra TZ, Alves LS, Belchior ADS, *et al.* Predictive model of unfavorable outcomes for multidrug-resistant tuberculosis. *Rev Saúde Pública* 2019;53:77. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2019053001151>.
- 35 Melsew YA, Doan TN, Gambhir M, Cheng AC, McBryde E, Trauer JM. Risk factors for infectiousness of patients with tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect* 2018;146:345–53. <https://doi.org/10.1017/S0950268817003041>.
- 36 Thomas BE, Thiruvengadam K, S. R, Kadam D, Ovung S, Sivakumar S, *et al.* Smoking, alcohol use disorder and tuberculosis treatment outcomes: A dual co-morbidity burden that cannot be ignored. *PLoS ONE* 2019;14:e0220507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220507>.
- 37 Walker IF, Baral SC, Wei X, Huque R, Khan A, Walley J, *et al.* Multidrug-resistant tuberculosis treatment programmes insufficiently consider comorbid mental disorders. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2017 Jun 1;21(6):603-609. doi: 10.5588/ijtld.17.0135.
- 38 Reis-Santos B, Pellacani-Posses I, Macedo LR, Golub JE, Riley LW, Maciel EL. Directly observed therapy of tuberculosis in Brazil: associated determinants and impact on treatment outcome *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015 Oct;19(10):1188-93. doi: 10.5588/ijtld.14.0776.
- 39 Bammann RH, Zamarioli LA, Pinto VS, Vázquez CM, Litvoc MN, Klautau GB, *et al.* High prevalence of drug-resistant tuberculosis and other mycobacteria among HIV-infected patients in Brazil: a systematic review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105:838–41. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000600019>.
- 40 Bruchfeld J, Correia-Neves M, Källenius G. Tuberculosis and HIV Coinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5:a017871. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017871>.
- 41 Chem ED, Van Hout MC, Hope V. Treatment outcomes and antiretroviral uptake in multidrug-resistant tuberculosis and HIV co-infected patients in Sub Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* 2019;19:723. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4317-4>.

42 Hurtado RM, Meressa D, Goldfeld AE. Treatment of drug-resistant tuberculosis among people living with HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS* 2018;13:478–85. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000503>.

43 Santos ML, Coeli CM, Batista J d'Arc L, Braga MC, Albuquerque M de FPM de. Fatores associados à subnotificação de tuberculose com base no Sinan Aids e Sinan Tuberculose. *Rev Bras Epidemiol* 2018;21. <https://doi.org/10.1590/1980-549720180019>.

44 Bhering M, Duarte R, Kritski A. Predictive factors for unfavourable treatment in MDR-TB and XDR-TB patients in Rio de Janeiro State, Brazil, 2000-2016. *Plos ONE* 2019;14:e0218299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218299>.

45 Gallo JF, Pinhata JMW, Simonsen V, Galesi VMN, Ferrazoli L, Oliveira RS. Prevalence, associated factors, outcomes and transmission of extensively drug-resistant tuberculosis among multidrug-resistant tuberculosis patients in São Paulo, Brazil: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:889–95. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.015>.

46 Salvato RS, Schiefelbein S, Barcellos RB, Praetzel BM, Anusca IS, Esteves LS, *et al.* Molecular characterisation of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a high-burden tuberculosis state in Brazil. *Epidemiol Infect* 2019;147:e216. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001006>.

47 Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho W da S, Gomes HM, de Almeida IN, de Assis LJ, *et al.* Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. *BMC Infect Dis* 2015;15:306. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1057-y>.

48 Luiz RDSS, Suffys P, Barroso EC, Kerr LRFS, Duarte CR, Freitas MVC, *et al.* Genotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2013;17:338–45. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.019>.

49 Nogueira CL, Prim RI, Senna SG, Rovaris DB, Maurici R, Rossetti ML, *et al.* First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil. *Tuberculosis* 2016;97:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.12.005>.

50 Soares RO, Macedo MB de, von Groll A, Silva PEA da. *Mycobacterium tuberculosis* belonging to family LAM and sublineage RD Rio: common strains in Southern Brazil for over 10 years. *Brazilian Journal of Microbiology* 2013;44:1251–5. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000400032>.

51 Koro Koro F, Um Boock A, Kaiyven AL, Noeske J, Gutierrez C, Kuaban C, *et al.* Genetic Structure and Drug Susceptibility Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains

Responsible of Human Pulmonary Tuberculosis in the Major Rearing Region in Cameroon. *Biomed Res Int* 2016;2016:2904832. <https://doi.org/10.1155/2016/2904832>.

52 Duarte TA, Nery JS, Boechat N, Pereira SM, Simonsen V, Oliveira M, *et al.* A systematic review of East African-Indian family of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2017;21:317–24. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.01.005>.

53 Conceição EC, Refregier G, Gomes HM, Olessa-Daragon X, Coll F, Ratovonirina NH, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* lineage 1 genetic diversity in Pará, Brazil, suggests common ancestry with east-African isolates potentially linked to historical slave trade. *Infection, Genetics and Evolution* 2019;73:337–41. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.06.001>.

54 Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Thonnon J, Vincent V, Gutierrez MC. Molecular characteristics of strains of the cameroon family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:5029–35. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5029-5035.2004>.

Figures and legends:

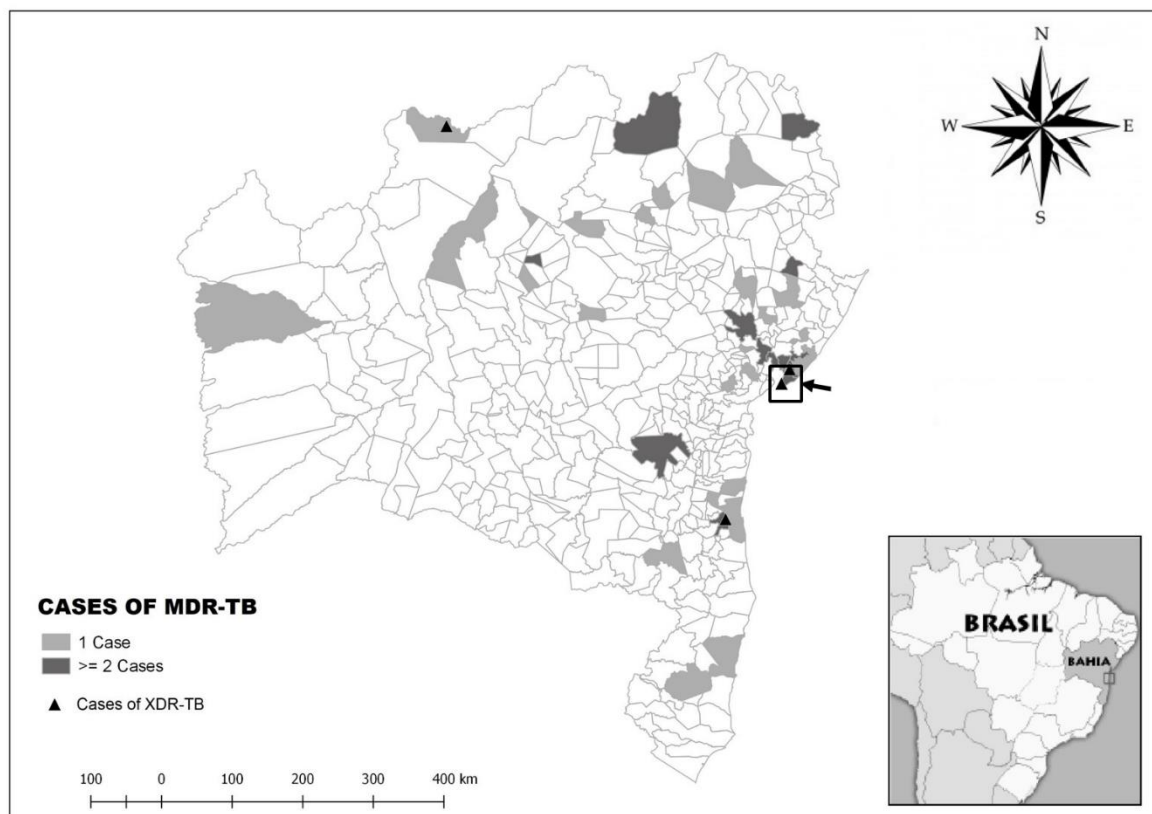


Figure 1: Geographic distribution of MDR-TB cases in Bahia, Brazil. The location of the state capital, Salvador, is indicated (box with arrow). Municipalities with one case are highlighted in light grey, while those with more than one case are highlighted in dark grey. Locations with XDR-TB cases are marked with a dark triangle.

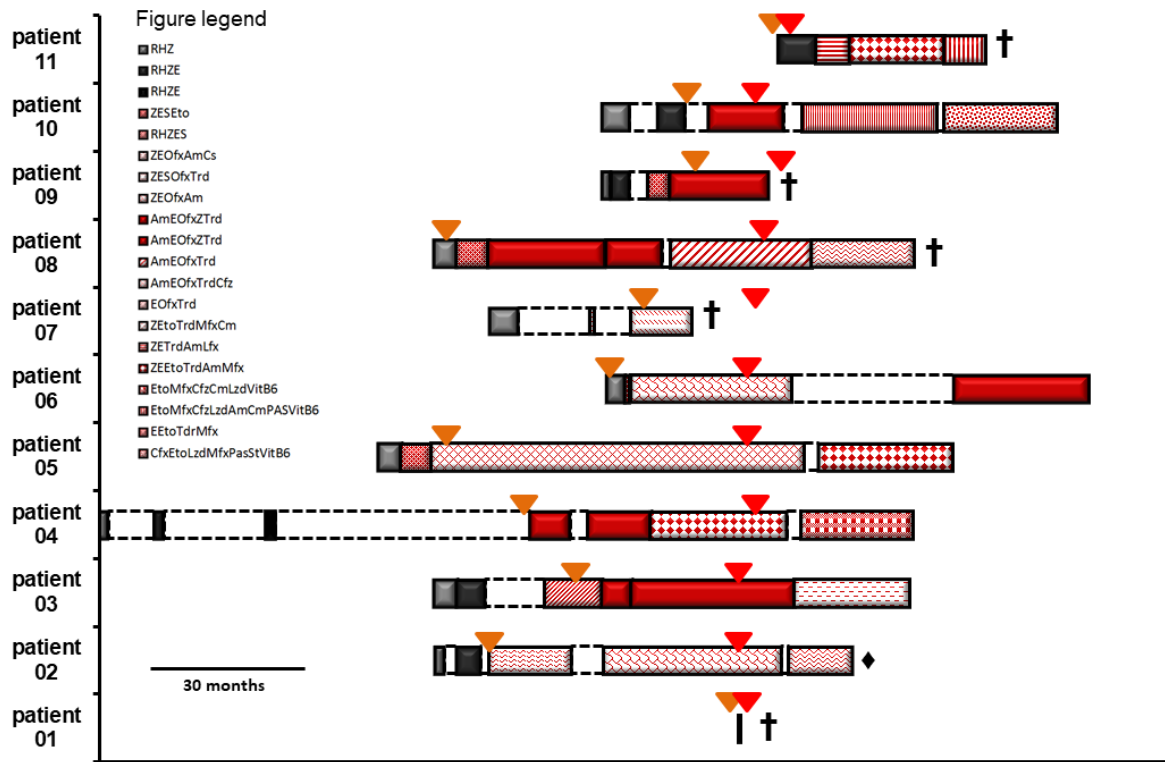


Figure 2: Treatment history of the XDR-TB patients from Salvador, Bahia, Brazil. Bars represent treatment duration for each of the 11 patients studied. The gray boxes represent treatment with first-line anti-TB drugs (light gray, RHZ; dark grey, RHZE), while the red boxes represent treatment with second-line anti-TB drugs (the solid red bar represents the current standard treatment for MDR-TB, personalized regimens are represented in different patterns - see figure legend). Clear boxes with interrupted outlines represent the time lag between two treatment regimens. The inverted yellow triangles represent the time of MDR-TB diagnosis, while the red ones represent the time of XDR-TB diagnosis (for some of the individuals, XDR-TB diagnosis was available only after patient death, which is represented by a black cross). The black diamond represents treatment default. R, rifampin; H, isoniazid; Z, pyrazinamide; E, ethambutol; S, streptomycin; Eto, ethionamide; Ofx, ofloxacin; Am, ampicillin; Cs, cycloserine; Trd, terizidone; Cfz, clofazimine; Mfx, moxifloxacin; Cm, capreomycin; Lfx, levofloxacin; Lzd, linezolid; VitB6, pyridoxine; PAS, paramino-salicylic acid.

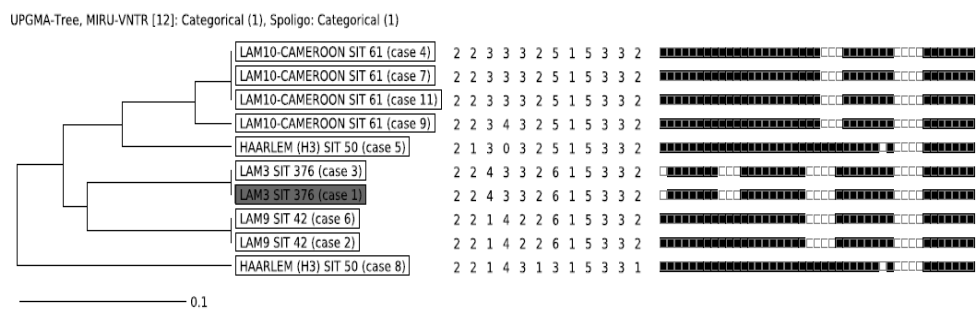


Figure 3: Spoligotype/MIRU-VNTR-based UPGMA dendrogram of the XDR-TB isolates from Salvador, Bahia, Brazil. The isolate from a primary XDR-TB patient is highlighted in grey.

