



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

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

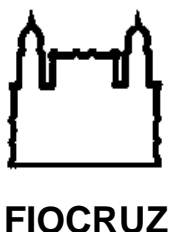
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS E DE RESISTÊNCIA A
FÁRMACOS DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis*
ASSOCIADOS COM CASOS DE TUBERCULOSE
MULTIRRESISTENTE NA BAHIA, BRASIL.**

ERIVELTON DE OLIVEIRA SOUSA

Salvador- Bahia

2012



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
(PGBSMI)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS E DE RESISTÊNCIA A
FÁRMACOS DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis*
ASSOCIADOS COM CASOS DE TUBERCULOSE
MULTIRRESISTENTE NA BAHIA, BRASIL

ERIVELTON DE OLIVEIRA SOUSA

Orientadora: Dra. Theolis Barbosa

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa como um dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre.

Salvador- Bahia

2012

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S725c Sousa, Erivelton de Oliveira
Caracterização dos perfis genéticos e de resistência a fármacos de isolados de
Mycobacterium tuberculosis associados com casos de tuberculose multirresistente
na Bahia, Brasil. [manuscrito] / Erivelton de Oliveira Sousa. - 2012.
94 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

*Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa, 2012.*

Orientador: Dr^a.Theolis Barbosa, Laboratório Integrado de Microbiologia e
Imunorregulação- LIM1

1. Tuberculose 2. TBMR 3. TBXDR. 4. Genotipagem 5. MIRU 6. LAM
7. Cameroon 8. Haarlem I. Título.

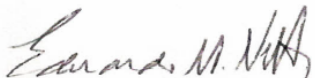
CDU 616-005.5: 575.22

“CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS GENÉTICOS E DE RESISTÊNCIA A FÁRMACOS DE ISOLADOS DE
Mycobacterium tuberculosis ASSOCIADOS COM OS CASOS DE TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE
NA BAHIA, BRASIL”

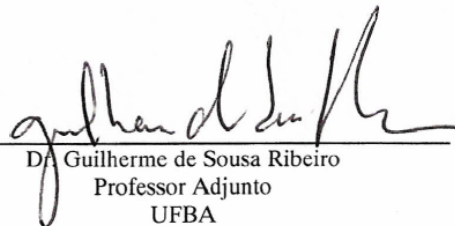
ERIVELTON DE OLIVEIRA SOUSA

FOLHA DE APROVAÇÃO

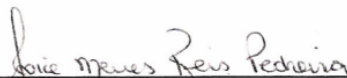
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Eduardo Martins Netto
Pesquisador Colaborador
FAPEX



Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro
Professor Adjunto
UFBA



Dr^a Joice Neves Reis Pedreira
Pesquisador Colaborador
CPqGM / FIOCRUZ

Aos meus país e irmãos, pela minha formação;

Aos mestres, pela orientação;

Aos amigos, pela compreensão;

E ao amor que nos une.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Alda e Mimiro que em DEUS me proporcionaram ter irmãos que tanto me orgulham; um exemplo de família unida e amada.

A minha orientadora Dra. Theolis Barbosa, pelo desafio e confiança neste trabalho;

Aos meus amigos e colegas do LACEN BA, em especial, aos amigos do setor de micobacteriologia Angélica, Elane Amorim, Helenilda, Neide, Silvio, Zileide e Zilda;

À grande Coordenadora da CLAVEP Dra. Cristiane Mota pelos ensinamentos e à Dra. Rosa Veloso pela dedicação;

A companheira Rosane Will, diretora do LACEN BA, pelo apoio e grande visão de Vigilância em Serviço;

Aos meus colegas de estudo e professores do CPqGM pelas contribuições no caminhar acadêmico;

À Dra. Karla Valéria e Emilyn do Instituto Evandro Chagas (PA) pela calorosa recepção;

Ao Centro de Referência Prof. Hélio Fraga (RJ), em especial, Dra. Fátima Fandinho e Clara Menezes pelo apoio Institucional;

Aos professores do Instituto de Saúde Coletiva (UFBA) pela contribuição, em especial Prof. Dra. Susan Pereira pelos meus primeiros passos em pesquisa;

Aos colegas da DIVEP, pelo desafio de um serviço íntegro e de qualidade;

Aos colegas do HEOM, Dra. Eliana Matos, Hilma Guimarães e Silvana Cerqueira pela vontade de melhoria e respeito aos pacientes;

Aos profissionais técnicos do LIMI (J.Tolentino, Elze, Andrezza, Silvana Paz) e da Biblioteca BIEPS (Ana Fiscina, Adelvani [Vânia] de Araújo, Eliana Garcia e Rute Vivas) pelo excelente compromisso com os alunos;

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram direta e indiretamente na realização deste Mestrado. *Ah! Precisarei de vocês nos próximos capítulos.*

Ao querido sobrinho Beto (*in memoriam*)

SOUSA, Erivelton de Oliveira. Caracterização dos perfis genéticos e de resistência a fármacos de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* associados com casos de tuberculose multirresistente na Bahia, Brasil 94 f. il. Dissertação (Mestrado)- Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012..

RESUMO

INTRODUÇÃO: A resistência aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (TB) é um importante desafio no combate à doença. A rifampicina e a isoniazida são dois fármacos de primeira linha essenciais para a cura da doença, a qual tem como agente o *M. tuberculosis*. Pacientes com TB cujos isolados de *M. tuberculosis* apresentem resistência *in vitro* simultânea a estes dois fármacos desenvolvem a TB multirresistente (TBMR). A resistência do *M. tuberculosis* está relacionada com mutações em genes importantes para a sobrevivência do bacilo. O tratamento da TBMR é mais longo e utiliza fármacos anti-TB de segunda linha, os quais são de maior toxicidade, predispondo os pacientes à não adesão aos esquemas de tratamento. O paciente com TBMR, quando não devidamente tratado, pode selecionar cepas resistentes aos fármacos anti-TB de segunda linha, proporcionando o surgimento da TB extensivamente resistente (TBXDR). Por sua vez, estas cepas podem ser transmitidas em comunidades, constituindo um grave problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a TBXDR tem sido documentada em alguns países, mas no Brasil estes dados são escassos. A caracterização genética de cepas de *M. tuberculosis* envolvidas com os casos TBMR/TBXDR pode facilitar a identificação de vias de transmissão. **OBJETIVO:** Pesquisar casos de TBXDR na Bahia e caracterizar perfis genéticos de isolados de *M. tuberculosis* de pacientes com TB multirresistente, associando o perfil genético encontrado com as características sócio-demográficas e clínicas dos pacientes envolvidos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Isolados de *M. tuberculosis* obtidos de pacientes com diagnóstico de TBMR entre 2008-2011 residentes no Estado da Bahia (Brasil) foram submetidos ao teste de sensibilidade utilizando fármacos anti-TB de primeira e segunda linha e genotipados pela técnica do Número Variável de Repetições em Tandem de Unidades Repetitivas Inter-espaciaadas Micobacterianas (MIRU-VNTR) para obtenção de perfis genéticos que foram associados com perfis da base de dados internacional MIRU-VNTR_{plus}. Isolados com perfis genéticos não associáveis a linhagens com o uso desta técnica foram adicionalmente genotipados por Spoligotyping e ambas as informações foram consideradas para assimilação de linhagens utilizando esta mesma base de dados. Informações clínico-epidemiológicas foram obtidas do banco de dados “Sistema TBMR” do Ministério da Saúde. **RESULTADOS:** Foram analisados 392 isolados. Destes, 35% foram excluídos por ausência de crescimento ou contaminação e 12% constituíram amostras em duplicata, resultando em 206 pacientes com TBMR no estudo. Comprovou-se a ocorrência da TBXDR em 7% (14/206) dos pacientes; destes, dois não possuíam registro anterior para qualquer tratamento anti-TB. Os pacientes estudados foram provenientes de 45 municípios do Estado. A capital, Salvador, concentrou 71% dos casos TBMR e 76% dos TBXDR. Dos casos TBXDR, 36% (5/14) apresentaram isolados resistentes a todos os fármacos testados. Observou-se associação de resistência combinada entre estreptomicina e etambutol (8/14, 57%) e o perfil TBXDR (RP 4,0; IC95% 1,2-13,8; $P=0,01$). Dos casos TBXDR, 71% (10/14) desenvolveram uma ou mais comorbidades ($P=0,04$), sendo o transtorno mental uma comorbidade significativa neste grupo (21%; 3/14; $P=0,04$). Encontrou-se 56 perfis genéticos, 38 únicos e 18 agrupados em *clusters* (contendo de 2 a 11 isolados). Quase a totalidade (92%) dos casos TBXDR esteve agrupada em *clusters*, diferindo dos casos não-TBXDR ($P=0,049$). Os perfis genéticos estiveram principalmente associados a seis famílias: LAM (70%), Cameroon (16%), Haarlem (10%) e as famílias X, S, Uganda I, que combinadas perfizeram 4%. Os casos TBXDR foram representados pelas famílias LAM (45%, ST's 376, ST42, ST20), Cameroon (36%, ST61 único) e Haarlem (18%, ST50). **CONCLUSÕES:** A Bahia apresentou casos de TBXDR e as famílias de *M. tuberculosis* envolvidas com estes casos foram LAM, Cameroon e Haarlem. A genotipagem auxiliou na descoberta de casos epidemiologicamente relacionados.

Palavras-Chave: Tuberculose, cepas, genotipagem, MIRU, LAM, Cameroon, Haarlem.

SOUSA, Erivelton de Oliveira. Characterization of the genetic profiles and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates associated with cases of multidrug-resistant tuberculosis from Bahia, Brazil 94 f. il. Dissertation (Master) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Resistance to drugs used in tuberculosis (TB) chemotherapy is a major challenge to fighting this disease caused by *M. tuberculosis*. Rifampin and isoniazid are two main first-line drugs to achieve TB cure. TB patients whose *M. tuberculosis* isolates exhibit resistance simultaneously to these two drugs develop multidrug-resistant TB (MDR-TB). *M. tuberculosis* resistance is related to mutations in genes important for bacillus survival. MDR-TB treatment is longer and uses more toxic second-line anti-TB drugs, predisposing patients to non-adherence to treatment regimens. Patients with MDR-TB, when not properly treated, can select strains resistant to second-line anti-TB drugs leading to the emergence of extensively drug-resistant TB (XDR-TB). These strains can be transmitted in communities, constituting a serious public health problem. According to the World Health Organization, XDR-TB has been documented in some countries, but in Brazil these data are scarce. The genetic characterization of *M. tuberculosis* strains involved in MDR/XDR-TB cases could facilitate the identification of transmission chains. **AIMS:** To investigate cases of XDR-TB in Bahia and to characterize the genetic profiles of the isolates of *M. tuberculosis* from patients with multidrug-resistant TB, associating the genetic profiles observed with the socio-demographic and clinical characteristics of patients involved. **MATERIALS AND METHODS:** *M. tuberculosis* isolates obtained from patients diagnosed with MDR-TB between 2008-2011 resident in the State of Bahia (Brazil) were tested for sensitivity against first and second-line anti-TB drugs and genotyped by the Variable Number of Tandem Repeats in Repetitive Unit Inter- Mycobacterial spaced (MIRU-VNTR) technique to obtain the genetic profiles that were associated with profiles in the international database MIRU-VNTR_{plus}. Isolates whose genetic profiles have not matched any lineage with the use of this technique were further genotyped by Spoligotyping and information from both methods were considered to test for the possible matching with lineages from the same database. Clinical and epidemiological data were obtained from the database "Sistema TBMR" of the Ministry Health. **RESULTS:** We analyzed 392 isolates. Of these, 35% were excluded due to absence of growth or contamination and 12% corresponded to duplicate samples, resulting in 206 patients with MDR-TB in the study. XDR-TB was found in 7% (14/206) of the patients, two of which had no previous record of any anti-TB treatment. The patients studied were from 45 cities of the State. The capital, Salvador, concentrated 71% of all MDR-TB and 76% of the XDR-TB cases. Among XDR-TB cases, 36% (5/14) had isolates resistant to all drugs tested here. Combined resistance to streptomycin and ethambutol (8/14, 57%) was associated with the XDR-TB profile (OR 4.0, 95% CI 1.2 to 13.8, $P = 0.01$). 71 % (10/14) of XDR-TB cases developed one or more comorbidities ($P= 0.04$), mental disorder being a significant comorbidity in this group (21%, 3/14, $P=0.04$). Genotyping yielded 56 profiles, 38 unique and 18 in clusters (containing 2 to 11 isolates). Almost all (92%) XDR-TB cases were clustered, differing from non-XDR-TB cases ($P=0.049$). The genetic profiles were mainly associated with six families: LAM (70%), Cameroon (16%), Haarlem (10%), and the families X, S, Uganda I, which altogether amounted to 4%. The XDR-TB cases were represented by LAM (45% ST's 376, ST42, ST20), Cameroon (36%, single ST61) and Haarlem (18% ST50). **CONCLUSIONS AND STUDY CONTRIBUTIONS:** Bahia presented cases of XDR-TB and the families involved with these cases were LAM, Haarlem and Cameroon. Genotyping helped in epidemiologically linked case finding.

Keywords: Tuberculosis, strains, genotyping, MIRU, LAM, Cameroon, Haarlem.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amicacina
A.C	Antes de Cristo
BA	Bahia
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BIEPS	Biblioteca Eurydice Pires de Sant'Anna
C	Capreomicina
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (Unidade Formadora de Colônia)
CMT	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CRPHF	Centro de Referência Professor Helio Fraga
DIS	Diretoria de Informação de Saúde
DIVEP	Divisão de Vigilância Epidemiológica
DNA	Acido desoxirribonucléico
E	Etambutol
EC	Eletroforese Capilar
FIOCRUZ-BA	Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
H	Isoniazida
HEOM	Hospital Especializado Otávio Mangabeira
hab.	Habitantes
ISC	Instituto de Saúde Coletiva
K	Kanamicina
LACEN BA	Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz /Bahia
LAM	Latin-American-Mediterranean – família do <i>M.tuberculosis</i>
LJ	Meio de cultura Lowenstein-Jensen
LSP's	Polimorfismo de de sequencias ampliadas do inglês <i>Lengh Sequence Polymorphisms</i>
MGIT960	Mycobacteria Growth Indicator Tube, capacidade para 960 tubos - Sistema de cultivo que utiliza um meio líquido que verifica automaticamente o crescimento de micobactérias da empresa Becton Dickinson (BD).
MIRU-VNTR	Repetições em Tandem de Número Variável de Unidades Repetitivas Interespaçadas Micobacterianas do inglês, <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units of Variable Number Tandem Repeat</i> .
MIRU-VNTRnp	MIRU-VNTR 12 loci que não encontrou similaridade no site
MIRU-VNTRplus	Site do banco de dados internacional utilizados para comparação de perfis

obtidos pela técnica do MIRU-VNTR 12 ou 24 *loci* com perfis de cepas de referencias de *M.tuberculosis* (www.miru-vntrplus)

MNT	Micobactéria Não-Tuberculosa
MQ	Milique
MS	Ministério da Saúde
MT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>M.tuberculosis</i>)
MT-MDR	<i>M.tuberculosis</i> multidroga-resistente (resistência a, pelo menos, rifampicina e isoniazida)
O	Ofloxacina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
p.m	Peso molecular
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
R	Rifampicina
RFLP	Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição do inglês <i>Restrction Fragment Lengh Polymorphisms</i>
S	Estreptomicina
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
SESAB	Secretaria de Saúde do Estado da Bahia
SINAN	Sistema de Informação Nacional de Agravo de Notificação
SISTEMA-TBMR	Sistema de Vigilância da tuberculose multirresistente do MS
SMART	Sistema Informação (Banco de dados) do LACEN
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
ST ou SIT	Tipo Compartilhado (do inglês <i>Shared [Internacional] Types</i>) Seqüência específica de oligonucleotídios presente no perfil genético de uma família subdividindo-a em subfamílias. O ST é dado em número arábico.
SUVISA	Superintendência de Vigilancia da Saúde
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose Multirresistente, resistência à rifampicina e isoniazida simultaneamente.
TBXDR	Tuberculose Extensivamente Resistente. É uma TBMR com resistência adicional à uma fluoquinolona e a qualquer fármaco injetável de segunda linha, simultaneamente.
TS	Teste de Sensibilidade (mesmo que teste de Susceptibilidade ou antibiograma para <i>M.tuberculosis</i>)

TSI	Teste de Sensibilidade I – utilizando os fármacos rifampicina, isoniazida, etambutol e estreptomicina
TSII	Teste de Sensibilidade II – utilizando os fármacos: capreomicina, ofloxacina, kanamicina e amicacina.
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VE	Vigilância Epidemiológica
ZN	Ziehl-Nielsen

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA	1	Dendograma apresentando a caracterização genética de linhagens de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mostrando a associação dos perfis encontrados nas três técnicas. Perfil de spoligotyping (A e B); perfil RFLPI-IS6110 (C); número de linhagens agrupadas pelo perfil RFLP6110 (D); sequencia numérica obtida pela técnica de MIRU-VNTR por 12 <i>loci</i> (E) e identificação do isolado no estudo (F). (Lopez-Alvares et al; 2010)	32
FIGURA	2	Descrição MIX's (de 1 a 8) e os seus respectivos <i>loci</i> ou nome do MIRU (alias). Todos os lócus estão representados pela sua seqüência de oligonucleotídica de iniciação (<i>primers</i>) com a sua respectiva concentração de uso. Os <i>primers</i> marcados são designados com a terminação FAN, VIC ou NED. Fonte van Soolingen et al,(2010)	46
FIGURA	3	Município de ocorrência dos casos de TBMR (n=192) e TBXDR (n=14) por ocorrência. Em vermelho (▲) os municípios com casos de TBXDR. Mapa do Estado da Bahia, Brasil 2012.	54
FIGURA	4	Diversidade genética de <i>M.tuberculosis</i> multirresistentes. A) Dendograma dos isolados em <i>cluster</i> . O Shared type (ST) é mostrado, seguido da identificação do isolado no estudo. Em vermelho, isolados de casos TBXDR. O isolado 105 foi mantido por ser de caso TBXDR pela sua similaridade de perfil com os isolados do <i>cluster</i> 6 (destaque em pontilhado). Em asterisco (*) isolados sem família associadas ao perfil MIRU-VNTR 12 loci (B). Dendograma em NJ- Tree, peso categórico um construído no banco de dados www.miru-vnrplus .Bahia , 2012	60
FIGURA	5	Figura 5. Distribuição das três principais famílias/subfamílias <i>M. tuberculosis</i> multirresistente identificadas. A) distribuição dos isolados com perfil MIRU-VNTR 12 <i>loci</i> associados às famílias/subfamílias do banco internacional www.miruvnrplus . B, C e D ocorrência das famílias LAM, Haarlem e Camerron no Estado da Bahia. 2012.	62
TABELA	1	Fármacos utilizados no tratamento dos casos novos de tuberculose: fase de utilização, mecanismo de ação e tempo de uso. Fonte: Brasil, MS, 2010 (adaptado)	19

TABELA	2	Fármacos utilizados no tratamento dos casos de tuberculose multirresistente: fase de utilização, mecanismo de ação e tempo de uso. Fonte: Brasil, MS 2010 (adaptado)	20
TABELA	3	Genes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> associados à resistência aos fármacos de primeira e segunda linha para o tratamento da Tuberculose. Fonte: KADUMA et al. 2003 (adaptado)	26
TABELA	4	Principais famílias do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> descritas em estudos no Brasil	29
TABELA	5	Referência para obtenção do número de repetições em tandem após amplificação do <i>locus</i> MIRU-VNTR utilizando PCR – multiplex Fonte: Supply et al, 2005 (adaptado)	47
TABELA	6	Frequência dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistentes à rifampicina e à isoniazida. Bahia 2012.	51
TABELA	7	Resultados do teste de sensibilidade I (TSI) de isolados de pacientes com tuberculose Multirresistente. Bahia, 2012.	52
TABELA	8	Resultados do teste de sensibilidade II (TSII) de isolados de pacientes com tuberculose Multirresistente. Bahia, 2012.	53
TABELA	9	Frequência de casos de TBMR por município de ocorrência. Bahia, 2012	54
TABELA	10	Características sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com tuberculose multirresistentes (n=206). Bahia, 2012	56
TABELA	11	Perfil clínico-epidemiológico e de resistência aos fármacos dos pacientes com tuberculose extensivamente resistente. Bahia, 2012	58
TABELA	12	Perfil MIRU-VNTR 12 <i>loci</i> combinado com perfil Spoligotyping de cepas de <i>M.tuberculosis</i> multirresistentes submetidos ao banco internacional www.miru-vntrplus para obtenção das famílias e <i>Shared International Types</i> (ST). Bahia 2012.	62
TABELA	13	Frequência das famílias/subfamílias de <i>M. tuberculosis</i> por grupo de pacientes: extensivamente resistente (TBXDR) e não tuberculose extensivamente resistente (n-TBXDR). Bahia, 2012	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA	17
3.2 TRATAMENTO	18
2.3 TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE (TBMR)	20
2.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA	22
2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
2.6 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA	25
2.7 POLIMORFISMOS GENÉTICO DE FAMÍLIAS DE <i>M. tuberculosis</i> .	27
2.7.1 Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP)	27
2.7.2 Oligonucleotídeos Espaçadores (Spoligotyping)	28
2.7.3 Número Variável de Repetições em Tandem de Unidades Repetitivas Interespaçadas (MIRU-VNTR).	30
3 JUSTIFICATIVA	36
4 OBJETIVOS DO TRABALHO	38
OBJETIVO GERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 DESENHO DO ESTUDO	39
5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	39
5.2.1 Amostras	39
5.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA	40
5.4 EXTRAÇÃO DO DNA.	41
5.5 GENOTIPAGEM	42
5.6 DESCRIÇÃO DOS PERFIS MIRU-VNTR E OBTENÇÃO DAS FAMÍLIAS E SUBFAMÍLIAS.	44
5.7 PERFIS DE MIRU-VNTR NÃO PAREADOS COM AS LINHAGENS DE REFERÊNCIAS DO BANCO DE DADOS MIRU-VNTR _{plus} .	45
5.8 VARIÁVEIS DE ESTUDO DOS PACIENTES	48
5.8.1 Variáveis Qualitativas	48
5.8.2 Variáveis Quantitativas	48
5.9 CATEGORIZAÇÃO DOS PACIENTES	49

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5.11 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PACIENTES	50
5.12. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	50
5.13 ATIVIDADES E LOCAIS - Fluxograma	50
6 RESULTADOS	51
6.1 DESCRIÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> DO ESTUDO	51
6.2 DESCRIÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE PACIENTES COM TBMR.	52
6.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES TBMR.	53
6.3.1 Detalhamento Clínico-Epidemiológico dos casos de TBXDR	57
6.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE PACIENTES COM TBMR.	58
6.4.1 Genotipagem pela técnica de MIRU-VNTR-12 <i>loci</i>	58
6.4.2 Genotipagem pela técnica de Spoligotyping	59
6.4.3 Identificação de <i>clusters</i> e suas características genotípicas.	59
6.6 FAMÍLIAS/SUBFAMÍLIAS DOS ISOLADOS DE <i>M. tuberculosis</i> DOS PACIENTES	61
6.6.1 Associação dos perfis genéticos a famílias de <i>M. tuberculosis</i> .	61
6.6.2 Descrição das famílias de <i>M. tuberculosis</i> associadas aos casos de TBMR e TBXDR.	61
6.6.3 Localização geográfica das famílias de <i>M. tuberculosis</i> dos casos de TBMR e TBXDR.	63
7 DISCUSSÃO	66
8 CONCLUSÃO	76
9 LIMITAÇÕES	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE	
ANEXOS I – Ficha de Notificação de Casos de Tuberculose Multirresistente.	
ANEXOS II – Manuscrito em preparação para submissão ao <i>Clinical Microbiology and Infection</i> (CMI) sob formato Research Note.	

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) constitui a principal causa de morte por uma doença infecto contagiosa tratável em todo o mundo. Estima-se que no mundo, aproximadamente, nove milhões de casos novos da doença, por ano, sejam identificados; destes, cerca de quatro milhões correspondem à forma pulmonar com escarro positivo, sendo esta a forma capaz de transmitir o *M. tuberculosis*, agente causador da doença (OMS, 2011).

A resistência aos fármacos antituberculose é um importante desafio no combate à doença. A rifampicina e a isoniazida são dois fármacos antituberculose essenciais para a cura da doença. Famílias de *M. tuberculosis* com resistência simultânea *in vitro* a estes dois fármacos caracterizam a TB como multirresistentes (TBMR), o que leva à necessidade do uso de fármacos de segunda linha, os quais são mais tóxicos e menos efetivos (ARBEX et al, 2010; CDC, 2010; DALCOMO et al.; 2007). Atualmente, o surgimento de casos de TB com resistência a fármacos de segunda linha, a chamada TB extensivamente resistente (TBXDR), tem evidenciado uma situação preocupante para os programas de controle da doença (GANDHI et al 2006; HOLTZ et al 2005; MIGLIORI, 2007). A resistência do *M.tuberculosis* esta relacionada com mutações em genes importantes para a sobrevivência da bactéria (DEMEREK et al 2008; GILLESPIE, 2002; TENOVER, 2006); sendo a presença de fármacos antituberculose um importante papel na pressão seletiva destas famílias resistentes (LEVY e MARSHALL, 2004; PINHEIRO et al; 2009). Cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes podem ser transmitidas em comunidades, constituindo um grave problema de saúde pública (CAMPOS et al. 1999).

