

**Cláudio José Augusto**

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA MOLECULAR  
DE CEPAS DO *Mycobacterium tuberculosis*  
PROVENIENTES DE MINAS GERAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto  
Ciências Clínicas

Belo Horizonte – MG  
2014

# **AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA MOLECULAR DE CEPAS DO *Mycobacterium tuberculosis* PROVENIENTES DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, Faculdade Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Clínicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Silvana Spíndola de Miranda  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Wânia da Silva Carvalho

Belo Horizonte  
2014

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **Reitor**

Jaime Arturo Ramirez

### **Vice-Reitora**

Sandra Regina Goulart Almeida

### **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

### **Pró-Reitor de Pesquisa**

Adelina Martha dos Reis

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **Diretor**

Tarcizo Afonso Nunes

### **Vice Diretor**

Humberto José Alves

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO**

Coordenadora

Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenador

Paulo Caramelli

### **Colegiado**

Marcus Vinícius de Melo de Andrade

Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Luiz Gonzaga Vaz de Coelho

Francisco Eduardo Costa Cardoso

Paulo Caramelli

Valéria Maria Azeredo Passos

Andréia de Lima Bastos

*À minha esposa Michelle, meus filhos Júlia e Pedro, meus pais Maria do Amparo e Kerone, e meus irmãos Lilian e Kerone Júnior, por todo apoio e dedicação as minhas escolhas vocês tornaram esta etapa possível...  
Obrigado por tudo!*



## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>ª</sup> Silvana Spíndola de Miranda pela oportunidade de tê-la como orientadora e acreditado em meu potencial; sobretudo por seu carinho, amizade e respeito.

À Prof<sup>ª</sup> Wânia da Silva Carvalho que com todo seu otimismo conseguia dar apoio nos momentos em que nada dava certo.

Aos professores da Pós-Graduação pela contribuição em toda a minha trajetória no Doutorado.

À Michelle minha esposa que tanto me ajudou e incentivou. Você é minha inspiração!

À Júlia e Pedro, pela paciência que não tiveram, mas compreendo. Prometo brincar mais!

À minha mãe Maria do Amparo pela presença em todos os momentos que precisei em minha vida, exemplo de dignidade, caráter, ....Você é meu exemplo de vida!

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa e da Pós-Graduação (Isabela, Lúcia, Ana Lethicia, Carla, Nayanne e Lida), pelo empenho, auxílio nas atividades, amizade e solidariedade.

À toda minha família Amparo, Kerone, Lilian, Junior, Polyanna, Thiago e Maria Luiza pelo carinho, apoio e paciência durante os anos dedicados as atividades no desenvolvimento dessa tese.

À Selma, Tuca, Tatiane, Diego e Gil por todo apoio e preocupação, vocês sempre estiveram presentes.

Aos profissionais Júlio César, Chequer Chamone e Marluce Oliveira, pela confiança na realização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de tuberculose / FUNED (Alan, Elza, e Glaydson), que souberam transpor as dificuldades na minha ausência.

À Michelle Samuel agradeço por todo auxílio, disponibilidade e dedicação nas traduções.

À Lucina Gerente do Laboratório Distrital Noroeste, obrigado por todo apoio e compreensão de sempre.

À Lucilaine Ferrazoli e Vera Simonse do Instituto Adolfo Lutz que sempre estiveram dispostas a ajudar e esclarecer as dúvidas, pelo acolhimento no laboratório do IAL e pela disponibilização de conhecimentos básicos para este projeto.

*Febre, hemoptise, dispnéia e suores noturnos.  
A vida inteira que podia ter sido e que não foi.  
Tosse, tosse, tosse.  
Mandou chamar o médico:  
- Diga trinta e três.  
- Trinta e três... trinta e três... trinta e três...  
- Respire.  
- O senhor tem uma escavação no pulmão esquerdo e o pulmão direito infiltrado.  
- Então, doutor, não é possível tentar o pneumotórax?  
-Não. A única coisa a fazer é tocar um tango argentino.*

**BANDEIRA, Manuel, 1967.**

## RESUMO

No Brasil, são registrados por ano cerca de 71.000 casos novos de tuberculose (TB), com um coeficiente de incidência de 36,7 casos/100 mil habitantes e 4.600 óbitos, classificando o país em 16º lugar entre os 22 países com 80% da carga da doença no mundo. Em Minas Gerais no ano de 2007 foram identificados 4.810 casos novos de TB com coeficiente de incidência de 25 casos/100 mil habitantes e 276 óbitos. Neste cenário conhecer as características epidemiológicas da doença e a diversidade genética dos isolados clínicos do *M. tuberculosis* pode ser útil na informação sobre a origem e a transmissão de cepas circulantes. Técnicas moleculares de genotipagem do DNA do *M. tuberculosis* tem sido amplamente aplicada para a investigação das relações epidemiológicas entre casos de tuberculose desde a década de 1990, como o Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP-IS6110 – *Restriction Fragment Length Polymorfism*) que revolucionou os estudos sobre a transmissão de *M. tuberculosis* e o Número Variável de Repetições em Sequência – Unidades Repetitivas Intercaladas de Micobactérias (VNTR-MIRU *Variable Number Tandem Repeat – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*). Os principais objetivos desse estudo foram: Genotipar cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes diagnosticados como casos novos de TB e avaliar a sua variabilidade genética; analisar o perfil de casos de TB em Minas Gerais de acordo com características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais; comparar o grau de similaridade entre as cepas de *M. tuberculosis* utilizando as técnicas RFLP e MIRU; avaliar os dados clínico-demográficos entre pacientes com cepas do *M. tuberculosis* resistentes ou sensíveis aos fármacos considerados como casos novos e o perfil molecular dos bacilos. Avaliar a presença de vínculo epidemiológico nos casos de cepas do *M. tuberculosis* caracterizadas como *cluster*. Os métodos para atingir esses objetivos e os resultados foram apresentados em dois artigos originais resumidos a seguir. **Artigo Original 1:** Analisar o perfil da TB em Minas Gerais/Brasil, segundo as características sociodemográficas, clínicas, laboratoriais, comorbidades e mortalidade, durante o período de 2002 a 2009. Trata-se de estudo epidemiológico, descritivo, com levantamento de dados dos casos notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e Sistema de Informação de Mortalidade (SIM), no período de 2000 a 2009. Foram notificados 47.285 casos de TB nesses anos, com média de incidência 22,3/100 mil habitantes. A maior frequência foi na faixa etária de 20 a 49 anos (62,4%), sexo masculino (67,0%) e baixa escolaridade (18,5%). Os casos novos representaram 84,3%, a recidiva 5,7%, reingresso após abandono 5,7% e Tratamento Supervisionado Diretamente Observado (DOTS) 21,8%. Foram registrados percentuais 66,2;