4.2 ANÁLISE DE DISPERSÃO ESPACIAL E DESCRIÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS DOS ISOLADOS DE *M. tuberculosis* MULTIDROGA RESISTENTE (MDR) NA CIDADE DE SALVADOR, BAHIA, BRASIL (2008 A 2011)

No trabalho intitulado: “**Distribuição espacial e perfis genéticos dos isolados *M. tuberculosis* multidroga resistentes, circulantes em Salvador, Bahia, Brasil no período de 2008 a 2011**” foi realizado o georreferenciamento dos casos de TBMDR nos bairros de Salvador, Bahia. Os isolados de Mtb com múltipla resistência aos fármacos anti-TB coletados das amostras de escarro dos pacientes diagnosticados com TBMDR residentes em Salvador foram caracterizados por técnicas de genotipagem clássica e sequenciamento do genoma completo. O presente trabalho encontra-se na etapa de adequação às normas para submissão ao periódico PLOS ONE.

Distribuição espacial e perfis genéticos dos isolados *M. tuberculosis* multidroga resistentes, circulantes em Salvador, Bahia, Brasil no período de 2008 a 2011

Rita Terezinha de Oliveira Carneiro, Erivelton de Oliveira Sousa, Renato Barbosa Reis, Andrea Maurizio Cabibbe, Emilyn Costa Conceição, Karla Valeria Batista Lima, Marcio Santos da Natividade, Patricia Bartholomay, Mauricio Lima Barreto, Taane Clark, Eliana Dias Matos, Wildo Navegantes, Grant Hill-Cawthorne, Ricardo Soares Magalhães, Daniela Cirillo, Theolis Costa Barbosa Bessa

Distribuição espacial e perfis genéticos dos isolados *M. tuberculosis* multidroga resistentes, circulantes em Salvador, Bahia, Brasil no período de 2008 a 2011

Rita Terezinha de Oliveira Carneiro¹, Erivelton de Oliveira Sousa², Renato Barbosa Reis³, Andrea Maurizio Cabibbe⁴, Emilyn Costa Conceição⁵, Karla Valeria Batista Lima⁶, Marcio Santos da Natividade⁷, Patricia Bartholomay⁸, Mauricio Lima Barreto⁹, Taane Clark¹⁰, Eliana Dias Matos¹¹, Wildo Navegantes⁸, Grant Hill-Cawthorne¹², Ricardo Soares Magalhães¹³, Daniela Cirillo⁴, Theolis Costa Barbosa Bessa^{1,14*}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brazil.

²Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA), Salvador, Bahia, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Urbano, Universidade Salvador. Salvador, Bahia, Brasil.

⁴Emerging Bacterial Pathogens Unit, San Raffaele Scientific Institute. Milão, Itália.

⁵Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁶Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil.

⁷Universidade Federal da Bahia, Instituto de Saúde Coletiva, Salvador, Bahia, Brazil.

⁸Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

⁹Centro de Integração de Dados e Conhecimentos para Saúde, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brazil

¹⁰Department of Pathogen Molecular Biology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Inglaterra.

¹¹Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública, Faculdade de Medicina, Salvador, Bahia, Brasil

¹²Sydney School of Public Health, The University of Sydney. Sydney, Austrália.

¹³School of Veterinary Science Faculty of Science, The University of Queensland. Queensland, Austrália.

¹⁴Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: theolis@bahia.fiocruz.br (TB).

Resumo

Apesar de curável, a tuberculose (TB) foi confirmada como a principal causa de óbito por doença infectocontagiosa de único agente até o final de 2019. A ocorrência da TB está associada às condições de pobreza, e sua transmissibilidade tende a se intensificar em locais com precárias condições de ventilação e habitação. A capacidade de neutralizar os efeitos dos fármacos anti-TB, adquirida evolutivamente por linhagens de *M. tuberculosis* (Mtb) dificulta o enfretamento da doença. A tuberculose multidroga resistente (TBMDR), caracterizada pela infecção por linhagem de Mtb capaz de resistir concomitante aos efeitos da rifampicina e isoniazida, é a forma clínica com maior notificação mundial entre as diversas formas de TB resistente e está associada ao mau prognóstico da doença. A vigilância epidemiológica realizada por meio do georreferenciamento dos casos e pela caracterização genotípica dos isolados de Mtb configura-se como um elemento-chave em sua propagação, especialmente em locais onde se registra endemismo da doença. Historicamente a cidade de Salvador, capital do estado da Bahia, Brasil reporta alta carga de TB entre as demais capitais brasileiras. O objetivo foi avaliar a dispersão espacial e caracterizar genotipicamente os isolados de Mtb multidroga resistente (MDR) circulantes nos bairros de Salvador, Bahia, Brasil entre Janeiro de 2008 a Dezembro de 2011. Dados de latitude e longitude dos bairros das residências dos casos de TBMDR foram georreferenciados no programa QGIS (v 2.18). Amostras dos isolados de Mtb dos respectivos casos de TBMDR foram cedidas pela coleção de micobactéria resistente da Bahia, pertencente ao LACEN-BA. Os isolados foram genotipados por MIRU-VNTR (12 loci) e *spoligotyping*, posteriormente submetidos ao sequenciamento completo do genoma (Illumina) e analisados pela técnica de *core genome* MSLT (Ridom SeqShere). No período desse estudo foram notificados 130 casos de TBMDR em Salvador, concentrados em 9 bairros ($N \geq 6$ casos/bairro) na região periférica da cidade (Subúrbio Ferroviário e Centro Histórico). Em comum os referidos bairros foram caracterizados pela presença de “bolsões de pobreza”. Os casos TBMDR apresentaram dependência espacial nos bairros que reportam altas taxas de TB na cidade. 121 isolados (93%, $N=130$) apresentaram DNA de boa qualidade e foram sequenciados. Os isolados pertenciam predominantemente às famílias LAM e Haarlem e se evidenciou a presença de dois *clusters* genético (> 6 SNPs de diferença), os quais por sua vez não apresentaram dependência espacial nos bairros da cidade que apresentam alta carga de TB. Os resultados permitem inferir que entre 2008 a 2011 houve transmissão ativa de TBMDR na população de Salvador, Bahia.

Palavras-chave: Georreferenciamento; Tuberculose resistente; Vigilância epidemiológica.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) persiste como grave problema de saúde pública em esfera mundial. Em 2018, foram notificados 10,4 milhões de casos novos e 1,4 milhões de óbito em sua decorrência, confirmando a TB como a principal causa de óbito por doença infectocontagiosa de único agente até final do ano de 2019 ^[1].

A forma clínica de TB sensível ao tratamento é curável em mais de 80-90% dos casos. Em contrapartida a TB resistente configura-se como um dos grandes desafios no controle da doença em todo o mundo e apresenta percentuais de cura bastante reduzidos, principalmente em função do acúmulo sucessivo de mutações que interferem nos mecanismos de ação dos fármacos até então utilizados no tratamento da TB ^[1].

Tuberculose multidroga resistente (TBMDR) consiste na infecção por isolado de *M. tuberculosis* (Mtb) capaz de resistir à ação combinada de rifampicina (R) e isoniazida (H), principais fármacos empregados no esquema básico do tratamento contra a TB ^[2]. Portanto, o tratamento torna-se mais difícil, com o emprego de fármacos mais caros, menos eficazes e mais tóxicos, o que retarda e pode mesmo inviabilizar a cura da doença. Em 2018 foram oficialmente notificados 186.772 casos de TBMDR em todo o mundo ^[1]. Entre os casos supracitados foram confirmados a presença de isolados resistentes aos fármacos de segunda linha, o que por sua vez reduz as opções terapêuticas dos respectivos infectados ^[3].

Outro aspecto de grande preocupação consiste no fato de que a TBMDR pode ser transmitida para um indivíduo sem história prévia de TB facilitando ocorrência de surtos da doença. A vigilância dos casos atua como elemento-chave no controle da TBMDR, especialmente nas localidades onde a TB é endêmica. Essa vigilância compreende a investigação dos indivíduos na rede de contatos do paciente índice, e por análises de georreferenciamento que permitem descrever o padrão da distribuição espacial da doença, o que por sua vez direciona aplicação de recursos financeiros e ações de combate mais efetivas para os locais com maior concentração dos casos ^[4]. Ferramentas de genotipagem molecular são de grande auxílio para validar a ocorrência de possíveis surtos e compreender aspectos evolutivos, a ocorrência de introdução de linhagens, a reativação endêmica e para acompanhar linhagens de destacada virulência, por exemplo ^[5-7].

Oficialmente o Brasil reporta baixa carga de TB resistente, porém, a realização de testes de sensibilidade a fármacos (fenotípicos ou genotípicos) não ocorre uniformemente no país, e está bem aquém do preconizado nas diretrizes nacionais na maior parte do território brasileiro [8]. O país enfrenta dificuldades para caracterizar esses casos, sugerindo ocorrência de subnotificação [9]. Por outro lado, é importante reconhecer fatores que possam influenciar a concentração destes casos no território, considerando que os registros de TB são mais frequentes nos bairros periféricos da cidade e naqueles que apresentam bolsões de pobreza [10].

Salvador, capital do estado da Bahia é a 3ª capital mais populosa do Brasil responsável por 1.380 casos novos da doença em 2018. A cidade ocupa o 5º lugar entre as capitais brasileiras com maior incidência da TB [11]. Para levantar fatores possivelmente associados com o desenvolvimento e/ou transmissão da doença, analisamos a distribuição espacial e genotípica dos casos de TBMDR notificados em Salvador, Bahia-Brasil, no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2011, avaliando a sua relação com as informações epidemiológicas disponíveis e considerando a ocorrência de casos de TB por unidade do território.

MATERIAL E MÉTODO

Análise de dados epidemiológicos

As informações sobre o endereço da residência e local do provável contágio dos respectivos casos de TBMDR foram extraídas dos prontuários disponibilizados pelo Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM), único hospital referência no tratamento das formas especiais de TB no estado da Bahia.

Confirmação ou atualização das informações sobre residência dos casos foram realizadas pela análise dos dados no Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose (SITE-TB) <<http://sitetb.saude.gov.br/>>, sistema eletrônico utilizado pelo Ministério da Saúde do Brasil que reúne também informações sócio-demográficas e clínicas, tratamentos prévios, regime(s) terapêutico(s) empregados, co-morbidades e reações adversas aos medicamentos.

Análise da distribuição espacial dos casos TBMDR nos bairros de Salvador, Bahia

Dados de latitude e longitude das residências dos casos de TBMDR notificados em Salvador, Bahia no período desse estudo foram analisadas por meio da interpolação de pontos em malha digital da referida cidade, utilizando o software livre QGIS (v.2.18.14). A malha digital empregada nessa análise foi atualizada em 2018 pela Companhia de Desenvolvimento Urbano do Estado da Bahia (CONDER).

Os registros de TB e TBMDR por bairros de Salvador foram extraídos de boletins epidemiológicos divulgados anualmente pela Secretaria Municipal de Saúde (SMS). A taxa de TBMDR observada por bairro foi calculada para cada um dos anos nos quais os isolados foram coletados (*i.e.*: 2008 a 2011) e empregada na elaboração do mapa temático da cidade. Para cálculo dessa taxa foi adotado como numerador a frequência de casos prevalentes de TBMDR no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2011 e como denominador foi utilizada a frequência de casos prevalentes de TB nos respectivos bairros registrada no ano de 2010, quando houve maior notificação dos casos de TB na referida cidade.

A ocorrência de agrupamento espacial foi avaliada utilizando o software R (<https://cran.r-project.org/>), com o pacote GeoR, para construção de semivariogramas a partir das taxas esperadas (considerando a incidência de TBMDR no período) e observadas de TBMDR alinhadas com as coordenadas dos pontos médios, aqui consideradas para fins de delimitação espacial dos bairros.

Caracterização genotípica dos isolados MDR

A partir da amostra de escarro dos pacientes TBMDR notificados em Salvador, Bahia no período desse estudo foram obtidos isolados de *Mtb*, os quais constituem a coleção de micobactérias resistentes da Bahia, sob a curadoria do Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA). No período do estudo, o LACEN era o único laboratório responsável pelo diagnóstico da resistência a fármacos anti-TB de primeira linha no tratamento para a tuberculose em todo o estado baiano.

O DNA dos isolados supracitados foi extraído segundo protocolo de van Embden ^[12] e caracterizados genotipicamente pelas técnicas de *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats* (MIRU-VNTR) de 12 loci segundo protocolo de Supply

et al ^[13] e adaptações proposta por Beer et al ^[14]; e também pela técnica de *spoligotyping* conforme descrição de Kamerbeek et al ^[15] e Parwanti et al ^[16].

A genotipagem por VNTR-MIRU foi realizada utilizando mix de primers marcados com corantes fluorescentes bem como os primer não-marcados, que flanqueiam as regiões a serem amplificadas. A reação dessa PCR multiplex foi realizada com o kit de reagente da Qiagen HotstartTaq polymerase com solução Q (Quiagem[®]), além do LIZ1200 (GeneScanTM LIZ1200[®], Applied Biosystems) utilizado como marcador de peso molecular para verificar a separação dos *loci* amplificados em eletroforese capilar (EC), realizada em sequenciador automático (Analyser 3100, Applied Biosystems[®]) de 16 capilares (50cm).