A caracterização do polimorfismo genético de isolados de *M. tuberculosis* circulantes, principalmente àquelas envolvidas com os casos de resistência, possibilita o conhecimento de famílias que possam estar associados com as formas

graves da doença e àquelas mais adaptadas a um dado contexto geográfico. Neste contexto, a genotipagem das famílias, aliada aos estudos epidemiológicos clássicos, fortalece ações de controle da doença (BRUDAY et al, 2006; FOXMAN et al, 2001; SUPPLY 2006). A Bahia é o terceiro Estado em números de casos novos de TBMR, sendo que estudos prévios já identificaram casos de pacientes com TBMR em falência de tratamento (OLIVEIRA et al, 2010).

Neste trabalho, utilizando um banco de isolados de *M.tuberculosis* resistentes, pertencente ao Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz (LACEN BA), objetivamos descrever o perfil de susceptibilidade destes isolados, frente aos fármacos antituberculose de primeira e segunda linha; caracterizar o perfil genético destes isolados e avaliar uma possível associação entre o perfil genético das famílias encontradas com as características sócio-demográfica e clínica dos pacientes com tuberculose resistente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA

Do Egito surgiram as primeiras evidências da TB em 44 múmias bem preservadas, datando de 3.700 a 1.000 A.C que apresentavam lesões pleuropulmonares e sangue na traquéia. No Peru, através de técnicas de biologia molecular, identificou-se o DNA do *M. tuberculosis* em múmia Inca, sendo este considerado o primeiro diagnóstico bacteriológico de certeza em múmia milenar, comprovando assim a existência da TB na América, na era pré-colombiana. No Brasil, jesuítas e colonos, atraídos pelos benefícios do clima ameno, trouxeram o bacilo; conforme carta do padre Antonio de Anchieta (ROSEMBERG, 1999)

A TB é a primeira causa de morte por doença infectocontagiosa em pacientes com HIV/AIDS no mundo. Um terço da população mundial está infectada, ocasionando cerca de 2 a 3 milhões de mortes a cada ano. Vinte e dois países concentram 80% de todos os casos novos da doença; entre os quais se encontra o Brasil, na 22ª posição (OMS, 2011).

No Brasil, aproximadamente, 70 mil casos novos de TB são registrados por ano, correspondendo a 35% dos casos registrados na Região das Américas (OMS, 2009). A Bahia com 14,7 milhões de habitantes é o terceiro Estado em população e em número de casos de TB (BRASIL, 2011). Em 2010 e 2011, respectivamente, apresentou um coeficiente de incidência, para todas as formas da doença, de 38/100 mil hab. e de 32,3/ 100 mil hab, sendo a proporção de cura dos casos bacilíferos em torno de 62% (DIVEP, 2012). Salvador, a capital do Estado, com 2,4 milhões de hab. é a terceira capital mais populosa (BRASIL/IBGE, 2011) e nos últimos cinco anos (2007-2011) tem registrado, aproximadamente, 2000 casos novos de TB /ano; perfazendo uma incidência média de 69 casos / 100 mil hab (SESAB/DIS, 2011).

2.2 TRATAMENTO

No Brasil, a tuberculose teve recentemente, seu esquema básico de tratamento alterado, visando uma maior adesão, conforto para o paciente e prevenção da resistência aos fármacos antituberculose de primeira linha. Os fármacos de primeira linha utilizados para o tratamento dos casos novos são isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida e, desde que obedecidos os princípios da quimioterapia e se assegure que não haja abandono do tratamento, são esperadas taxas de cura acima de 85% para os casos novos. No Brasil, a média nacional de cura é de 72% dos casos novos; sendo que para a Bahia essa taxa é de 65% (BRASIL/PNCT, 2010).

O tratamento da TB consiste no uso de múltiplos fármacos com diferentes ações farmacológicas e é dividido em duas fases: 1) Fase de ataque, que consiste no uso de uma maior quantidade de fármacos durante um período relativamente curto (dois meses), visando impedir a multiplicação dos bacilos extracelulares e exterminar as formas sensíveis; 2) Fase de manutenção, a qual objetiva manter a biodisponibilidade dos principais fármacos por um período mais longo (quatro meses) e impedindo a multiplicação dos bacilos intracelulares e bacilos resistentes (Brasil, PNCT 2010). Na tabela 1, está descrito, de forma resumida, o mecanismo de ação dos fármacos empregados para o tratamento dos casos novos de TB.

Tabela 1 – Fármacos utilizados no tratamento dos casos novos de tuberculose: fase de utilização, mecanismo de ação e tempo de uso. Fonte: Brasil, MS, 2010 (adaptado)

Fase	Fármaco	Mecanismo de Ação	Tempo
Ataque	Rifampicina	Impede a síntese de RNA mensageiro;	2 meses
	Isoniazida	Inibe a formação de ácido micótico da parede celular;	
	Pirazinamida	O acúmulo deste fármaco diminui o pH intracelular a níveis que causam a inativação de enzimas do bacilo;	
	Etambutol	Inibe a enzima de polimerização de polissacarídeo da parede celular.	
Manutenção	Rifampicina Isoniazida	*	4 meses

O abandono do tratamento ou o uso irregular dos fármacos; bem como, a monoterapia, proporcionam uma pressão seletiva que favorece a sobrevivência no paciente de bacilos resistentes, conduzindo à resistência ao tratamento. A TB resistente onera os custos de um tratamento em até 200 vezes e diminui as taxas de cura da doença (OMS, 2009)

2.3 TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE (TBMR)

A TBMR é definida pela OMS como a doença causada pelo *M. tuberculosis* com resistência *in vitro* simultaneamente à rifampicina e à isoniazida; é um fenômeno iatrogênico e tem como principal fator associado o tratamento irregular e/ou incompleto dos casos tendo a infecção pelo HIV como um fator agravante para o tratamento e cura da TBMR. Pacientes com TBMR devem fazer uso de antibióticos de segunda linha (BRASIL, 2010). Os fármacos de segunda linha possuem um maior espectro de ação farmacológica, porém são menos específicos contra o bacilo da tuberculose, possuindo ainda um maior potencial para efeitos adversos. O tempo de tratamento da TBMR é mais longo (dezoito meses) o que, somado à toxicidade dos fármacos de segunda linha, dificulta à adesão do paciente para um tratamento completo e efetivo (DALCOMO, 2007; GANDHI, 2006; ARBX, 2010). Na tabela 2 são descritos os fármacos empregados para o tratamento da TBMR, bem como o mecanismo de ação destes fármacos.

Tabela 2 - Fármacos utilizados no tratamento dos casos de Tuberculose Multirresistente: fase de utilização, mecanismo de ação e tempo de uso. Fonte: Brasil, MS 2010 (adaptado)

Fase	Fármaco	Mecanismo de ação	Tempo
Intensiva - 1	Estreptomicina ^b	Inibe a síntese protéica.	2-meses
	Levofloxacina	Impede a síntese de DNA nascente	
	Terizidona	impede a formação da membrana peptidoglicana	
	Pirazinamida ^a	*	
	Etambutol ^a		
Intensiva - 2	Estreptomicina ^c		4 meses
	Etambutol	*	
	Levofloxacina		
	Pirazinamida		
Manutenção	Terizidona		12 meses
	Etambutol	*	
	Levofloxacina		

a) mecanismo de ação descritos na tabela 1

b) estreptomicina é usada cinco vezes por semana

c) estreptomicina é usada três vezes por semana

Nos últimos anos, além da TBMR, tem-se verificado o surgimento de um problema maior, a tuberculose extensivamente resistente (TBXDR), a qual é definida pela OMS (2010) com a TBMR com resistência adicional à uma fluoroquinolona (ex: ofloxacina) e a, pelo menos, um dos fármacos injetáveis de segunda linha (amicacina, kanamicina ou capreomicina) utilizados no tratamento da TBMR. Quando não tratado adequadamente, o paciente com TBMR pode transmitir bacilos resistentes às pessoas susceptíveis, estabelecendo uma cadeia de transmissão que constitui um grave problema de saúde pública (CAMPOS 1999; OMS, 2010). A importância da pesquisa de famílias de *M.tuberculosis* envolvidas com o desenvolvimento da TBXDR pode ser ressaltada em situações de ocorrências de surto; a exemplo o que ocorreu no final de 2005, na província de KwaZulu-Natal, África do Sul, com 221 casos identificados como TBMR, dos quais 53 também apresentavam resistência à kanamicina e à ciprofloxacina (isto é TBXDR). Dos pacientes com TBXDR, 51% (27/53) nunca tinham sido tratados previamente para TB e 83% (44/53) estavam infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A grande maioria, 98% (52/53), morreu, em média, vinte e cinco dias após a coleta de escarro para o diagnóstico da doença (GANDHI et al 2006; MOLL et al 2006)

Estima-se que em 2008, aproximadamente, 3,6 % de todos os casos novos de TB no mundo tenham sido de TBMR (OMS, 2010). Nos Estados Unidos (EUA), estima-se que 4% dos casos de TBMR tenham preenchido o critério de TBXDR no mesmo período (HOLTZ et al. 2007). No Brasil, estima-se que 0,9% (0,6-1,4 IC 95%) dos casos novos de TB sejam TBMR, sendo que o Brasil já relata ter pelo menos um caso de TBXDR diagnosticado (OMS, 2009). A Bahia ocupa o terceiro lugar em número de casos registrados de TBMR no Brasil (BRASIL/MS, 2007), e até o momento, não há registro na literatura científica da ocorrência de casos de TBXDR no Estado.

A análise do banco nacional de dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica para a Tuberculose Multirresistente, do Centro de Referência Professor Hélio Fraga, revelou, para o período de 2000 a 2009, a existência de 36 pacientes com falência comprovada ao esquema de tratamento para TBMR, no Estado da Bahia. O Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz (LACEN BA), serviço de referência para o diagnóstico da TBMR no Estado, registrou, entre 2008 e 2009, 323 isolados com perfil de TBMR (OLIVEIRA et al., 2010) e mantém um banco de isolados com cepas caracterizadas com este perfil de resistência. A resistência antituberculose é considerada uma ameaça aos esquemas de tratamento preconizados pelo Ministério da Saúde, sendo a falência ao tratamento um possível desfecho.

2.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA

Canetti et al. (1963) estabeleceu como parâmetros de detecção de resistência fenotípica um teste de sensibilidade (TS) baseado no resultado da proporção de unidades formadoras de colônia (CFU) crescidas no meio de cultivo Lowenstein-Jensen (LJ) contendo uma concentração crítica de um fármaco anti-tuberculose em comparação a quantidade de colônias crescidas no mesmo meio, porém na ausência do fármaco, sendo inoculado, em ambos os testes, uma mesma concentração de colônias. Assim, a proporção entre o número de CFU resistentes e o número de CFU crescidas no meio sem a droga não deve ultrapassar um valor crítico pré-determinado para cada fármaco. Este TS, conhecido como Método das Proporções (MP) é considerado pela OMS como o antibiograma de referência para a determinação fenotípica de resistência aos fármacos antituberculose. Com a chancela da OMS, métodos automatizados para a cultura e TS para o *M. tuberculosis* vêm sendo utilizados visando obtenção de resultados mais rápidos. Diversos autores têm comparados resultados de cultura e TS obtidos no MP e em

sistemas automatizados, ressaltando a concordância de resultados entre os dois métodos e evidenciando um tempo significativamente reduzido de respostas para os testes automatizados porém, ressaltam que os custos para implantação da automação da cultura e do TS ainda são elevados. (COELHO et al., 2005; SOMOSKÖVI & PÁL MAGYAR, 2000, 2010; HILLEMANN et al., 2006; SOMOSKOVI et al, 2006; MARTIN et al, 2009).

2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO *M. tuberculosis*

Um tempo de divisão celular mais longo, uma parede celular rica em lipídios e a presença natural de enzimas hidrolíticas ou fármaco-modificadoras (ex; β -lactamases, aminoglicosídeo acetil transferases) podem ser considerados fatores *naturais* de resistência do *M.tuberculosis* a certos antibióticos, como a penicilinas e sulfonamidas (GILLESPIE, 2003, MURRAY et al, 2009; TENOVER, 2006). Além disso, o bacilo pode localizar-se em cavidades pulmonares ou dentro de células do sistema fagocitário em um estado de latência, o que impede a ação de fármacos que agem durante o processo de replicação celular (BARBOSA, et al.2003).

O desenvolvimento da resistência aos fármacos, num contexto geral, pode ser atribuído ao comportamento do paciente durante o uso dos fármacos prescritos; a fatores intrínsecos ao sistema imune-celular do paciente, à qualidade do fármaco e ao contágio já com cepas resistentes. As bactérias possuem uma taxa constante de mutação espontânea de 0, 0033 mutações por replicação de DNA, independente do gênero (DRAKE et al.,1999; KANDUMA et al., 2004). Mutações são mudanças na seqüência dos nucleotídeos do DNA. Estas mudanças envolvem troca, deleção ou inserção de nucleotídeos, promovendo o surgimento de uma estrutura de DNA diferente da fita original (DUNNEN et al; 2000). Mutações podem explicar a presença de bacilos resistentes numa população de bacilos *selvagens*; que são bacilos que nunca entraram em contato com um determinado fármaco.

Campos et. al; (1999) aponta que cepas de *M.tuberculosis* resistentes são um sério problema de saúde pública por dois motivos principais: primeiro, há poucos fármacos efetivos disponíveis e uma infecção por cepas resistentes pode levar a uma doença potencialmente intratável; e segundo, embora apenas uma parte menor dos infectados pelo o bacilo (5-10%) adoeça, a TB é altamente contagiosa. Portanto, um número elevado de doentes portadores de bacilos multirresistentes se elevaria exponencialmente numa dada comunidade.

A resistência do *M. tuberculosis* acontece por mutação cromossômica espontânea. A presença de cepas resistentes ao antibiótico estreptomicina foi descrita por Crofton e Mitchison (1948), logo após a descoberta deste antibiótico por Albert Schatz and Selman Waksman (1944) em pacientes que não tinham feito uso deste fármaco à época do estudo possibilitando o entendimento de que pode haver famílias com resistência *natural* à estreptomicina.

Um bacilo de *M.tuberculosis* resistente, resultante de uma mutação, terá resistência específica para um dado fármaco, podendo ter uma vantagem seletiva caso o paciente não siga adequadamente os esquemas terapêuticos preconizados; estes esquemas se baseiam no uso simultâneo de múltiplos fármacos (OMS, 2010). Considera-se a seleção pelo uso irregular dos fármacos antituberculose um fator preditivo e essencial para o fenômeno da resistência na TB (GILLESPIE, et al., 2002; TENOVER et al., 2006). Apesar de que outros processos para o desenvolvimento de resistência aos antibióticos em outras espécies de bactérias sejam descritos (ex: conjugação, transdução e transformação) para a *M.tuberculosis*, a mutação é o fenômeno responsável pela variabilidade genética (DUNNEN et al, 2000; GILLESPIE, 2003, MURRAY et al, 2009; TENOVER, 2006)

Trabalhos recentes têm descrito que as espécies pertencentes ao CMT, assim como outros patógenos humanos, como o *Yersinia pestis* e o *Bacillus anthracis*, possuem um DNA constitucional com baixa variabilidade genética, sendo que estas espécies

não apresentam evidência de troca genética horizontal; sendo então consideradas bactérias geneticamente monomórficas (COMAS et al, 2009). A baixa variabilidade genética exige o uso de técnicas de genotipagem mais específicas e diferenciadas.

2.6 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RESISTÊNCIA

A variabilidade genética entre as famílias é consequência direta das mutações, resultando no polimorfismo em regiões do DNA (KANDUMA et al. 2003; ROSSETI 2006). A detecção da mutação de certos genes associada à resistência para alguns fármacos é, atualmente, utilizada para diagnóstico rápido da tuberculose resistente. Talenti et al, (1993) identificaram inicialmente mutação na subunidade β do gene *rpoB* de linhagem de *M.tuberculosis* resistentes a rifampicina não relacionadas epidemiologicamente. A detecção de mutações em genes envolvidos na resistência aos fármacos antituberculose tem sido descrita como uma possibilidade de detecção mais rápido de resistência nos casos de suspeita de TB resistente (CAMBAUP et al. 1994; HELB et al. 2009; HILLEMANN et al. 2005).

Ressalta-se que estudos também evidenciam a ocorrência de famílias com resistência fenotípica sem apresentar mutação no gene associado ao fármaco; o que pode inferir que outros mecanismos de resistência possam estar envolvidos (SUN et al. 2004 e 2008). A tabela 3 descreve algumas mutações já referenciadas na literatura em genes micobacterianos que, quando alterados, estão associados com resistência a antibióticos.

Tabela 3 – Genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência aos fármacos de primeira e segunda linha para o tratamento da Tuberculose. Fonte: KADUMA et al. 2003 (adaptado)

Fármaco	Gene mutante associado
Rifampicina	<i>rpoB</i>
Isoniazida	<i>KatG, inhA, oxyR, ahpC, furA</i>
Estreptomina	<i>rrs, rpsL</i>
Pirazinamida	<i>pncA, IS6110 insertion</i>
Etambutol	<i>embB</i>
Fluoroquinolona	<i>gyrA, gyrB</i>

Fonte : KADUMA et al. 2003 (adaptado)

Gagneux et al (2006) sugere que a tendência para resistência a um dado fármaco antituberculose e a capacidade de transmissibilidade durante a multiplicação celular podem estar associadas a um perfil genético, gerado a partir de mutações no genoma da família ancestral. Adicionalmente, distinguir famílias possibilita a caracterização de surtos e identificação de fontes comuns; diferenciar infecção recente de reativação endógena, detectar possíveis contaminações intra extra laboratorial, durante a manipulação de amostras; além disso, para questões de saúde pública, a genotipagem é uma ferramenta a mais para identificação de fatores de risco de transmissão da tuberculose em comunidades (ROSSETI 2001, FERRAZOLI et al. 2000). A caracterização do polimorfismo genético de *M.tuberculosis* é obtida empregando-se técnicas de biologia molecular adequadas para a situação da baixa diversidade genética do bacilo (COMAS et al. 2009; WIRTH et al, 2008).

2.7 POLIMORFISMOS GENÉTICO DE FAMILIAS DE *M. tuberculosis*.

O conhecimento das famílias/subfamílias de *M.tuberculosis* mais comuns e com ampla distribuição mundial tem ajudado a entender a dinâmica de transmissão da tuberculose. As técnicas de caracterização de polimorfismos do genoma micobacteriano mais comumente empregadas detecta a presença ou ausência de elementos genéticos móveis ou seqüências espaçadoras localizadas entre elementos repetitivos do genoma micobacteriano, ou na quantificação de seqüências repetidas em *tandem* em regiões de microssatélites; ou ainda, na detecção de alterações pontuais de único nucleotídeo em seqüências altamente conservadas. (BRUDAY et al. 2006; DURMAZ et al. 2007; VAN DEUTEKON et al. 2005; SUPPLY et al. 2006). A seguir, são descritas técnicas de caracterização genética do *M.tuberculosis* amplamente empregadas na literatura.

2.7.1 Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP)

A avaliação por RFLP da presença e quantidade de repetições do elemento de inserção 6110 (*IS6110*) mostrou-se um método muito robusto para ajudar a confirmar casos de tuberculose epidemiologicamente relacionados. A técnica de RFLP-*IS6110* baseia-se na detecção do elemento móvel *IS6110* no genoma de micobactérias, o qual apresenta variação tanto no local de sua inserção como no número de cópias presentes. A base genética do polimorfismo observado resulta de mutações nos sítios de restrição alvo da enzima utilizada para lise do DNA e de translocações e duplicações ou deleções do elemento móvel (*IS6110*) em diferentes partes do genoma (FERRAZOLI et al. 2000; COMAS et al.; 2009 VAN EMBDEN et. al, 1993). Este método tem como limitações a incapacidade de distinguir cepas com baixo número de cópias de *IS6110* (< 5 cópias), e a necessidade de obtenção de DNA de elevada qualidade, a partir de culturas recentes e em quantidade suficiente

para a realização da técnica. É um método laborioso e de alto custo para ser empregado numa rotina de diagnóstico (SUPPLY et al. 2000, 2001 e 2006)

2.7.2 Oligonucleotídios Espaçadores (Spoligotyping)

O spoligotyping é uma técnica baseada na amplificação por PCR da região DR e sequencialmente, na hibridação do produto amplificado com oligonucleotídios marcados complementares às regiões espaçadas variáveis localizadas entre as regiões DR no genoma da micobactéria. O *locus* DR é membro de uma *estrutura* universal de seqüências conhecidas como repetições palindrômicas curtas regulatórias agrupadas -*Clustered Regulatory Short Palindromic Repeats* (CRISPR).

A ausência/presença de um conjunto de 43 oligonucleotídios únicos proporciona a variabilidade entre as famílias. O seu uso tem permitido caracterizar famílias e subfamílias de *M.tuberculosis* com base em padrões de spoligotyping obtidos após a hibridação (BRUDAY et al. 2006; KAMERBEEK et al. 1997 WIRTH 2008). O perfil do spoligotyping da família Beijing, por exemplo, não possui os espaçadores de 35 a 43, sendo esta a característica genético desta família por esta técnica.

O poder discriminatório do spoligotyping entre as famílias pode ser menor quando comparado com técnicas que avaliam alterações pontuais de nucleotídeos, em todo o genoma da bactéria (COMAS et al. 2006) ou quando o numero de cópias do *IS6110* é alto (SANTOS e KIPNIS et al, 2007; KANDUMA et al, 2003) mas, permite o agrupamento (*clusterização*) de linhagem com base nos *Shared Types* (ST's) comuns compartilhados, os quais caracterizam o genoma bacteriano com base nos resultados dos spoligotyping das famílias/subfamílias. Estes ST's são identificados por números arábicos e constituem um tipo internacional identificação do genoma micobacteriano com base nos resultados do spoligotyping, servindo de parâmetro de comparação entre técnicas de genotipagem diferentes, como MIRU-

VNTR. Os ST's são classificados por um banco internacional de dados (SITVIT), possibilitando a comparação de taxas de agrupamento por ST's de famílias de *M.tuberculosis* genotipadas em todo o mundo. (BRUDAY et al 2006, MENDES et al, 2011). A tabela 4 descreve a freqüência de algumas famílias e subfamílias de *M.tuberculosis* caracterizadas por spoligotyping, comumente circulantes em algumas regiões do Brasil.

Tabela 4 - Principais famílias do complexo *M. tuberculosis* descritas em estudos no Brasil.

Autor e Ano	Local	Família							
		LAM	Haarlem	T	X	U	S	EAI	Beijing
Malaspina et. al; 2008	Araraquara/SP	*	*	*	*	*			
Cafrune et. al 2009	Rio Grande do Sul	*	*	*	*	*	*		
Mendes et. al 2011	São Paulo	*	*	*	*	*	*		*
Groll et. al 2010	Rio Grande do Sul	*	*	*					
Noguti et. al 2010	Paraná	*	*	*	*	*	*		
Miranda et. al 2011	Minas Gerais	*	*	*	*	*	*		
Oelemann et. al 2011	Rio de Janeiro, Porto Alegre e Belém	*	*	*	*	*	*		*
Perrizolo et al. 2012	Rio Grande do Sul	*	*	*	*	*	*		
Nery et al, 2011 ¹	Salvador (BA)	*	*	*	*	*		*	

* presença da família no estudo

¹Dissertação de mestrado

Como base nos estudos descritos na tabela 4, verifica-se no Brasil uma maior frequência da família Latin-American-Mediterranean (LAM), seguida da família Haarlem (H) e da família T. Os dados estão em acordo com Bruday et al (2006) que realizou um análise exploratória do banco de dados internacional de perfis de spoligotyping (SpolDB4 – versão mais atual) descrevendo 62 famílias/subfamílias do CMT com base em 1.939 padrões de spoligotyping de 39.295 cepas do CMT obtidos de 112 países, inclusive o Brasil. Aproximadamente 50% dos isolados da America do Sul pertencem à família LAM, a família H e T são principalmente encontradas África, America Central e Caribe, Europa e América do Sul. O SpolDB4 é uma ferramenta útil para estudos de epidemiologia molecular e filogenia da TB.

2.7.3 Número Variável de Repetições em Tandem de Unidades Repetitivas Interespaçadas Micobacterianas (MIRU-VNTR).

A genotipagem de famílias de *M.tuberculosis* pela técnica de MIRU-VNTR vem sendo amplamente empregada em todo o mundo (ALLIX-BEGUEC et al. 2008; FLECHE et al. 2001; TAJAJ et al. 2009). Estudos têm comparado os resultados desta técnica com os obtidos com RFLP-*IS6110* e spoligotyping para a determinação de famílias relacionadas epidemiologicamente (van DEUTEKON, 2005). Comparada ao RFLP-*IS6110*, o MIRU-VNTR mostra-se mais rápido, de menor custo, e passível de automação, o que sugere o seu possível uso na rotina laboratorial para detecção de famílias relacionadas (RORING et al. 2002; SUPPLY, 2006; SKUCE et al. 2002).