11,2; 0,2; e 12,9 de cura, abandono do tratamento, TB multirresistente e a mortalidade respectivamente. Os exames de baciloscopia e cultura não foram solicitados em 26,1% e 87,1% dos casos, respectivamente. O radiograma de tórax foi realizado em 90,5%. A forma pulmonar teve maior proporção (83,9%). Em relação às comorbidades foi observado o alcoolismo em 15,0% dos casos notificados, o Vírus da Imunodeficiência Humana em 8,4% e o *Diabetes mellitus* em 3,7%. A incidência de casos novos, o abandono, a mortalidade por TB são elevados, as comorbidades são relevantes e os exames bacteriológicos não são realizados adequadamente para o diagnóstico da TB. É necessário um trabalho multiprofissional, ampliação da estratégia DOTS e conhecimento da distribuição da doença no estado com melhoria e associação dos bancos de dados do SIM e SINAN, para se ter melhor controle da TB em Minas Gerais. **Artigo Original 2:** A genotipagem de DNA do *M. tuberculosis* tem sido amplamente aplicada para a investigação das relações epidemiológicas entre casos de TB, em vários países desde que técnicas de tipagem do DNA foram desenvolvidas na década de 1990 tais como o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-IS6110 – *Restriction Fragment Length Polymorfism*) e o número variável de repetições em sequência – Unidades repetitivas intercaladas de micobactérias com 12 e 24 *locus* (MIRU-VNTR – *Variable Number Tandem Repeat – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*). A aplicação desses métodos tem avançado significativamente o conhecimento sobre a transmissão e/ou propriedades patogênicas importantes das micobactérias e fornece novas e poderosas ferramentas para combater e proteger contra doenças causadas por esses patógenos. Este estudo objetivou genotipar as cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes diagnosticados como casos novos de tuberculose em Minas Gerais e comparar os resultados das técnicas de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR 12 *loci*. Trata-se de estudo transversal retrospectivo com análise de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de casos novos de TB no ano de 2007 em Minas Gerais, utilizando-se as técnicas moleculares RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR para analisar o poder discriminatório, concordâncias, similaridade e formação de *cluster* entre essas técnicas. Cepas com padrão de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR com similaridade superior 85% foram considerados da mesma família. Das amostras, 32,3% foram similares pelo RFLP-IS6110 e 50,9% pelo MIRU-VNTR. O nível de discriminação dos dois métodos não diferiram substancialmente: RFLP-IS6110 resultou em 191 padrões distintos em comparação com 176 no MIRU-VNTR. A concordância global, definida como isolados de perfis únicos ou identicamente distribuídos em grupos por ambos os métodos, foi de 87,7% (179/204), sendo considerados 171 como perfis únicos e 8 isolados em *cluster*. Dos restantes 25 casos, 2,5% (5/204) casos foram agrupados apenas por RFLP-IS6110 e 9,8% (20/204)

apenas por MIRU-VNTR. A taxa de *cluster* do RFLP-IS6110 também foi menor que a do MIRU-VNTR, sendo 3,2% e 4,3% respectivamente. A relação epidemiológica entre as cepas agrupadas foi confirmada em quatro pacientes (31%) no RFLP-IS6110 em comparação com 14% no MIRU-VNTR. Concluimos que poucos isolados foram semelhantes. O RFLP-IS6110 mostrou-se altamente discriminatório podendo ser usado em Minas Gerais. A comparação entre as duas técnicas mostrou poder discriminatório do RFLP-IS6110 ligeiramente superior ao MIRU-VNTR e teve maior relação epidemiológica quando os *clusters* foram analisados.

**Palavras - chave:** Epidemiologia Molecular, tuberculose, RFLP-IS6110, MIRU-VNTR.

## ABSTRACT

In Brazil, are registered for year about 71.000 new tuberculosis cases, with incidence coefficient of 36.7 cases/100mil inhabitants and 4.600 deaths, being the country in 16<sup>o</sup> place between 22 countries with 80% of load of the disease in the world. In Minas Gerais in 2007 year were identified 4.810 new tuberculosis cases with an incidence coefficient of 25 cases/100mil inhabitants and 276 deaths. At this scene, know about disease epidemiological characteristics and the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates can be useful for information about circulating strains origin and transmission. Molecular techniques of DNA *M. tuberculosis* genotyping has been very used for epidemiologic relations investigation between tuberculosis cases since 1990 decade, as Restriction Fragment Length Polymorfism - RFLP-IS6110, that revolutionized the studies about *M. tuberculosis* transmission and the Variable Number Tandem Repeat – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – MIRU-VNTR. The main objectives of this study were: Genotype *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated of patients diagnosed as new TB cases and evaluate the genetic variability of these strains. Analyze the profile of TB cases in Minas Gerais according with sociodemographic, clinical and laboratorial characteristics. Compare the similarity degree between *M. tuberculosis* strains using RFLPIS6110 and MIRU-VNTR techniques. Evaluate clinical-demographics data between patients with *M. tuberculosis* strains resistant or sensitive in relation at drugs considered as new cases and the bacillus molecular profile. Evaluate presence of epidemiological bond in cases of *M. tuberculosis* strains characterized as cluster. The methods for have these objectives and the results were submitted in two original articles resumed as follow. **Original Article 1:** Analyze the tuberculosis (TB) profile in Minas Gerais/Brazil, according sociodemographic, clinical, laboratorial, comorbidities and mortality characteristics during the 2002 to 2009 period. Epidemiological, descriptive study, with lifting of data of notified cases in Information System of Notifiable Diseases (SINAN) and System of Mortality Information (SIM), in 2000 to 2009 period. It was notified 47.285 TB cases in the years studied, with an average of incidence 22,3 /100 mil inhabitants. The biggest frequency was from age of 20 to 49 years (62,4%), male (67,0%) and low schooling (18,5%). The new cases represented (84,3%), the relapse (5,7%), reentry after abandonment (5,7%) e DOTS (21,8%). The cure was (66,2%), treatment abandon (11,2%), TB multiresistance (0,2%) and mortality of (12,9%). The bacilloscopy exams and culture were requested in 26,1% and 87,1% of the cases, respectively. The chest radiogram was performed in 90,5%. The pulmonary form had higher incidence (83,9%). In relation of comorbidities were observed the alcoholism in (15,0%) of notified cases, the Human