Em seguida as amostras foram caracterizadas por *spoligotyping* utilizando membranas imobilizadas com 43 oligonucleotídeos (Isogen, Bioscience[®]), e reveladas com o kit Imobilion Western (Milipore[®]) utilizando filme autorradiográfico (Ortho, AGFA[®]). Os controles positivos na caracterização por *spoligotyping* foram as cepas *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* e para a genotipagem por MIRU-VNTR 12 loci a cepa BCG (Moreau-RJ) foi utilizada como controle positivo na verificação das ampliações.

Os padrões binários de *spoligotyping* de cada isolado foram submetidos a base de dados SITVIT2 <<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>> para identificação das suas respectivas famílias e subfamílias. Os números de repetições por locus obtidos a partir da genotipagem por MIRU-VNTR 12 loci foram associados aos padrões de *spoligotyping* para inferir o grau de semelhança entre os isolados por meio de um dendrograma, montado com base no algoritmo UPGMA utilizando a ferramenta *on line* MIRU-VNTR Plus disponível no site: <<https://www.miru-vntrplus.org>>.

Posteriormente as amostras foram tratadas com kit Nextera (Illumina[®]) conforme instrução do fabricante e submetidas ao sequenciamento de genoma completo utilizando o sequenciador Illumina (Illumina[®]) nas plataformas GAI e HiSeq 2000 usando reagentes do kit da MiSeq (Illumina[®]). O sequenciamento gerou sequências *paired-end* de 80 a 100pb, as quais foram analisadas na ferramenta *on line* FASTQC <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>.

Amostras que apresentaram um bom sequenciamento foram analisadas pela técnica de *core genome Multilocus Sequence Typing Scheme* (cgMSLT). Os arquivos FASTA dessas amostras, obtidos no sequenciamento, foram submetidos no software Ridon SeqShere⁺ para obtenção da árvore de máxima parcimônia, adotando o valor de *cutoff* ≥ 6 alelos diferentes ^[18].

Aspectos éticos da pesquisa

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ) sob o registro CAAE n°. 0006.0.225.000-11, e está em conformidade com a Resolução 196/96 ^[19] do Conselho Nacional de Saúde do Brasil (CNS), vigente no período de coleta dos dados, assim como com as diretrizes internacionais expressas na Declaração de Helsinque.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização sociodemográfica e descrição da taxa observada de TBMDR por bairros

No período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2011 foram notificados 130 casos de TBMDR em Salvador, Bahia distribuídos em 28 bairros da cidade. A taxa observada de TBMDR nesses bairros é representada no mapa temático ilustrado na Fig. 1A.

As maiores taxas de TBMDR ($N \Rightarrow 4$ casos observados/bairro) foram registradas em 9 bairros periféricos localizados nas porções noroeste e norte de Salvador (Tabela 1), e que constituem as regiões conhecidas como Subúrbio Ferroviário e Centro Histórico respectivamente. A distribuição espacial dos casos aqui observada é semelhantemente descrita pelo estudo de georreferenciamento de TB realizado anteriormente na cidade ^[10].

A região do Subúrbio Ferroviário, que concentrou a maioria dos bairros com maior taxa de TBMDR (56%, $N=5/9$) é constituída por 22 bairros populares criados de forma desordenada e sem planejamento a partir da década de 60 ^[20]. O semivariograma elaborado para fins de identificar dependência espacial ilustrado na Fig. 1B revela presença de agrupamento de casos TBMDR numa distância de 1,5Km, confirmando que locais populosos e/ou com precárias condições de habitação concentram isolados Mtb, de modo a favorecer sua propagação entre indivíduos que compartilham o mesmo ambiente ^[10].

Destacamos que as taxas observadas nos bairros de IAPI e do Pau Miúdo (ambos com N=> 6 casos observados/bairro) estejam enviesadas, considerando que a concentração desses casos podem estar relacionada à fixação residencial dos pacientes nas proximidades no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM) onde se encontra o ambulatório de referência para o tratamento da TBMDR no estado da Bahia [21].

Análise dos dados socioeconômicos revelou que as populações residentes nos bairros com maiores taxas de TBMDR possuem renda familiar mensal de até 2 salários-mínimos e/ou dependem dos programas governamentais de auxílio financeiro. Resultado equivalente aos demais estudos de base nacional e que reforçam o caráter social da doença [10, 22, 23]. Programas sociais (Bolsa Família por exemplo) tem contribuído para minimizar o impacto negativo do déficit financeiro desses pacientes durante o tratamento da doença [22]. Todavia, a erradicação da TB depende de mudanças mais profundas capazes de ofertar equidade de renda e educação para a população [24]. As dificuldades financeiras enfrentadas pelos pacientes com TB também é descrita como fator que contribuir para a não adesão ao tratamento anti-TB, o que por sua vez favorece a seleção e fixação dos isolados resistentes [25, 26].

Caracterização genotípica dos isolados Mtb

Dos 130 isolados de Mtb obtidos dos respectivos casos de TBMDR registrados em Salvador no período do estudo, apenas 9 (7%, N=130) não tiveram DNA de boa qualidade, portanto, não foram caracterizados genotipicamente.

Os isolados de Mtb com múltipla resistência (MDR) aos fármacos anti-TB pertencem predominantemente às famílias/subfamílias: LAM9 (N=24/121); H3 (N=18/121) e LAM10-Cameroon (N=15/121). Os percentuais de isolados pertencentes a cada família/subfamília e seus respectivos perfis de identificação por *spoligotyping* e MIRU-12 estão descritos na Tabela 2.

As proporções das famílias/subfamílias observadas nesse estudo são similares aos estudos de base nacional destinados a descreveram a distribuição de isolados MDR no Brasil. Os resultados desses estudos também confirmam prevalência das famílias LAM e Haarlem no território brasileiro [27-30]. O dendograma gerado a partir da análise de similaridade entre os padrões de

spoligotyping e MIRU-VNTR (Figura 2) evidencia o agrupamento entre todos os isolados obtidos nesse estudo.

Isolados da família LAM apresentam ampla dispersão e capacidade de adaptação no continente americano, justificando sua prevalência entre as demais famílias [17, 31]. A introdução dos isolados da família Harleem no nordeste brasileiro ocorreu no século 17, durante a colonização holandesa e persiste na população até os dias atuais devido as estratégias de adaptação desenvolvidas (fenômeno de simpatria) [29, 32]. As famílias LAM e Haarlem estão inseridas na linhagem 4 do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB), e são caracterizadas por sua grande habilidade de dispersão continental e alta virulência. A presença desses isolados é comumente relatada em surtos mundiais de TB resistente, evidenciando sua capacidade de adquirir resistência aos fármacos anti-TB [33, 34].

Em particular, destacamos a elevada prevalência de isolados da subfamília LAM10-Cameroon em relação a outros estudos conduzidos no Brasil [35, 36]. Na literatura essa subfamília está associada à deleção no gene DpB1 e à presença de sequências IS6110 nas *open reading frame* (ORFs) de importantes enzimas, como adenilato ciclase e fosfolipase C, as quais respectivamente modulam o metabolismo energético e o comportamento virulento dessas linhagens [37]. LAM10-Cameroon é descrita como prevalente da África e responsável por surtos de TB resistente nesse continente [38].

No contexto evolutivo de *Mtb* é possível ocorrer variações entre determinados isolados que se mantem e são propagadas ao longo da gerações por meio da expansão clonal, caracterizando o fenômeno de convergência evolutiva [39, 40]. A genotipagem clássica é limitada para avaliar a similaridade genética entre isolados de *Mtb*, porém a técnica de *core genome* MLST apresenta resultados mais confiáveis para a identificação de transmissão da TB [18], e foram os resultados dessa análise que identificou a presença de dois grupamentos de isolados com baixa divergência genética (diferença de no máximo 6 SNPs), conforme ilustrado no dendrograma da Figura 3.

Os grupos genéticos mencionados acima estão identificados como *clusters* 1 e 3. O agrupamento 1 é constituído por 15 isolados, sendo que 11 (73%, N= 15) desses isolados pertencem à subfamília LAM10-Cameroon, enquanto o *cluster* 3 é formado por 6 isolados da subfamília LAM3. Estudos anteriores revelam fenômenos de transmissão ativa de TBMDR a

partir de isolados de LAM e Harleem ocorridos na Bahia e em outros estados do Nordeste brasileiro ^[29]. A distribuição espacial dos grupos genéticos não apresentou dependência espacial com os bairros de Salvador (Figura 4), o que reforça a hipótese de transmissão ativa de TBMDR na cidade de Salvador no período de 2008 a 2011.

Chamamos a atenção sobre o fato de os três grupamentos mais prevalentes (*i.e.*: LAM 9; Haarlem 3, LAM-Cameroon) ultrapassarem a metade dos casos de TBMDR avaliados neste estudo, sugerindo duas possíveis justificativas: *i)* ocorrência de transmissão ativa ou *ii)* *fitness* biológico favorável ao desenvolvimento de resistência aos fármacos entre os isolados destes grupos genéticos.

Ressaltamos a presença de 14 casos (8%, N=130) descritos nos prontuários como contágio intradomiciliar. Além disso, as informações epidemiológicas disponíveis possibilitam presumir oito outros contatos intradomiciliar, sugerido pelo grau de parentesco entre: caso 39 que era filho do caso 221 e cunhado do caso 104, contágio sugerido também pelo fato de todos esses casos apresentaram infecção por isolados da subfamília LAM10-Cameroon. O caso 112 era filha do caso 221, irmã do caso 39 e casada com caso 221 e apresentaram infecção por LAM9. O contágio intradomiciliar impacta em menor grau na transmissão da TB no Brasil e na América Latina, não ultrapassando 10% de todos os casos de transmissão ativa analisados ^[41]. Ainda assim, esta forma de contágio exerce um poder adicional na transmissão da doença, reforçando a importância dos comunicantes e os riscos sob os quais estão expostos ^[42].

Entre todos casos TBMDR confirmados em Salvador no período de estudo, pelo menos 3 (2%, N=130) tiveram confirmação de passagem pelo sistema prisional, cuja infraestrutura favorece a rápida disseminação e concentração de TB ^[43]. No entanto, informamos sobre uma possível ocorrência de subnotificação nos dados dessa natureza, haja vista que na grande maioria dos prontuários e fichas dos casos de TBMDR (97%, N=110/130) o dado sobre o provável local de contágio constavam a informação “ignorado”. A não completude das informações em fichas e prontuários de pacientes já tinha sido relatada em estudos anteriores revelando a má qualidade na produção de dados sobre a TB no estado e suas consequências no direcionamento de ações mais incisivas para o controle e a erradicação da doença ^[44].

CONCLUSÃO

Os casos de TB continuam a se concentrar em bairros periféricos de Salvador, caracterizados por bolsões de pobreza. A presença de *clusters* genéticos entre os isolados de Mtb, os quais não apresentaram dependência espacial com os bairros da cidade com maiores taxas da doença sugere fortemente a ocorrência de transmissão ativa de TBMDR entre os anos de 2008 a 2011. Os dados aqui encontrados reforçam a necessidade de avaliar melhor a transmissão primária da TB em Salvador, Bahia, Brasil e da promoção de ações de controle e prevenção da doença de forma direcionada para os bairros que já registram alta carga de TB.

Agradecimentos.

Miguel Viveiros, Unidade de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisbon, Portugal

Referências

1. World Health Organization. WHO | Global tuberculosis report 2019 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2019 [cited 2019 Dec 12]. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Plan to combat extensively drug-resistant tuberculosis: recommendations of the Federal Tuberculosis Task Force. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep* 2009;58(RR-3):1–43.
3. Conradie F, Diacon AH, Ngubane N, Howell P, Everitt D, Crook AM, et al. Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. *N Engl J Med* [Internet] 2020 [cited 2020 Mar 6];382(10):893–902. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1901814>
4. Shaweno D, Karmakar M, Alene KA, Ragonnet R, Clements AC, Trauer JM, et al. Methods used in the spatial analysis of tuberculosis epidemiology: a systematic review. *BMC Med* [Internet] 2018 [cited 2020 Feb 18];16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6193308/>
5. Conceição EC, Refregier G, Gomes HM, Olessa-Daragon X, Coll F, Ratovonirina NH, 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* [Internet] 2019 [cited 2020 Jan 30]; 73:337–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134819301030>
6. Dalla Costa ER, Lazzarini LCO, Perizzolo PF, Diaz CA, Spies FS, Costa LL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* of the RDRio Genotype Is the Predominant Cause of Tuberculosis and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *J Clin Microbiol* [Internet] 2013 [cited 2020 Mar 6];51(4):1071–7. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01511-12>