O MIRU-VNTR baseia-se na amplificação por PCR de múltiplos *loci* micobacterianos usando *primers* específicos para regiões flangeadoras de cada locus proposto; o tamanho do amplificado (*amplicons*) reflete o numero de cópias do locus MIRU-VNTR alvo. Os *loci* contendo as seqüências de repetições em tandem possuem tamanho de 40-100 pb (isto é, são minissatélites) podendo variar entre as

famílias no número de cópias. O número de cópias obtido é ordenado por *locus* alvo, seguindo uma seqüência única; gerando um código numérico composto de 12 dígitos (12 *loci*) à 24 dígitos (24 *loci*) que pode ser comparado intra e extra laboratorialmente. Um sistema baseado do em 12 *loci* MIRU-VNTR é o mais amplamente usado por apresentar robustez mínima necessária para discriminação genética de isolados de *M. tuberculosis*.(ALLIX-BÉGUEC et al, 2008; van DEUTEKOM et al., 2005, SUPPLY et al; 2006;). Estes *loci* são, portanto, úteis em estudos de reconhecimento de grupos (*clusters*) em TB devido a pouca variação genética no DNA de espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*. Ressalta-se que a técnica RFLP apresenta robustez para estabelecer uma ligação epidemiológica entre isolados de *M.tuberculosis* obtidos de dois ou mais pacientes enquanto que as técnicas de Spoligotyping e MIRU-VNTR, além de estabelecer um *link* epidemiológico entre casos de TB, pode permitir a descrição de famílias e subfamílias da espécie *M. tuberculosis*; a figura 1 mostra o resultado da genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* por estas três técnicas.

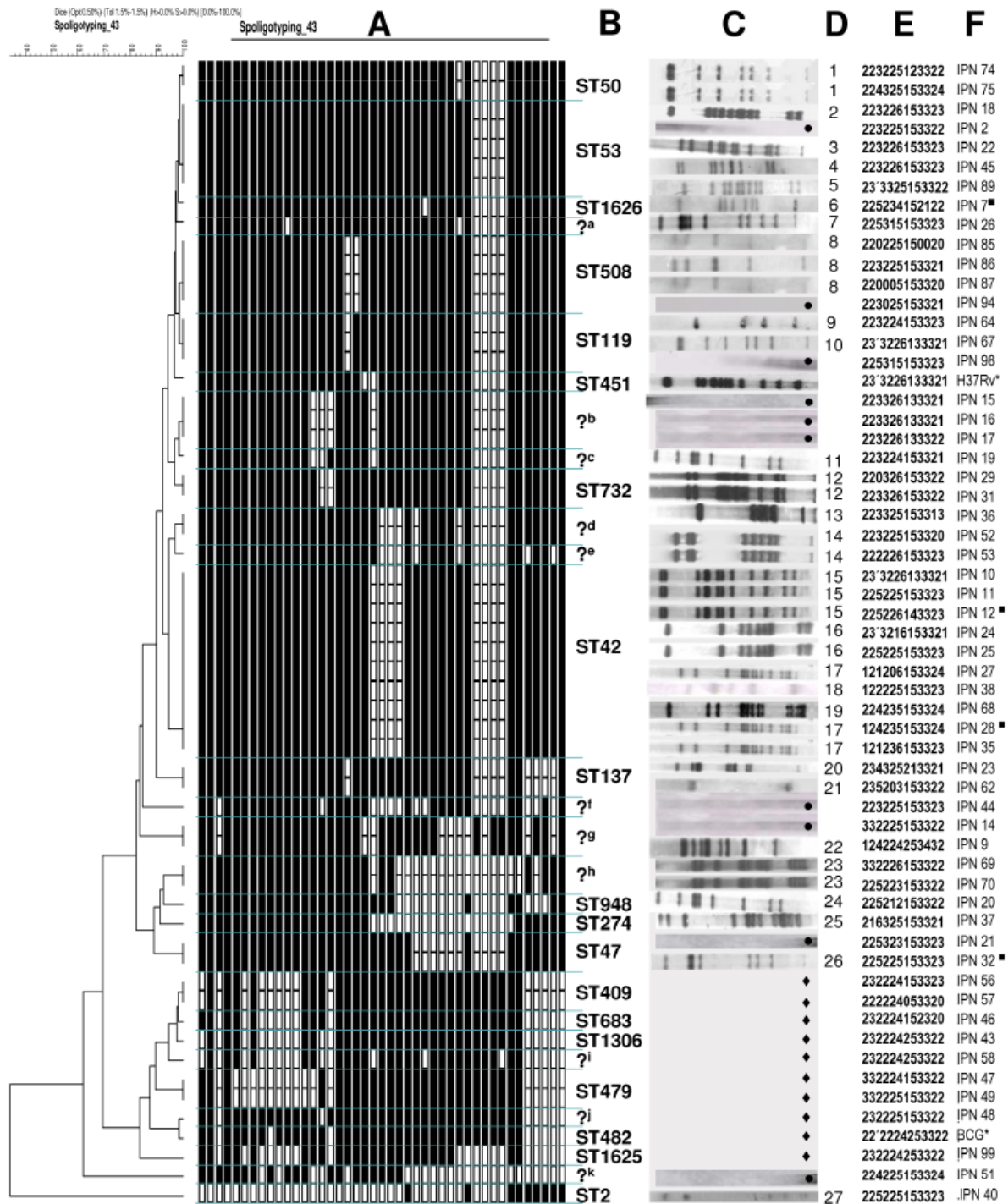


Figura 1 - Dendrograma apresentando a caracterização genética de famílias de *Mycobacterium tuberculosis* segundo os perfis encontrados em três técnicas de genotipagem: Perfil de spoligotyping (A), os ST's específicos da linhagem (B); perfil RFLP-*IS6110* (C); número de famílias agrupadas pelo perfil RFLP-*IS6110* (D); seqüência numérica obtida pela técnica de MIRU-VNTR utilizando 12 loci (E) e a identificação do isolado no estudo (F). (Lopez-Alvares et al; 2010)

A descrição dos perfis genéticos de famílias pertencentes ao CMT tem permitido o entendimento da distribuição espacial das diversas famílias e subfamílias em todo o mundo, o que possibilitou o entendimento da dispersão das famílias mais adaptadas e responsáveis por infecções humanas (BRUDAY 2006); bem como o reconhecimento de famílias isoladas geograficamente ou restritas à infecção em animais (FOXMAN, 2001; SMITH et al. 2006). A caracterização do perfil genético e o conhecimento do tipo de família ou subfamília mais prevalente e circulante numa população humana vulnerável pode permitir o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais acurado e de medidas de prevenção (ex vacinas) mais eficientes e direcionadas.

As dez principais famílias mais freqüentes do CMT com base no SpoIDB4 são: a família T, família Central-Asia (CAS), família East-African-Indian (EAI) família Manu, família S, família X, família Latin-American-Mediterranean (LAM), família Haarlem (H), família Beijing, família Beijing-like. A família T esta distribuída em todos os continentes. A família CAS está principalmente distribuída no Ásia Central e Oriente Médio, sendo dividida em duas principais subfamílias: a CAS1-Delhi, encontrada na Índia e a CAS1-Kilimanjaro, encontrada na Tanzânia. A família EAI, distribuída na Ásia Oriental, é descrita principalmente na China, Coréia do Norte, Coréia do Sul e Japão, sendo prevalente nas Filipinas e Malásia. As famílias S e Manu são famílias novas e ainda pouco descritas; esta última, é derivada da subfamília LAM11-ZWE, sendo essencialmente encontrada na Índia (Bhanu, 2002). Há alta prevalência das famílias LAM e T nos continentes Africanos e Sul-Americano. A família X é prevalente na América do Norte e, secundariamente, na América Central.

A família Beijing, comumente associada às famílias resistentes, é prevalente no continente Asiático, sendo muitas vezes descrita como uma família endêmica na China. Estudos mostram que a família Beijing está se difundindo para a Rússia

(GLYNN, 2002; QIAN, 1999). Almeida et al. (2005) relataram uma alta frequência (20/55) de isolados da família Beijing entre todos os isolados multirresistentes em um estudo na cidade de Mumbai, Índia.

No início de 1990, cepas de *M.tuberculosis* multirresistentes foram isoladas em 22% (43/198) dos pacientes que eram casos novos de TB, internados no Hospital da Cidade de Nova York (EUA). Investigações epidemiológicas clássicas aliadas às técnicas de tipagem do DNA destes isolados revelaram tratar-se de um surto ocasionado por famílias de MT-MDR pertencentes à família Beijing, que foram denominadas linhagem W (HEWLETT et al. 1993, KREMER et al. 2004).

Gibson et al. (2008) demonstraram a ocorrência de um subgrupo da família LAM no Brasil caracterizado por uma deleção genômica única verificável através de um PCR multiplex. Tal subgrupo, obtido de pacientes com TB no Rio de Janeiro, foi denominado RD^{Rio}. Famílias do subgrupo RD^{Rio} são encontradas dispersas em outros continentes e sua associação com maior transmissibilidade e potencialmente maior *fitness* biológico destaca a importância deste subgrupo ser prontamente identificado, como medida de controle para a saúde pública (GIBSON et al, 2008) .

Entender os mecanismos de resistência é um desafio no combate à tuberculose resistente, principalmente na sua forma mais grave. O estudo de caracterização genética amplia o potencial de intervenção no surgimento de casos novos da doença, proporcionando competências para distinguir casos epidemiologicamente relacionados, o que favorece ações mais direcionadas de vigilância à saúde com foco na quebra da cadeia de transmissão. Assim, a Bahia, terceiro Estado da Federação em números de casos novos de TB e também, o terceiro em números de casos de tuberculose multirresistente (TBMR) carece de estudos que objetivam entender a dispersão e as características genéticas das famílias do *M. tuberculosis* dos casos de TB diagnosticados nos seus serviços de referências.

Estimativas da OMS revelam que se medidas efetivas contra a TB não forem substancialmente tomadas, a níveis locais e globais, mais de um bilhão de pessoas irão se infectar com o bacilo da TB até 2020, devidos a combinação de fatores demográficos, movimentos migratórios, expansão do número de pessoas infectadas com o HIV e o surgimento de casos novos de resistência aos fármacos antituberculose (KOCHI 1994; KANDUMA et al, 2003; OMS, 2010).

O Estado deve cumprir seu papel fomentando pesquisas que visem subsidiar políticas públicas de combate à doença. A tuberculose pode ser controlada e possui cura, porém continua sendo a primeira causa de morte por doença infecto-contagiosa em todo o mundo.

3 JUSTIFICATIVA

A caracterização genética de famílias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* resistentes pode contribuir para o diagnóstico precoce da TB potencialmente grave, possibilitando a identificação dos casos novos de TB resistente envolvendo famílias filogeneticamente associadas com os casos de TB resistentes (e graves) previamente descritos. O conhecimento do perfil genético destas famílias pode fornecer ferramentas para a descrição de situação epidemiológica, permitindo, por exemplo, a caracterização de surtos e um melhor entendimento do processo de dispersão das famílias de *M. tuberculosis* circulantes no Estado da Bahia.

Em particular, para as famílias resistentes, a descrição genética possibilita um melhor entendimento do processo de desenvolvimento da resistência do *M.tuberculosis* aos fármacos antituberculose, permitindo a identificação de fatores de riscos locais associados ao surgimento TBMR. Em conjunto com a genotipagem, a avaliação do grau de susceptibilidades aos fármacos antituberculosos de segunda linha proporciona a caracterização de pacientes com TBXDR.

Como aponta BRUDAY et al. (2006), é um desafio estabelecer relações entre a variabilidade genética do bacilo e a clínica dos pacientes, mas esta associação pode permitir uma melhor conduta clínica. Compreender a dispersão das principais famílias e subfamílias do bacilo da TB no Estado pode favorecer ações de vigilância mais focadas; atentando, principalmente, para prevenção de novos casos. Ressalta-se ainda, a possibilidade de implantação/implementação de tecnologias de genotipagem para o diagnóstico de TB resistente no Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz, referência estadual no diagnóstico laboratorial da TB.

As técnicas de genotipagem quando utilizadas em conjunto com os métodos convencionais de investigação epidemiológica permitem grandes avanços no conhecimento sobre evolução, transmissão e patogênese de agentes infecciosos. Na Bahia, terceiro estado em números de casos novos de TB e de TBMR, não há estudos na literatura científica abordando a prevalência/incidência das principais famílias de *M.tuberculosis* resistentes circulantes, bem como dos casos de TBXDR.

4 OBJETIVOS DO TRABALHO

4.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar uma possível ocorrência de TBXDR na Bahia e caracterizar o perfil genético de famílias de *M. tuberculosis* multirresistentes associando o perfil genético com as características sócio-demográficas e clínicas dos pacientes envolvidos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Descrever o perfil de resistência de isolados de *M. tuberculosis* submetidos ao teste de sensibilidade utilizando os fármacos: rifampicina (R), isoniazida (H) e etambutol (E), estreptomicina (S), ofloxacina (O), kanamicina (K) e amicacina (A), capreomicina (C);
- 4.2.2 Localizar geograficamente e avaliar uma possível associação entre os perfis de resistência encontrados com as características sócio-demográficas e clínicas dos pacientes envolvidos;
- 4.2.3 Caracterizar o perfil genético dos isolados multirresistentes através do Número Variável de Repetições em Tandem de Unidades Repetitivas Inter-Espaçadas (MIRU-VNTR) 12 *loci* e do Spoligotyping.
- 4.2.4 Descrever a distribuição dos casos de TB multirresistente e das famílias e subfamílias de *M. tuberculosis* encontrados por município de ocorrência do Estado da Bahia.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de corte transversal com amostragem de conveniência.

5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Casos prevalentes TBMR do Estado da Bahia do período de 2008 a 2011.

5.2.1 Amostra

As amostras foram os isolados de *M. tuberculosis* apresentando resistência simultânea à R e H (isto é MT-MDR) com resistência adicional ou não a outros fármacos antituberculose. Os isolados foram obtidos de amostras biológicas de pacientes com diagnóstico de TB do Estado da Bahia, principalmente aqueles atendidos no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM) no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2011. Os isolados MT-MDR com resistência adicional à Ofloxacina mais resistência à kanamicina e/ou capreomicina e/ou amicacina caracterizados no TSII foram designadas como isolados de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes (MT-XDR). Dois ou mais isolados pertencentes a um mesmo pacientes foram avaliados, sendo utilizado um único isolado (mais recente) para descrição do perfil de resistência e para genotipagem.

5.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA

Os perfis de resistência dos isolados de *M. tuberculosis* foram obtidos a através da realização do TSI no LACEN BA e do TSII no Centro de Referência Prof. Hélio Fraga (CRPHF). O TSI foi realizado pelo método das proporções segundo Canetti et al. (1969) em meio sólido de cultura Lowenstein-Jensen (LJ) no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2011. Antes da realização do TSI, os isolados foram identificados como pertencente à espécie *M. tuberculosis* pelo uso de meios de LJ contendo agentes inibidores de crescimento para outras espécies (ácido-p-nitrobenzóico a 500ug/ml e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico a 2ug/ml), realização do teste da niacina e teste da redução do nitrato, além da avaliação das características fenotípicas conforme protocolos internos do setor de micobacteriologia do LACEN BA e do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias (Brasil, 2008). Os seguintes fármacos foram utilizados no TSI: isoniazida (H), rifampicina (R), etambutol (E), estreptomicina (S), nas concentrações de 0,2mg/ml; 40mg/ml; 2mg/ml e 4mg/ml. Uma alíquota de cada isolado de foi armazenada em meio líquido 7H9 de Middlebrook e mantida a -20°C, constituindo um banco de isolados do LACEN BA. Cada isolado foi posteriormente repicado em dois (2) tubos contendo meio LJ e armazenado a 36°C (± 1) em estufa bacteriológica por 30 dias. Após crescimento das culturas em ambos os tubos; um tubo foi enviado ao Centro de Referência Prof. Hélio Fraga (CRPHF) para realização TSII e o outro tubo, foi utilizado para extração do DNA da cultura.

O TSII foi realizado em meio líquido de Middlebrook 7H9 modificado, automatizado e pertencente a um sistema não-radiométrico de cultura comercial (BACTEC MGIT960, Becton Dickinson Diagnostic Systems, MD) empregando os seguintes fármacos ofloxacina, kanamicina, capreomicina e amicacina nas concentrações de 2,0 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml e 1,0 μ g/ml, respectivamente. A realização do TSII pelo CRPHF segue as recomendações da Organização Pan Americana de Saúde (OPAS).

5.4 EXTRAÇÃO DO DNA.

O DNA dos isolados foi extraído a partir de culturas crescidas no tubo 2 do repique. As colônias de *M. tuberculosis* foram retiradas com auxílio de alça plástica estéreis de 10µl e colocadas em criotubos contendo 500µl de tampão TE pH8,0 (100 mM Tris/HCl, pH 8.0 e 10 mM EDTA em água destilada estéril) e mantidas a -20°C. O DNA foi extraído conforme técnica descrita por van EMBDEN et al (1993). Em resumo, os criotubos armazenados contendo as colônias foram aquecidos em termobloque à 80°C por 30 minutos para inativação das cepas; posteriormente, 70µl de uma solução de lisozimas (10mg/ml) foi introduzida nos criotubos, mantendo-os a 37°C em *over night*. No dia seguinte, uma mistura de 70 µl SDS10% mais 20µl de uma solução de proteinase K (10mg/ml) foi introduzida, incubando a 65°C por 15 minutos. Adicionalmente, 100µl de NaCl 5M e 100µl de CTAB (previamente aquecido) foram introduzidos, mantendo-se os criotubos mais uma vez, a 65°C por 15 minutos; sequencialmente, 500ul de uma solução de Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi introduzida e todo o material foi homogeneizado em vórtex e centrifugados a 14000 rpm. Para a extração final. Retirou-se 600µl do sobrenadante aquoso para um eppendorff estéril. O DNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico gelado; e mantido em temperatura ambiente para evaporação, sendo então o DNA lavado com álcool 70% gelado. Utilizou-se 100µl de tampão TE pH 8,0 para diluição final do DNA extraído que acondicionado a -20°C para posterior uso na genotipagem. Os reagentes foram preparados conforme protocolo disponível em [web:http://www.protocol-online.org](http://www.protocol-online.org) Todos os procedimentos foram realizados no laboratório NB2/NB3, atendendo as normas de biossegurança para agente nível 3.

5.5 GENOTIPAGEM

Empregou-se a técnica de Número Variável de Repetições em Tandem de Unidades Repetitivas Inter-Espaçadas (MIRU-VNTR) com amplificação de 12 *loci* (MIRU-VNTR 12 *loci*), utilizando *primers* marcados com corantes fluorescentes (*dyes*), e *primers* não-marcados tendo como alvo regiões flanqueadas dos respectivos *loci* a serem amplificados. Realizou-se amplificação por multiplex-PCR (MIX) para três *loci*; cada conjunto de mix, designados como mix 1, composto pelos MIRU 04 (*locus* 580), 26 (*locus* 2996) e 40 (*locus* 802); o mix2, constituído pelos MIRU10 (*locus* 960), 16 (*locus* 1644), 31 (*locus* 3192); mix 6 formados pelos MIRU 02 (*locus* 154), 23 (*locus* 2531), 39 (*locus* 4348), e pelo mix 7 composto pelos MIRU 20 (*locus* 2059), 24 (*locus* 2687), e 27 (*locus* 3007), conforme tabela 5 desta seção.

A amplificação destes *loci* seguiu-se conforme protocolo do guia técnico de Supply et al (2005) com adaptações propostas por van Soolingen et al (2010). Resumidamente, a análise utilizou kit comercial Qiagen HotstartTaq polymerase com solução Q com *primers* não-marcados e marcados para a técnica MIRU-VNTR 12 *loci*, empregando-se LIZ1200 (GeneScan™ LIZ1200® da Applied Biosystems como marcador de peso molecular durante a separação dos *loci* amplificados em eletroforese capilar (EC).

Para cada amostra cujo DNA foi genotipado, foi utilizado uma quantidade de 0,08 ul de HotStart-Taq DNA polimerase (0,4U), 4ul de solução-Q 5x; 2ul Buffer 10x; 0,4 a 1,2ul de MgCl₂ 25mM (dependendo do MIX - exceto para o MIX 7); 9ul de H₂O MQ e 0,8ul de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (c.c de 10mM para todos); 0,4ul de *primers* não-marcados (c.c de 4pmol/ul) e 0,4ul de *primers* marcados na c.c. de 4pmol/ul (MIRU-VNTR's 2, 4, 10, 16, 20, 23, 26, 27, 31, 39 e 40) e 2pmol/ul (MIRU 24). As seqüências dos *primers* de todos os MIRU-VNTR's podem ser vistas na figura 3.

Numa placa de 96 poços, 18µl da mistura dos reagentes foram adicionadas a 2µl do DNA da amostra; perfazendo, 20µl de solução final para amplificação. Para

cada mix a ser amplificado, foram utilizados um controle positivo (cepa BCG Morreau) e um controle negativo (todos os reagentes mais 2µl H₂O MQ no lugar do DNA) por placa trabalhada. O perfil genético da cepa BCG é previamente conhecido para cada *locus* MIRU-VNTR amplificado.

Os parâmetros de amplificação bem como o procedimento de realização das placas estão descritos nos protocolos estabelecidos por Supply et al (2005) e van Soolingen et al (2010). Para todos os MIX's, utilizou-se a mesma programação no termociclador, iniciando com 15 min a 95°C seguido por de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 min. a 59°C, 1,5 min. a 72°C sendo finalizada com incubação de 10 min. a 71°C. Após amplificação, os *amplicons* foram diluídos 5x com H₂O MQ e 1µl deste DNA amplificado diluído foi aliquoteado em uma nova placa de 96 poços, contendo 9ul de uma solução LIZ1200 diluído 20x em formamidaHi-Di™, conforme instrução do fabricante. Seqüencialmente, esta placa foi denaturada a 95°C por 5 min e reservada a – 20°C para seqüenciamento em EC.

A EC foi realizada na plataforma de seqüenciamento do Centro de Pesquisa Prof. Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz do Estado da Bahia (CPqGM/FIOCRUZ BA), utilizando seqüenciador automático (Analyser 3100, Applied Biosystems) de 16 capilares (50cm) com parâmetros de corrida estabelecidos por Supply et al (2005). Para obtenção dos tamanhos (em pb) dos *loci* alvos amplificados, os resultantes da EC foram analisados utilizando *software* livre PeakScanner v.1.0 (Applied Biosystems) disponível em *web*. Os tamanhos das amplificações dos *loci* (em pb) foram transcritos para uma planilha de Excel e comparados manualmente utilizando a tabela 5 como referência para obtenção do número de repetição em *tandem* dos *loci* amplificados.

5.6 DESCRIÇÃO DOS PERFIS MIRU-VNTR E OBTENÇÃO DAS FAMÍLIAS E SUBFAMÍLIAS.

O perfil genético encontrado corresponde às ampliações das repetições em *tandem* para os 12 loci amplificados no estudo foram organizados conforme tabela 5; obtendo assim uma seqüência numérica de 12 dígitos. Os perfis genéticos dos isolados foram comparados com os perfis constantes em uma base de dados internacional disponível via *web* (www.miru-vntrplus.org) que possui dados de 186 cepas caracterizadas pelo uso das técnicas MIRU-VNTR (24 *loci*), Spoligotyping, polimorfismo de nucleotídeo único (*single-nucleotide-polymorphism - SNP*) e polimorfismo de seqüência ampliada (*large-sequence-polymorphism-LSPs*) conforme descrito por ALLIX-BÉGUECE et. al (2008).

Os perfis genéticos dos isolados do estudo obtidos pela técnica de MIRU-VNTR 12 *loci* foram submetidos ao banco de dados www.miru-vntrplus.org para obtenção das famílias/subfamílias e do *Internacional shared type* (ST's). Os ST's são números que caracterizam o genoma das famílias/subfamílias conforme o banco de dados internacional de Spoligotyping (SpolDB) na sua última versão (SpolDB4).

A família/subfamília foi identificada quando a análise de congruência entre o perfil MIRU-VNTR 12 *loci* encontrado dos isolados do estudo apresentou uma congruência igual ou inferior a 0,17 (*cut off*) com os perfis MIRU-VNTR 24 *loci* das cepas de referências do banco de dados; sendo o melhor grau de congruência (*bestmatch*) igual a zero, conforme utilizado e recomendado por ALLIX-BERGUEC et. al (2008) e OELEMAN et al (2011). Um dendograma baseado no perfil do MIRU-VNTR 12 *loci* das linhagens do estudo foi gerado utilizando um coeficiente categórico de peso um no formato *tree* UPGMA utilizando o mesmo banco de dados. Dois ou mais isolados apresentando o mesmo perfil MIRU-VNTR 12 *loci* foram consideradas como pertencentes ao mesmo *cluster* e àqueles isolados possuindo perfis MIRU-VNTR 12 *loci* únicos foram consideradas como *não-cluster*.