Immunodeficiency Virus in (8,4%) and Diabetes mellitus in (3,7%). The new cases incidence, the abandonment, the TB mortality are high, the comorbidities are relevant and the bacteriological exams are not accordingly performed for TB diagnostic. It is necessary a multiprofessional study, treatment magnification directly observed (DOTS) and knowledge of the disease distribution in state with improvement and association with data bank SIM e SINAN, to have better TB control in Minas Gerais. **Original Article 2:** The genotyping of *M. tuberculosis* has being broadly applied for epidemiological relations investigation between tuberculosis cases, in many countries since that DNA typing techniques were developed in 1990 decade as the *Restriction Fragment Length Polymorfism* - RFLP-IS6110 and the *Variable Number Tandem Repeat – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* - MIRU-VNTR with 12 and 24 locus. The application of these methods has highly advanced the knowledge about the transmission and/or important pathogenic properties of mycobacterial and provides new and powerful tools to combat and protect against diseases caused for this pathogens. This study has as objective genotype *M. tuberculosis* strains isolated of patients diagnosed as new TB cases in Minas Gerais and compare the RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR 12 loci techniques results. It is a retrospective transversal study with analyses of *M. tuberculosis* strains isolated from new TB cases in 2007 in Minas Gerais, using molecular techniques RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR to analyze the similarity, the discriminatory power, concordances and cluster formation between these techniques. Strains with RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR profile with similarity superior to 85% were considered of the same family. From samples, 32,3% were similar by RFLP-IS6110 and 50,9% by MIRU-VNTR. The discriminatory levels of the two methods don't differ substantially: RFLP-IS6110 resulted in 191 distinct profiles in comparison with 176 by MIRU-VNTR. The global concordance, defined as isolates of unique profiles or identically distributed in groups for both methods, was 87,7% (179/204), being considered 171 as unique profiles and 8 isolates in cluster. From remaining 25 cases, 2,5%(5/204) cases were grouped only by RFLP-IS6110 and 9,8% (20/204) only by MIRU-VNTR The RFLP-IS6110 cluster tax was also smaller than the MIRU-VNTR, being 3,2% and 4,3% respectively. The epidemiological relation between the grouped strains were confirmed in 4 patients (31%) in RFLP-IS6110 in comparison with 14% in MIRU-VNTR We concluded that few isolates were similar. The RFLP-IS6110 showed highly discriminatory being to be used in Minas Gerais. The comparisons between the techniques showed the RFLP-IS6110 discriminatory power lightly superior to MIRU-VNTR and have higher epidemiological relation when the clusters were analyzed.

**Keywords:** Molecular Epidemiology, tuberculosis, RFLP-IS6110, MIRU-VNTR.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BK	Bacilo de Köch
C	Citosina
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOTS	Tratamento Supervisionado Diretamente Observado
E	Etambutol
EUA	Estados Unidos da América
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
G	Guanina
GRS	Gerência Regional de Saúde
HC	Hospital das Clínicas - UFMG
H	Isoniazida
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
ILTB	Infecção latente por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LACEN	Laboratório Central
LJ	Löwenstein Jensen
MG	Minas Gerais
MNT	Micobactéria Não Tuberculosa
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i>
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
Z	Pirazinamida
pb	Pares de base
PCT	Programa de Controle da Tuberculose
PIB	Produto Interno Bruto
PNB	Ácido Paranitrobenzóico
PSF	Programa de Saúde da Família



R	Rifampicina
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RP	Regiões de Planejamento
S	Estreptomicina
SDS	Duodecilsulfato de Sódio
SILTB	Sistema de Informação Laboratorial da Tuberculose
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SR	Sintomático Respiratório
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TBMDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TCH	Hidrazida do Ácido Tiofeno-2-Carboxílico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VNTR	<i>Variable numbers of tandem repeats</i>
TBXDR	Tuberculose Extensivamente Resistente
ZN	Ziehl Neelsen

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

<b>TABELA 1 – Reprodutibilidade e números obtidos utilizando diferentes métodos para diferenciar 90 cepas de <i>M. tuberculosis</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>TABELA 2 – Tamanho da amostra para a frequência em uma população .....</b>	<b>37</b>
<b>TABELA 1 – (Artigo 1) Frequência de TB de acordo com faixa etária, sexo e escolaridade .....</b>	<b>46</b>
<b>TABELA 2 – (Artigo 1) Frequência na realização de exames dos casos diagnosticados com TB.....</b>	<b>48</b>
<b>TABELA 1 – (Artigo 2) Diversidade alélica de cada <i>locus</i> e o poder discriminatório ....</b>	<b>59</b>
<b>TABELA 2 – (Artigo 2) Perfis encontrados e poder discriminatório comparando: RFLP versus MIRU .....</b>	<b>61</b>
<b>GRÁFICO 1 – (Artigo 1) Perfil da tuberculose referente ao Tipo de Entrada, Minas Gerais - 2002 a 2009 .....</b>	<b>46</b>
<b>GRÁFICO 2 – (Artigo 1) Perfil da tuberculose referente ao Tipo de Encerramento, Minas Gerais - 2002 a 2009.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 – Estimativa de incidência TB no mundo em 2011 .....</b>	<b>18</b>
<b>FIGURA 2 – Genoma com distribuição dos MIRUs .....</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA 3 – Distribuição geográfica dos municípios analisados .....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURA 4 – Visualização do DNA extraído.....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 5 – Gel de agarose após restrição <i>PvuII</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 6 – Membrana com resultado final de RFLP.....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA 7 – Visualização de resultado do MIRU 23 .....</b>	<b>36</b>
<b>FIGURA 1 – (Artigo 1) Distribuição espacial da média de incidência de TB em Minas Gerais .....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 1 – (Artigo 2) Distribuição de combinações de <i>clusters</i> obtidos pelo RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR.....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 2 – (Artigo 2) Distribuição de cepas nos <i>clusters</i> de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR com e sem relação epidemiológica .....</b>	<b>62</b>

## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3 DETALHAMENTO DA METODOLOGIA .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 CENÁRIO DO ESTUDO E POPULAÇÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 ISOLAMENTO BACTERIANO .....</b>	<b>27</b>
<b>3.5 EXTRAÇÃO DO DNA.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA EXTRAÍDO .....</b>	<b>29</b>
<b>3.7 PREPARAÇÃO DA SONDA IS6110.....</b>	<b>29</b>
<b>3.8 PROGRAMA DA PCR .....</b>	<b>30</b>
<b>3.9 MARCAÇÃO DA SONDA IS6110 .....</b>	<b>30</b>
<b>3.10 ANÁLISE RFLP-IS6110.....</b>	<b>30</b>
<b>3.11 ANÁLISE DO MIRU-VNTR.....</b>	<b>34</b>
<b>3.12 FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE CEPAS EM CLUSTERS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.13 CÁLCULO AMOSTRAL PARA ESTUDOS DE GENOTIPAGEM DO <i>M. tuberculosis</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>3.14 COMPARAÇÃO ENTRE RFLP-6110 E MIRU-VNTR .....</b>	<b>36</b>
<b>3.15 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>4 NOTA EXPLICATIVA.....</b>	<b>38</b>
<b>5 ARTIGO 1.....</b>	<b>39</b>
<b>6 ARTIGO 2.....</b>	<b>47</b>
<b>6.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6.2 MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
<b>6.3 RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>6.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>66</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

<b>10 APÊNDICE .....</b>	<b>75</b>
<b>10.1 APÊNDICE A - REPRESENTATIVIDADE DAS AMOSTRAS .....</b>	<b>75</b>
<b>10.2 APÊNDICE – B DENDROGRAMA RFLP-IS6110 / TODOS OS MUNICÍPIOS...</b>	<b>76</b>
<b>10.3 APÊNDICE – C DENDROGRAMA MIRU-VNTR.....</b>	<b>77</b>
<b>10.4 APÊNDICE – D DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – BELO HORIZONTE .....</b>	<b>78</b>
<b>10.5 APÊNDICE – E DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – BETIM.....</b>	<b>79</b>
<b>10.6 APÊNDICE – F DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – CATAGUAZES.....</b>	<b>80</b>
<b>10.7 APÊNDICE – G DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – CONTAGEM.....</b>	<b>81</b>
<b>10.8 APÊNDICE – H DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – CORONEL FABRICIANO.</b>	<b>82</b>
<b>10.9 APÊNDICE – I DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – GOVERNADOR VALADARES .....</b>	<b>83</b>
<b>10.10 APÊNDICE – J DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – IBIRITÉ .....</b>	<b>84</b>
<b>10.11 APÊNDICE – K DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – IPATINGA.....</b>	<b>85</b>
<b>10.12 APÊNDICE – L DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – ITAJUBÁ.....</b>	<b>86</b>
<b>10.13 APÊNDICE – M DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – JUIZ DE FORA .....</b>	<b>87</b>
<b>10.14 APÊNDICE – N DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – MONTES CLAROS.....</b>	<b>88</b>
<b>10.15 APÊNDICE – O DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – NOVA LIMA .....</b>	<b>89</b>
<b>10.16 APÊNDICE – P DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – NOVA LIMA.....</b>	<b>90</b>
<b>10.17 APÊNDICE – Q DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – SANTA LUZIA .....</b>	<b>91</b>
<b>10.17 APÊNDICE – R DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – SÃO JOÃO DEL REI .....</b>	<b>92</b>
<b>10.18 APÊNDICE – S DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – SETE LAGOAS .....</b>	<b>93</b>
<b>10.19 APÊNDICE – T DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – TRÊS CORAÇÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>10.20 APÊNDICE – U DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – UBERABA .....</b>	<b>95</b>
<b>10.21 APÊNDICE – U DENDROGRAMA RFLP-IS6110 – UBERABA .....</b>	<b>96</b>
<b>11 ANEXOS .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO B – ATA DE APROVAÇÃO DA DEFESA .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO C – DESENHO DAS SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DOS 12 LOCI DE MIRU ESTUDADOS .....</b>	<b>100</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Uma doença que acompanha a humanidade, assim tem sido a história da tuberculose (TB). Existem indícios de TB óssea em esqueletos do período neolítico (9000 a 3000 a.C.) encontrados na Alemanha e também em múmias do Antigo Egito. Descrições sobre as manifestações da doença existem desde a Antiguidade, particularmente entre os gregos. A responsabilidade pela morte de milhares de pessoas lhe deu o título no século XVIII de Peste Branca<sup>1</sup>.

Mesmo com o avanço da ciência e o passar dos tempos a TB é nos dias atuais considerada como a doença infectocontagiosa que causa o maior número de óbito em adultos no mundo. Estima-se que 1/3 da população mundial esteja infectada pelo bacilo e que a cada ano faz adoecer 9 milhões de pessoas e matar 1,4 milhões. No Brasil, ocorrem cerca de 71.000 novos casos da doença e 4.600 óbitos por ano, classificando o país em 16º lugar entre os 22 países com 80% da carga de TB no mundo<sup>2</sup> (Figura -1).