7. Kühnert D, Coscolla M, Brites D, Stucki D, Metcalfe J, Fenner L, et al. Tuberculosis outbreak investigation using phylodynamic analysis. *Epidemics* [Internet] 2018 [cited 2020 Mar 6]; 25:47–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6227250/>
8. BRASIL, B. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 2019; 366. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf
9. Bartholomay P, Pinheiro RS, Pelissari DM, Arakaki-Sanchez D, Dockhorn F, Rocha JL, et al. Special Tuberculosis Treatment Information System (SITE-TB) in Brazil: background, description and perspectives. *Epidemiol E Serv Saude Rev Sist Unico Saude Bras* 2019;28(2):e2018158.
10. Erazo C, Pereira SM, Costa M da CN, Evangelista-Filho D, Braga JU, Barreto ML. Tuberculosis and living conditions in Salvador, Brazil: a spatial analysis. *Rev Panam Salud Publica Pan Am J Public Health* 2014;36(1):24–30.
11. BRASIL. Boletim Epidemiológico Tuberculose - Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença. 2019;
12. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):406–9.
13. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome: Tandem repeat variability in mycobacteria. *Mol Microbiol* [Internet] 2002 [cited 2020 Jan 22];36(3):762–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x>
14. de Beer J, Ködmön C, Van Ingen J, Supply P, D van, Jamieson F, et al. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* 2014; 18:594–600.
15. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35(4):907–14.
16. Parwati I, Crevel R van, Soolingen D van, Zanden A van der. Application of Spoligotyping to Noncultured *Mycobacterium tuberculosis* Bacteria Requires an Optimized Approach. *J Clin Microbiol* [Internet] 2003 [cited 2020 Mar 6];41(11):5350–1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC262530/>
17. Phelan JE, Coll F, Bergval I, Anthony RM, Warren R, Sampson SL, et al. Recombination in *pe/ppe* genes contributes to genetic variation in *Mycobacterium tuberculosis* lineages. *BMC Genomics* [Internet] 2016 [cited 2020 Mar 6];17(1):151. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2467-y>

18. Kohl TA, Diel R, Harmsen D, Rothganger J, Walter KM, Merker M, et al. Whole-Genome-Based *Mycobacterium tuberculosis* Surveillance: a Standardized, Portable, and Expandable Approach. *J Clin Microbiol* [Internet] 2014 [cited 2020 Mar 6];52(7):2479–86. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00567-14>
19. Brasil. Resolução 196/96 [Internet]. 1996 [cited 2019 Dec 13]; Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/1996/res0196_10_10_1996.html
20. Soares AM de C. “TERRITORIALIZAÇÃO” E POBREZA EM SALVADOR – BA. *Estud Geográficos Rev Eletrônica Geogr* [Internet] 2006 [cited 2020 Mar 6];4(2):17–30. Available from: <https://www.periodicos.rc.biblioteca.unesp.br/index.php/estgeo/article/view/202>
21. Souza MSPL, Aquino R, Pereira SM, Costa M da CN, Barreto ML, Natividade M, et al. Fatores associados ao acesso geográfico aos serviços de saúde por pessoas com tuberculose em três capitais do Nordeste brasileiro. *Cad Saúde Pública* [Internet] 2015 [cited 2020 Jan 28];31(1):111–20. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2015000100111&lng=pt&tlng=pt
22. Andrade KVF de, Nery JS, Araújo GS de, Barreto ML, Pereira SM. Associação entre desfecho do tratamento, características sociodemográficas e benefícios sociais recebidos por indivíduos com tuberculose em Salvador, Bahia, 2014-2016*. *Epidemiol E Serviços Saúde* [Internet] 2019 [cited 2020 Jan 28];28(2). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222019000200305&lng=pt&nrm=isso
23. Santos E, Pinho JAG, Moraes LRS, Fisher T. *Caminho das Águas em Salvador: Bacias Hidrográficas*. Universidade Federal da Bahia. Escola de Administração da UFBA. Centro Interdisciplinar de Desenvolvimento e Gestão Social – CIAGS-EA/UFBA. Salvador - BA. 2010.
24. Gomes MGM, Barreto ML, Glaziou P, Medley GF, Rodrigues LC, Wallinga J, et al. End TB strategy: the need to reduce risk inequalities. *BMC Infect Dis* 2016; 16:132.
25. Alipanah N, Jarlsberg L, Miller C, Linh NN, Falzon D, Jaramillo E, et al. Adherence interventions and outcomes of tuberculosis treatment: A systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *PLoS Med* [Internet] 2018 [cited 2020 Jan 27];15(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6029765/>
26. Xavier MIM, Barreto ML. Tuberculosis in Salvador, Bahia, Brazil, in the 1990s. *Cad Saúde Pública* [Internet] 2007 [cited 2020 Jan 28];23(2):445–53. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-311X2007000200021&lng=en&nrm=iso&tlng=en
27. Machado LNC, Marcondes NR, Leite CQF, Santos ACB, Pavan FR, Baldin VP, et al. First Baseline of Circulating Genotypic Lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in Patients from the Brazilian Borders with Argentina and Paraguay. *PLOS ONE* [Internet] 2014 [cited 2019 Dec 13];9(9):e107106. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0107106>

28. Nogueira CL, Prim RI, Senna SG, Rovaris DB, Maurici R, Rossetti ML, et al. First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil. *Tuberculosis* [Internet] 2016 [cited 2020 Jan 22]; 97:57–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979215301761>
29. Luiz RDSS, Suffys P, Barroso EC, Kerr LRFS, Duarte CR, Freitas MVC, et al. Genotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis* 2013;17(3):338–45.
30. Mendes NH, Melo FA, Santos AC, Pandolfi JR, Almeida EA, Cardoso RF, et al. Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil. *BMC Res Notes* [Internet] 2011 [cited 2019 Dec 13];4(1):269. Available from: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-269>
31. Lagos J, Couvin D, Arata L, Tognarelli J, Aguayo C, Leiva T, et al. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Genotypic Lineage Distribution in Chile and Neighboring Countries. *PLOS ONE* [Internet] 2016 [cited 2020 Mar 6];11(8):e0160434. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0160434>
32. Comas I, Hailu E, Kiros T, Bekele S, Mekonnen W, Gumi B, et al. Population Genomics of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia Contradicts the Virgin Soil Hypothesis for Human Tuberculosis in Sub-Saharan Africa. *Curr Biol* [Internet] 2015 [cited 2020 Jan 30];25(24):3260–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4691238/>
33. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol* [Internet] 2014 [cited 2020 Jan 29];26(6):431–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4314449/>
34. Nguyen QH, Contamin L, Nguyen TVA, Bañuls A. Insights into the processes that drive the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Evol Appl* [Internet] 2018 [cited 2020 Jan 28];11(9):1498–511. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6183457/>
35. Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho W da S, Gomes HM, de Almeida IN, de Assis LJ, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. *BMC Infect Dis* 2015; 15:306.
36. Soares RO, Macedo MB de von Groll A, Silva PEA da. *Mycobacterium tuberculosis* belonging to family LAM and sublineage RD Rio: common strains in Southern Brazil for over 10 years. *Braz J Microbiol* [Internet] 2013 [cited 2020 Feb 14];44(4):1251–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1517-83822013000400032&lng=en&nrm=iso&tlng=en
37. Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Thonnon J, Vincent V, Gutierrez MC. Molecular characteristics of strains of the cameroon family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):5029–35.

38. Koro Koro F, Um Boock A, Kaiyven AL, Noeske J, Gutierrez C, Kuaban C, et al. Genetic Structure and Drug Susceptibility Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains Responsible of Human Pulmonary Tuberculosis in the Major Rearing Region in Cameroon. *BioMed Res Int* 2016; 2016:2904832.
39. Chen Y-Y, Chang J-R, Huang W-F, Hsu C-H, Cheng H-Y, Sun J-R, et al. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* East African–Indian family in three tropical Asian countries. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet] 2017 [cited 2020 Jan 30];50(6):886–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118215009093>
40. Walker IF, Baral SC, Wei X, Huque R, Khan A, Walley J, et al. Multidrug-resistant tuberculosis treatment programmes insufficiently consider comorbid mental disorders. :8.
41. Leonor Noia Maciel E, Maia Martins Sales C. A vigilância epidemiológica da tuberculose no Brasil: como é possível avançar mais? *Epidemiol E Serviços Saúde* [Internet] 2016 [cited 2020 Feb 28];25(1):1–10. Available from: http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000100018&scielo=S2237-96222016000100175
42. Classen C, Warren R, Richardson M, Hauman J, Gie R, Ellis J, et al. Impact of social interactions in the community on the transmission of tuberculosis in a high incidence area. *Thorax* [Internet] 1999 [cited 2020 Mar 6];54(2):136–40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1745413/>
43. Moreira TR, Lemos AC, Colodette RM, Gomes AP, Batista RS. Prevalência de tuberculose na população privada de liberdade: revisão sistemática e metanálise. *Rev Panam Salud Pública* [Internet] 2019 [cited 2020 Jan 27];43. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6393725/>
44. Lírio M, Santos NP dos, Passos LAR, Kritski A, Galvão-Castro B, Grassi MFR. Completeness of tuberculosis reporting forms for disease control in individuals with HIV/AIDS in priority cities of Bahia state. *Ciênc Saúde Coletiva* [Internet] 2015 [cited 2020 Feb 4];20(4):1143–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232015000401143&lng=en&tlng=en

Tabelas e figuras e suas legendas

Tabela 1: Caracterização dos bairros de Salvador, Bahia com maior concentração de casos TBMDR.

Nome do bairro	Taxa de TBMR^a	Latitude^b	Longitude^b	Área (Km²)^b	População^{b,c}
IAPI	12,1	-12.957	-38.487	0,98	2.613,4
Centro Histórico	10,4	-12.975	-38.513	0,38	270,700
Pau Miúdo	8,54	-12.960	-38.482	0,70	2.021,1
Praia Grande	8,35	-12.874	-38.475	0,39	624,4
Boa Viagem	6,96	-12.933	-38.510	0,23	302,6
Comércio	6,96	-12.967	-38.509	1,39	34,5
Roma	5,22	-12.934	-38.503	0,26	348,6
Vale das Pedrinhas	4,64	-13.006	-38.482	0,15	682,4
Jaguaribe	4,18	-12.905	-38.405	1,3	581,8

^aObtida pela razão de casos TBMDR esperados/observados no ano de 2010; ^bDados atualizados em 2018 e gentilmente fornecidos pela Companhia de Desenvolvimento Urbano do Estado da Bahia (CONDER); ^cmil habitantes.

Tabela 2: Dados de genotipagem clássica dos isolados de Mtb circulantes em Salvador, Bahia, Brazil (2008-2011).

Família e subfamília	SIT	Número Octal	Padrão de MIRU	% de isolados (N)
LAM9	42	777777607760771	221422615332	20 (24)
LAM10-CAMEROON	61	777777743760771	223432515332	12 (15)
LAM3	376	376177607760771	224332615332	11 (13)
LAM1	33	776177607760771	224422515331	9,0 (11)
Outras subfamilias LAM	20	677777607760771	221412615232	6 (7)
H3	----	----	----	5 (6)
T1	50	777777777720771	213532515332	14,8 (18)
U	159	777740017760771	122432615322	9,0 (11)
X	534	777777607400000	222431614322	4 (5)
Outras famílias	119	777776777760771	225422515331	2 (2)
	----	----	----	7,4 (9)

LAM, Latin American-Mediterranean; H, Haarlem

Figura 1: Distribuição espacial (A) dos casos de TBMDR nos bairros de Salvador, Bahia, Brasil notificados entre 2008 a 2011 e semivariograma (B) evidenciando dependência espacial desses casos numa distância máxima de 1,5 Km entre eles. O símbolo de cruz em amarelo representa a localização do Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM). A quebra na graduação das cores representativas para a escala dos casos observados e esperado de casos TBMDR destina-se a maior destaque para as localidades com alta taxa da doença.

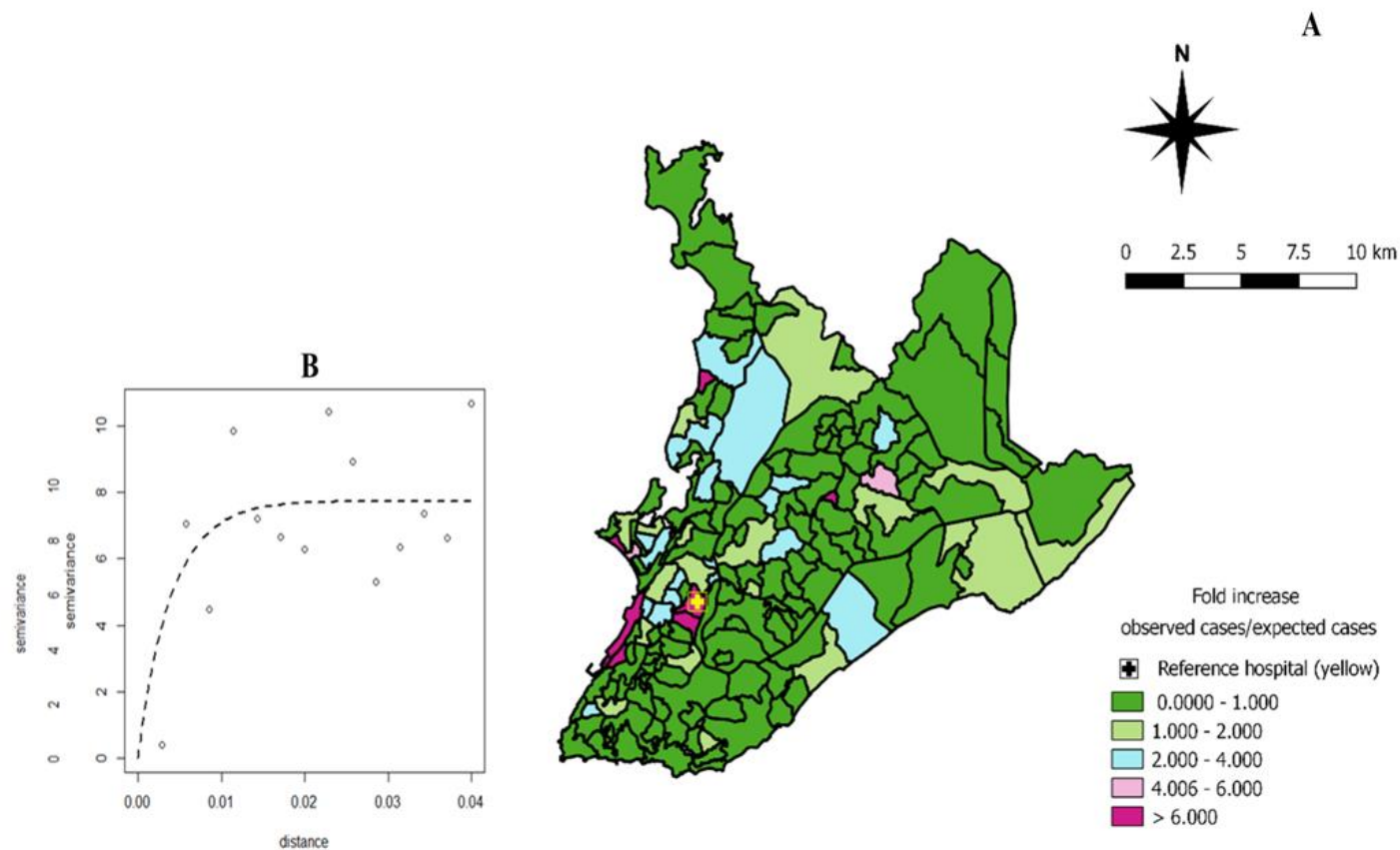


Figura 3: Árvore de máxima parcimônia entre os isolados MDR circulantes em Salvador, Bahia (2008 a 2011) evidenciando formação de *clusters* genéticos entre os isolados que apresentam menor diferenças de SNPs entre eles (*cutoff* ≥ 6). As setas verde e marrom indicam respectivamente os *clusters* 1 e 3 caracterizados nesse trabalho. Os círculos nas extremidades da linha identificam as amostras e os pontos no meio das linhas que unem os agrupamentos indicam a quantidade de SNPs diferentes entre os isolados inclusos em cada agrupamento.