5.7 PERFIS DE MIRU-VNTR NÃO PAREADOS COM AS LINHAGENS DE REFERÊNCIAS DO BANCO DE DADOS www.MIRU-VNTRplus.

Os perfis de MIRU-VNTR do estudo que apresentaram *cut off* similaridade alto ($> 0,17$) com as linhagens das cepas de referências do banco de dados foram considerados como perfis de MIRU-VNTR não-pareados (MIRU-VNTR-np)

O DNA dos isolados que apresentaram perfil de MIRUVNTRnp foram enviados ao Instituto Evandro Chagas no Estado (IEC) no Pará uma segunda genotipagem utilizando a técnica do Spoligotyping. Para a realização do Spoligotyping, utilizou-se o protocolo descrito por KAMERBEEK et al (1997). Rapidamente, esta técnica consiste na utilização de 20pmols de *primers* biotinilados específicos para região da DR cromossomal do *M. tuberculosis*; 200 μ M de dNTP's e 1U de Taq DNA polimerase para amplificação por PCR. O produto amplificado foi hibridizado em membrana (*IsogenLifeScience*) contendo 43 oligonucleotídios espaçadores do *locus* DR complementares à aqueles oligonucleotídios amplificados da amostra. Os fragmentos ligados à membrana foram detectados por quimiluminescência após incubação com peroxidase, revelando a presença ou ausência de um determinado oligonucleotídio espaçador.

Os perfis encontrados foram compilados numa planilha Excel e combinados com os perfis MIRU-VNTRnp dos isolados correspondentes e submetidos novamente ao ao mesmo banco de dados (www.miru-vntrplus) para obtenção das famílias/subfamílias e ST's.

Mix	Locus	Alias	Sequence (optional label)	Work soluti concentrati (μ M)
Mix 1	580	MIRU 4 / ETR-D	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM)	4
			GCGCAGCAGAAACGCCAGC	20
	2996	MIRU 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	20
			CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)	4
Mix 2	802	MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED)	4
			GGGTGATCTCGGCCGAAATCAGATA	20
	960	MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	20
			GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)	4
Mix 3	1644	MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA	20
			CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)	4
	3192	MIRU 31 / ETR-E	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	20
			GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)	4
Mix 4	424	VNTR 42	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT	20
			GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC (FAM)	2
	577	VNTR 43 / ETR-C	CGAGAGTGGCAGTGGCGTTATCT (VIC)	4
			AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA	20
Mix 5	2165	ETR A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED)	8
			CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	20
	2401	VNTR 47	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM)	4
			ACTTGAACCCCCACGCCCATAGTA	20
Mix 6	3690	VNTR 52	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC)	4
			TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	20
	4156	VNTR 53 / QUB-4156c	TGACCACGGATTGCTCTAGT	20
			GCCGGCGTCCATGTT (NED)	20
Mix 7	2163b	QUB-11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG	20
			CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)	8
	1955	VNTR 1955	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC)	4
			CAACATCGCCTGGTTCTGTA	20
Mix 8	4052	QUB-26	AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED)	8
			CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCCTCCCGAT	20
	154	MIRU 2	TGGACTTGCAGCAATGGACCACT	20
			TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (FAM)	4
Mix 9	2531	MIRU 23	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG (VIC)	4
			AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTG	20
	4348	MIRU 39	CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC	20
			CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)	4
Mix 10	2059	MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM)	4
			GGAGACCGCGACCAGGTA	20
	2687	MIRU 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT	20
			GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)	2
Mix 11	3007	MIRU 27 / QUB-5	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA	20
			GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)	4
	2347	VNTR 46	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT (FAM)	4
			AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC	20
Mix 12	2461	VNTR 48 / ETR-B	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC)	2
			CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC	20
	3171	VNTR 49	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA (NED)	4
			GCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC	20

Figura 2 – Descrição MIX's(de 1a8) e os seus respectivos *loci* ou nome do MIRU (alias). Todos os lócus estão representados pela sua seqüência de oligonucleotídica de iniciação (*primers*) com a sua respectiva concentração de uso. Os *primers* marcados são designados com a terminação FAN, VIC ou NED. Fonte van Soolingen et al,(2010)

Tabela 5 Referencia para obtenção do número de repetições em tandem após amplificação do *locus* MIRU VNTR utilizando PCR – multiplex Fonte: Supply et al, 2005 (adaptado)

Repetições	Tamanho da amplificação por <i>locus</i>											
	MIX 1			MIX 2			MIX 6			MIX 7		
	580	2996	802	960	1644	3192	154	2531	4348	2059	2687	3007
0	175	285	354	482	565	492	402	150	540	437	395	498
1	252	336	408	537	618	545	455	200	593	514	447	551
2	329	387	462	590	671	598	508	253	646	591	501	604
3	406	438	516	643	724	651	561	306	699	668	555	657
4	483	489	570	696	777	704	614	359	752	745	609	710
5	560	540	624	749	830	757	667	412	805	822	663	763
6	637	591	678	802	883	810	720	465	858	899	717	816
7	714	642	732	855	936	863	773	518	911	976	771	869
8	791	693	786	908	989	916	826	571	964	1053	825	922
9	868	744	840	961	1042	969	879	624	1017	1130	879	975
10	945	795	894	1014	1095	1022	932	677	1070	1207	933	1028
11	1022	846	948	1067	1148	1075	985	730	1123	1284	987	1081
12	1099	897	1002	1120	1201	1128	1038	783	1176	1361	1041	1134
13	1176	948	1056	1173	1254	1181	1091	836	1229	1438	1095	1187
14	1253	999	1110	1226	1307	1234	1144	889	1282	1515	1149	1240
15	1330	1050	1164	1279	1360	1287	1197	942	1335	1592	1203	1293

5.8 VARIÁVEIS DO ESTUDO

As variáveis sócio-epidemiológico e clínicas dos pacientes, foram obtidas dos prontuários dos pacientes no HEOM e nas fichas do Sistema Vigilância Epidemiológicos da TBMR do Ministério da Saúde - Sistema TBMR/MS (ANEXO I).

5.8.1 Variáveis Qualitativas:

Sexo, município, escolaridade, apresentação da radiografia pulmonar, história de abandono e história de falência, resultado do exame para HIV, situação clínica atual (quando da obtenção dos dados, como se encontrava o paciente), perfil de resistência para fármacos de primeira e segunda linha, perfil genético obtido no MIRU-VNTR e pelo Spoligotyping.

Na variável ***situação clínica atual*** foram considerados os desfechos dos pacientes no momento da coleta dos dados, estabelecendo as seguintes categorias: *tratamento favorável*, que compreende a cura da doença ou situação de tratamento com evolução para à cura (melhora clínica com negatização da cultura ao longo do tratamento), *falência ao tratamento*, verificado com positividade da cultura para *M. tuberculosis* com piora do quadro clínico ao longo do tratamento), *abandono*, caracterizado quando há ausência de tratamento do paciente por mais de 30 dias, e *óbito*. Considerou-se como existência de co-morbidade àquela (s) notificada (s) no prontuário ou na Ficha Sistema TBMR ao tempo da análise.

5.8.2 Variáveis Quantitativas

Idade, tempo de tratamento para TBMR, número de tratamento anterior para TBMR.

5.9 CATEGORIZAÇÃO DOS PACIENTES

As variáveis nome, sexo, idade, data de nascimento, nome da genitorados pacientes (quando presente) do pacientes cujas famílias foram obtidas foram comparadas e analisadas com auxílio de planilha de Excel para a identificação do número exato de pacientes do estudo. Os pacientes foram categorizados em dois grupos: 1) pacientes com tuberculose extensivamente resistente (TBXDR) e 2) pacientes com tuberculose não extensivamente resistente (não-TBXDR).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram compilados em planilha do Excel (2007) para as análises subsequentes. As variáveis foram descritas através de suas proporções, medianas. As proporções entre os grupos foram comparadas pelo teste qui-quadrado (χ^2); quando apropriado, utilizou-se o teste exato de Fischer. As médias foram comparadas pelo teste *t* Student se presente. Considerou-se como significativos resultados com $p < 0,05$, sendo utilizado o programas Epi-Info v 3.5.1 para análise dos dados. A localização geográfica das famílias/subfamílias foi realizada sob o mapa geopolítico vetorizado do Estado da Bahia, Brasil, utilizando o programa ArcView v.3.3.

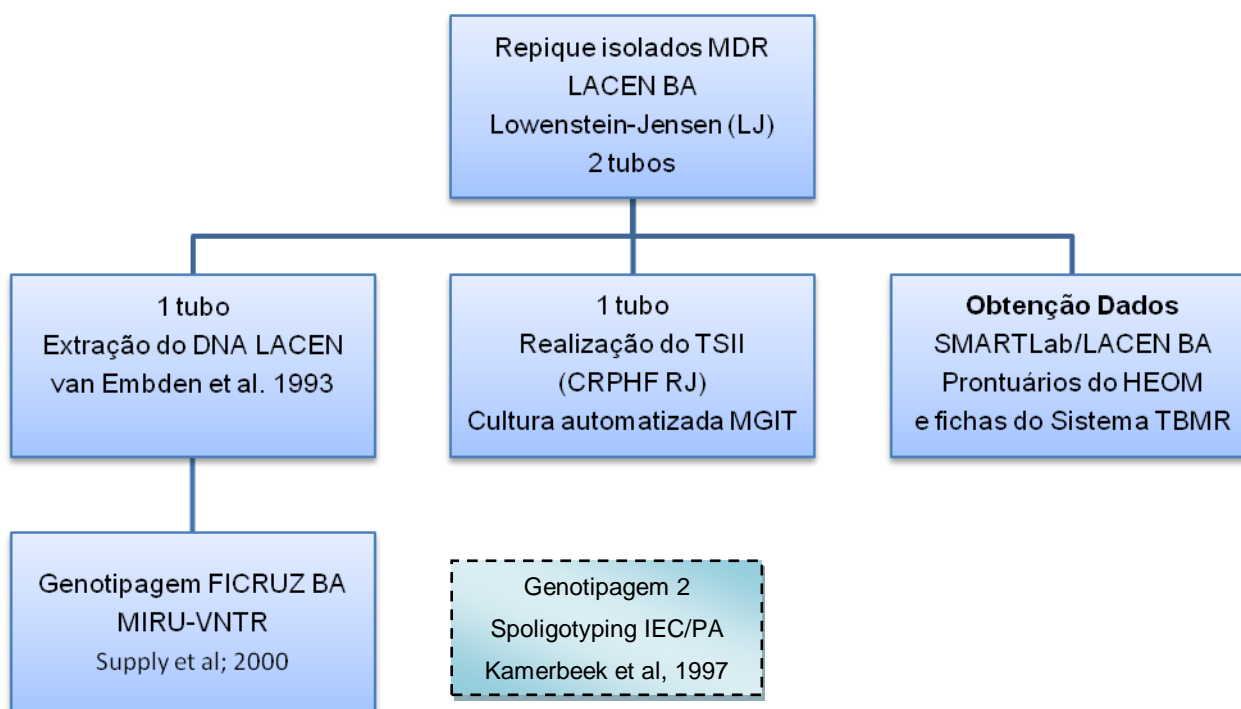
5.11 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PACIENTES

Incluíram-se para análise do perfil genético, os pacientes com isolado MT- MDR com resultado do TSII conhecido. Para os pacientes que tiveram mais de um isolado foi considerado o resultado de TSI mais recente. Pacientes de outros Estados foram excluídos.

5.12. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo não inclui a coleta de novas amostras dos pacientes. O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da CPqGM/FIOCRUZ BA sob o PARECER Nº 226/2010.

5.13 ATIVIDADES E LOCAIS - Fluxograma



6 RESULTADOS

6.1 DESCRIÇÃO DOS ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DO ESTUDO.

Do total de isolados *M. tuberculosis* resistentes, simultaneamente, à rifampicina (R) e isoniazida (H) repicados; 34% (132/392) não cresceram e seis apresentaram contaminação (tabela 6).

Tabela 6 - Frequência dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à rifampicina e à isoniazida. Bahia 2012.

Descrição	n	%
Isolados com crescimento	254	65
Isolado sem crescimento	132	34
Isolados contaminados ¹	6	1
Total de isolados repicados	392	100

¹ contaminação por *Mycobacterias-não tuberculosa*; por fungos, impróprio para realização do teste de sensibilidade.

Os 254 isolados MT-MDR com crescimento corresponderam a 206 pacientes com tuberculose Multirresistente (TBMR). Foi mantido no estudo apenas um isolado de cada paciente, sendo selecionado para análise o último isolado obtido, conforme descrito na seção 5.2 de Materiais e Métodos.

Não há indícios de que a população de pacientes excluídos por problemas no cultivo (contaminados ou sem crescimento) apresente diferenças em comparação com a população de pacientes que permaneceu no estudo (tabela I - Apêndice).

6.2 DESCRIÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE *M. tuberculosis* DOS PACIENTES COM TBMR.

Os perfis de resistência dos 206 isolados do estudo para os fármacos de primeira linha (rifampicina, isoniazida, etambutol) e estreptomicina utilizados no TSI (teste de sensibilidade um [1]), e os perfis de resistência para fármacos de segunda linha (capreomicina, ofloxacina, kanamicina e amicacina) utilizados no TSII são mostrados na tabela 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 – Resultados dos testes de sensibilidade I de isolados de *M. tuberculosis* de pacientes com tuberculose multirresistente. Bahia, 2012.

Perfil	n	%
RH (apenas)	86	42
RH+S+E	56	27
RH+E	35	17
RH+S	29	14
TOTAL	206	100

R- rifampicina

H- isoniazida

E- etambutol

S- estreptomicina

Resistência a pelo menos um fármaco anti-tuberculose além da rifampicina e isoniazida foi encontrada em 58% (120/206) dos isolados. Dentre estes, quase metade (47%) apresentou resistência a todos os fármacos de primeira linha mais estreptomicina.

Tabela 8 – Resultados dos testes de sensibilidade II de isolados de *M.tuberculosis* de pacientes com tuberculose multirresistente. Bahia, 2012.

Perfil	n	%
Sensíveis	140	68,0
Resistência apenas à C	11	5,3
Resistência apenas à O	39	19,0
Resistência apenas à K	1	0,5
Resistência à K+A	1	0,5
Resistência à O+C	2	1,0
Resistência à O+K+A	1	0,5
Resistência à O+C+K+A	11	5,3
TOTAL	206	100

C - capreomicina

O - ofloxacina,

K- kanamicina

A- amicacina

Aproximadamente 7% (14/206) dos isolados preencheram o critério para TB extensivamente resistente (**TBXDR**). Destes, 36% (5/14) apresentaram resistência a todos os fármacos testados no TSI e TSII.

6.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES COM TBMR.

Os 206 casos de TBMR do estudo ocorreram em 45 dos municípios do Estado da Bahia (Figura 3). Salvador, a capital do Estado, concentrou mais da metade dos casos de TBMR (Tabela 9). Em seguida à capital, Salvador, a maior proporção de casos de TBMR foi encontrada em Feira de Santana, Paulo Afonso e Jequié. Em relação aos casos de TBXDR, cinco municípios tiveram pelo menos um caso, sendo que Salvador concentrou a maioria (79%, 11/14).

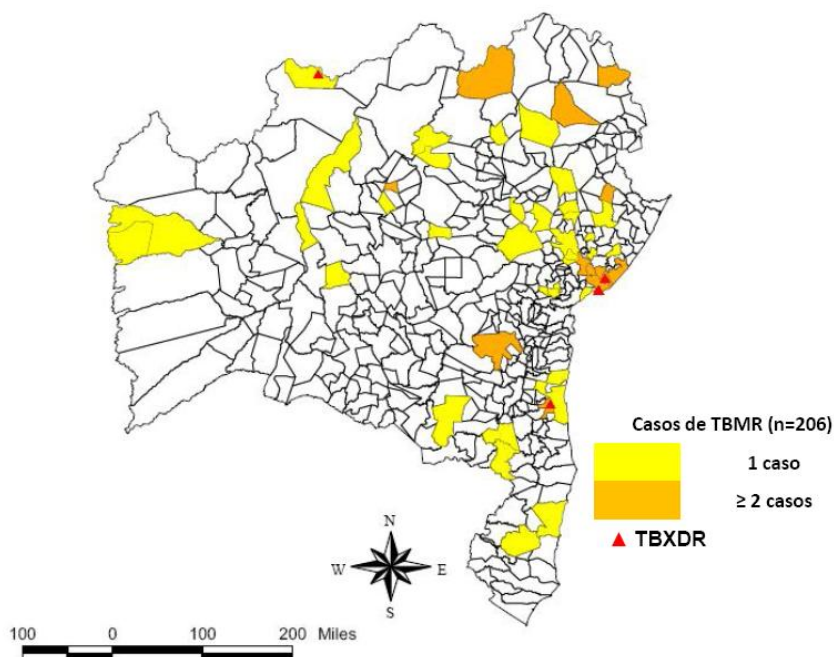


Figura 3. Município de ocorrência dos casos de TBMR (n=192) e TBXDR (n=14) por ocorrência. Em vermelho (▲) os municípios com casos de TBXDR. Mapa do Estado da Bahia, Brasil 2012.

Tabela 9- Frequência de casos de TBMR por município de ocorrência no período de 2008-2011. Bahia, 2012

Município	Número de casos		Total	%
	TBXDR	n-TBXDR		
Camaçari	0	2	2	1
Campo Alegre Lourdes	1	0	1	0,5
Candeias	0	2	2	1
Canudos	0	2	2	1
Feira de Santana	0	10	10	5
Irecê	0	2	2	1
Itabuna	1	1	2	1
Jequié	0	4	4	2
Juazeiro	0	2	2	1
Lauro de Freitas	0	2	2	1
Olindina	0	2	2	1
Paulo Afonso	0	7	7	3
Santo Amaro	0	2	2	1
São Francisco do Conde	0	2	2	1
Simões Filho	1	0	2	1
Salvador	11	123	133	65
Outros Municípios com apenas um caso de TBMR	0	29	29	14
Total	14	192	206	100

A maioria dos pacientes com TBMR foi do sexo masculino, com mediana de idade de 38 anos (Tabela 10). Os pacientes com TBMR a partir dos quais foram obtidos os isolados foram estratificados quanto ao perfil de resistência aos fármacos anti-tuberculose como pacientes TBXDR e com tuberculose não extensivamente resistente (**n-TBXDR**). Perfil similar para estas variáveis foi observado entre os pacientes com TBXDR.

Informações sobre co-morbidades nestes pacientes estavam notificadas para as seguintes condições, por ordem de frequência: uso de álcool, transtorno mental, co-infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), diabetes, tabagismo, uso de drogas ilícitas, co-infecção por vírus T-linfotrópico (HTLV) e hanseníase. São mostrados na tabela 9 os dados para as co-morbidades com frequência igual ou superior a dois casos em cada grupo. A co-morbidade *transtorno mental* apresentou diferença na proporção de número de casos entre os grupos avaliados. A pesquisa do HIV foi realizada numa proporção aumentada nos indivíduos com TBXDR. Não se verificou diferença quanto à positividade ao teste HIV, história previa de falência a tratamentos anteriores para TB ou abandono de tratamento entre os dois grupos estudados. Foram observados casos de resistência primária no grupo TBXDR, à mesma proporção encontrada entre os demais pacientes.

A forma clínica pulmonar representou a totalidade dos casos com informação disponível, sendo que apresentação radiológica (comprometimento pulmonar) não divergiu entre os grupos. Os pacientes com TBXDR apresentaram maior frequência de falência de tratamento para TB e a situação clínica atual mostrou desfecho menos favorável, com falência do tratamento vigente para mais da metade dos pacientes e óbito em mais de um terço dos indivíduos com TBXDR.

Tabela 10- Características sócio-demográficas e clínicas dos pacientes com tuberculose multirresistente (N=206). Bahia, 2012

VARIÁVEIS	TBXDR N=14	não-TBXDR N=192	Total N=206	RP (IC 95%)	P
Sexo					
Masculino	71%(10/14)	65% (124/192)	65%(134/206)	1,37 [0,38-5,42]	0,420
Idade (anos)					
Mediana (Variação)	43[20-72]	38 [18-71]	38 [18-72]		
Município de Residência					
Salvador	79%(11/14)	64%(123/192)	65%(133/206)	2,06 [0,51-9,64]	0,212
Outros municípios	29% (4/14)	36% (69/192)	35% (73/206)		
Co-morbidade					
Pelo menos uma relatada	71% (10/14)	39% (52/133)	44%(65/147)	2,54 [0,98-6,53]	0,040
Dado não disponível		31% (59/192)	29% (59/206)		
Tipos de Co-morbidades					
Transtorno mental	21% (3/14)	5% (6/133)	6% (9/147)	5,77 [0,98-31,8]	0,041
Diabete	7% (2/14)	11% (14/133)	10% (16/147)	1,42 [0,01-7,83]	0,467
Uso de álcool ¹	21%(3/14)	23% (31/133)	23% (34/147)	0,99 [0,20-4,25]	0,607
Tabagismo ¹	7% (2/14)	4% (5/133)	5% (7/147)	4,27 [0,51-29,5]	0,134
Pesquisa de HIV					
Realizado	100% (14/14)	56% (108/192)	59% (122/206)	11 [1,57-242]	0,003
Dado não disponível	0	44% (84/192)	41% (84/206)		
Resultado do HIV					
Positivo	14% (2/14)	6% (6/108)	6% (8/122)	2,83 [0,35-18,6]	0,229
Negativo	86% (12/14)	94% (102/108)	93% (114/122)	0,35 [0,05-2,86]	0,230
Historia previa de Falência					
Sim	93%(13/14)	79% (104/132)	81% (117/145)	3,50[0,40-74,6]	0,187
Dado não disponível	0	31% (60/192)	29% (60/206)		
Historia previa de Abandono					
Sim	86%(12/14)	67% (89/132)	69% (101/146)	2,90 [0,60-19,70]	0,132
Dado não disponível	0	31% (60/192)	29% (60/206)		
Tipo de Resistência					
Primária	14%(2/14)	18% (24/132)	18%(26/146)	0,75 [0,11-3,91]	0,529
Dado não disponível	0	31% (60/192)	29% (60/206)		
Radiograma pulmonar					
Comprom. bilateral cavitário	76%(11/14)	80%(106/132)	80%(117/146)	0,90 [0,21-4,40]	0,500
Comprom. unilateral cavitário	14% (2/14)	17% (22/132)	16% (24/146)	0,83 [0,12-4,38]	0,587
Dado não disponível	0	31% (60/192)	29% (60/206)		
Situação Clínica Atual					
Tratamento favorável	7% (1/14)	62%(95/154)	60% (96/168)	0,10 (0,0-0,79)	< 0,001
Falência de tratamento	57% (8/14)	13% (20/154)	18%(29/168)	8,93 [2,47-33,1]	< 0,001
Óbito	36% (5/14)	14% (22/154)	16%(26/168)	3,33 [0,87-12,3]	0,052
Abandono do tratamento	0	5%(7/154)	4% (7/168)		
Dado não disponível	0	20% (38/192)	29%(38/206)		
Perfil de Resistência					
Resistência a E	86%(12/14)	41% (79/192)	44%(91/206)	8,58 [1,87-39,42]	0,0015
Resistência a S	43% (6/14)	60% (115/192)	59% (121/206)	0,56 [0,15-1,67]	0,211
Resistente a E+S (simultaneamente)	57% (8/14)	25%(48/192)	27% (56/206)	4,00[1,18-13,8]	0,014
TDO					
Não	79%(11/14)	82%(108/132)	82% (119/146)	0,81 [0,19-4,01]	0,471
Dado não disponível	0	31%(60/192)	29%(60/206)		

1 - Foram considerados como comorbidade neste estudo; E, etambutol.S, estreptomicina. TDO, tratamento diretamente observado

Em contraste, apenas 30% dos pacientes não-TBXDR tiveram situação clínica atual de falência ou óbito. Cerca de 20% dos pacientes com TBMR foram notificados estarem sob terapia diretamente observada, não havendo diferença na proporção entre os grupos.

Quanto à resistência aos fármacos etambutol e estreptomicina, houve proporção maior de ocorrência de resistência ao etambutol bem como de resistência combinada a estreptomicina e etambutol no grupo TBXDR. Uma proporção importante de sensibilidade à estreptomicina (43%) foi verificada em todos os casos TBXDR, sendo não significativa quando comparada ao grupo não-TBXDR.

6.3.1 Detalhamento Clínico-Epidemiológico dos casos de TBXDR

O perfil clínico-epidemiológico e de resistência aos fármacos dos pacientes do grupo TBXDR foi detalhado na tabela 11. Eles apresentaram mediana de 3 [1-6, mín-máx] tratamentos prévios para TB e 30 [1-94] meses em esquema de tratamento para TBMR até o diagnóstico de TBXDR. A história prévia de internação hospitalar foi verificada em 71% dos casos.

Onze pacientes apresentaram resistência a todos os fármacos de segunda linha testados no TSII, porém não houve diferença na proporção do número de tratamentos prévios, tempo de tratamento em esquema para TBMR, ocorrência de óbito, positividade ao HIV e na história prévia de internação destes pacientes quando comparados com os pacientes que apresentaram isolados sensíveis a algum dos fármacos testados no TSII. Ressalta-se que dois casos TBXDR apresentaram infecção primária.