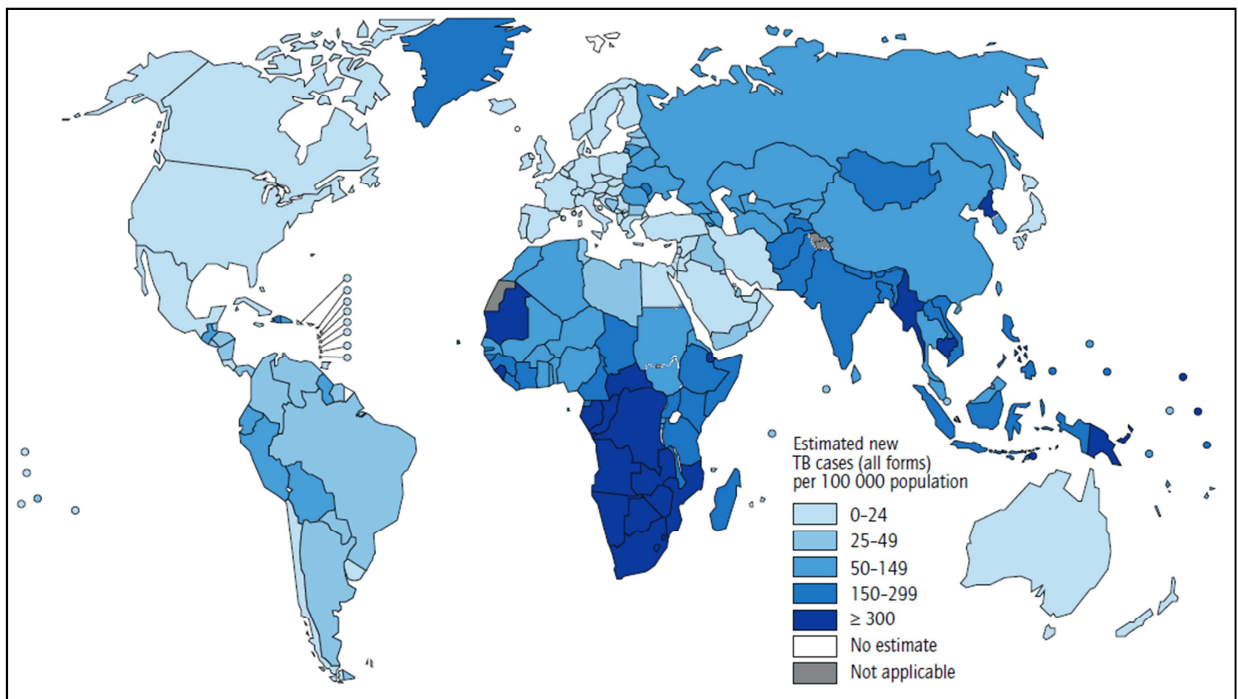


Figura – 1 Estimativa de Incidência de TB no Mundo em 2011.

Fonte: Global Tuberculosis Report; 2012 – WHO

1 - Museu digital da tuberculose [home Page on the internet]. São Paulo: Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia. [updated 2011 Jan 23; cited 2011 Ago 25]. Available from: <<http://www.sppt.org.br>>.

2 - World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **WHO**, 2012;1:3-24.

Foram notificados em Minas Gerais (MG) no ano de 2007, 4.810 casos novos de TB com coeficiente de incidência de 25 casos/100 mil habitantes. O coeficiente de mortalidade por TB foi de 1,4 /100 mil habitantes. O percentual de cura entre os casos novos foi de 56% e o de abandono de tratamento de 7,2%. Em moradores de Belo Horizonte no mesmo ano, foram notificados 828 casos novos com uma taxa de incidência de 34/100 mil habitantes e 38 óbitos por TB com taxa de mortalidade de 1,6/100 mil habitantes. Cerca de 50% dos casos ainda são descobertos em hospitais, serviços de urgência e ambulatórios de referência. A taxa de cura obtida em 2007 foi de 62,9% e a de abandono do tratamento de 13,9%. Em 2012 foram identificados em MG 3.643 casos novos com mortalidade de 0,8/100 mil habitantes e 203 (5,57%) casos de abandono de tratamento<sup>3</sup>.

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde tem se esforçado para controlar a TB no Brasil, tendo três bases importantes: diagnosticar pelo menos 70% dos casos esperados; tratar corretamente 100% dos casos diagnosticados e curar pelo menos 85% dos mesmos; além de manter o abandono de tratamento em percentuais considerados aceitáveis de até 5%<sup>4</sup>.

A ocorrência de micobactérias multirresistente (TB-MDR) e micobactérias extensivamente resistente (TB-XDR) são resultantes do uso inadequado dos medicamentos e de sua elevada transmissão em locais fechados (hospitais, prisões, asilos para pessoas idosas ou albergues para indigentes), onde usualmente não há cuidados adequados de biossegurança e maior chance de transmissão. Tão importante quanto o tratamento e a descoberta de novos casos é o estudo epidemiológico da cadeia de transmissão da TB que pode ser realizado com técnicas de biologia molecular, nos diferentes cenários clínicos e epidemiológicos: na comunidade ou em ambientes fechados, como hospitais, prisões e albergues.

---

3 - Brasil. Ministério da Saúde. SINANWEB. Disponível em: <<http://www.sinanweb.gov.br>>. Acesso em: 13 abril. 2013.

4 - Brasil. Ministério da Saúde. Uma Proposta de Integração – **MS/SVS Ensino Serviço**. 2002; 5: 17-66.

Com o objetivo de verificar a semelhança entre as cepas responsáveis pela infecção por *M. tuberculosis* e estudar a cadeia de transmissão, as técnicas moleculares tiveram grande desenvolvimento após o sequenciamento completo do genoma da cepa de referência e patogênica *M. tuberculosis* H37Rv<sup>5</sup>. O *M. tuberculosis* apresenta em torno de 4,5 milhões de pares de base (pb), contém cerca de 4.000 genes, e tem alto conteúdo de guanina (G) e citosina (C), aproximadamente 65,6%<sup>6</sup>. O genoma do *M. tuberculosis* é expressivamente homogêneo em todo o mundo tendo poucas substituições silenciosas nos nucleotídeos. Estas substituições encontradas no genoma são responsáveis por mutações que resultam em resistência aos fármacos<sup>7</sup>.

No Complexo *M. tuberculosis*, em razão da proximidade genética das subespécies há um grau de polimorfismo do DNA associado ao DNA repetitivo (DR) como: Sequências de Inserção (IS) e sequências curtas DR. Embasados nestas sequências de repetições, métodos de genotipagem foram desenvolvidos para mostrar o perfil de cepas do *M. tuberculosis*, a rota da transmissão da doença, e a similaridade entre os isolados de uma população específica.

Os mais frequentes métodos de genotipagem utilizados no estudo da epidemiologia da TB são o polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length – RFLP*), números variáveis de repetições em sequência (*Variable numbers of tandem repeats – VNTR*) - Unidades Repetitivas Intercaladas de Micobactérias (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – MIRU*) e *Space oligonucleotide typing (Spoligotyping)*.

---

5 - COLE, S. T.; Comparative mycobacterial genomics. **Genomics**, 1998, 1:567-571.

6 - THIERRY, D.; BRISSON-NOEL, A.; VICENT-LEVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. **Journal Clinical Microbiology**. 1990; 28(12): 2668-2673.

7 – SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K.E. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 1997; 94: 9869-9874.



O RFLP utiliza locais repetitivos no gene *IS6110*, um elemento genético de 1.355 pares de base que está, exclusivamente, presente nas espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que normalmente possuem de 0 a 25 cópias que estão presentes e integradas em vários sítios cromossômicos do *M. tuberculosis*. A localização, assim como a quantidade de cópias dessa inserção presente no cromossomo, variam enormemente de cepa para cepa, mas são relativamente estáveis dentro da mesma cepa<sup>8</sup>.