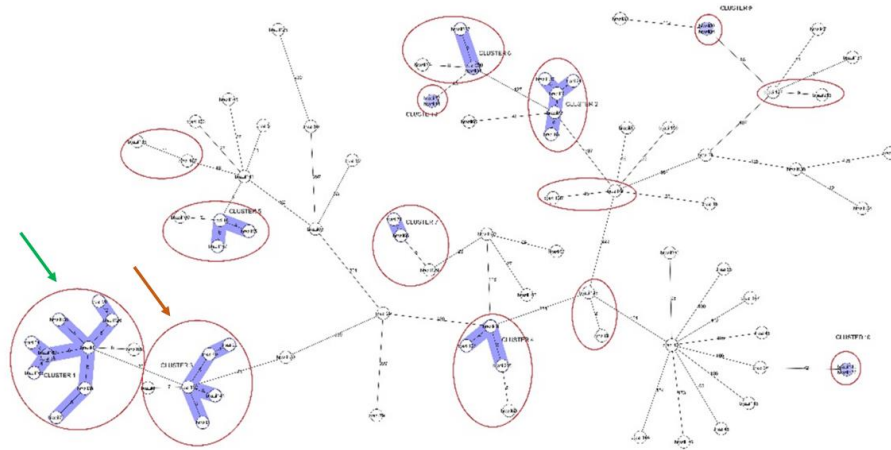
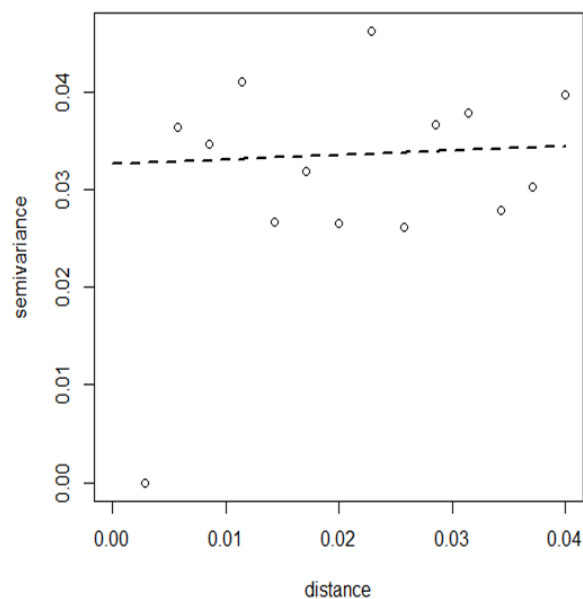


Figura 4: Semivariograma elaborado a partir da localização dos *clusters* genéticos nos bairros de Salvador, Bahia. A linha tracejada evidencia a não dependência espacial desses *clusters* independentemente da distância na qual os respectivos isolados de Mtb que compõem esses agrupamentos foram localizados na referida cidade.



4.3 ANÁLISE DAS ANOTAÇÕES GENÔMICAS DOS ISOLADOS MULTIDROGA RESISTENTES (MDR) E EXTENSIVAMENTE RESISTENTE (XDR) AOS FÁRMACOS ANTI-TB CIRCULANTES NO ESTADO DA BAHIA E NA CIDADE DE SALVADOR, ENTRE 2008 A 2011

Uma terceira fase do trabalho está prevista para ser desenvolvida no curso do pós-doutoramento, e consiste na análise das anotações genômicas presente nos isolados MDR e XDR circulantes no grupo populacional estudado, por meio do sequenciamento completo dos seus respectivos genomas (*Whole Genome Sequencing* – WGS). Nossa perspectiva é identificar mutações compensatórias e/ou evidenciar o fenômeno de epistasia nesses isolados.

Uma etapa prévia na metodologia foi executada e juntamente com os resultados obtidos estão descritos a seguir.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 SEQUENCIAMENTO GÊNICO

O sequenciamento completo do genoma de *Mtb* foi realizado com 92 isolados obtidos no estudo, cujas amostras foram alíquotadas e enviadas ao *London School of Hygiene & Tropical Medicine* (LSHTM), onde foram tratadas com kit Nextera (Illumina®) conforme instrução do fabricante e submetidas ao sequenciamento de genoma completo utilizando o sequenciador Illumina (Illumina®) nas plataformas GAI e HiSeq 2000 usando reagentes do kit da MiSeq (Illumina®).

1.2 ANÁLISE E TRIMAGEM DOS *READS*

As sequências *paired-end* geradas no sequenciamento foram baixadas em servidor ssh -X bioinfoserver3@bioinfo03.bahia.fiocruz.br, disponibilizado pelo Instituto Gonçalo Moniz, e analisadas e corrigidas.

Para análise de qualidade os 184 arquivos FASTA (sequências *forward* e *reverse* das 92 amostras) foram submetidos à ferramenta FASTQC, usando a seguinte linha de comando: <sudo fastqc -t 25 --noextract -o qualidade>. Essa análise nos possibilitou verificar a qualidade do sequenciamento das amostras, e aquelas que apresentaram um *score* de qualidade menor ou igual a 20phred foram submetidas à trimagem para remoção de eventuais sequências técnicas e/ou nucleotídeos mal identificados. As triplicadas dessas amostras foram identificadas conforme a descrição na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1: Identificação das triplicadas das amostras testes.

Identificação da amostra	Composição dos <i>reads</i>
[Id da amostra]_ não_trimado	Sequências individuais R1 e R2, sem trimagem
[Id da amostra]_ trimado_pareado	Sequência R1 e R2 (<i>paired-end</i>), pós trimagem
[Id da amostra]_ trimado	Sequências R1 + R2 (<i>paired-end</i>) e R1 + R2 (<i>single-end</i>), pós trimagem

O passo seguinte foi a realização da trimagem pelo programa Trimmomatic (BOLGER, 2014), cujos parâmetros adotados estão descritos na linha de comando que segue: <java -jar /home/bioinfoserver3/Downloads/Trimmomatic/Trimmomatic-0.36/trimmomatic-0.36.jar PE -threads 20 -phred33 /home/theolis/data_upload/ [id da amostra] TRAILING:4 SLIDINGWINDOW:5:15 MINLEN:80>.

1.3 MONTAGEM DOS *CONTIGS*

1.3.1 MONTAGEM “DE NOVO ASSEMBLER”

A montagem dos *contigs* para cada amostra foi realizada em 2 diferentes montadores, conforme metodologia adotada por Phelan e colaboradores (2016). No montador AbySS (JACKMAN et al., 2014) foi utilizado a linha de comando: <abyss-pe name=mtuberculosis k=64 in='reads1.fa reads2.fa>, conforme orientação de Jackman e Raymond (2014). No SPAdes (NURK et al., 2012) foi empregada a linha de comando conforme descrito no manual: <spades.py [options] -o <output_dir>, para essa análise foi adotado o intervalo de 49, 55 para os valores de kmer.

Posteriormente, os arquivos FASTA dos *contigs* gerados em ambos os montadores foram submetidos à análise qualitativa na ferramenta de bioinformática QUAST v. 4.3, pela linha de comando: <python quast.py [options] <contig_files> conforme recomendação descrita no manual do programa, utilizando genoma H37Rv como referência para montagem.

1.3.2 MONTAGEM POR REFERÊNCIA

A montagem dos *contigs/scaffolds* por referência será realizada a partir do genoma H37Rv disponível em banco de dados pelo número de acesso: NCBI: ALI123456.3.

2 RESULTADOS ALCANÇADOS

A análise qualitativa dos 92 pares dos arquivos FASTA (R1 e R2) realizada pelo FASTQc, possibilitou identificar que 39 desses pares (42%) apresentaram tamanhos diferentes entre si, sugerindo que os mesmos foram submetidos à uma análise prévia. As sequências R1 dos 39 pares de sequências apresentaram *score* de qualidade na faixa do 20 phred, como evidenciado na Figura 1, a seguir. E, portanto, foram submetidos ao corte pelo Trimmomatic.

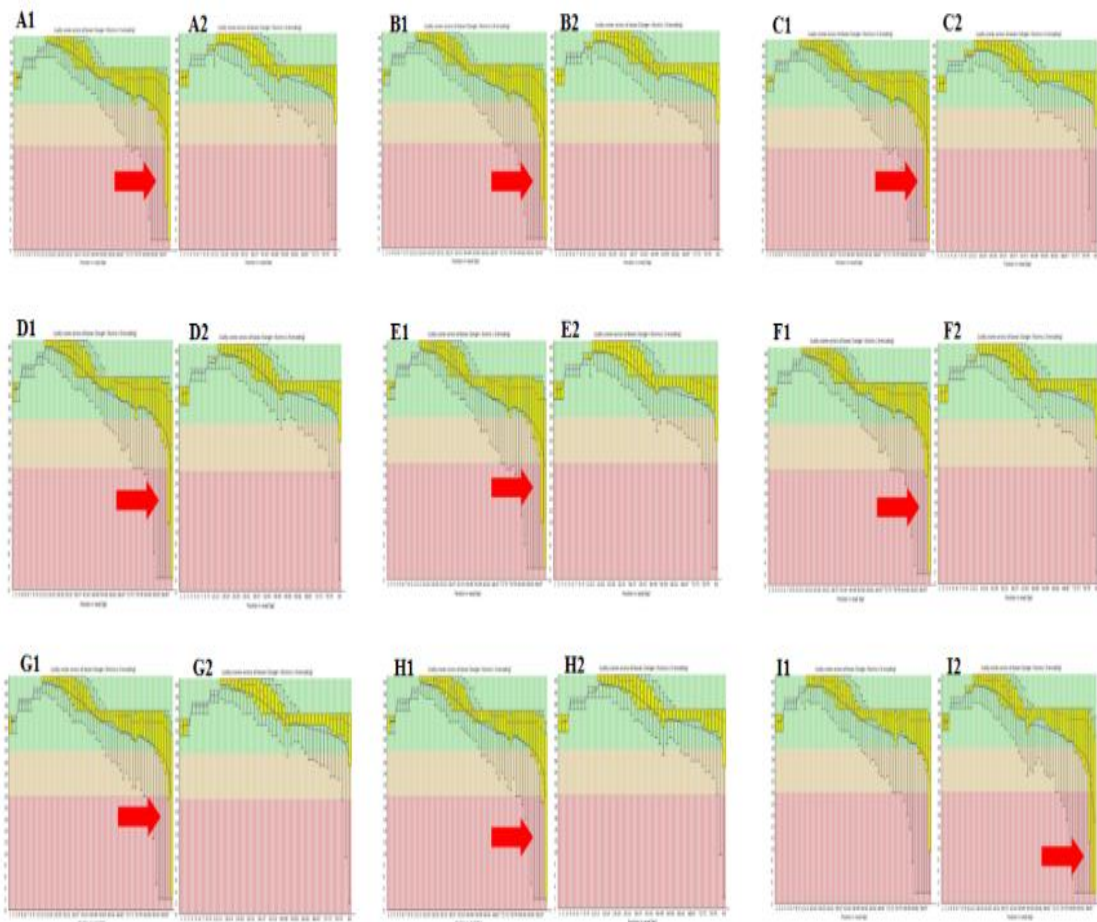


Figura 1: Blox plot referentes à qualidade do sequenciamento dos *reads* das amostras testes antes da trimagem. As imagens identificadas com 1 e 2 correspondem respectivamente às sequências R1 e R2 de cada uma das amostras-testes avaliadas, enquanto a seta vermelha indica a posição e presença de pareamento de bases com baixa qualidade. A = brazil3_AACGTGAT; B = brazil5_AAACATCG; C = brazil6_ATGCCTAA; D = brazil13_ACCACTGT; E = brazil15_ACATTGGC; F = brazil17_CAGATCTG; G = brazil19_CATCAAGT; H = brazil20_AAGGTACA e I = brazil107_CCGTGAGA.