Tabela 11. Perfil clínico-epidemiológico e de resistência aos fármacos dos pacientes com tuberculose extensivamente resistente. Bahia, 2012

Paciente	HIV (+)	Nº de Tratamentos Prévios p/TB	Tempo de Tratamento TBMR (meses)	História de Internação Hospitalar	Situação Clínica Atual	TSI				TSII			
						R	H	S	E	C	O	K	A
22	Sim	1	1	Sim	Óbito	R	R	S	S	R	R	R	R
24	Não	6	28	Sim	Tratamento p/TBXDR	R	R	S	R	R	R	R	R
34	Não	4	38	Não	Tratamento p/TBXDR	R	R	R	R	R	R	S	S
40	Não	3	32	Sim	Tratamento p/TBXDR	R	R	S	S	R	R	R	R
81	Não	6	18	Sim	Óbito	R	R	S	R	R	R	R	R
85	Não	4	73	Sim	Tratamento p/TBXDR	R	R	R	R	R	R	R	R
98	Não	3	94	Sim	Tratamento p/TBXDR	R	R	R	R	S	R	R	R
105	Não	2	75	Não	Tratamento p/TBXDR	R	R	R	R	R	R	R	R
112	Não	3	34	Não	Tratamento p/TBXDR	R	R	R	R	R	R	R	R
143	Não	2	14	Sim	Óbito	R	R	R	R	R	R	R	R
160	Sim	2	65	Sim	Óbito	R	R	S	R	R	R	R	R
181	Não	3	21	Sim	Óbito	R	R	R	R	R	R	R	R
221	Não	2	20	Não	Tratamento p/TBXDR	R	R	S	R	R	R	R	R
233	Não	1	2	Sim	Tratamento p/TBXDR	R	R	R	R	R	R	S	S

TSI/TSII: Teste de Sensibilidade nº I, nº II

R/S Resistente/S: Sensível

RHSE: Rifampicina, Isoniazida, Estreptomina, Etambutol

COKA: Capreomicina, Ofloxacina, Kanamicina e Amicacina

Em negrito, os onze pacientes com resistência a todos os fármacos de segunda linha testados

6.4 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS DE PACIENTES COM TBMR.

6.4.1 Genotipagem pela técnica de MIRU-VNTR-12 *loci*

Amostras de DNA de 183 dos 206 isolados do estudo foram submetidas à técnica MIRU-VNTR-12 *loci*; para os demais não foi possível realizar esta genotipagem por restrições de tempo. A amplificação dos 12 *loci* foi realizada com sucesso em 63% das amostras (116/183). Para 35 (30%) isolados, o perfil genotípico não teve correspondência (*cut off* > 0,17) com os perfis já descritos na base de dados MIRU-VNTR_{plus}, sendo estes perfis identificados como perfis MIRU-VNTR não pareados (MIRU-VNTR_{np}). Todos os perfis estão descritos na tabela II (Apêndice).

6.4.2 Genotipagem pela técnica de Spoligotyping

Amostras de DNA de 30 dos 35 isolados com perfil MIRU-VNTRnp foram submetidas à técnica de Spoligotyping como método alternativo. Os perfis MIRU-VNTRnp foram combinados com os perfis de Spoligotyping e submetidos ao mesmo banco de dados internacional para obtenção das famílias e ST's, mantendo-se o mesmo *cut-off* ($\leq 0,17$). Para seis isolados, não foi possível realizar a técnica por restrições logísticas.

6.4.3 Identificação de *clusters* e suas características genotípicas.

Os isolados foram agrupados de acordo com o perfil MIRU-VNTR-12 *loci* para a identificação de possíveis *clusters* (Figura I - Apêndice). Um dendrograma destacando os isolados em *clusters* é mostrado na Figura 4

Houve agrupamento em 18 *clusters*, correspondendo a 67% (78/116) dos isolados. Dos isolados em *clusters*, 56% (44/78) pertenceram a cinco *clusters* majoritários. Os casos TBXDR distribuíram-se em sete *clusters* diferentes; sendo que quatro *clusters* majoritários (2, 7, 8 e 16) concentraram 73% (8/11) dos casos TBXDR; destacando o *cluster 7* com três casos. Um isolado TBXDR agrupou num *cluster* cuja família não foi identificada. Uma proporção elevada de casos TBXDR em *cluster* foi encontrada ($P=0,049$). Não houve associação entre pertencer a um dos quatro *clusters* majoritários e ser do grupo TBXDR ($RP 3,29$; $P=0,086$). Para 22% dos *clusters*, não foi possível a identificação família ou ST.

Figura 4 - Diversidade genética de *M. tuberculosis* multirresistentes. A) Dendrograma dos isolados em *cluster*. O Shared type (ST) é mostrado, seguido da identificação do isolado no estudo. Em vermelho, isolados de casos TBXDR. O isolado 105 foi mantido por ser de caso TBXDR pela sua similaridade de perfil com os isolados do *cluster 6* (destaque em pontilhado). Em asterisco (*) isolados sem família associadas ao perfil MIRU-VNTR 12 loci (B). Dendrograma em NJ- Tree, peso categórico um construído no banco de dados www.miru-vnrplus.Bahia,2012

6.6 FAMÍLIAS/SUBFAMÍLIAS DOS ISOLADOS DE *M. tuberculosis* DOS PACIENTES.

6.6.1 Associação dos perfis genéticos a famílias de *M. tuberculosis*.

A combinação dos perfis (MIRU-VNTRnp+Spoligotyping) resultou em 22 perfis (tabela 12); para nove destes, foi possível uma associação com perfis das cepas de referências do banco internacional. A família LAM concentrou 82% (7/9), dos perfis associados e identificados, sendo o ST42 o mais prevalente. (Tabela 12).

Do total de cepas genotipadas pelo MIRU-VNTR-12 *loci*, 21% (24/116) permaneceram com perfis não associados a nenhuma família das cepas de referenciado banco internacional, mesmo após 75% (18/24) terem sido genotipadas pelas duas técnicas. Os perfis MIRU-VNTRnp dos isolados estão descritos na tabela III (Apêndice).

6.6.2 Descrição das famílias de *M. tuberculosis* associadas aos casos de TBMR e TBXDR.

Entre os pacientes com TBXDR, para 76% (11/14) foi possível associar o perfil genotípico encontrado com uma família/subfamília do banco de dados internacional, enquanto que para o grupo n-TBXDR, a associação ocorreu para 42% (81/192) dos casos, totalizando 92 isolados com famílias/subfamílias identificadas pelo MIRU-VNTR 12*loci* (Tabela 13). Houve uma maior proporção de casos TBXDR com isolados identificados genotipicamente ($X^2 = 6,9$; $RP 5,02$ [1,2-23,5 IC 95%]; $P=0,008$)

Tabela 13- Frequência das famílias/subfamílias de *M. tuberculosis* por grupo de pacientes: extensivamente resistente (TBXDR) e não tuberculose extensivamente resistente (n-TBXDR). Bahia, 2012

Família	ST	TBXDR*		n-TBXDR		RP (IC 95%)	<i>p</i>
		n	%	n	%		
LAM (n=64; 70%)			45%		72%	0,31 (0,07-1,31)	0,064
	20	1		6			
	33	0		8			
	42	2		24			
	159	0		10			
	376	2		11			
CAMEROON (n=15; 16%)	61	4	36%	11	14%	3,64 (0,74-17,43)	0,076
HAARLEM (n=9; 10%)			18%		10%		
	2	0		2		2,35 (0,29-15,76)	0,292
	47	0		2			
	50	2		3			
X (n=2; 2%)	119	0		2	2%		
S (n=1; 1%)	71	0		1	1%		
UGANDAI (n=1; 1%)	52	0		1	1%		
TOTAL(92; 100%)		11	100%	81	100%		

* Um isolado permaneceu sem identificação da família (Amostra 160)

Os 92 isolados pertenceram a seis famílias de *M. tuberculosis*. As principais famílias/subfamílias descritas (LAM, Cameroon e Haarlem) concentraram 96% dos casos. Os ST's mais freqüentes por ordem de ocorrência foram ST42, ST61, ST376 e ST159 perfazendo 70% (64/92) dos casos.

Nenhuma família foi associada aos casos TBXDR; bem como não houve diferença na distribuição dos casos entre as principais famílias ($\chi^2 = 5,57, P=0,1344$).

6.6.3 Localização geográfica das famílias de *M. tuberculosis* dos casos de TBMR e TBXDR.

As família/subfamília do *M.tuberculosis* descritas na tabela 12 (n=92) foram distribuídas conforme município de residência dos pacientes. Vinte quatro municípios apresentaram pelo menos um caso das sete famílias/subfamílias encontradas. A família LAM foi encontrada em 17 dos 24 municípios, sendo 43 (67%) casos em

Salvador e 21 em outros municípios (média de 1,3 casos por município). Já a Haarlem foi encontrada em seis municípios, sendo 44% (n=4) casos em Salvador e cinco no interior do Estado (média de 1 caso por município). Salvador concentrou 80% (12/15) da família Cameroon sendo os outros três casos foram encontrados em Feira de Santana, Monte Santo e Simões Filho. Os ST's mais frequentes em Salvador foram o ST42 (29%,18/62), o ST61 (19%, 12/62) e o ST376 (19%, 12/62), porém não houve associação com a ocorrência na capital para nenhuma das famílias/subfamílias.

As famílias, Uganda I e família X foram encontradas apenas na capital. O único caso para família S teve ocorrência no município de Juazeiro, extremo norte do Estado.

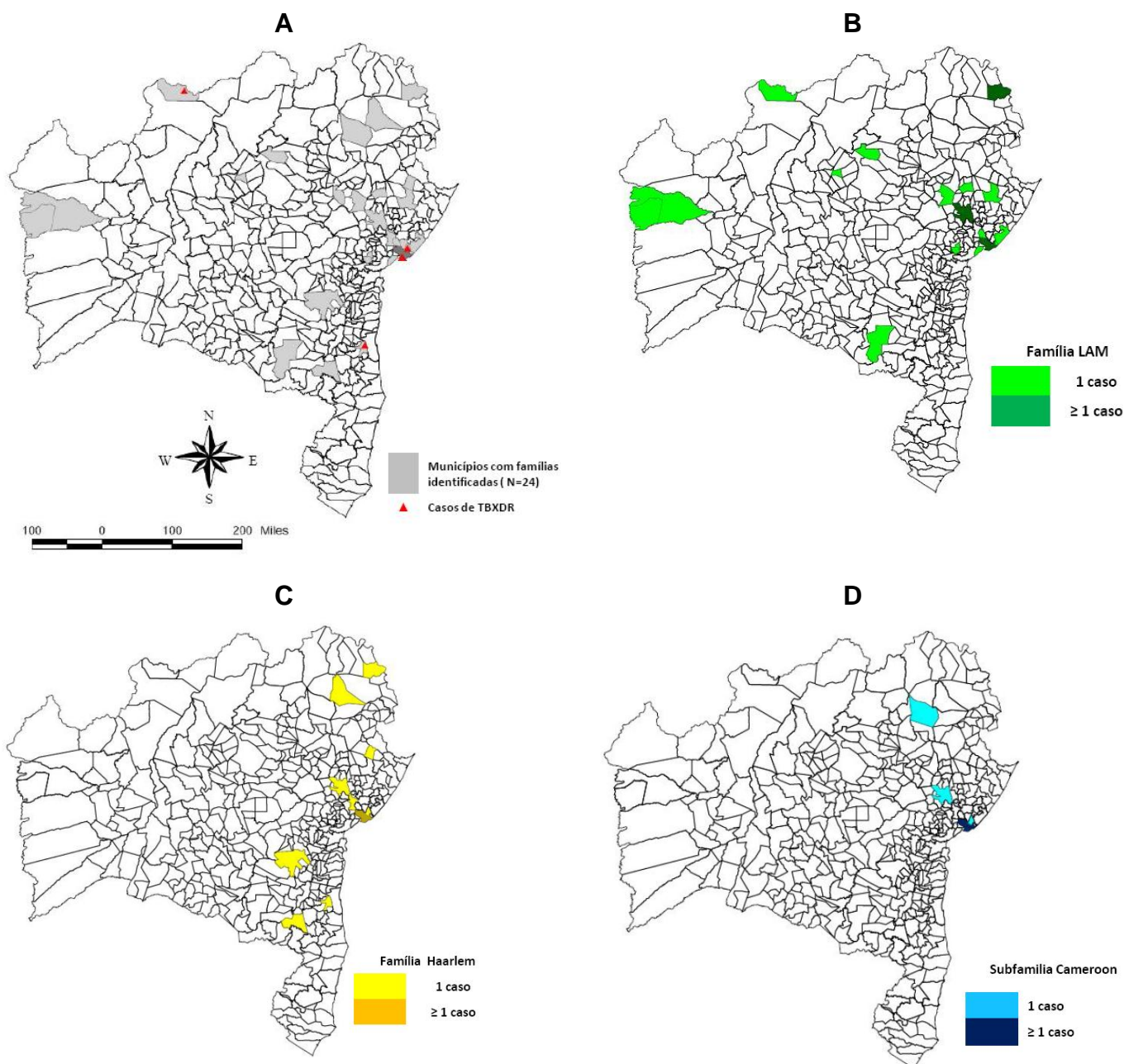


Figura 5. Distribuição das três principais famílias/subfamílias *M. tuberculosis* multirresistente identificadas. **A)** distribuição dos isolados com perfil MIRU-VNTR 12 *loci* associados às famílias/subfamílias do banco internacional www.miruvnrplus. **B, C e D** ocorrência das famílias LAM, Haarlem e Cameroon no Estado da Bahia. 2012.

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho, descrevemos pela primeira vez a ocorrência da tuberculose (TB) extensivamente resistente (TBXDR) no Estado da Bahia e as famílias/subfamílias do *Mycobacterium tuberculosis* envolvidas com os casos de TB multirresistentes (TBMR). Foram encontrados 14 casos TBXDR após a caracterização fenotípica de resistência aos fármacos de segunda linha. Os isolados avaliados foram provenientes de um banco de amostras constituído entre 2008 e 2010 e mantido no Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz (LACEN BA). Caracterizou-se genotipicamente 116 isolados TBMR deste banco, utilizando a técnica de repetições em *tandem* de número variável de unidades repetitivas interespaçadas micobacterianas (MIRU-VNTR). Associamos também as famílias e subfamílias de *M. tuberculosis* com casos TBXDR e não TBXDR; bem como, verificamos a ocorrência destas famílias/subfamílias nos municípios de residência dos pacientes envolvidos.

As amostras de *M. tuberculosis* estudadas foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital Especializado Otavio Mangabeira (HEOM) que é um hospital público e centro de referência para o diagnóstico clínico da TB/TBMR e outras pneumopatias, que atendendo pacientes da capital e de toda zona rural do Estado. Os casos graves de TB, principalmente aqueles apresentando resistência aos fármacos anti-TB, são encaminhados para este hospital que disponibiliza para este atendimento 60% dos 218 leitos. O HEOM atende 85% dos casos de TB que necessita de cuidados hospitalares no Estado da Bahia (MATOS et al, 2007; SESAB/BAHIA 2010). Os isolados foram identificados e armazenados no LACEN BA que é o laboratório de referência estadual para o diagnóstico *in vitro* da TB e outras micobacterioses. Apenas dois laboratórios realizam o teste de sensibilidade para

fármacos de primeira linha (TSI) no Estado; o LACEN e o Instituto Brasileiro de Investigação da Tuberculose (IBIT). O LACEN BA realizou, aproximadamente, 65% de todos os TSI de 2008 a 2010 no Estado e recebeu, no mesmo período, cerca de 60 culturas/mês de *M. tuberculosis* do HEOM para realização do TSI. Sendo um laboratório de referência, há avaliação anual de proficiência para realização do TSI, sendo esta proficiência coordenada pelo Centro de Referência Prof. Helio Fraga (CRPHF/RJ), que é o Laboratório de referência nacional. Neste trabalho, o CRPHF foi responsável pela realização dos TS para fármacos de segunda linha (TSII), seguindo protocolos na OMS (BRASIL, 2010).

Neste estudo, 34% (132/392) dos isolados não cresceram após repique para realização do TSI. Lourenço et al; (2000) verificou crescimento insuficiente de colônias em 48% (53/111) dos isolados de *M. tuberculosis* repicados. Verificamos que no período de armazenamento dos isolados trabalhados neste estudo, o LACEN BA utilizava meio líquido 7H9 de Midlebrook sem glicerol. Internacionalmente, recomenda-se o uso de 10% de glicerol neste meio e congelamento à -70°C para garantir a viabilidade de crescimento em estocagem de cepas de *M. tuberculosis* por um tempo acima de um ano (CDC,1985); estas recomendações de armazenamento foram sugeridas e adotadas pelo LACEN BA durante o desenvolvimento deste trabalho.

Durante a realização do TSII no CRPHF/RJ pelo método automatizado de cultura líquida (Sistema MGIT960 da Becton Dickinson Microbiology Systems), tivemos uma baixa taxa (2%) de contaminação das amostras manipuladas. Tipicamente, é esperado uma média de contaminação de 8,1% [1,8 e 14,6%] neste sistema (BD BBL™ MGIT™ /2010). Coelho et al. (2005) encontrou 9,5% de contaminação em 1317 isolados trabalhados e Somoskovi et. al (2006) encontrou 11% de contaminação em 260 isolados de *M. tuberculosis*. Para serem considerados

válidos os resultados dos testes de sensibilidade em meio líquido automatizado é necessário que sejam excluídas possíveis contaminações sendo estas contaminações normalmente ocasionadas por micobactérias não tuberculosas (MNT). A importância de se avaliar possíveis contaminações é porque os resultados de resistência no sistema MGIT960 é baseado no consumo de oxigênio presente no meio líquido contendo fármacos anti-tuberculose (BD BBL™ MGIT™ /2010). Assim, a nossa população de estudo resultou daqueles pacientes cujos isolados puderam ser analisados no TSI e TSII simultaneamente, o que representou 206 isolados multirresistentes no período proposto.

Neste estudo, a proporção de indivíduos do sexo masculino, a faixa etária e a forma de apresentação da doença entre indivíduos TBMR e TBXDR foram semelhantes às encontradas para os casos de TB não resistentes (OMS, 2010. SINAN/SVS/MS, 2012). Observamos uma proporção de 7% de casos de TBXDR em nosso banco de TBMR, em consonância com os dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010) que referiu uma proporção ajustada de casos de TBXDR entre os TBMR de 5,4% (IC95% 3,4-7,5) em 2008, considerando 963 casos notificados em 33 Federações internacionais. Apesar da importância clínica e epidemiológica da TBXDR, no Brasil, apenas um caso de TBXDR; masculino, 54 anos, com tratamento prévio para TB durante quatro anos, é descrito na literatura científica até o momento (ARAUJO-FILHO et al, 2008).

Os casos de TBXDR normalmente representam histórico de falhas terapêuticas, com uso de fármacos anti-tuberculose de forma irregular decorrentes de tratamentos anteriores, e por tempo diferente daqueles preconizados pela OMS (OMS, 2010). O tratamento para TBMR é mais longo e são utilizados fármacos alternativos (de segunda linha) que são mais caros e mais tóxicos, o que pode contribuir para o abandono do tratamento e para a seleção de cepas extensivamente resistentes

(DALCOMO et al., 2008; BRASIL/PCNT, 2009). Os pacientes TBXDR aqui descritos apresentaram, em geral, tratamentos prévios de mais de um ano para TBMR até o diagnóstico de TBXDR, sendo que a maioria teve história de internação hospitalar. Um diagnóstico em tempo oportuno é um fator que contribui para a descoberta precoce de novos casos de TBXDR com tratamento adequado e à prevenção da transmissão em comunidades; sendo que a possibilidade da genotipagem pode favorecer a identificação de perfis genéticos que possam estar relacionados. (SMALL, 1993; MASJEDI MR et al, 2010; CALVER et al., 2010; SALERI et al, 2010; OELEMANN et al., 2011; BAPTISTA et al, 2020).

A identificação de perfil de resistência aos fármacos anti-TB é importante devido à necessidade de esquemas individualizados para os casos de multirresistência. O tratamento da TBMR utiliza esquemas terapêuticos com uso de múltiplos fármacos tendo como objetivo esterilizar as formas sensíveis e prevenir o surgimento de cepas resistentes (DALCOMO, 2008; BRASIL, 2009). Neste trabalho, verificamos que 36% dos isolados dos casos TBXDR apresentaram resistência a todos os fármacos utilizados no TSI e no TSII, o que alguns autores denominam de cepas *super extensivamente droga resistentes* ou *totalmente droga resistentes* (TBTDR) sendo importante ressaltar que a OMS não chancela tais termos. Udwadia et al, (2012), na Índia, encontrou quatro pacientes com TBXDR cujos isolados apresentaram resistentes à isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina, pirazinamida, etionamida, ácido para-aminosalicílico, levofloxacina, moxifloxacina, kanamicina, amicacina e capreomicina (todos os fármacos anti-TB disponíveis) sendo tais pacientes identificados como TBTDR. Velayati et al (2009) encontrou em uma população de 146 pacientes com TBMR no Irã, aproximadamente, 5% de TBXDR e 10% de TBTDR.

Em 2009, o MS alterou o esquema de tratamento dos casos novos de TB não resistente com introdução do fármaco etambutol nos dois primeiros meses de tratamento do esquema básico, tendo como justificativa a constatação do aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4 para 6%) e dos casos de TBMR primário (de 1,1 para 1,4%), observadas no II Inquérito Nacional de Resistência aos fármacos anti-TB conduzido de 2007-2008, em comparação com os resultados do I Inquérito Nacional realizado de 1995 a 1997 (BRASIL, 2009). Verificamos que a resistência ao etambutol (E) e do E + estreptomicina (simultaneamente) estavam aumentadas no grupo TBXDR quando comparado ao grupo não-TBXDR. Os dados encontrados neste estudo podem auxiliar tratamento mais direcionados, ao utilizar fármacos cujo perfil de sensibilidade tenha sido evidenciada nos TSI e TSII, e contribuir com a fármaco vigilância da TBMR no Estado, atentando para os efeitos adversos que são motivos de queixas dos pacientes e fator importante para o surgimento de comorbidades.

Verificamos que houve maior freqüência de realização da pesquisa de HIV nos pacientes TBXDR, quando comparados aos não TBXDR, mostrando que houve uma maior preocupação do serviço médico hospitalar em evidenciar possíveis falhas terapêuticas na evolução clínica dos casos com falência, embora não tenha havido maior positividade ao teste neste grupo. Em todos os pacientes (TBXDR e não-TBXDR) a coinfeção TBMR/HIV foi de 6%, comparável à média nacional de 7%(BRASIL, 2006). Foram observados dois casos de TBXDR positivos para o HIV, o que difere de outros trabalhos nos quais se verifica altas proporções de casos HIV positivos (CALVER et al, 2010; 2006; GANDHI et al, 2006). Lembramos que para quase metade dos pacientes TBMR não foi possível obter a informação sobre a infecção do vírus. Fato a ser destacado neste trabalho e pouco relatado em estudos prévios foi à associação de transtornos mental e TBXDR, o que sugere que para

pacientes apresentando esta comorbidade pode haver benefício um tratamento diretamente observado (TDO) e diferenciado. Ainda, verificamos uma proporção elevada de pacientes TBMR sem TDO, o pode contribuir para o surgimento de novos casos de TBMR primária. Garrido et al (2012), estudando falhas no tratamento da TB em Manaus (Brasil), encontrou como fator protetor para surgimento da resistência o paciente estar em TDO. Villa TC e Ruffino-Netto et al. (2011) avaliando o desempenho dos serviços básicos de saúde para o tratamento da TB em cinco cidades brasileira evidenciaram que na região Nordeste do país há uma menor oferta TDO em comparação à região Sudeste. Yen et. al (2012) em Taiwan ressalta que a existência de TDO esteve associado com uma menor mortalidade de casos de TB.

Dos 189 isolados submetidos à genotipagem pelo MIRU-VNTR, apenas 61% (116) tiveram os 12 *loci* alvo amplificados, formando 56 perfis. Neste trabalho, utilizamos o protocolo desenvolvido por Supply et al. (2005) com modificações sugeridas por van Soolingen et al. (2010) e outros ajustes padronizados neste trabalho, de forma a levar em consideração a performance dos *primers*, enzimas e reagentes obtidos de diferentes fabricantes. Em nossa experiência, os *loci* MIRU-VNTR 154, 802, 2996 e 4348 foram os que menos amplificaram, o *locus* 802 foi o mais polimórfico, com cinco alelos, e o *locus* 2687 foi o mais conservado, sem polimorfismo. Mendes et al. (2011) referem ausência de amplificação nos *loci* 2631 e 802 para dois isolados, mesmo após repetições da técnica, os *loci* 802 e 2996 os mais polimórficos, sendo o *loci* 2687 mais conservado, em consonância com os nossos dados.