Este método é baseado na digestão do DNA por uma enzima de restrição, gerando fragmentos de comprimentos diferentes, que são analisados em gel de agarose, transferidos para uma membrana e hibridizados com sonda de DNA para revelação das bandas. Inicialmente considerado como padrão ouro possui alto poder de discriminação, porém é uma técnica demorada que necessita de treinamento técnico altamente especializado, tendo ainda dificuldade na padronização entre laboratórios e baixo poder discriminatório para cepas com menos de seis cópias de *IS6110*<sup>9</sup>.

Em 1997 foram identificados 41 *loci* de repetições variáveis em sequências (VNTR) e os denominaram de Unidades de Repetição Intercalada de Micobactérias (MIRU) (Figura - 2). Um estudo a nível genômico, em isolados não relacionados de origem geográfica diferentes, revelou que 12 dos 41 *loci* de MIRU presentes no *M. tuberculosis* H37Rv correspondiam às regiões VNTR tipo minisatélite do genoma humano<sup>10</sup>. Estes 12 *loci* contem número variável de cópias que vão de 51 a 77 pb, sendo que a mudança nesses *loci* sempre consistem na adição ou deleção sequencial de unidades de tamanhos idênticos. Assim, para cada *locus*, o número de unidades variáveis pode ser calculado medindo o tamanho dos fragmentos amplificados com iniciadores que pareiam e anelam com as regiões de DNA flanqueadoras<sup>11</sup>.

---

8 – MOSTROM, P.; GORDON, M.; RIDELL, M.; RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. **Clinical Microbiology Infect.** 2002; 8(11): 694-704.

9 - COWAN, L.S.; DIEM, L.; MONSON, T.; WAND, P.; TEMPORADO, D.; OEMIG, T.V.; CRAWFORD, J.T. Evaluation fo a Two-Step Approach for Large-Scale, Prospective Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in the United States. **Journal of Clinical Microbiology.** 2005; 43(2): 688-695.

10 - SUPPLY, P.; MAGDALENA, J.; HIMPENS, S.; LOCHT, C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. **Molecular Microbiolog.** 1997; 28(5): 991-1103.

11 – MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYREBNC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 2001; 98(4):1901-1906.

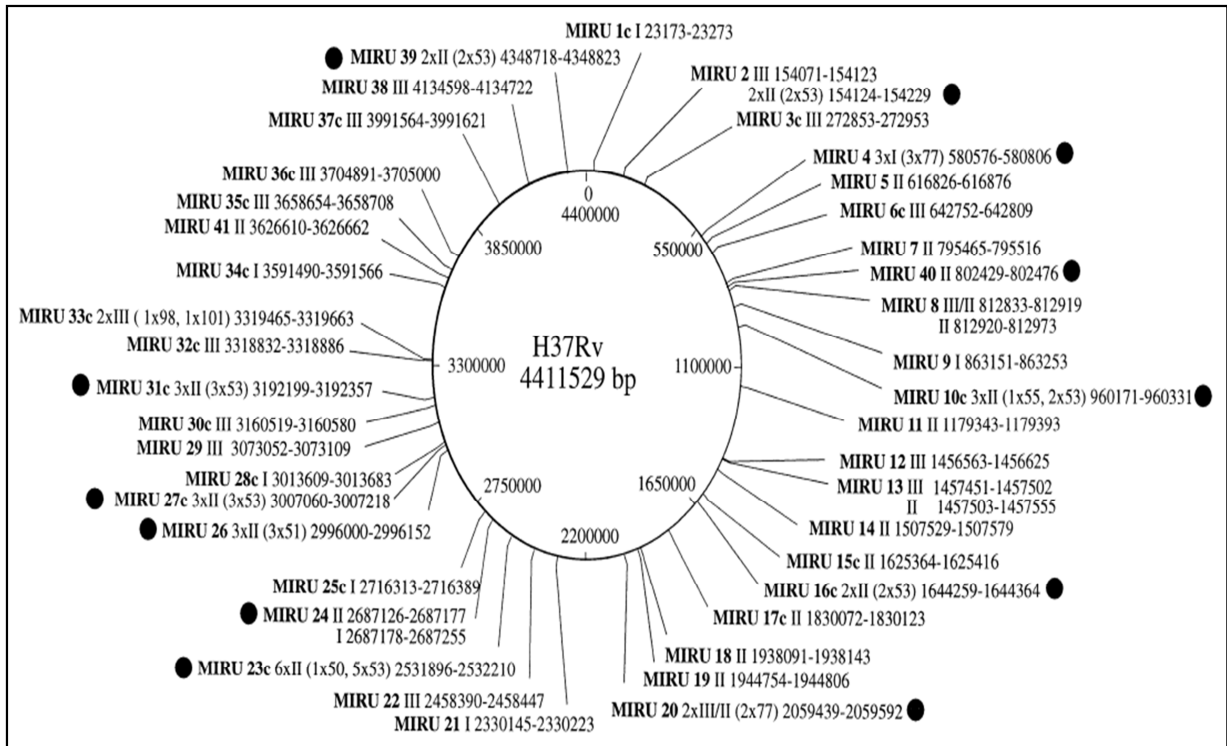


Figura – 2 Genoma com distribuição dos MIRUs.

Fonte: Supply *et al.*; 2000.

O método MIRU-VNTR tem se mostrado aplicável em estudos de genotipagem e epidemiologia molecular do *M. tuberculosis*. Tem poder de discriminação similar ao RFLP-IS6110. É rápido, reprodutível e de fácil comparação entre laboratórios, o que permite analisar a confiabilidade dos dados podendo ainda ser realizado de forma automatizada com 24 *loci*. A escolha de utilização do número de *loci* está diretamente relacionada ao objetivo de trabalho, sendo considerado o maior poder discriminatório para o MIRU-VNTR com 24 *loci* e o menor para o MIRU-VNTR com 12 *loci*<sup>12</sup>.

12 - SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; SOOLINGEN, D.; LOCHT, C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units. **Journal of Clinical Microbiology**. 2001; 30(10): 3563-3571.