Após a trimagem das amostras testes foi verificada a melhoria na qualidade das seqüências, que alcançaram *score* de qualidade igual a 30 phred, conforme ilustram as Figuras 2 e 3.

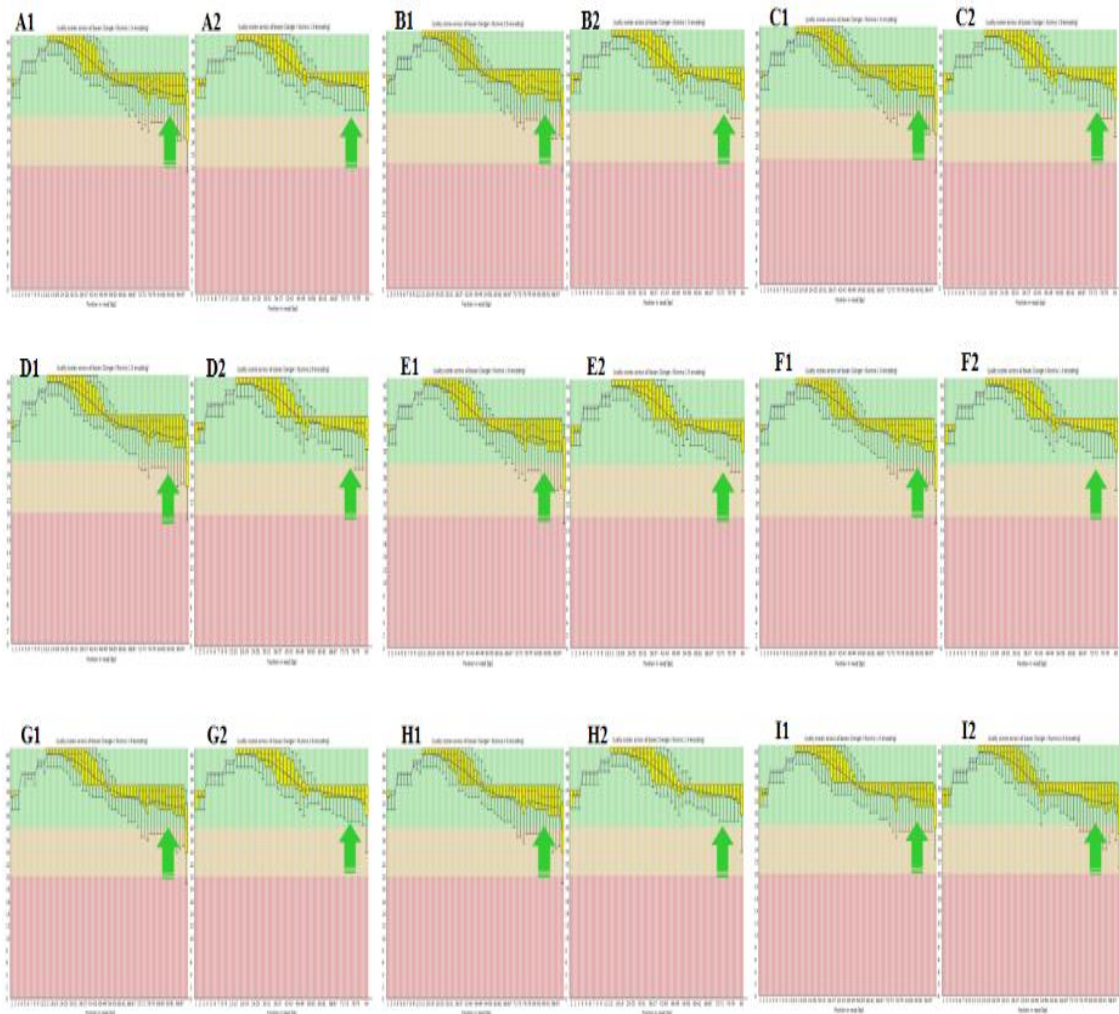


Figura 2: Blox plot referentes à qualidade do sequenciamento dos *reads* das amostras testes pareadas (R1 e R2 *pair-end*), após trimagem. A = brazil3_AACGTGAT; B = brazil5_AAACATCG; C = brazil6_ATGCCTAA; D = brazil13_ACCACTGT; E = brazil15_ACATTGGC; F = brazil17_CAGATCTG; G = brazil19_CATCAAGT; H = brazil20_AAGGTACA e I = brazil107_CCGTGAGA.

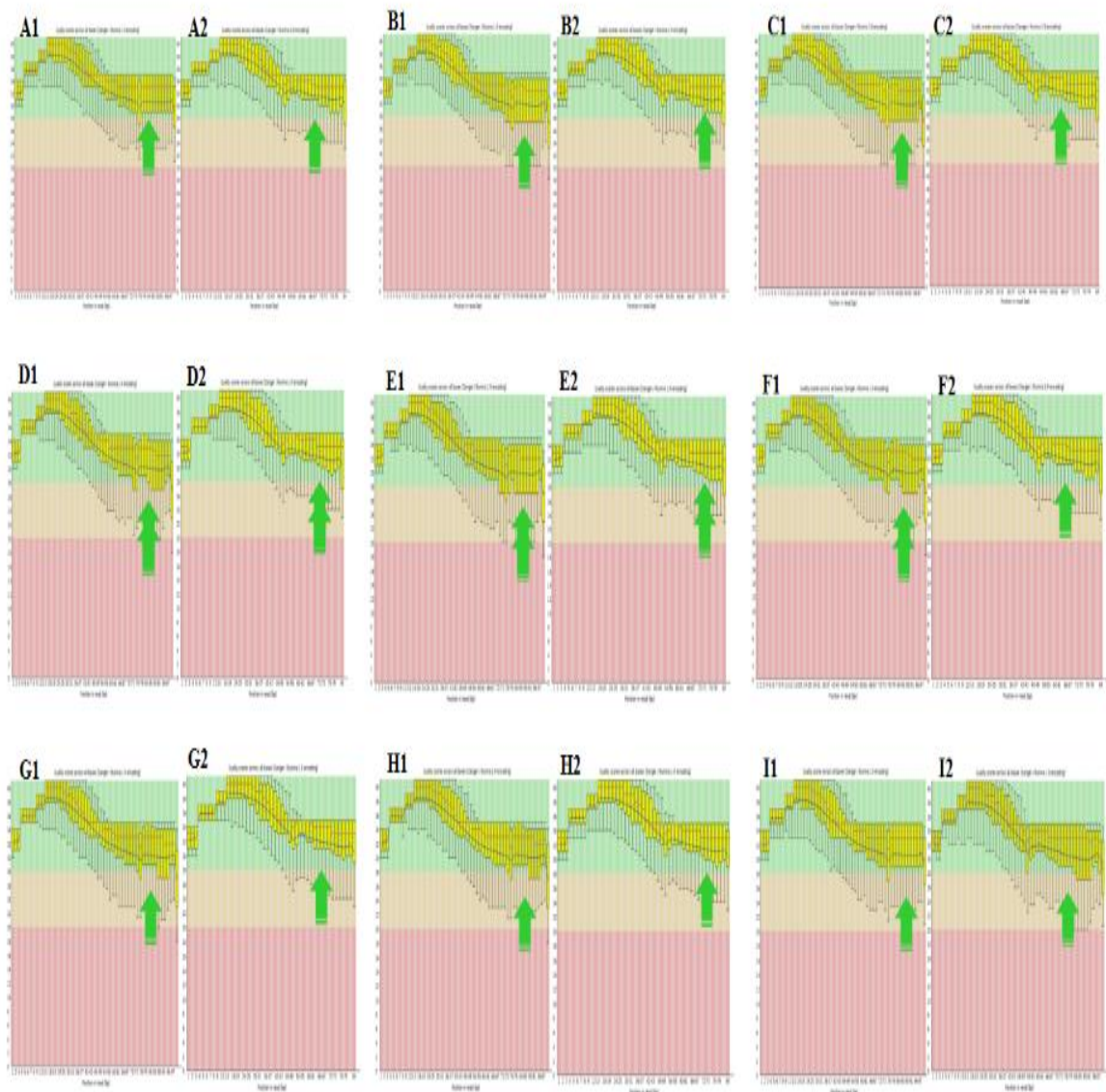


Figura 3: Blox plot referentes à qualidade do sequenciamento dos *reads* das amostras testes trimadas (R1 e R2 *pair-end* + R1 e R2 *single-end*), após trimagem. A = brazil3_AACGTGAT; B = brazil5_AAACATCG; C = brazil6_ATGCCTAA; D = brazil13_ACCACTGT; E = brazil15_ACATTGGC; F = brazil17_CAGATCTG; G = brazil19_CATCAAGT; H = brazil20_AAGGTACA e I = brazil107_CCGTGAGA.

A montagem “de novo” dos *contigs* pelos programas AbySS e SPAdes das amostras testes são ilustradas nas Figuras 4 e 5 respectivamente, e o resumo com os principais parâmetros estatísticos empregados na análise de cada montagem está descrito nas Tabelas 2 e 3.

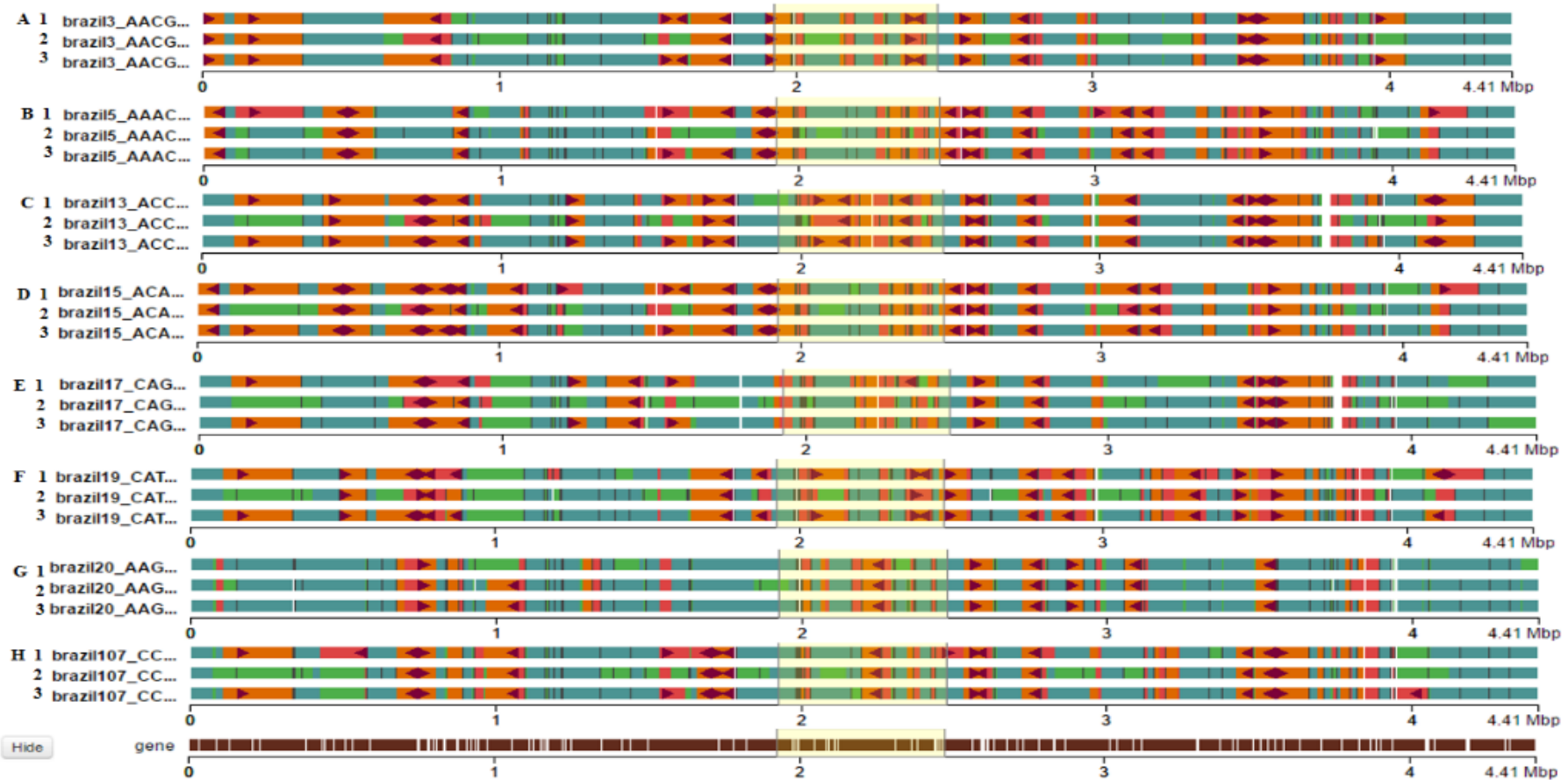


Figura 4: *Contigs* das amostras testes montados pelo montador AbySS e verificadas pelo software QUAST. As amostras são identificadas por: 1- sequências brutas sem trimagem, 2 – sequências R1 e R2 trimadas e 3 – conjunto das sequências R1 e R2 *pair-end* trimada + sequências R1 e R2 *single-end* trimada. A = brazil3_AACGTGAT; B = brazil5_AAACATCG; C = brazil13_ACCACTGT; D = brazil15_ACATTGGC; E = brazil17_CAGATCTG; F = brazil19_CATCAAGT; G = brazil20_AAGGTACA; H = brazil107_CCGTGAGA. A linha marrom na base da figura representa o genoma H37Rv, e as cores dos blocos nas linhas representativas dos respectivos *contigs* acima corresponde a: montagem correta do *contig* (verde); montagem de *contig* com similaridade acima de 50% (azul); *contig* mal montado (vermelho); *contig* mal montado mas com similaridade de 50% (laranja), e porções genômicas não pareadas ou não checadas (cinza).