Perfis genotípicos de referência, obtidos por diversas técnicas combinadas, podem ser comparados aos perfis encontrados utilizando bancos de dados internacionais (SUPPLY et al; 2006; ALLIX-BÉGUEC et al; 2008; OELEMANN et al2011), estes bancos de dados são ferramentas importantes que auxiliam o estudo

da diversidade genética do *M. tuberculosis* (DEMAY et al; 2012; SHARMA D, SUROLIA A, 2011; WENIGER T 2012). O MIRU-VNTR_{plus} é um banco dados internacional que utiliza perfis genéticos de 186 cepas de referência formados e combinados pelas técnicas de MIRU-VNTR 24 *loci*, Spoligotyping, Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) e Polimorfismo de Seqüência Ampliada (LSP's) sendo estas as técnicas as mais utilizadas atualmente para a descrição de perfis de espécies do CMT- Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (ALLIX-BÉGUEC et al, 2008) o que auxilia no entendimento da dispersão de certas famílias da de espécies do CMT e conseqüentemente da TB no mundo (BRUDAY et al, 2006). Verificamos que 35 dos nossos isolados não apresentaram similaridade com os perfis de referência da base de dados MIRU-VNTR_{plus}, tendo sido denominados neste estudo como isolados com perfis não pareados (MIRU-VNTR_{np}). Utilizamos a técnica de Spoligotyping como segunda técnica de genotipagem (KAMERBEEK 1997) para 30 destes isolados (19 perfis MIRU-VNTR_{np}) e submetemos a combinação dos perfis (MIRU-VNTR+Spoligotyping) novamente ao mesmo banco de dados. Cinco isolados não puderam ser genotipados pelo Spoligotyping por motivos não vinculados à técnica. A combinação das técnicas aumentou em 9% o numero de isolados identificados e reduziu para dez o numero de perfis MIRU-VNTR_{np}.

Ao final, 56 perfis distintos foram encontrados com 38 perfis únicos e 18 perfis em *clusters*; estes últimos contendo de dois a onze isolados, agrupando 67% dos isolados. No Brasil, Oelemann et al. (2011) em estudo de base populacional, trabalhando com 361 isolados obtidos de pacientes de três capitais brasileiras (Rio de Janeiro, Porto Alegre e Belém), encontrou 185 perfis distintos, 123 perfis únicos e 62 *clusters* utilizando MIRU-VNTR 12 *loci*. Portanto, a proporção de isolados em *cluster* e perfis únicos que encontramos é semelhante à deste estudo, apesar do mesmo não ter sido realizado com casos de TB multirresistente. Não há estudos

sobre diversidade genética de isolados de *M. tuberculosis* na Bahia utilizando a técnica do MIRU-VNTR, porém há dois estudos utilizando o Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) com amostras de pacientes com TB da Capital. Silva et al. (2011) genotipou 56 isolados obtidos de 56 pacientes atendidos no hospital de referência HEOM, tendo encontrado 73% de perfis únicos e seis *clusters* distintos contendo de dois a cinco isolados. Nery et al. (2011), em um estudo de base populacional com 326 casos, encontrou 265 padrões distintos e 27 *clusters*. Estes também apresentaram proporções equivalentes às observadas em nosso estudo.

Os isolados analisados aqui pertenceram a seis famílias/subfamílias (LAM, Haarlem, Cameron, X, S, Uganda I) sendo as principais LAM (72%), Cameroon (14%) Haarlem (10%) perfazendo 96% dos casos. A diversidade genética dos isolados trabalhados neste estudo pode ser inferida pelos doze diferentes ST's encontrados. Para um *cluster* majoritário contendo dez isolados não houve identificação da família. Nery et al. (2011) refere, no estudo de base populacional em Salvador, 51% família LAM, sendo o ST 42 o mais prevalente, 11% para família Haarlem, sendo o ST 50 mais prevalente, 9% família T e 7% da família X. Em isolados multirresistentes, Mendes et al. (2011) encontraram em São Paulo como principais famílias: LAM (21%), sendo encontrado o ST 60 com três isolados, os ST 42 e ST 17, com dois isolados cada, e o ST 828 com um isolado; T (15%), sendo encontrados ST 53 com cinco isolados e ST 1905 com um isolado; Haarlem ST 50 com cinco isolados (13%) e Beijing ST 1 com quatro isolados (10%). Perizzolo et al. (2012) referem no Rio Grande do Sul como principais famílias: LAM (58%), sendo mais prevalente o ST93 (18%); família T (18%) sendo ST53, ST65 e ST58 os mais prevalentes; U (13%) com os ST 863 e ST 106 predominantes para esta família e Haarlem (4%) tendo como mais prevalente o ST 47. Nossos resultados assemelham-se aos estudos descritos

quanto à maior prevalência da família LAM, especialmente com o ST42 como o mais freqüente, bem como quanto à presença das famílias Haarlem, T e X, sendo que as proporções encontradas para os demais ST's descritos diferem entre os estudos citados. Por outro lado, em nossa população verificamos uma proporção importante do ST 376 da família LAM e, principalmente, a presença da subfamília Cameroon com ST 61 (único), o que diverge dos estudos realizados em outros Estados Brasileiros. As famílias/subfamílias identificadas ocorreram em 27 dos 45 municípios do Estado com casos de TBMR identificados; 63% foram descritos em Salvador. As famílias Uganda I e X foram encontradas apenas em Salvador, porém, nenhuma família/subfamília esteve associada à Capital. O único caso para família S teve ocorrência no município de Juazeiro, extremo norte do Estado.

Verificamos nos nossos resultados que os casos de LAM ST 376 e Cameroon ST61 concentraram-se Capital do Estado (Salvador). Em relação à subfamília Cameroon ST 61, dos 15 casos encontrados no nosso estudo, 14 casos formaram dois *clusters*, um *cluster* com três casos e outros com onze casos, os quais diferiram apenas num único *locus* MIRU-VNTR (*locus* 920) revelando pouca diversidade MIRU-VNTR 12 loci para esta subfamília. A subfamília Cameroon tem sido descrita como limitada a países da África Ocidental, como Benin, Senegal e Costa de Marfim. Numa avaliação da biodiversidade genética de isolados de *M.tuberculosis* na cidade de Ovest, Camarões, de 455 isolados, 42% pertenceram à subfamília Cameroon, e destes 74% (143/193) apresentaram o ST61 (NIOBE-EYANGO et al, 2004; TAJAJ S et al, 2009). Outros estudos poderão avaliar a importância dos fluxos migratórios como fator possivelmente associado a esta proporção elevada de Cameroon em nossa população (BRUDEY et al., 2006). É importante salientar que o *cluster* ST61 com onze casos agrupou três com perfil TBXDR.

Este é o primeiro estudo no Brasil descrevendo as características genotípicas de casos de TBXDR. Salvador apresentou quase a totalidade dos casos de TBXDR o que pode ser reflexo direto da elevada incidência de TB (DIS/SESAB, 2010; MS, 2010). Os casos de TBXDR ocorreram associados a *clusters*, distribuídos em sete *clusters* diferentes. Ressaltamos que dos quatro *clusters* majoritários, dois contiveram dois casos TBXDR e um *cluster* aglomerou três casos. LEUNG et al. (2012) sugerem que os casos de TBXDR estão associados à transmissão recente. A diversidade dos isolados extensivamente resistentes em nossa população sugere que o desenvolvimento TBXDR na Bahia não é explicável apenas por uma transmissão clonal.

Doze dos 14 casos de TBXDR aqui descritos foram genotipados com sucesso e destes, onze tiveram famílias/subfamílias reconhecidas. Houve maior frequência da família LAM (45% ST's 376 e ST42, ST20) seguida pela subfamília Cameroon (36%, ST61) e pela família Haarlem (18%, ST50). Verificamos uma tendência dos casos TBXDR pertencerem à família Cameroon, e não encontramos nenhum caso da família Beijing. Estudos internacionais têm descritos casos de TBXDR associados à família Beijing (VELAYATI et al. 2009; AJBANI et al., 2011; CHANG et al., 2011; COHEN-BACRIE et al., 2011; HANEKOM et al. 2011; SURCOUF et al., 2011; VAN SOOLINGEN et al, 2011; BUU et al. 2012; CHIHOTA et al., 2012; MIGLIORI et al, 2012; SAID et al. 2012; YUAN et al., 2012), à família EAI (VELAYATI et al. 2009; AJBANI et al., 2011; CHANG et al., 2011; CASALI et al., 2012; SAID et al., 2012) à família Haarlem (VELAYATI et al. 2009; AJBANI et al., 2011; CHANG et al. 2011), à família LAM (CHANG et al., 2011), à família CAS (VELAYATI et al. 2009; AJBANI et al., 2011) e à família T (AJBANI et al., 2011; CHANG et al., 2011; CHIHOTA et al., 2012). Para dois casos de TBXDR e um caso de TBMR com mesmo perfil (LAM ST42) foi possível estabelecer ligação epidemiológica: trabalharam numa mesma empresa por mais de dois anos, e compartilharam um mesmo ambiente de escritório. Este resultado ressalta a importância da genotipagem como ferramenta para o entendimento sobre a dispersão das cepas de *M. tuberculosis* por tanto o que pode favorecer ações de vigilância epidemiológica.

8 CONCLUSÃO

Demonstramos, pela primeira vez no Estado, a existência de casos de tuberculose extensivamente resistente (TBXDR). Verificamos que estes casos não apresentaram uma associação com a infecção pelo HIV, porém houve proporção aumentada de casos TBXDR apresentando transtornos mentais com reduzida proporção em tratamento favorável e tendência para o óbito quando comparado aos casos não TBXDR. Estes resultados devem, entretanto, ser interpretados com cautela por terem sido obtidos a partir de fontes secundárias.

Verificamos que a genotipagem foi uma ferramenta importante para o estabelecimento de casos relacionados, sendo encontrados perfis genotípicos de isolados de *M. tuberculosis* multirresistentes em *clusters*, com dois casos TBXDR, que estiveram num mesmo *cluster*, com ligação epidemiológica confirmada após investigação do grupo. Em relação às famílias do bacilo da tuberculose envolvidas com os casos de TB multirresistente, verificamos que na Bahia houve prevalência das famílias LAM e Haarlem, em consonância com a prevalência geral destas famílias em nossa meio, obtida em outros estudos. Destaca-se a subfamília Cameroon, que apesar de não ter sido identificada em número expressivo em estudos prévios de distribuição das famílias de *M. tuberculosis* no país, estava em proporção aumentada especialmente entre os casos de TBXDR.

Este estudo contribuiu com a Vigilância Epidemiológica para o enfrentamento da TB multirresistente na Bahia, pois apresentou um breve panorama da epidemiologia dos casos de TB multirresistente no Estado, caracterizou as famílias de *M. tuberculosis* associadas a estes casos e a sua ocorrência por município, e descreveu a existência de casos TBXDR.

9 LIMITAÇÕES

Em nosso estudo, não foi possível obter informações para todos os pacientes em relação a algumas variáveis (comorbidades, pesquisa para o vírus HIV, história previa de falência, história previa de abandono, radiografia pulmonar, desfecho atual e tratamento diretamente observado [TOD.]) principalmente para o grupo não-TBXDR. Os isolados trabalhados foram obtidos de uma amostra de conveniência, o que não permite calcular a incidência de TBXDR no Estado. Parte dos isolados não apresentou crescimento após repique, impossibilitando a genotipagem de todos os isolados. Também não foi possível realizar ambas as técnicas de genotipagem, MIRU-VNTR e Spoligotyping, para a totalidade dos isolados, limitando a possibilidade de atribuição da família para os mesmos.

REFERÊNCIAS

AJBANI K, RODRIGUES C, SHENAI S, et al. Mutation Detection and Accurate Diagnosis of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: Report from a Tertiary Care Center in India. **J.Clin.Microbiol.** v.49, p.1588-90, 2011.

ÁKOS SOMOSKÖVI, PÁL MAGYAR; et al. Comparison of Recoveries of Mycobacterium tuberculosis Using the Automated BACTEC MGIT 960 System, the BACTEC 460 TB System, and Lowenstein-Jensen Medium **J.Clin.Microbiol.** [Internet]. 2000 citado 2011 jun2. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/38/6/2395>. Acesso em: 2 jun. 2012

ALLIX-BÉGUEC, D. HARMSSEN, T. WENIGER, P. SUPPLY, S. Niemann, Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. **J.Clin.Microbiol.**v.46, p.2692-2699.2008.

ALMEIDA, D.; RODRIGUES, C.; ASHAVID, T.F.; LALVANI, A.; UDWADIA, Z.F.; MEHTA, A. High Incidence of the Beijing Genotype among Multidrug-Resistant Isolates of Mycobacterium tuberculosis in a Tertiary Care Center in Mumbai, India. **Clin.Infec. Dis.**v. 40, p. 881-6,2005.

AMERICAN THORACIC SOCIETY, Centers for Disease Control and Prevention, Infectious Diseases Society of America, Treatment of Tuberculosis, **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**v.52, p.1-77, 2003.

ARBEX M.A.; VARELLA M. C.; SIQUEIRA H.R.; MELLO F.A. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. **J Bras Pneumol.** v.36, p.641-56,2010.

BAPTISTA, I. M. F. D.; OELEMANN, M. C.; OPROMOLLA, D. V. et al. Drug resistance and genotypes of strains of Mycobacterium tuberculosis isolated from human immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.97, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000800015>. Acesso em: 15 set. 2012.

BARBOSA T. BCG (Bacille of Calmette-Guerin) revaccination leads to improved in

vitro IFN gamma; response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. **Vaccine**. v.21, p.2152-2160, 2003.

BD BBL™ MGIT™ – Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 ml para Uso em Sistema Automatizado. BACTEC™ MGIT™ 960 Supplement kit. Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152. USA, 2010/2011. Cod.L000180JAA(201106)Disponível em: <http://www.bd.com/ds/>

BHANU, N.V.; van SOOLINGEN D.; van EMBDEN, J.D.A.; Dar L,Pandey, R.M.; Seth, P. Predominance of a novel Mycobacterium tuberculosis genotype in the Delhi region of India. **Tuberculosis** (Edinb). v.82, p.105–12, 2002

BLOSS E, CHAN P-C, CHENG N-W, WANG K-F, Yang S-L, Cegielski P. Increasing directly observed therapy related to improved tuberculosis treatment outcomes in Taiwan. **Int. J. Tuberc. LungDis**.v.16, p.462-7,2012

BRASIL. Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde / Centro de Referência Prof. Hélio Fraga / Projeto MSH, Sistema de vigilância epidemiológica da tuberculose multirresistente: Boletim nº 1. 1994 – 2006. **Rev. Bras.Pneumol.Sanit**.v.15, p. 39-46, 2007.

BRASIL. III Diretrizes para a Tuberculose da sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. comissão de Tuberculose da SBPT. Grupo de Trabalho das Diretrizes para Tuberculose da SBPT. **J. Bras.Pneumol**.v. 35,p.1018-1048, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Situação da Tuberculose no Brasil e no mundo. Brasília;Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portaL>. Acesso em 22 out. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica do Programa de Controle da Tuberculose. Trata sobre mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília: Ministério da Saúde, 2010 (Nota Técnica).

BRUDEY, K. ; DRISCOLL, J.R.; RIGOUTS, L. et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database

(SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol.**v.6, p.23, 2006.

BUU, T.N.; van SOOLINGEN, D, HUYEN, M.N.T. et al. Increased Transmission of Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype Strains Associated with Resistance to Streptomycin: A Population-Based Study. Mokrousov I, organizador. **PLoS ONE.** v.13, p.e42323, 2012.

BUU, T.N.; van SOOLINGEN, D.; HUYEN, M.N.T.; et al. Increased Transmission of Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype Strains Associated with Resistance to Streptomycin: A Population-Based Study. **PLoS ONE.**v.7, p.e42323, 2012.

CAMBAUP, E.; SOUGAKOFF, W.; BESSON, M.; TRUFFOT-PERNOT, C.; GROSSET, J.; JARLIER, V. Selection of a gyrA Mutant of Mycobacterium tuberculosis Resistant to Fluoroquinolones during Treatment with Ofloxacin. **J.Infect.Dis.**v.170, p.479-483, 1994.

CAMPOS, HISBELLO S. Mycobacterium tuberculosis resistente: de onde vem a resistência?.**Bol. Pneumol. Sanit.** v. 7, p. 51-64, 1999Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103. Acesso em: 02 nov. 2011

CANETTI, G. S.; FROMAN, J.; GROSSET, P. HAUDUROY.;H.T. MAHLER, L. Sula. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance**Bull. World Health Organ.**v.41, p. 565-578, 1963.

CANETTI, G. W.; FOX, A.; KHOMENKO, H.T.; MAHLER, N.K.; MENON, D.A. Mitchison, et al., Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes, **Bull. World Health Organ.**v.41, p. 21-43. 1969.

CASALI, N.; NIKOLAYEVSKYY, V.; BALABANOVA, Y.; IGNATYEVA, O.; KONTSEVAYA, I.; HARRIS, S.R.; et al. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. **Genome Res.**V.22, p.735-45. 2012.

CDC. Reported tuberculosis in the United States, 2005: Mycobacterium tuberculosis. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC;

2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nchstp/tb/surv/surv2005/pdf/tbsurvfullre>.

CDC. Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**v.55, p.301-5, 2006.

CDC. KENT P. T.; KUBICA. G. P. **Public Health Mycobacteriology** a guide for the level III laboratory. Published by U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control in Atlanta, Ga. **1985**.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, Plan to combat extensively drug-resistant tuberculosis: recommendations of the Federal Tuberculosis Task Force. **Morb.Mortal .Wkly. Rep.**v.58, p.1-43, 2009.

CHANG, C.W.; WU, M.H.; CHUANG, P.C.; JOU, R. Characteristics of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Taiwan: a population-based study. **Infect. Genet. Evol.**v.11, p.633-9. 2011

CHIHOTA, V.N.; MÜLLER, B.; MLAMBO, C.K.; PILLAY, M.; TAIT, M.; STREICHER, E. M.; et al. Population structure of multi- and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in South Africa. **J. Clin. Microbiol.** v. 50, p.995-1002, 2012.

COELHO, A.G.V. ZAMARIOLI, L.A. REIS, C.M.P. et al, Estudo comparativo entre técnicas de Lowenstein-Jensen e do Sistema MB/BacT™ no Isolamento de Micobacterias. **Rev. Inst.Adolfo Lutz.** v.64, p.132-6, 2005.

COHEN-BACRIE, S.; BEN KAHLA, I.; BOTELHO-NEVERS, E.; MILLION, M.; PAROLA, P.; BROUQUI, P.; et al. Imported extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype, Marseilles, France, **Europ.Surveill.**v.16, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527133>. acesso em 01 out. 2012.

COMAS, I.; HOMOLKA, S.; NIEMANN, S.; GAGNEUX, S. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in Mycobacterium tuberculosis Highlights the Limitations of Current Methodologies. **PLoS ONE.**v. 12, p.e7815. 2009.

CROFTON, J.; D. A. MITCHISON. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. **Br. Med. J.**v.2, p.1009-1015. 1948.

DALCOMO, M.P.; M.K. NORONHA. ; Andrade, P.D.;Picon. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle.**Rev. Saúde Pública.** v.41, p. 34, 2007.

DE VRIES, G.; BAARS, H.W.M.; SEBEK, M.M.G.G.; VAN HEST NAH.; RICHARDUS, J.H. Transmission classification model to determine place and time of infection of tuberculosis cases in an urban area. **J. Clin. Microbiol.** v.46, p.3924-30. 2008.

DE VRIES, G.; VAN HEST, R. A.; BURDO, C.C.; VAN, SOOLINGEN, D.; RICHARDUS, J.H. A Mycobacterium tuberculosis cluster demonstrating the use of genotyping in urban tuberculosis control. **BMC Infect. Dis.**v.9, p.151. 2009.

DEMAY, C.; LIENS, B.; BURGUIÈRE, T.; et al. SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology. **Infect. Gent.Evol.**v.12, p.755-66. 2012.

DEMEREK,M. Genetic Aspects of Drug Resistance [Internet]. In: WolstenholmeGEW, O'Connor CM, organizadores. Novartis Foundation Symposia. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. p. 47-63, 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780474>

den DUNNEN, J.T.; ANTONARAKIS, S.E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Hum. Mutation**v.15, p.7–12, 2000

DIVEP. Diretoria De Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB) em Boletim Epidemiológico da Tuberculose/TB de Dezembro 2011/ DIVEP N° 01. Disponível em:<http://www.suvisa.saude.ba.gov.br>. Acesso em: agosto 2012

DRAKE, J.W. The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**v.870, p.100-107, 1999.

DURMAZ, R.; ZOZIO, T.; GUNAL, S.; Yaman, A.; Cavusoglu, C.; Guney, C.; et al. Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from different regions of Turkey. **Infect. Gent. Evol.** v. 7, p.513-519, 2007.

FALMER, A.A.; MURRAY, M.; STRAUSS, O.J.; et al. Emergence of Increased Resistance and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis Despite Treatment Adherence, South Africa. **Emerg. Infect. Dis.** v.16, p.264-71. 2010

FERRAZOLI, L.; PALACI, M.; MARQUES, L.R.; et al; Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.** v.4, p.18–25. 2000.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **Am. J. Epidemiol.** v.153, p.1135-1141, 2001.

FROTHINGHAM, R.; MEEKER-O'CONNELL W.A. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. **Microbiol.** v. 144 (Pt 5):1189–96. 1998.

GAGNEUX, S.; BURGOS, M.V.; DERIEMER, K.; ENCISO, A.; MUÑOZ, S, Hopewell PC, et al. Impact of Bacterial Genetics on the Transmission of Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis. **PloS Pathog.** v.2, p. e61. 2006.

GANDHI, N.R.; MOLL, A.; STURM, A.W.; PAWINSKI, R.; GOVENDER, T.; LALLOO U, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. **Lancet.** v.368, p.1575–80, 2006.

GANDHI, N.R.A.; MOLL, A.W.; STURM, R. Pawinski, T. Govender, U. Lalloo, et al., Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa, **Lancet.** v. 368, p. 1575–1580, 2006.

GARRIDO, M.S.; PENNA, M.L.; PEREZ-PORCUNA, T.M.; Factors Associated with Tuberculosis Treatment Default in an Endemic Area of the Brazilian Amazon: A Case Control-Study. Pai M, organizador. **PLoS ONE.** v.7, p.e39134, 2012.

GIAMPAGLIA, C.M.; MARTINS, M.C.; CHIMARA, E.; OLIVEIRA, R.S.; DE OLIVEIRAVIEIRA, G.B.; MARSICO, A.G.; MELLO, F.C.; DE SOUZA FONSECA, L.; KRITSKI, A.; DA SILVA TELLES, M.A. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis from other mycobacteria with rho-nitrobenzoic acid using MGIT960. Disponível em: http://zotero.org/support/quick_start_guide. Acesso em: 2007.

GIBSON, A.L.; HUARD, R.C.; GEY, VAN PITTIUS, N.C.; LAZZARINI, L.C.O. DRISCOLL, J.; KUREPINA, N.; et al. Application of Sensitive and Specific Molecular Methods To Uncover Global Dissemination of the Major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean Mycobacterium tuberculosis Spoligotype Family. **J. Clin. Microbiol.** v.46, p.1259–67. 2008.

GILLESPIE, S.H. Evolution of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Clinical and Molecular Perspective..v. 46, p.267-274. 2002. **Antimicrob. Agents Chemother.**

GLYNN, J.R.; WHITELEY, J.; BIFANI, P. J.; Kremer, K.; VAN SOOLINGEN D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. **Emerg. Infect. Dis.** v.8, p.843–9, 2002.

HANEKOM, M.; GEY, VAN PITTIUS, N.C.; MCEVOY, C. et al.. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: A template for success. **Tuberculosis.** v. 91, p. 510-23. 2011.

HELB, D.; JONES, M.; STORY, E.; BOEHME, C.; WALLACE, E.; HO, K.; et al. Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. **J. Clin. Microbiol.** v.48, p.229–37. 2009

HEWLETT, D. Jr.; FRANCHINI, D.; HORN, D.; ALFALLA, C.; YAP, R.; DI PIETRO, D, et al. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis at a hospital—New York City, 1991. **Morb. Mortal Wkly. Rep.** v.42, p.427–33. 1993.

HEWLETT, D. Jr.; FRANCHINI, D.; HORN, D.; ALFALLA, C.; YAP, R.; DI PIETRO, D.; et al. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis at a hospital—New York City 1991. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.** v. 42, p.427–33. 1993.

HILLEMANN, D.; RICHTER, E.; RUSCH-GERDES, S. Use of the BACTEC

Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 Automated System for Recovery of Mycobacteria from 9,558 Extrapulmonary Specimens, Including Urine Samples. **J.Clin.Microbiol.**v.44, p.4014-4017. 2006.

HILLEMANN, D.; WEIZENEGGER, M.; KUBICA, T.; RICHTER, E.; NIEMANN, S. Use of the Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates. **J.Clin.Microbiol.**v. 43, p.3699-3703. 2005.

HIRANO, K. M.; TAKAHASHI, Y.; KAZUMI, Y.; FUKASAWA, C. A mutation in pncA is a major mechanism of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Tuber. Lung Dis.**v. 78:117–122.1997.

HOLTZ TH, CEGIELSKI JP. Origin of the term XDR-TB. *European Respiratory Journal*. 2007 ago 1;30:396–396.