Em 1993 a descoberta da natureza polimórfica de Repetições Diretas (DR) no genoma do *M. tuberculosis*, possibilitou o desenvolvimento da técnica de *Spoligotyping*<sup>13,14</sup>. Esta técnica baseou-se na amplificação da região DR por PCR, e posterior hibridização diferencial dos produtos amplificados com oligonucleotídeos complementares às regiões espaçadoras variáveis localizadas entre as DRs, imobilizados em uma membrana de nylon, onde 43 dessas sequências espaçadoras são previamente sensibilizadas. Os spoligotipos comuns a mais de um isolado são designados como *Shared Types* (ST) aos quais é atribuído um número “*Shared International Type*” (SIT), de acordo com o banco de dados internacional SpolDB4, os SITs são então agrupados em famílias e subfamílias<sup>15</sup>.

Apesar de ter poder discriminatório menor do que o RFLP e o MIRU, o *Spoligotyping* tem se mostrado como ferramenta útil na identificação de linhagens, e avaliação genética principalmente em situações em que o DNA esteja altamente fragmentado, já que fragmentos de 55 a 60 pb são suficientes para obter resultados positivos<sup>16</sup>. Outros fatores como simplicidade da técnica, alta reprodutibilidade, resultado padronizado de forma binária e disponibilidade de banco de dados têm possibilitado maior aplicação dessa técnica.

---

13 - GROENEN, P.M.; BUNSCHOTEN, A.E.; VAN SOOLINGEN, D.; VAN EMBDEN, J.D. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat *cluster* of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Molecular Microbiology**. 1993; 10(5): 1057-1065.

14 - KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; D VAN SOOLINGEN; KUIPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal Clinical Microbiology**. 1997; 35(4): 907.

15 – SOLA, C.; FERDINAND, S.; MAMMINA, C.; NASTASI, A.; RASTOGI, N. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily Based on Spoligotyping and Variable Number of Tandem DNA Repeats and Comparison with a Spoligotyping Database for Population-Based Analysis. **Journal Clinical Microbiology**. 2001; 39: 1559-1565.

16 - DONOGHUE, H.; SPIGELMAN, M.; GREENBLATT, C.L.; LEV-MAOR, G.; BAR-GAL, G.K.; MATHESON, C.; VERNON, K.; NERLICH, A.G.; ZINK, A.R. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. **Lancet Infect Disease**. 2004; 4: p.584-592.

Em estudos comparativos entre várias técnicas e alvos diferentes no DNA Kremer *et al.*(1999)<sup>17</sup> e Supply *et al.*(2001)<sup>12</sup>, avaliaram a reprodutibilidade e o poder discriminatório de vários métodos de genotipagem como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Reprodutibilidade e números obtidos utilizando diferentes métodos para diferenciar 90 cepas de *M. tuberculosis*

Método Usado	DNA alvo	Referência	Reprodutibilidade (%)	Número de Tipos Obtidos
RFLP ( <i>PvuII</i> )	IS6110	(Van Soolingen 1994)	100	84
RFLP ( <i>AluI</i> )	DR locus	(Van Soolingen 1993)	100	48
RFLP ( <i>AluI</i> )	PGRS	(Van Soolingen 1993)	100	70
Mixed-Linker PCR	IS6110	(Haas 1993)	100	81
Spoligotyping	DR locus	(Kamerbeek 1997)	94	61
DRE-PCR	IS6110 / PGRS	(Friedman 1995)	58	63
VNTR Typing	ETRs A-E	(Frothingham 1998)	97	56
MIRU - VNTR	MIRU 12 loci	(Supply 2001)	100	78

Kremer *et al.*; 1999 e Supply *et al.*; 2001

17 – KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHIGHAM, R. *et al.*. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproductibility. **Journal Clinical Microbiology**. 1999; 37: 2607-2618.

Recentemente duas novas técnicas foram descritas para a avaliação de agrupamentos genéticos: a genotipagem por polimorfismos de base única ou *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)<sup>18,19</sup> e a genotipagem mediante o polimorfismo de sequências compridas ou *Large Sequence Polymorphism* (LSP)<sup>20,21</sup>. Os LSP acontecem com maior frequência em regiões genômicas onde há tendência de eventos de inserção e deleção, podendo ser responsáveis pela variedade genética no *M. tuberculosis*<sup>22</sup>.

Todas estas técnicas têm sido amplamente utilizadas para maior compreensão da distribuição e transmissão da TB no mundo. Com a demonstração de *cluster* ou não pelas técnicas de genotipagem os investimentos poderão ser direcionados para a busca de TB em locais com agrupamentos próximos ou para populações de risco em desenvolver a doença. No caso de detecção de cepas com padrão genético semelhante (infecção exógena), poderá haver investimento maior na descoberta de casos naquele local com a identificação do Sintomático Respiratório (SR). Em locais com cepas de perfis diferentes como acontece na reativação endógena, o tratamento da infecção latente por *M. tuberculosis* (ILTB) será a melhor opção para impedir a reativação da doença. Nestes casos os investimentos devem ser direcionados na identificação da ILTB em grupos com alto risco de desenvolver a TB. Conhecer a rota de transmissão, as linhagens predominantes com maior ou menor virulência e se a infecção foi recente ou não, são, portanto, informações vitais para a efetivação de ações no controle da TB.

---

18 - FILLIOL, I.; SOLA, C.; LEGRAND, E.; RASTOGI, N. Genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in the Guiana-Antilles region. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**. 1990; 92(5): 292-298.

19 - GUTACKER, M.M.; MATHEMA, B.; SOINI, H.; SHASSHKINA, E.; KREISWIRTH, B.N.; GRAVISS, E.A.; MUSSER, J.A.M. Single-Nucleotide Polymorphism-Based Population Genetic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strains from 4 Geographic Sites. **The Journal of Infectious Diseases**. 2006; 193: p.121-128.

20 - MOSTOWY, S.; COUSINS, D.; BRINKMAN, J.; ARANAZ, A.; BEHR, M.A. Genomic Deletions Suggest a Phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **The Journal of Infectious Diseases**. 2002; 186: p.74-80.

21 - TSOLAKI, A.G.; GAGNEUX, S.; PYM, A.S.; LA SALMONIERE, Y.O.L.G.; KREISWIRTH, B.N.; VAN SOOLINGEN, D.; SMALL, P.M. Genomic Deletions Classify the Beijing/W Strains as a Distinct Genetic Lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**. 2005; 43(7): 3185.

22 - ALLAND, D.; LACHER, D.W.; HAZBON, M.H.; MOTIWALA, A.S.; QI, W.; FLEISHAMANN, R.D.; WHITTAM, T.S. Role of Large Sequence Polymorphisms (LSPs) in Generating Genomic Diversity among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and the Utility of LSPs in Phylogenetic Analysis. **Journal Clinical Microbiology**. 2007, 45(1): 39.