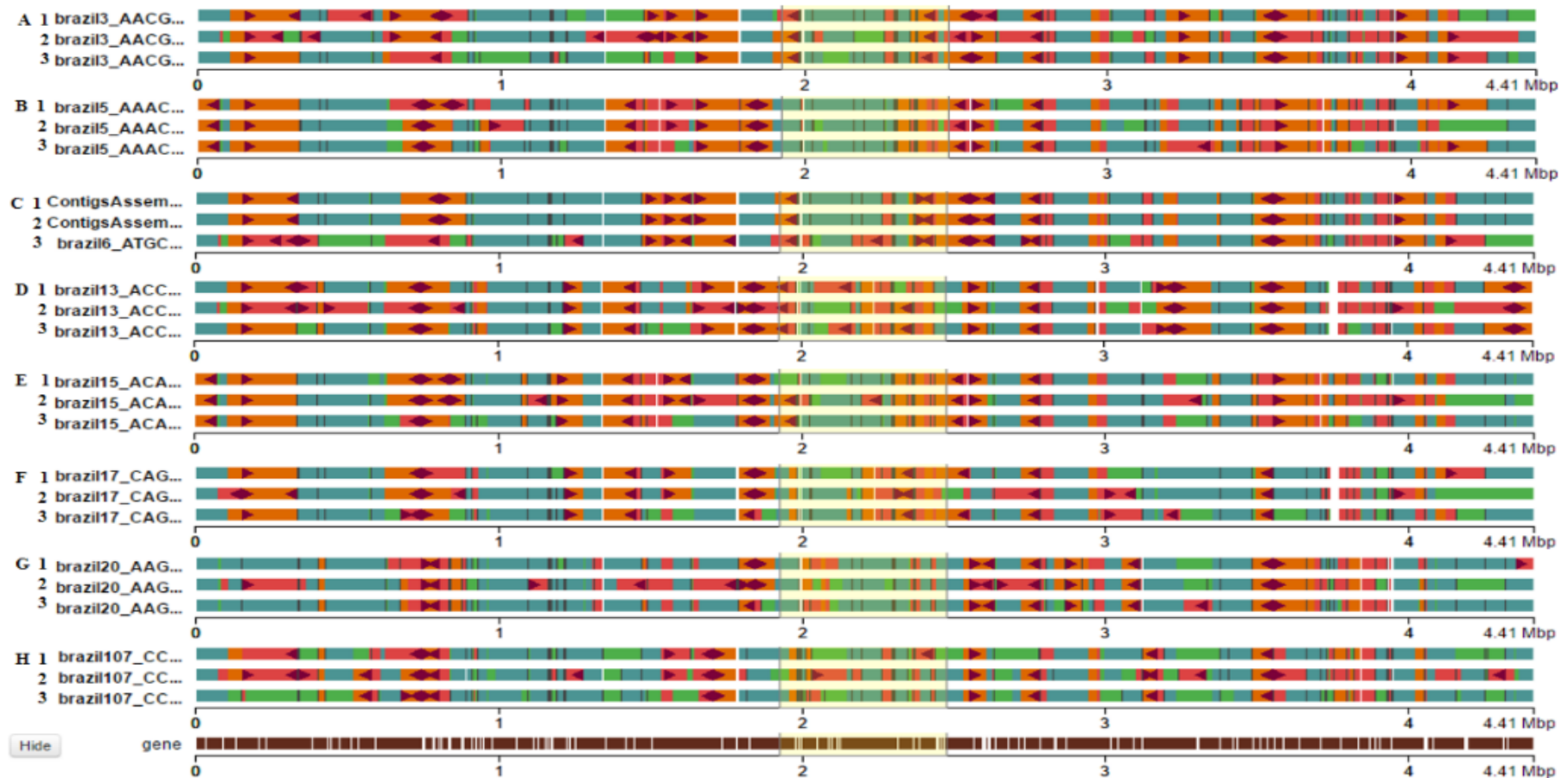


Figura 5: *Contigs* das amostras testes montados pelo montador SPAdes e verificadas pelo software QUAST. As amostras são identificadas por: 1-sequências brutas sem trimagem, 2 – sequências R1 e R2 trimadas e 3 – conjunto das sequências R1 e R2 *pair-end* trimada + sequências R1 e R2 *single-end* trimada. A = brazil3_AACGTGAT; B = brazil5_AAACATCG; C = brazil6_ATGCCTAA; D = brazil13_ACCACTGT; E = brazil15_ACATTGGC; F = brazil20_AAGGTACA; G = brazil107_CCGTGAGA. A linha marrom na base da figura representa o genoma H37Rv, e as cores dos blocos nas linhas representativas dos respectivos *contigs* acima corresponde a: montagem correta do *contig* (verde); montagem de *contig* com similaridade acima de 50% (azul); *contig* mal montado (vermelho); *contig* mal montado mas com similaridade de 50% (laranja), e porções genômicas não pareadas ou não checadas (cinza).

Tabela 2: Resumo dos parâmetros para análise da montagem das amostras teste por AbySS.

Amostra – Sequência		Dados			
		Cobertura	N50	Quantidade de contigs	Tamanho do maior contig
brazil3_AACGTGAT	Bruta	100	106239	75	282753
	Trimada (<i>pair-end</i>)	99	102444	98	229115
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	99	105582	80	231678
brazil5_AAACATCG	Bruta	99	102387	104	230593
	Trimada (<i>pair-end</i>)	99	77348	126	196935
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	99	96170	114	196935
brazil13_ACCACTGT	Bruta	99	125780	84	283040
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	103788	114	263400
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	99	125780	86	263399
brazil15_ACATTGGC	Bruta	100	125348	89	283664
	Trimada (<i>pair-end</i>)	99	83248	116	196935
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	100	99826	94	283668
brazil17_CAGATCTG	Bruta	98	115734	89	283093
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	81601	130	263399
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	99	81601	97	233057
brazil19_CATCAAGT	Bruta	99	122079	91	284440
	Trimada (<i>pair-end</i>)	100	80763	135	223480
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	99	99207	106	231685
brazil20_AAGGTACA	Bruta	98	66712	145	192509
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	66488	151	157397
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	98	66403	150	192525
brazil107_CCGTGAGA	Bruta	99	92823	120	231651
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	66641	152	225219
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	99	83000	128	231650

Tabela 3: Resumo dos parâmetros para análise da montagem das amostras teste por SPAdes.

Amostra – Sequência		Dados			
		Cobertura	N50	Quantidade de contigs	Tamanho do maior contig
brazil3_AACGTGAT	Bruta	98	130476	82	281421
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	184790	73	352952
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	98	114872	102	245161
brazil5_AAACATCG	Bruta	98	111394	100	281328
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	114787	100	273579
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	98	106477	119	230520
brazil6_ATGCCTAA	Bruta	98	125546	84	245134
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	125546	84	245134
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	98	170738	69	393382
brazil13_ACCACTGT	Bruta	98	140266	96	298056
	Trimada (<i>pair-end</i>)	97	169590	82	508523
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	97	130461	108	261246
brazil15_ACATTGGC	Bruta	99	123263	93	281376
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	128002	81	281376
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	98	106476	108	230492
brazil17_CAGATCTG	Bruta	98	125475	97	281478
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	155589	72	690076
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	98	114872	124	261094
brazil20_AAGGTACA	Bruta	98	82903	139	226540
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	91664	127	226540
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	97	73166	149	226540
brazil107_CCGTGAGA	Bruta	98	81216	127	230098
	Trimada (<i>pair-end</i>)	98	83761	114	295799
	Trimada (<i>pair-end</i> + <i>single-end</i>)	98	70173	164	182379

3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS PRÉVIOS

Os resultados ilustrados na Figura 2 sugerem que o sequenciamento das amostras foi bem sucedido, haja vista que suas mediana e as distâncias interquartil correspondem ao padrão para uma amostra de boa qualidade, tal como preconiza os idealizadores do FASTQc.

Contudo, nota-se também o desvio dessa qualidade na porção final das sequências R1 (entre 80 a 90 pb) em 39 das amostras sequenciadas. As Figuras 3 e 4 evidenciam que a trimagem nas sequências melhorou a qualidade, o que justifica a aplicação do Trimmomatic e corrobora com a sugestão de Bloger et al (2014).

Na análise da montagem genômica, foram adotados os seguintes parâmetros de qualidade: *i*) maior tamanho de N50 e *ii*) menor quantidade de contigs gerados por ambos os montadores. Os dados elucidados na Tabela 2 mostram que a montagem realizada pelo AbySS obteve melhores valores dos parâmetros supracitados nas sequências brutas, ou seja, sem a trimagem. Esse resultado já era esperado, haja vista a recomendação dos seus idealizadores para que não sejam feitas correções nas amostras antes das suas respectivas montagens.

A Figura 4 sugere que as melhores montagens com o AbySS em relação ao genoma H37Rv foram com as sequências: brazil3, brazil5, brazil19, brazil20 e brazil107, evidenciadas pela maior quantidade de blocos em cor azul presentes nos contigs montados, os quais indicam similaridade acima de 50%.

Os dados disponíveis na Tabela 3 demonstram que a montagem pelo SPAdes apontam que os *contigs* de melhor qualidade foram aqueles obtidos a partir das sequências trimadas (R1 e R2 pair-end). Na Figura 5 identificamos um suposto padrão de dissimilaridade entre as amostras teste e o genoma H37Rv no intervalo de 0 a 1 Mbp compartilhado pelas sequências: brazil3_AACGTGAT, brazil5_AAACATCG, brazil6_ATGCCTAA, brazil13_ACCACTGT e brazil15_ACATTGGC, sendo evidenciada pela disposição de blocos laranja nos respectivos contigs montados.

A confirmação quanto a veracidade desses dados será possível a partir das etapas de mapeamento e anotação gênica, as quais serão realizadas posteriormente.

5 DISCUSSÃO

As características sociodemográficas dos pacientes de TBMDR da Bahia são comuns aos de outros estudos realizados anteriormente (CUNHA et al., 2015; LEAL et al., 2017). Esse dado evidencia o fator social intrínseco da doença e reforça a necessidade de ações que equalizem a distribuição de renda; ampliem a oferta de educação e promovam melhoria na qualidade ambiental dos infectados pelo Mtb (ANDRADE et al., 2019; GOMES et al., 2016).

A concentração dos casos em Salvador era esperada, considerando que capitais de estado apresentam alta densidade demográfica em comparação aos municípios interioranos, e que as condições de sobrevivência de uma parte da população que vive nas capitais são consideradas irregulares ou péssimas, as quais favorecem a rápida disseminação do Mtb (OLIVEIRA et al., 2013). Todavia, ressaltamos a possibilidade de ocorrência de viés em virtude de uma suposta subnotificação de casos nos municípios do interior do estado. A incompletude nos dados sobre TB em cidades interioranas se deve a diversos fatores como: a má qualidade da base de dados utilizada (algumas ainda não são eletrônicas) e a falta de treinamento adequado e contínuo e a não fidelização da equipe de saúde no programa de atenção a TB (ARAKAWA et al., 2017).

A concentração de casos da doença em bairros de Salvador caracterizados por “bolsões de pobreza” já foi relatada anteriormente (ERAZO et al., 2014) e os dados aqui encontrados reforçam a dependência espacial dos casos de TBMDR nos locais de alta carga de TB. Contudo, a análise de dispersão e vias de introdução dos isolados Mtb ainda não está totalmente esclarecida, haja vista o endemismo da doença na cidade o que dificulta sua caracterização (ocorrência de surtos, por exemplo) e impacta negativamente em seu controle.

O histórico de falência e abandono registrado nos casos TBXDR favorece o processo evolutivo dos isolados no tocante a aquisição de resistência aos fármacos (ALIPANAH et al., 2018). Esse contexto ajuda na compreensão dos impactos negativos advindos de atrasos na emissão dos laudos laboratoriais e na inconsistência nos resultados de testes fenotípicos sobre o perfil de resistência dos isolados de Mtb. O diagnóstico correto e rápido é imprescindível para o controle da doença, pois são essas as informações que direcionam os pacientes para o tratamento adequado (BRASIL, 2019a).

Ressaltamos que a taxa de falha terapêutica foi maior do que a de abandono nos casos de TBXDR de Salvador indicando a inadequação na terapia proposta e reforça a necessidade da utilização dos testes rápidos na caracterização laboratorial da doença. A Organização Mundial da Saúde estimula o uso de testes genotípicos (sondas moleculares) devido a robustez

e urgência na obtenção dos dados na caracterização dos isolados clínicos (CHANG et al., 2012). Casela e colaboradores (2018) compararam resultados de caracterização de TBMDR realizados no HEOM (hospital de referência no tratamento de TB no estado da Bahia), e comprovaram acurácia de 61% na identificação dos casos obtidos pelo teste rápido em comparação aos testes fenotípicos, o que corrobora com os esforços para sua definitiva implantação.

A proporção de indivíduos com resistência a etambutol em Salvador foi maior do que a relatada em outros estudos de base nacional (BRITO et al., 2010), situação que requer atenção por evidenciar o processo evolutivo dos isolados em pacientes pré-MDR que não recebem tratamento adequado.