HOLTZ, T.H.; RIEKTSINA, V.; ZAROVSKA, E.; LASERSON, K.F.; WELLS, C.D.; LEIMANE, V. XDR-TB: extreme drug-resistance and treatment outcome under DOTS-Plus, Latvia, 2000–2002. **Int. J.Tuberc. Lung. Dis.**v. 9: Suppl. 1, S258. 2005.

IWAMOTO T. [Population structure analysis of Mycobacterium tuberculosis Beijing family in Japan]. **Kekkaku.** v.84, p.755-9. 2009.

JANSEN, R, VAN EMBDEN, J.D.A.; GAASTRA, W. Schouls LM. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. **OMICS.**v.6, 23–33. 2002.

KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. **J.Clin. Microbiol.** v.35, p.907–14.1997.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. Molecular Methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a users guide. **J. Appl. Microbiol.** v.94, p.781–91. 2003.

KOCH, R. The aetiology of tuberculosis. Pinner M, Pinner B. **Trans. Amer. Rev.tuberc.** v. 25: 285-323. 1932.

KOCHI, A. Tuberculosis: distribution, risk factors, mortality. **Immunobiol.** 1994 v.191, p.325-36.1994.

KREMER, K.; GLYNN, J.R.; LILLEBAEK, T.; NIEMANN, S.; KUREPINA, N.E.; KREISWIRTH, B.N.; et al. Definition of the Beijing/W lineage of Mycobacterium tuberculosis on the basis of genetic markers. **J. Clin. Microbiol.**v.;42, p.4040–9. 2004.

KREMER K, VAN SOOLINGEN D, FROTHINGHAM R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **J. Clin. Microbiol.**v.37, p. 2607–18. 1999.

KRUUNER, A.M.D.; YATES, F.A.; DROBNIIEWSKI, Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first-and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of Mycobacterium tuberculosis, **J. of Clinical Microbiol.**. v.44, p. 811. 2006.

KWON, Y.S.; KIM, Y.H.; SUH, G.Y.; et al. Treatment outcomes for HIV-uninfected patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. **Clin. Infect. Dis.** v.47, p.496-502. 2008.

LE FLECHE, P. ; HAUCK, Y. ; ONTENIENTE, L. ; PRIEUR, A. ; DENOEUDE, F. ; RAMISSE, V. ; et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of Yersinia pestis and Bacillus anthracis. **BMC Microbiol.** v.1, p. 2, 2001.

LEUNG, E.C.C.;LEUNG, C.C.; KAM, K.M.; YEW, W.W.;CHANG, K.; LEUNG, W.M.; et al. Transmission of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in a metropolitan city. *EuropeanRespiratoryJournal*. Disponível em: <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00071212>. Acesso em 9ago 2012.

LEUNG, E.C.C.;LEUNG, C.C.; KAM, K.M.; YEW, W.W.; CHANG, K.C.; LEUNG,W.M.; et al. Transmission of multidrug-resistant and extensively drug-

resistant tuberculosis in a metropolitan city. **Eur.Respir. J.** [Internet]. 2012 ago 9 [citado 2012 out 1]; Disponível em <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00071212>. Acesso em 1 out 2012.

LEVY, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat.Med.**.v.10, S122–9. 2004

LOPEZ-ALVAREZ, R.; BADILLO-LOPEZ, C.; CERNA-CORTES, J.F.; et al. First insights into the genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. **BMC Microbiol.** v.10, p.82,2010.

MACNABB, A. L. The tubercle bacillus. In: Diagnostic procedures and reagents-techniques for the laboratory diagnosis and control of communicable diseases. New York, **AmericanPublic Health Association.** p. 281–292. 1941.

MARTIN, A.; FISSETTE, K.; VARAINE, F.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Thin layer agar compared to BACTEC MGIT 960 for early detection of Mycobacterium tuberculosis. **J.Microbiol. Methods.**v.78, p.107-8. 2009.

MASJEDI, M.R.; TABARSI, P.; BAGHAEI, P.; et al. Extensively drug-resistant tuberculosis treatment outcome in Iran: a case series of seven patients. **Int. J.Infect. Dis.**.v.14, p.e399-e402. 2010

MENDES, N.H.; MELO, F.A.; SANTOS, A. C.; et al. Characterization of the genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in São Paulo city, Brazil. **BMC Res. Notes.** v.4, p.269.2011.

MIGLIORI, G.B.; K. DHEDA, R.; CENTIS, P. Mwaba, M. Bates, J. O'Grady, et al., Review of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB: global perspectives with a focus on sub-Saharan Africa, **Trop. Med.Int.Health.** 2010

MILAN, S.J.; HAUGE,K.A.; KUREPINA, N.E.; LOFY, K.H.; GOLDBERG, S.V.; NARITA, M.; et al. Expanded geographical distribution of the N family of Mycobacterium tuberculosis strains within the United States. **J. Clin. Microbiol.** v.42, p.1064–8. 2004.

MITCHISON, D.A. Drug resistance in tuberculosis. **Eur. Resp. J.** v. 25, p.376-9. 2005.

Mlambo, C.K.; Warren, R.M.; POSWA, X.; VICTOR, T.C.; DUSE, A.G.; MARAIS, E. Genotypic diversity of extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) in South Africa. **Int.J.Tuberc. Lung Dis.** v.12, p.99-104. 2008.

MOLL, A.; GANDHI, N.R.; PAWINSKI, R.; et al. Identification of a multidrug-resistant tuberculosis cluster as a cause of death among HIV co-infected patients in rural South Africa. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, CO, USA. February 7, 2006, Poster O-115.

MOSS, A.R.; ALLAND, D.; TELZAK, E.; et al. A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.** v.1, p.115–21. 1997.

MURRAY, P. Medical microbiology. 6.Ed.. Philadelphia: Mosby ,Elsevier; 2009.

NERY, J. G.; CABRAL, M.; LOUREIRO, F.; Rodrigues, L.; FERRAZOLI, M.; BARRETO, et al. Perfil epidemiológico dos isolados de pacientes com tuberculose pulmonar da cidade de Salvador-Bahia obtidos no período de 2008 a 2009, in: Anais Do IV Encontro Nacional De Tuberculose, Rio de Janeiro/RJ, Brazil, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2010.

NIOBE-EYANGO, S.N.; KUABAN, C.; SORLIN, P.; 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. **J.Clin.Microbiol.**v.42, p.5029-35. 2004.

NIOBE-EYANGO, S.N.; KUABAN, C.; SORLIN, P.; et al. Genetic Biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains from Patients with Pulmonary Tuberculosis in Cameroon. **J.Clin.Microbiol.** v.41, p. 2547-53. 2003.

OELEMANN, C, M.; GOMES, H.M.; WILLERY, E.; et al. (2011)The Forest behind the Tree: Phylogenetic Exploration of a Dominant *Mycobacterium tuberculosis* Strain Lineage from a High Tuberculosis Burden Country.**PLoS ONE**, v.6, p. e18256.

OLIVEIRA, E. E.; AMORIM, A.; PEREIRA. Descrição dos perfis de resistência de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz (LACEN/BA) no período de 2008-2009, in: Anais Do IV Encontro Nacional De Tuberculose, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, Rio de Janeiro/RJ, Brazil, 2010.

OMS. Global Tuberculosis Control: A short update to the 2009 report; 2009

OMS. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response, World Health Organization, 2010.

PINHEIRO RO, DALCOLMO MP, SAMPAIO EP. Tuberculose e MDR-TB: mecanismos imunológicos e novas ferramentas de controle da doença. RECIIS [Internet]. 2008 jul 3 [citado 2011 nov 9]; 2. Available from: <http://www.reciis.cict.fiocruz.br/index>

QIAN L, VAN EMBDEN J.D.; VAN DER ZANDEN A.G.; WELTEVREDEN, E.F.; DUANMU H, Douglas JT. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. **J. Clin. Microbiol.** v.7, p.471–4. 1999.

RAMASWAMY, S.V. ; AMIN, A.G. ; GÖKSEL, S. ; STAGER, C.E. ; DOU, S.J. ; EL SAHLY H. ; et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.44, p.326–36. 2000

RORING, S. A.; SCOTT, D.; BRITAIN, I.; Walker, G.; Hewinson, S.; Neill, R.; Skuce. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. **J.Clin. Microbiol.** v. 40, p.2126-2133, 2002.

ROSEMBERG, JOSÉ. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Bol. Pneumol. Sanit.** v.7, p. 5-29. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo>. Acesso em: 11 dez 1999.

ROSSETTI, M.L.R.; Tuberculose Resistente: revisão molecular. **Rev. Saúde Pública.** v.36, 2002.

SAID, H.M.; KOCK, M.N.; ISMAIL, N.A.M.; PHAHLELE, M, BABA, K.; OMAR, S.V.; et al. Molecular Characterization and Second-Line Antituberculosis Drug Resistance Patterns of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from the Northern Region of South Africa. **J. Clin. Microbiol.** v.50, p.2857-62. 2012

SALERI, N.; BADOUM, G.; OUEDRAOGO, M.; et al. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis, Burkina Faso. *Emerging Infectious Diseases.* v.16, v. 840-2. 2010.

SANTOS, L. C.; KIPNIS A. P. J.; KIPNIS, A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do Mycobacterium tuberculosis. **Rev. Patol. Trop.**

SCHATZ, A. S. A.; WAKSMAN. 1944. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon Mycobacterium tuberculosis and related organisms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.57, p.244–248.

SHARMA D, SUROLIA A. Computational tools to study and understand the intricate biology of mycobacteria. **Tuberculosis.** v.91, p.273-6, 2011.

SINAN/SVS/MS, 2012. Taxa de Incidência e Número de Casos Novos de Tuberculose por faixa etária e sexo. Brasil 2010. Em Situação epidemiológica e Política de Controle da Tuberculose no Brasil, 2012. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527

SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Molecular Epidemiology of Mycobacterium bovis [Internet]. In: Madkour, M.M.; Al SAIF, A.; Al SHAHED, M.; Al MOUTAERY, K.R.; Al KUDWAH, A. organizadores. Tuberculosis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; p. 75–92, 2004. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index> Acesso em: 14 nov 2011.

SKUCE, R. A.; T. P. McCORRY, J. F.; McCARROLL, S. M.; RORING, A. N.; SCOTT, D. BRITAIN, S. L.; HUGHES, R. G.; HEWINSON, S. D.; NEILL. Discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. **Microbiol.** p. 148:519-528, 2002

SMALL, P M N B MCCLENNY, S P SINGH, G K et al. Molecular strain typing of Mycobacterium tuberculosis to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive

cultures. **J. Clin. Microbiol.** v. 31, p. 1677–1682, 1993.

SMITH, N.H.; KREMER, K.; INWALD, J.; DAL, E. J.; DRISCOLL, J.R.; GORDON, S.V.; et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J.Theor. Biol.**v. 239, p.220–5. 2006.

SOMOSKOVI, A.; CLOBRIDGE, A.; LARSEN, S.C.; SINYAVSKIY, et al. Does the MGIT 960 System Improve the Turnaround Times for Growth Detection and Susceptibility Testing of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex? **J.Clin.Microbiol.**v.44, p.2314-5. 2006.

SOMOSKOVI, A.; CLOBRIDGE, A.; LARSEN, S.C.; SINYAVSKIY, O.; SURUCUOGLU, S.; et al. Does the MGIT 960 System Improve the Turnaround Times for Growth Detection and Susceptibility Testing of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex? *Journal of Clinical Microbiology.* v.44, p.2314,2006.

SOMOSKÖVI, A.; CSABA, K.; ÁKOS, L.; ZOLTÁN, B.; LILLA, T, JUDIT, F.; PÁL, M. Comparison of Recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* Using the utom, ated BACTEC MGIT 960 System, the BACTEC 460 TB System, and Löwenstein-Jensen Medium. **J.Clin.Microbiol.**n.11, p.2395-2397. 2000

SUN Z, CHAO Y, ZHANG X, et al. Characterization of Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in China. **J.Clin.Microbiol.**v.46, p.4075–7, 2008.

SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RUSCHGERDES, S.; WILLERY, E.; et al. Proposal for Standardization of Optimized *Mycobacterium tuberculosis* Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J.Clin.Microbiol.**v.44:4498–510, 2006.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Mol.Microbiol.**v.36, 762–71, 2000.

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

Clin.Microbiol.v.39, p. 3563-3571. 2001.

SURCOUF, C.; HENG, S.; PIERRE-AUDIGIER, C.; CADET-DANIEL, V.; NAMOUCHI A, MURRAY A.; et al. Molecular detection of fluoroquinolone-resistance in multi-drug resistant tuberculosis in Cambodia suggests low association with XDR phenotypes. **BMC Infect. Dis.**v.11, p.255,.2011.

TAJAJ, S.; ZHANG, J.; HAUCK, Y.; et al. First Insight into Genetic Diversity of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Albania Obtained by Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Spoligotyping Reveals the Presence of Beijing Multidrug-Resistant Isolates. **J.Clin.Microbiol.**v.47, p.1581-4. 2009.

TAJAJ, S.; ZHANG, J.; HAUCK, Y.; POURCEL, C.; HAFIZI, H.; ZORAQI, G.; et al. First Insight into Genetic Diversity of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Albania Obtained by Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Spoligotyping Reveals the Presence of Beijing Multidrug-Resistant Isolates. **J.Clin.Microbiol.** v.47, p.1581–4, 2009.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; MATTER, L.; SCHOPFER, K.; BODMER, T.; et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. *The Lancet.* v.341, p.647-651.1993.

TELLES, M.A.S.; FERRAZOLI. L.; WALDMAN E. A. GIAMPAGLIA.C .M.S ET AL. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in a urban community. *Int J Tuberc Lung Dis* fev 20059(9)970-976

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Med.**v.119,Suppl. 1, p.S3-10.discussion S62-70.

TSUCHIYA T. [Exogenous re-infection in tuberculosis]. *Kekkaku.* 2006 fev;81(2):79-91.

UDWADIA ZF, AMALE RA, AJBANI KK et al. Totally drug-resistant tuberculosis in India. **Clin. Infect. Dis.** v.54, p. 579–81, 2012.

VALWAY S.E., M.P. SANCHEZ, T.F. SHINNICK, I. Orme, T. Agerton, D. Hoy, et al., An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of Mycobacterium

tuberculosis, **N Engl. J. Med.**v.338, p. 633.

VAN DEUTEKOM, H. P.; SUPPLY, P.E.W.; DE HAAS.; et al., Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** v.43, p. 4473-4479, 2005.

VAN EMBDEN J.D., M.D. CAVE, J.T. CRAWFORD, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, et al., Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology, **J. Clin. Microbiol.** v.31, p.406-409, 1993.

VAN INGEN, J.; SIMONS, S.; DE ZWAAN, R.; VANDER LAAN, T.; KAMST-VAN AGTERVELD, M.; BOEREE, M.J.; et al. Comparative Study on Genotypic and Phenotypic Second-Line Drug Resistance Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. **J.Clin.Microbiol.**v.48, p.2749–53, 2010.

VAN SOOLINGEN, D.; KREMER, K. [Findings and ongoing research in the molecular epidemiology of tuberculosis]. **Kekkaku.** v.84, p.83-9,2009.

VAN SOOLINGEN D, KREMER K. [Findings and ongoing research in the molecular epidemiology of tuberculosis]. **Kekkaku.** v.84, p.83-9. 2009.

VAN SOOLINGEN, D; BEER, J.; KREMER, K. Multilocus variable numbers of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates.in Manual - VNTR typing (RIVM) da equipe de projetos ECDC (RIVM); 2010 disponível em:www.tuberculosis.rivm.nl

VAN SOOLINGEN, D; BEER, J; KREMER, K. Multilocus variable numbers of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. ECDC project team (RIVM); 2010.

VELAYATI, A. A.; MASJEDI, M.R.; FARNIA, P.; et al. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli: Super Extensively Drug-Resistant Tuberculosis or Totally Drug-Resistant Strains in Iran. **Chest.** v.136, p.420-5. 2009.

VELAYATI, A. A.; MASJEDI, M. R, FARNIA, P.; et al. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. **Chest**.v.136, p.420-5. 2009.

VILLA, T.C.; RUFFINO-NETTO, A.; SCATENA, L.M.;ANDRADE, R. L.; BRUNELLO, M.E.; NOGUEIRA, J.A.; et al. Health services performance for TB treatment in Brazil: a cross-sectional study.**BMC health serv. res**.v.11, p.241. 2011

WENIGER, T.; KRAWCZYK, J.; SUPPLY, P.; et al. Online tools for polyphasic analysis of Mycobacterium tuberculosis complex genotyping data: Now and next. **Infect. Genet.Evol**.v.12, p.748-54,2012.

WIRTH, T.; HILDEBRAND, F.; ALLIX-BÉGUEC, C.; WOLBELING, F.; KUBICA, T.; KREMER, K.; et al. Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium tuberculosis Complex. **PLoS Pathogens**. v.4, e1000160.2008.2008

YEN Y-F, RODWELL TC, YEN M-Y, et al. DOT associated with reduced all-cause mortality among tuberculosis patients in Taipei, Taiwan, 2006-2008. **Int. J. Tuberc. Lung Dis**.v.16, v.178-84. 2012.

APÊNDICE

Tabela I – População de isolados do estudo. Sexo dos pacientes cujos isolados foram obtidos. Bahia, 2012

Variável	Pacientes cujos isolados permaneceram no estudo n (%)	Pacientes cujos isolados foram excluídos n (%)	<i>p</i>
Sexo			0,775
Masculino	134 (65)	34 (63)	
Feminino	72 (35)	20 (37)	
Total	206 (100)	54 (100)	

Descrição da população de isolados excluídos por contaminação durante a realização do teste de sensibilidade. Para a variável gênero, não houve diferença significativa entre a população de isolados de pacientes com TBMR que permaneceram no estudo que aqueles que foram excluídos. Os isolados foram excluídos quando houve ausência de crescimento, contaminação das culturas por fungos ou outras bactérias não tuberculosas.

Tabela II- Descrição dos perfis de resistência aos fármacos do teste de sensibilidade I e II (TSI e TSII), do perfil MIRU-VNTR's 12 loci dos isolados de *M. tuberculosis multirresistentes* e as respectivas famílias e *Shared International Types* (ST) obtidos por similaridade (cut off $\leq 0,17$) com as linhagens de referências do site [www.miru-vntr plus](http://www.miru-vntr.plus). Bahia, Brasil, 2012

ID	TSI				TSII				MIRU-VNTR 12 loci											Familia	ST	
	R	H	S	E	C	O	K	A	580	2996	802	960	1644	3192	154	2531	4348	2059	2687			3007
3	R	R	S	R	S	R	S	S	2	5	4	3	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376
5	R	R	R	S	S	S	S	S	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	3		*
6	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	4	3	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376
11	R	R	S	S	S	S	S	S	1	4	1	2	1	3	2	6	2	2	1	2		*
13	R	R	R	R	S	S	S	S	2	6	1	3	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
15	R	R	R	S	R	S	S	S	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	3		*
17	R	R	R	S	S	R	S	S	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
19	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
20	R	R	S	S	S	S	S	S	3	4	2	3	3	3	2	5	2	2	1	3	S	71
21	R	R	S	S	R	S	S	S	2	2	1	4	2	3	2	5	2	2	1	3	LAM	42
22	R	R	S	S	R	R	R	R	2	5	4	3	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376
24	R	R	S	R	R	R	R	R	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
28	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
31	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
33	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	1	4	1	3	2	6	2	2	1	2	LAM	20
34	R	R	R	R	R	R	S	S	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
35	R	R	R	S	S	S	S	S	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
36	R	R	R	R	S	R	S	S	2	5	1	4	2	4	2	3	2	1	1	3		*
37	R	R	S	S	R	S	S	S	2	5	5	4	2	2	1	6	2	2	1	3	LAM	159
39	R	R	R	R	S	R	S	S	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
40	R	R	S	S	R	R	R	R	2	5	4	3	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376
41	R	R	R	S	S	R	S	S	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
43	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	3	4	3	2	1	6	2	2	1	3	LAM	159
44	R	R	R	S	S	S	S	S	2	6	1	4	2	3	2	5	2	2	1	3	LAM	42
46	R	R	S	R	S	R	S	S	2	5	6	4	3	2	1	6	2	2	1	3	LAM	159
47	R	R	S	R	S	R	S	S	2	4	1	2	2	3	2	4	2	2	1	2		*
48	R	R	R	R	S	R	S	S	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	3		*
49	R	R	S	S	R	S	S	S	2	5	4	4	2	3	2	5	1	2	1	3		*
51	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4	7	4	3	2	2	6	2	1	1	3		*
53	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	4	4	2	3	2	5	1	2	1	3		*
54	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	3		*
55	R	R	R	S	S	S	S	S	2	5	5	4	3	2	2	5	2	2	1	3	X	119
57	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4	7	4	3	2	2	6	2	1	1	3		*
60	R	R	R	S	S	S	S	S	2	6	1	4	2	3	2	5	2	2	1	3	LAM	42
63	R	R	R	S	S	S	S	S	2	6	1	4	2	3	2	5	2	2	1	3	LAM	42
65	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	4	2	3	2	1	6	2	2	1	3	LAM	159
66	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	3	4	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	33
67	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	3	4	3	2	2	6	2	2	1	3	LAM	33
68	R	R	S	S	R	S	S	S	2	6	4	0	3	3	2	3	2	1	1	3		*
71	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	1	4	1	3	2	6	2	2	1	2	LAM	20
72	R	R	R	R	S	S	R	S	2	5	3	4	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	33
73	R	R	S	S	S	S	S	S	1	5	1	3	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	20
75	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4	1	3	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
78	R	R	R	S	S	S	S	S	2	6	1	4	2	3	2	5	2	2	1	3	LAM	42

79	R	R	S	S	S	S	S	S	3	5	3	4	3	3	2	5	2	2	1	2		*
81	R	R	S	R	R	R	R	R	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
82	R	R	S	S	S	R	S	S	2	3	1	4	1	3	2	6	2	2	1	2		*
83	R	R	R	S	S	S	S	S	2	6	1	4	2	3	2	5	2	2	1	3	LAM	42
85	R	R	R	R	R	R	R	R	2	5	1	3	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	20
86	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	4	3	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376
87	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	3		*
89	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	3	5	3	3	2	3	2	1	1	3	HAARLEM	2
91	R	R	R	S	S	S	S	S	2	5	5	4	3	3	1	2	2	1	1	3		*
93	R	R	S	S	S	S	R	R	2	5	3	5	3	3	2	3	2	1	1	3	HAARLEM	2
94	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	3	4	2	3	2	6	2	2	1	4	LAM	33
95	R	R	S	S	S	R	S	S	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
98	R	R	R	R	S	R	R	R	1	5	3	5	3	3	2	5	2	2	1	3	HAARLEM	50
100	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	4	3	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376
101	R	R	R	R	S	R	S	S	1	5	3	5	3	3	2	5	2	2	1	3	HAARLEM	50
104	R	R	S	R	S	R	S	S	2	5	3	4	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
105	R	R	R	R	R	R	R	R	1	5	3	0	3	3	2	5	2	2	1	3	HAARLEM	50
106	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	4	4	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376
107	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	4	4	2	3	2	5	1	2	1	3		*
109	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4	7	4	3	2	2	6	2	1	1	3		*
110	R	R	R	S	S	S	S	S	2	6	4	4	3	2	1	6	2	2	1	3	LAM	159
111	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
112	R	R	R	R	R	R	R	R	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
113	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4	2	4	3	2	2	6	2	1	1	3		*
116	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	3	4	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	33
117	R	R	R	S	S	S	S	S	2	5	3	4	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	33
118	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	2	4	3	3	2	5	2	2	1	3	HAARLEM	47
120	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	1	4	1	3	2	6	2	2	1	2	LAM	20
121	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
124	R	R	S	R	S	S	S	S	2	4	2	4	3	2	1	6	2	2	1	3	LAM	159
125	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	3	4	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
126	R	R	S	S	S	R	S	S	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
127	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4	1	2	1	3	2	4	2	2	1	2		*
128	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4	2	4	3	2	2	6	2	1	1	3		*
129	R	R	S	R	S	R	S	S	2	5	3	4	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	33
130	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	4	LAM	42
132	R	R	S	S	R	S	S	S	2	5	4	3	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376
133	R	R	R	R	R	S	S	S	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	3		*
136	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	1	4	3	4	2	3	1	1	1	3		*
137	R	R	R	S	S	S	S	S	2	5	1	4	2	3	2	5	2	2	1	3	HAARLEM	47
138	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	1	3	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	20
140	R	R	R	R	S	R	S	S	2	4	4	4	2	2	1	6	2	2	1	3	LAM	159
141	R	R	S	S	S	R	S	S	2	5	4	3	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376
143	R	R	S	R	R	R	R	R	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
144	R	R	R	S	S	S	S	S	2	5	5	4	1	2	1	5	2	2	1	3	LAM	42
145	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	1	5	3	3	2	3	1	1	1	3		*
147	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	2	4	3	2	1	4	2	2	1	3	LAM	159
149	R	R	S	R	S	S	S	S	2	4	4	4	3	1	2	6	2	3	1	3		*
150	R	R	S	R	S	R	S	S	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61
151	R	R	S	S	S	R	S	S	1	5	1	3	1	3	2	4	2	2	1	3	LAM	20
152	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	3	4	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	33
153	R	R	S	S	S	R	S	S	2	4	5	2	2	2	1	6	2	2	1	3		*
154	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42
156	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	1	4	3	4	2	3	1	1	1	3		*
157	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	3		*
158	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4	1	3	2	4	2	6	2	2	1	3	UGANDA I	52