As comorbidades prevalentemente relatadas na população de estudo contribuem para o agravamento da doença, pois interferem na metabolização dos fármacos anti-TB ou desencadeiam reações adversas (MELSEW et al., 2018; THOMAS et al., 2019). Dois pacientes co-infectados com HIV-TB evoluíram para óbito, corroborando com estudos que evidenciaram a agressividade de ambas as infecções (BAMMANN et al., 2010; CHEN et al., 2019; HURTADO et al., 2018). A baixa taxa de realização do TOD revela descumprimento das recomendações para manejo de paciente TB (BRASIL, 2019a), especialmente no grupo aqui caracterizado que pela presença das comorbidades apresentadas deveriam receber esse tipo de acompanhamento (REIS-SANTOS et al., 2015).

Análise genômicas identificaram predomínio de isolados de *Mtb* pertencentes à família LAM e Haarlén como descrito em outros estudos realizados no Brasil (DANTAS et al., 2015; de ALMEIDA et al., 2019; LUIZ et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2016). Ambas as famílias pertencem a linhagem 4, caracterizada por sua virulência e capacidade de adquirir resistência aos fármacos (BRITES; GAGNEUX, 2014; COSCOLLA; GAGNEUX, 2014). Destacamos a presença de 11 isolados da subfamília LAM10-Cameroon na população de Salvador. Até o momento, a literatura aponta que essa subfamília é endêmica do continente africano (KORO KORO et al., 2016) e apresentam alta virulência, além de serem resistentes aos fármacos anti-TB (NIOBE-EYNHAGN, 2004).

Esse é o primeiro relato de LAM10-Cameroon, pelo menos em *cluster*, no Brasil. A presença desses isolados em Salvador pode ser explicado por processo de reativação de algum ancestral trazido durante o tráfico de escravos. Conceição et al., (2019) evidenciou a presença de representantes EAI na população de Pará-BE com genótipo filogeneticamente idênticos a linhagem da África e que foram introduzidas nesse estado durante o tráfico negreiro. Esse

achado dá suporte à evidência de introdução da LAM-Cameroon a partir da vinda dos escravos, embora novas análises serão realizadas para confirmar os dados.

6 CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados permite inferir que:

- Apesar da concentração dos casos da doença em bairros considerados mais pobres e de periferia, se observa ocorrência de transmissão ativa de TB resistente na população de Salvador no período em que os isolados foram coletados;
- O não cumprimento de recomendações para o controle da TB, como realização do TOD, e a demora na caracterização do perfil de resistência dos isolados clínicos podem ter contribuído para os desfechos menos favoráveis aqui observados;
- Presença de indivíduos infectados com isolados resistentes a etambutol e outras drogas empregadas na 2ª linha do tratamento anti-TB é característica do processo evolutivo dos casos multidroga resistentes para casos pré-XDR, os quais precisam ser manejados com maior atenção para evitar progressão da doença;
- Histórico de falência com taxa maior do que a taxa de abandono entre os casos tuberculose extensivamente resistente sugere erros no diagnóstico, inadequação do tratamento e ocorrência de interações medicamentosas;
- Óbito de pacientes com co-infecção HIV-TB corrobora com os dados sobre a dificuldade do tratamento concomitante de ambas as infecções, e reforça a importância da realização do teste de HIV em pacientes TB;
- Predomínio da família LAM reforça sua capacidade de adaptação no continente latino-americano;
- Até o momento, esse é o primeiro relato de casos tuberculose extensivamente resistente no estado da Bahia.

REFERÊNCIAS

- ABREU, G. R. F.; FIGUEREDO, M. A. A. Abandono do tratamento da Tuberculose em Salvador, Bahia – 2005 a 2009. **Revista Baiana de Saúde Pública**. v. 37, n. 2, p. 407-422 abr./jun., 2013.
- AJAWATANAWONG, P *et al.* A novel Ancestral Beijing sublineage of *Mycobacterium tuberculosis* suggests the transition site to Modern Beijing sublineages. **Scientific Reports**. v. 9, n. 1, 13718, 2019.
- ALIPANAH, N. *et al.* Adherence interventions and outcomes of tuberculosis treatment: A systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. **PLoS Medicine**. v. 15, n. 7, e1002595, 2018.
- ANDRADE, K.V.F. *et al.* Association between treatment outcome, sociodemographic characteristics and social benefits received by individuals with tuberculosis in Salvador, Bahia, Brazil, 2014-2016. **Epidemiologia e Serviços de Saude**. v. 28, n. 2, e2018220, 2019.
- ARAKA, W.A. *et al.* Tuberculosis control program in the municipal context: performance evaluation. **Revista Saúde Pública**. v. 51, n. 23, p. 1-9, 2017.
- BAMMANN, R.H. *et al.* High prevalence of drug-resistant tuberculosis and other mycobacteria among HIV-infected patients in Brazil: a systematic review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, p. 838–841, 2010.
- BARTHOLOMAY, P. *et al.* Special Tuberculosis Treatment Information System (SITE-TB) in Brazil: background, description and perspectives. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 28, n. 2, e2018158, 2019.
- BENTLEY, S.D. *et al.* The genome of *Mycobacterium Africanum* West African 2 reveals a lineage-specific locus and genome erosion common to the *M. tuberculosis* Complex. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 6, n. 2: e1552, 2012.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BORRELL, S. *et al.* Epistasis between antibiotic resistance mutations drives the evolution of extensively drug-resistant tuberculosis. **Evolution, Medicine, and Public Health**. n. 1, p. 65–74, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil – 2ª ed.** atualizada. Brasília: Ministério da Saúde, 2019a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico Tuberculose - Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença**. v. 50, n. 9, 2019b.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. **Recomendações para o manejo da coinfeção TB-HIV em serviços de atenção especializada a pessoas vivendo com HIV/AIDS**. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil** – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outra Micobactérias** – Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- BRITES, D.; GAGNEUX, S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 6-24, 2015.
- BRITO, R.C. *et al.* Drug-resistant tuberculosis in six hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 1, p. 24–33, 2010.
- BRYNILDSRUD, O.B. *et al.* Global expansion of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. **Science Advances**, v. 4, n. 10, eaat586, 2018.
- CARDONA, P.J.; CATALÁ, M.; PRATS, C. Origin of tuberculosis in the Paleolithic predicts unprecedented population growth and female resistance. **Scientific Reports**, v. 10, n. 42, p. 1-20, 2020.
- CASELA, M. *et al.* Teste rápido molecular para tuberculose: avaliação do impacto de seu uso na rotina em um hospital de referência. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 2, p. 112-117, 2018.
- CHANG, K. *et al.* Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis. **Journal of Infections**, v. 64, n. 6, p.580-588, 2012.
- CHEM, E.D.; VAN HOUT, M.C.; HOPE, V. Treatment outcomes and antiretroviral uptake in multidrug-resistant tuberculosis and HIV co-infected patients in Sub Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 723, p. 1-9, 2019.
- CHEN, Y.Y. *et al.* Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* East African–Indian family in three tropical Asian countries. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 6, p. 886-892, 2017.
- COLE, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, n. 393, p. 537-544, 1998.
- COMAS, I. *et al.* Population genomics of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia contradicts the Virgin Soil hypothesis for human tuberculosis in Sub-Saharan Africa. **Current Biology**, n. 25, p. 3260–3266, 2015.

COMAS, I. *et al.* Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1176–1182, 2013.

CONCEIÇÃO, E.C. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* lineage 1 genetic diversity in Pará, Brazil, suggests common ancestry with east-African isolates potentially linked to historical slave trade. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 73, p. 337–341, 2019.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 431–444, 2014.

DALCOLMO, M. P.; ANDRANDE, M. K. N.; PICON, P. D. Multiresistant tuberculosis in Brazil: history and control. **Revista de Saúde Pública**, v. 41 (Supl. 1), p. 34–42, 2007.

DANTAS, N.G.T. *et al.* Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 306, p. 1–11, 2015.

de ALMEIDA, I.N. *et al.* Frequency of the *Mycobacterium tuberculosis* RDRio genotype and its association with multidrug-resistant tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 556, p. 1–9, 2013.

DUARTE, T. A. *et al.* A systematic review of East African-Indian Family of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 317–324, 2017.

ERAZO, C. *et al.* Tuberculosis and living conditions in Salvador, Brazil: a spatial analysis. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 36, n.1, p. 24–31, 2014.

FIRDESSA, R. *et al.* Mycobacterial Lineages Causing Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis, Ethiopia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 460–463, 2013.

FORD, C. B. *et al.* *S Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug resistant tuberculosis **Nature Genetics**, v. 45, n.7, p. 784–790, 2013.

GYGLI, S.M. *et al.* Whole-genome sequencing for drug resistance profile prediction in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.63, n. 4, e02175–18, 2019.

GOMES, M. G. M. *et al.* End TB strategy: the need to reduce risk inequalities. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n.132, p. 1–4, 2016.

HURTADO, R.M.; MERESSA, D.; GOLDFELD, A.E. Treatment of drug-resistant tuberculosis among people living with HIV. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 13, n. 6, p. 478–485, 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. In.: **Cidades**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ba/salvador/panorama>. Acesso em: 21 dez 2019 as 16:45h.

KOCH, A.; MIZRAHI, V.; WARNER, D. F. The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? **Emerging Microbes and Infections**, v.3, e17, p.1-11, 2014.

KORO KORO, F. *et al.* Genetic structure and drug susceptibility patterns of *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains responsible of human pulmonary tuberculosis in the major rearing region in Cameroon. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

LUIZ, R. S. S. *et al.* Genotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.17, n. 3, p.:338–345, 2013.

MACHADO, L. N. C. *et al.* First baseline of circulating genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in patients from the Brazilian borders with Argentina and Paraguay. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p.1-9, 2014.

MALLA, B. *et al.* First Insights into the Phylogenetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Nepal. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1-8, 2012.

MELSEW, Y.A. *et al.* Risk factors for infectiousness of patients with tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **Epidemiology and Infection**, v.146, p.345–353, 2018.

MENDES, N. H. *et al.* Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 269, p.1-8, 2011.

MOREIRA T.R. *et al.* Prevalence of tuberculosis in incarcerated populations: systematic review and meta-analysis. **Revista Panamerica de Salud Publica**, v. 43, e16, 2019.

NIOBE-EYANGO, S.N. *et al.* Molecular characteristics of strains of the Cameroon family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 11, p. 5029–5035, 2004.

NOGUEIRA, C. L. *et al.* First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil. **Tuberculosis**, v. 97, p. 57-64, 2016.

NGUYEN, Q.H. *et al.* Insights into the processes that drive the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Evolutionary Applications**, v.11, n. 9, p.1498–1511, 2018.

OLIVEIRA, G.P. *et al.* Tuberculosis in Brazil: last ten years analysis - 2001-2010. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 218–233, 2013.

OTCHERE, I. D. *et al.* Comparative genomics of *Mycobacterium africanum* Lineage 5 and Lineage 6 from Ghana suggests distinct ecological niches. **Scientific Reports**, v. 8, p.11269, 2018.

PALITTAPONGARNPIM, P. *et al.* Evidence for Host-Bacterial Coevolution via Genome Sequence Analysis of 480 Thai *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 1 Isolates. **Scientific Reports**, v. 8, 11597, p. 1-11, 2018.

- PERRIN, P. Human and tuberculosis co-evolution: An integrative view. **Tuberculosis**, v. 95, p. S112-S116, 2015.
- PHELAN, J. E. *et al.* Recombination in *pe/ppe* genes contributes to genetic variation in *Mycobacterium tuberculosis* lineages. **BMC Genomics**, v. 17, n. 151, p. 1-12, 2016.
- REIS-SANTOS, B. *et al.* Directly observed therapy of tuberculosis in Brazil: associated determinants and impact on treatment outcome. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.19, n. 10, p. 1188–1193, 2015.
- RUTAIHWA, L.K. *et al.* Multiple introductions of *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 2–Beijing Into Africa Over Centuries. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p.1-12, 2019.
- SAELENS, J.W.; VISWANATHAN, G.; TOBIN, D. M. Mycobacterial evolution intersects with host tolerance. **Frontiers in Immunology**, n. 10, p. 1-14, 2019.
- SOUZA, M.S.P.L. *et al.* Fatores associados ao acesso geográfico aos serviços de saúde por pessoas com tuberculose em três capitais do Nordeste brasileiro. **Caderno de Saúde Pública**, v. 31, n. 1, p.111-120, 2015.
- SOUZA, E. O. **Caracterização dos perfis genéticos e de resistência a fármacos de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* associados com casos de Tuberculose multirresistente na Bahia, Brasil.** 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Osvaldo Cruz, Salvador, 2012.
- THOMAS, B.E. *et al.* Smoking, alcohol use disorder and tuberculosis treatment outcomes: A dual co-morbidity burden that cannot be ignored. **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, p.1-12, 2019.
- WAMPANDE, E.M. *et al.* Genetic variability and consequence of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 3 in Kampala-Uganda. **PLOS ONE**, n. 14, n. 9, p. 1-14, 2019.
- WARNER, D. F.; KOCH, A.; MIZRAHI, V. Diversity and disease pathogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 14-21, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2018.** 23th edition, Geneva: World Health Organization, 2019.
- XAVIER, M. I. M.; BARRETO, M. L. Tuberculose na cidade de Salvador, Bahia, Brasil: O perfil na década de 1990. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 2, p.445-453, 2007.
- ZHANG, Y.; YEW, W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 11, p.1276-1289, 2015.