159	R	R	R	S	S	S	S	S	2	2	2	2	2	2	3	2	6	2	2	1	3		*
160	R	R	R	R	R	R	R	R	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	1	3		*
161	R	R	R	R	S	R	S	S	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	1	3		*
162	R	R	S	S	S	S	S	S	2	5	4	4	3	3	2	6	2	2	1	3	LAM	376	
163	R	R	R	R	S	R	S	S	2	5	1	4	3	3	2	3	1	1	1	1	3		*
165	R	R	S	S	S	S	S	S	1	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61	
166	R	R	R	R	S	R	S	S	2	4	4	4	2	2	1	6	2	2	1	3	LAM	159	
167	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	1	4	3	4	2	3	1	1	1	1	3		*
168	R	R	R	R	S	R	S	S	2	3	5	4	3	3	1	2	2	1	1	3		*	
169	R	R	R	R	S	S	S	S	2	5	3	3	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61	
170	R	R	R	S	S	S	S	S	2	5	1	4	1	3	2	5	2	2	1	2		*	
181	R	R	R	R	R	R	R	R	2	5	3	4	3	3	2	5	2	2	1	3	CAMEROON	61	
210	R	R	R	R	S	R	S	S	2	4	2	4	3	2	1	6	2	2	1	3	LAM	159	
230	R	R	R	R	S	R	S	S	2	5	1	4	2	3	2	6	2	2	1	3	LAM	42	
235	R	R	S	R	S	S	S	S	2	5	5	4	2	3	2	5	1	2	1	3	X	119	
257	R	R	R	R	S	R	S	S	2	5	1	4	2	3	1	6	2	2	1	3	LAM	42	

ID: Identificação da amostra no estudo

R/S R: Resistente/S: Sensível

R,H,S,E: Rifampicina, Isoniazida, Estreptomina, Etambutol

C,O,K,A :Capreomicina, Ofloxacina, Kanamicina,Amicacina

* Isolado com perfil MIRU-VNTR 12 loci não pareado (MIRU-VNTRnp)

Em negrito, casos de tuberculose extensivamente resistente (TBXDR)

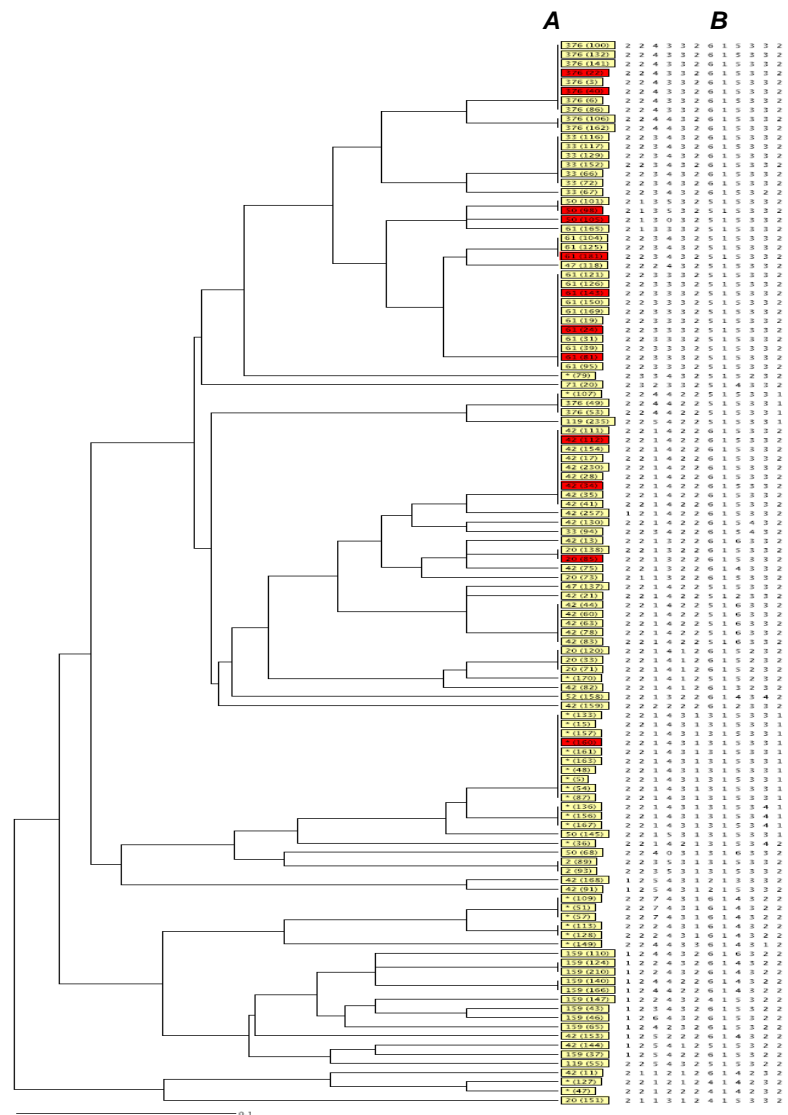


Figura 4- Diversidade genética das dos 18 clusters de linhagens de *M.tuberculosis* multirresistentes A) *Shared International types* (SIT) da linhagem com a identidade da amostra . B) perfil MIRU-VNTR 12 loci. Em destaque as linhagens de MT-XDR. Dendograma categórico de peso um para o MIRU-VNTR 12 loci em tree-UPGMA, utilizando o site www.miru-vntrplus.com

ANEXO I- Ficha de Notificação de Casos de Tuberculose Multirresistente

Menu Options

Última Pesquisa

Ficha de TBMR

Nova Ficha de Acompanhamento
Nova Ficha Pós-Cura

Informações

User:

Local: Barreiras

Connection Date and Time:

05-jul-2012 (qui)
às 01:41:39



Ficha de Notificação de Caso de Tuberculose Multirresistente

Caso: 1331 Ficha: Notificação de 17-jun-2003 Validado

Dados da US

1. US de Origem: 14º CENTRO DE SAÚDE
2. Município: Salvador 3. UF: BA
4. US de Tratamento: HOSPITAL OCTÁVIO MANGABEIRA
5. Município: Salvador 6. UF: BA

Identificação do Caso

7. Nº Notificação TBMR: 1331 8. Data início do tratamento: 17-jun-2003
9. Nº SINAN: 10. Nº Cartão SUS:
11. Nome do paciente:
12. Nome da mãe:
13. Data do nascimento: 17/07/1970 14. Idade: 32
15. Sexo: 1- Masculino 16. Cor/Etnia: 2- Negra
17. Escolaridade: 3- De 4 a 7 18. Ocupação: 11- Outros
19. Endereço: RUA VALDEK SIDNEY Nº: 1896
Complemento:
20. Bairro: ESTRADA DE BARREIRAS 21. CEP:
22. UF: BA 23. Município: Barreiras
24. Telefone: Celular:

História Patológica Progressa

25. Tratamento anterior para TB: 1- SIM 26. Número de tratamentos anteriores para TB: 3- 3 ou + tratamentos

27. Descrição dos tratamentos anteriores para TB

Trat.	Ano (Início)	Medicamentos										Nome de outros medicamentos utilizados	Resultado Tratamento			
		R	H	Z	E	S	Et	Ofx	Cs	Cfz	Trd			Am		
1º	1994	X	X	X												1- Cura
2º	2001	X	X	X												1- Cura
3º	2002		X	X	X	X										3- Falência

27.1. Tipo de resistência: 2- TBMR Adquirida

História de Doença Atual

28. Peso atual: 58,000 29. Está em uso de esquema III?: 1- SIM
30. Nº de meses de tratamento em que se verificou a falência: 4 31. Está hospitalizado(a)?: 2- NÃO
32. Local do provável contágio: 9- Ignorado 33. Número de Contatos Identificados: 0
34. HIV: 2- Negativo

35. Comorbidades:

Exames Laboratoriais Atuais

36. Baciloscopia de Escarro: 1- + 37. Cultura de escarro: 1- +
38. Data da coleta da cultura de escarro: 12/02/2003 39. Nome do laboratório onde foi feita a cultura: LACEN - BA
40. Método: 1- LJ

41. Padrão de resistência (TS)
Rifampicina: 1- Resistente
Isoniazida: 1- Resistente
Pirazinamida: 1- Resistente
Etambutol: 1- Resistente
Etionamida: 1- Resistente

Estreptomicina:	1- Resistente
Amicacina:	2- Não Realizado
Kanamicina:	2- Não Realizado
Capreomicina:	2- Não Realizado
Ciprofloxacino:	2- Não Realizado
Ofloxacino:	2- Não Realizado
Levofloxacino:	2- Não Realizado
Moxifloxacino:	2- Não Realizado
Terizidona:	2- Não Realizado

42. Ficha de TBMR: 1- Confirmado

Exames Complementares

43. Forma clínica: 1- Pulmonar 44. Raios X do tórax: 3- Bilateral cavitária
46. Cultura de outro material: 4- Não realizada

Tratamento Proposto

47. Medicamentos prescritos:

- AMICACINA - 500mg
- ETAMBUTOL - 800mg
- OFLOXACINO - 600mg
- TERIZIDONA - 500mg
- CLOFAZIMINA - 100mg

48. Outros medicamentos e doses:

49. Tratamento supervisionado: 2- NÃO

50. Outros Procedimentos:

51. Outras Informações:

52. Preenchido por:

[]

Profissão:

MEDICA

ANEXO II – Manuscrito em preparação para submissão ao *Clinical Microbiology and Infection* (CMI) sob formato Research Note

Extensively Drug Resistant Tuberculosis in Brazil: a series of fourteen cases from a reference laboratory MDR-TB collection

Erivelton Oliveira Sousa^{1,2}, Fátima Cristina Fandinho³, Jamocy Moura Marinho^{4,5}, Eliana Matos⁵, Karla Valéria BatistaLima⁶, Emily Costa Conceição⁶ Theolis Barbosa^{2,*}.

¹Laboratório de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz, Salvador/BA, Brasil; ²Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador/BA, Brazil; ³Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil; ⁴Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador/BA, Brasil; ⁵Hospital Especializado Octávio Mangabeira, Salvador/BA, Brasil. ⁶Instituto Evandro Chagas Ananindeua/PA, Brazil.

Erivelton Oliveira Sousa: oliveira.lacenbahia@gmail.com, Fátima Cristina Fandinho: fandinho@ensp.fiocruz.br, Jamocyr Moura Marinho: jamocyr@uol.com.br, Eliana Matos: elianadmatos@terra.com.br, Theolis Barbosa: theolis@bahia.fiocruz.br.

*Correspondenceto: Dr. Theolis Barbosa

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, 40296-710 Salvador, Bahia, Brasil. Tel. +55 71 3176-2215; fax +55 71 3176-2279, e-mail theolis@bahia.fiocruz.br.

RESUMO

A tuberculose (TB) extensivamente resistente (TBXDR) é considerada uma ameaça à saúde pública mundial por ter baixo índice de cura e não haver um tratamento padronizado. A identificação e caracterização de casos TBXDR são pontos-chave para ações de vigilância na prevenção de novos casos. Neste contexto, identificou-se uma série de casos TBXDR em um serviço de referência em Salvador, Bahia, Brasil, contexto de elevada endemicidade. São descritas as características sócio-demográficas, clínicas, epidemiológicas e o perfil de resistência aos fármacos anti-TB dos casos. Oportunamente, realizou-se a genotipagem dos isolados de *M. tuberculosis* envolvidos, utilizando as técnicas Spoligotyping e MIRU-VNTR.

Palavras-chave: Tuberculose, XDR-TB, epidemiologia, genotipagem, alta carga, Brasil.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) extensivamente resistente (TBXDR) é uma TB com baixos índices de cura pode ser disseminada em comunidades e os protocolos de tratamento são estabelecidos com base no perfil de sensibilidade dos fármacos, quer seja àqueles fármacos identificados como de primeira linha para o combate à TB, quer seja aqueles considerados de segunda linha. A TBXDR é caracterizada por apresentar cepas de *M. tuberculosis* com resistência *in vitro* a rifampicina e isoniazida, simultânea (isto é, TBMR) com resistência adicional a uma fluoroquinolona mais resistência a qualquer fármaco de segunda linha injetável (1); sendo que até março do ano de 2013, 84 países relataram, pelo menos, um caso de TBXDR à OMS, sendo estimada uma proporção de 9% de casos TBXDR entre todos os casos de TBMR no mundo (2). Pouco se sabe sobre a ocorrência de casos de TBXDR no Brasil, apenas um caso é relatado na literatura internacional (3).

O Brasil permanece na lista dos 22 países que concentram 80% da carga de TB sensível no mundo (1). Nos últimos anos, a Bahia, local deste estudo, região nordeste do país com população de 14 milhões de habitantes e Salvador, sua capital com três milhões de habitantes, apresentaram, respectivamente, uma média de 36 e 71 casos novos de TB sensível por 100 mil habitantes (4).

A biologia molecular é uma ferramenta que pode auxiliar na descoberta de perfis genéticos de cepas de *M. tuberculosis* de casos relacionados, favorecendo a identificação de fontes comuns de infecção e contribuindo para entendimento da dispersão de perfis mais adaptados a um dado contexto (5). Neste trabalho, objetivamos relatar 14 casos de TBXDR pulmonar ocorridos no estado da Bahia, descrevendo os perfis genotípicos dos isolados de *M. tuberculosis* envolvidos.

Os dados sócio-epidemiológicos e clínicos dos pacientes foram obtidos do Sistema de Vigilância Epidemiológica para TBMR do Ministério da Saúde do Brasil e de prontuários do Hospital Especializado Otavio Mangabeira (HEOM), referência estadual para o tratamento da TBMR/TBXDR, local onde os pacientes foram atendidos, notificados, tratados, e acompanhados. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do centro de pesquisa Gonçalo Moniz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ, 226/2010) de acordo com os princípios da declaração de Helsinki e seguiu os protocolos da Resolução Brasileira 196/196 do Conselho Nacional de Saúde.

Isolados de *M. tuberculosis*, armazenados em um banco de isolados do Laboratório Central de Saúde Pública e Referência do Estado da Bahia (LACEN-BA), obtidos de pacientes com diagnóstico de TBMR no período de 2008 a 2011, com resultados conhecidos de sensibilidade para rifampicina (R), isoniazida (H), etambutol (E) e (S) estreptomicina obtidos conforme Canetti (6), foram repicados em meio Lowenstein-Jensen e, posteriormente, após crescimento, foram avaliados quanto ao perfil de resistência, através do método líquido automatizado MGIT960 (7), utilizando ofloxacina (O) - uma fluoroquinolona de terceira geração -, e os fármacos kanamicina (K) e amicacina (A) capreomicina (C). No total, foram encontrados 206 isolados, um por paciente (masculino 65%;) e destes, 14 (7%) preencheram o critério para TBXDR.

Os casos TBXDR apresentaram proporções de gênero (masculino 71%) e idade (mediana [20-72, mínimo-máximo]) semelhantes às encontradas para TB sensível no Brasil (8,9) (Tabela 1). Onze casos residiam em Salvador sendo dois casos com infecção primária, o que pode estar relacionado à alta incidência da TB na capital. O número de tratamentos prévios (3 [0-6]) e a mediana de tempo (30 meses [1-94]) até o diagnóstico de TBXDR

revelam a demora do diagnóstico e corroboram a necessidade de testes mais rápidos para a detecção de TBXDR.

A história de internação hospitalar pode ter contribuído para detecção da presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em 100% dos casos, tendo apenas dois casos positivos. Apesar de haver estudos que relatam associação entre a coinfeção TBMR (XDR)/HIV (10) a coinfeção varia entre populações estudadas (11) e a baixa proporção encontrada aqui está de acordo com dados locais abordando pacientes TBMR (12).

Uma proporção importante de pacientes apresentou transtorno mental (21%). Registro de alcoolismo foi observado para 28%; além deste, outros determinantes estão bem escritos para o desenvolvimento da TB resistente como o uso prévio de fármacos anti-TB, situação de rua e indivíduos provindos de áreas com alta prevalência (1, 11, 12,13). Abandono (43%) e falência (86%) a qualquer tratamento anti-TB antes do diagnóstico de TBXDR foram observados, não havendo uma associação entre estas duas variáveis (RP= 1,3; 0,89-1,99 P=0,31). Os pacientes, em geral, não realizaram tratamento supervisionado para TBMR (apenas 21% realizaram), o que pode ter contribuído para o surgimento de casos de TBXDR primária e para o insucesso do tratamento individualizado, este verificado pela taxa de óbito que foi para todo o grupo de 36% (Tabela 1). Resistência a todos os fármacos testados foi observada em 57% dos isolados. Cepas de *M. tuberculosis* com perfil de resistência estendido são descritas na literatura científica e denominadas como cepa *super-extensivamente-droga-resistentes* ou *totalmente-droga-resistentes* (14).

O DNA destes isolados foi extraído (15) e genotipado conforme técnicas de MIRU-VNTR (Número Variável de Repetições em Tandem de Unidades Repetitivas Inter-Espaçadas) para 12 *loci* (16) e Spoligotyping, (17). Os perfis encontrados para as duas

técnicas foram associados e analisados utilizando a ferramenta via web www.miru-vntrplus (18,19). A genotipagem mostrou a ocorrência de X perfis, sendo Y perfis únicos e Z ocorreram em *clusters* contendo dois isolados. Dois pacientes cujos isolados apresentaram-se em um *cluster* puderam ser investigados e verificou-se que ambos trabalharam em um mesmo escritório particular na cidade de Salvador, estabelecendo-se assim um *link* epidemiológico e corroborando a utilidade do emprego destas técnicas na vigilância dos casos de tuberculose resistente (16,17,18,19)

Como descrito na tabela 2, os perfis genotípicos foram condizentes com três prevalentes famílias de *M. tuberculosis*: LAM (42%), Cameroon (33%) e Haarlem (25%). No Brasil, não há estudos abordando a genotipagem de cepas de *M. tuberculosis* de casos TBXDR, sendo que as famílias de *M. tuberculosis* envolvidas com os casos de TB sensíveis e descritas como prevalentes no país são: LAM, Haarlem, T, X e U (8,9,19). Nery (20) em um estudo local, de base populacional, envolvendo 362 pacientes residentes em Salvador com TB sensível, encontrou essas mesmas famílias. Mundialmente, a família W/Beijing tem sido fortemente associada à TBMR (18). Destacamos neste estudo a presença da família Cameroon, sendo que esta família é comumente encontrada em países da África Ocidental sem associação com casos TBXDR (21). A Bahia é o Estado brasileiro com maior histórico de ligação com a África, tendo a população de Salvador uma alta mistura racial com 85% de componente africano, vindo da África Central e principalmente da África Ocidental em decorrência tráfico de escravos no Brasil entre os séculos XVII e XVIII (22). São necessários estudos para determinar se há imigração de cepas resistentes ou se as cepas encontradas foram selecionadas a partir de cepas em circulação endêmica no Estado.

AGRADECIMENTOS

A equipe de micobacteriologia do LACEN-BA pela excelente trabalho, ao HEOM, à DIVEP/PCT-BA

Este trabalho é faz parte da dissertação de mestrado apresentada à FIOCRUZ BA em 2012.

DECLARAÇÃO DE TRANSPARÊNCIA

Declaramos que não há conflito de interesse. Este trabalho não recebeu qualquer tipo de fundo público ou privado.

REFERÊNCIAS

- 1 World Health Organization. Communicable Diseases Cluster. Stop TB Dept. Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015 WHO progress report 2011. [Internet]. [Geneva, Switzerland]: World Health Organization; 2011 em http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501330_eng.pdf
- 2 World Health Organization (OMS). Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) 2013 Update. In www.who.int/tb/challenges/mdr.March 2013.
- 3 Araújo-Filho JA de, Vasconcelos-Jr AC, Sousa EM de, Silveira C da, Ribeiro E, Kipnis A, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis: a case report and literature review. *Braz J Infect Dis.* outubro de 2008;12(5):447–52.
- 4 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Situação da Tuberculose no Brasil e no mundo. Brasília; Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal>. Acesso em abril 2013.
- 5 Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006;6:23.
- 6 CANETTI, G. S.; FROMAN, J.; GROSSET, P. HAUDUROY.;H.T. MAHLER, L. Sula. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. *Bull. World Health Organ.*v.41, p. 565-578, 1963.
- 7 BD BBL™ MGIT™ – Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 ml para Uso em Sistema Automatizado. BACTEC™ MGIT™ 960 Supplement kit. Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152. USA, 2010/2011. Cod.[L000180JAA\(201106\)](http://www.bd.com/ds/) Disponível em: <http://www.bd.com/ds/>
- 8 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.* 2011;4:269
- 9 Gomes HM, Elias AR, Oelemann MAC, Pereira MA da S, Montes FFO, Marsico AG, et al. Spoligotypes of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infection, Genetics and Evolution.* junho de 2012;12(4):649–56.
- 10 Gandhi NR, Andrews JR, Brust JCM, Montreuil R, Weissman D, Heo M, et al. Risk factors for mortality among MDR- and XDR-TB patients in a high HIV prevalence setting. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* janeiro de 2012;16(1):90–7.
- 11 Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A. Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review. *PLoS ONE.* 2009;4(5):e5561
- 12 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 InfectDis.* junho de 2007;11(3):331–8.
- 13 Chiang C-Y, Centis R, Migliori GB. Drug-resistant tuberculosis: Past, present, future. *Respirology.* abril de 2010;15(3):413–32.
 - 14 Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, Ziazarifi AH, et al. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. *Chest.* agosto de 2009;136(2):420–5.
 - 15 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.* fevereiro de 1993;31(2):406–9.
 - 16 Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology.* 27 de setembro de 2006;44:4498–510.
 - 17 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.* abril de 1997;35(4):907–14.
 - 18 Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* agosto de 2008;46(8):2692–9.
 - 19 Oelemann C. M, Gomes HM, Willery E, Possuelo L, Batista Lima KV, Allix-Béguec C, et al. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. *PLoS ONE.* 2011;6(3):e18256.
 - 20 Nery, JS. Distribuição de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* no espaço urbano de Salvador: contribuições à epidemiologia. Dissertação Mestrado. Salvador: Instituto de Saúde Coletiva da UFBA; 2011.
 - 21 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. *Journal of Clinical Microbiology.* 4 de novembro de 2004;42(11):5029–35.
 - 22 Verger P (1968). Fluxo e refluxo do tráfico de escravos: entre o golfo do Benin e a Bahia de Todos os Santos dos séculos XVII a XIX. Salvador: Corrupio; 2002.

Tabela 1- Características sócio-demográfica e clínica dos casos de TBXDR. Bahia, Brasil, 2012

Caso	Sexo	Idade	Município Residência Salvador	Infecção Primária	Nº de Trat. Prévios ¹	Tempo Trat. TBMR ²	Internação Hospitalar	História Abandono	História Falência	HIV+	Outras	Situação de Risco	TDO	Desfecho
1	M	27	Sim	Sim	0	1	Sim	Não	Não	Sim	TM		Sim	Óbito
2	F	46	Sim	Não	2	65	Sim	Não	Sim	Sim	Hanseníase	(“)	Não	Óbito
3	M	43	Sim	Não	6	28	Sim	Sim	Sim	Não	TM e DI	(“)	Não	Em Tratamento
4	M	24	Sim	Não	4	38	Não	Sim	Sim	Não	(“)	(“)	Não	Em Tratamento
5	M	54	Sim	Não	3	32	Sim	Não	Sim	Não	HTLV	(“)	Não	Em Tratamento
6	M	46	Não	Não	6	18	Sim	Sim	Sim	Não	TM	(“)	Sim	Óbito
7	M	43	Não	Não	4	73	Sim	Não	Sim	Não	DM	Alcoolismo	Não	Tratamento
8	M	38	Não	Não	3	94	Sim	Sim	Sim	Não	(“)	Alcoolismo	Não	Em Tratamento
9	M	46	Sim	Não	2	75	Não	Não	Sim	Não	(“)	Alcoolismo	Não	Em Tratamento
10	M	37	Sim	Não	3	34	Não	Não	Sim	Não	(“)	Alcoolismo	Sim	Em Tratamento
11	M	72	Sim	Não	2	14	Sim	Sim	Sim	Não	DM	(“)	Não	Óbito
12	F	31	Sim	Não	3	21	Sim	Não	Sim	Não	Hepatopatia	(“)	Não	Óbito
13	F	69	Sim	Não	2	20	Não	Sim	Sim	Não	(“)	(“)	Não	Em Tratamento
14	F	20	Sim	Sim	0	2	Sim	Não	Não	Não	(“)	(“)	Não	Em Tratamento

¹ Nº de tratamentos prévios para qualquer tipo de TB- antes do diagnóstico de TBXDR.

² tempo de tratamento em meses para TBMR até o diagnóstico de TBXDR

TM= transtornos mentais; DI=drogas ilícitas; HTLV = Vírus de células T linfotrófico humano; DM= diabetes melitos, TOD.= tratamento diretamente observado

(“) Dado não disponível.