## 2 OBJETIVOS

Genotipar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes diagnosticados como casos novos de TB e avaliar a variabilidade genética dessas cepas em Minas Gerais.

### 2.1 Objetivos Específicos

Analisar o perfil de casos de TB em Minas Gerais de acordo com características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais.

Avaliar a similaridade entre os isolados de *M. tuberculosis*

Comparar o grau de concordância e o poder discriminatório entre as técnicas RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR.

Avaliar a presença de vínculo epidemiológico nos casos de cepas do *M. tuberculosis* caracterizadas como *cluster*.

### 3 DETALHAMENTO DA METODOLOGIA

#### 3.1 Cenário do estudo e população

Trata-se de estudo transversal retrospectivo com aplicação de técnicas moleculares para avaliação da epidemiologia da TB referente aos casos novos notificados em 20 municípios de MG: Belo Horizonte, Betim, Cataguases, Contagem, Coronel Fabriciano, Governador Valadares, Ibirité, Ipatina, Itajubá, Juiz de Fora, Montes Claros, Nova Lima, Paracatu, Poços de Caldas, Santa Luzia, São João Del Rei, Sete Lagoas, Três Corações, Uberaba e Varginha durante o ano de 2007. Estes municípios representaram cerca de 40% dos casos novos de TB no estado de MG e foram selecionados de forma aleatória e randomizados pelo Ministério da Saúde (MS) e Organização Panamericana de Saúde (OPAS), para a realização do II Inquérito Nacional de Resistência aos fármacos para o tratamento da TB (Figura 3).

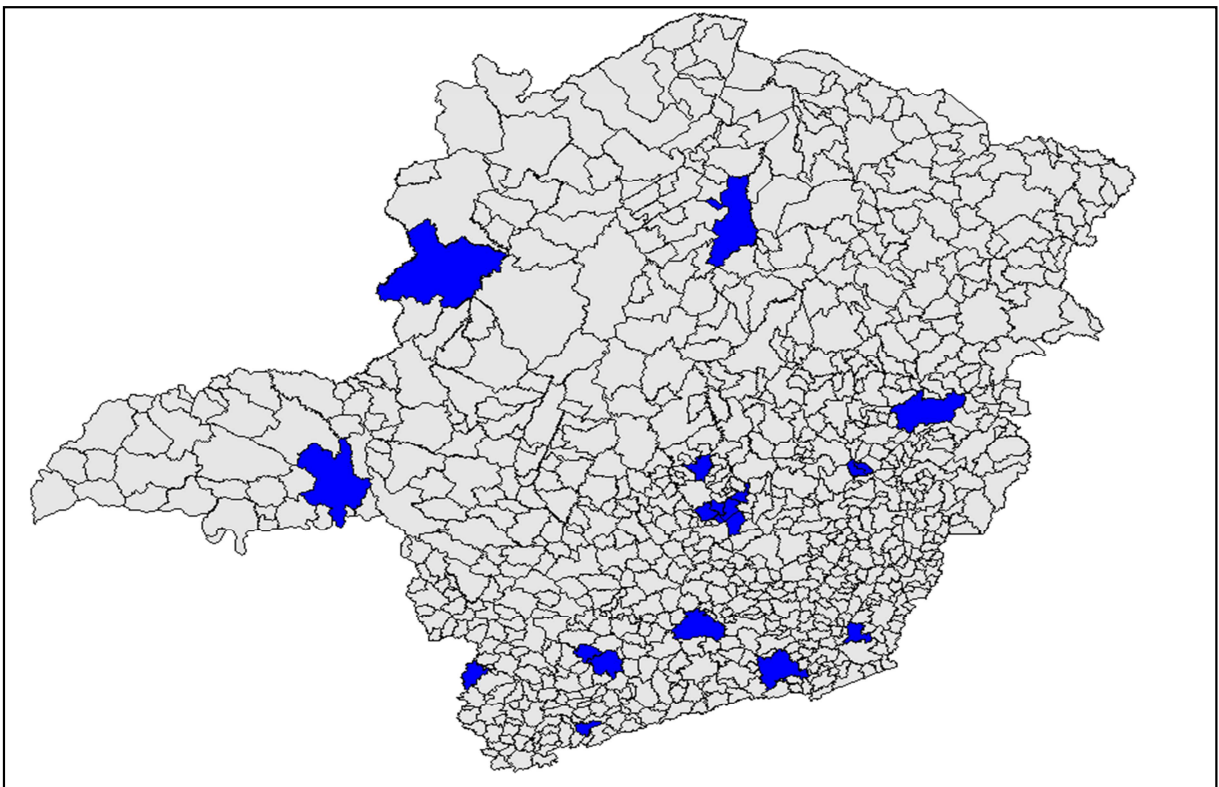


Figura – 3 Distribuição geográfica dos municípios analisados.

Fonte: Sinanweb 2013

Para participar do estudo foram selecionados pacientes maiores de 18 anos e com sintomas de tosse e expectoração por três semanas, sem tratamento prévio para TB ou com alterações radiológicas pulmonares. Foram coletadas duas amostras de escarro de cada paciente e

encaminhadas para o Laboratório de Diagnóstico de Micobactérias da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), considerado Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Minas Gerais (LACEN-MG).

### **3.2 Critérios de Inclusão**

Todas as culturas positivas em meio Löwenstein-Jensen (LJ) para *M. tuberculosis* do ano 2007 referente a cada um dos municípios participantes do II Inquérito.

### **3.3 Critérios de Exclusão**

Culturas positivas para micobactérias não tuberculosa (MNT).

Crescimento bacteriano insuficiente ou inexistente após repique em meio LJ.

DNA insuficiente para realização da técnica de RFLP e MIRU.

### **3.4 Isolamento Bacteriano**

As amostras clínicas foram processadas no Laboratório de micobactéria da FUNED seguindo a rotina laboratorial<sup>8</sup>. A baciloscopia de escarro foi realizada com pesquisa direta de Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR) com coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN). O processo de descontaminação para a realização de cultura foi o método de Petroff utilizando meio de cultura LJ e incubação em estufas com temperatura de 35°C.

A Identificação da espécie bacteriana foi realizada com provas bioquímicas: ácido paranitrobenzóico (PNB), Hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) e Niacina. O Teste de Sensibilidade (TS) aos fármacos de primeira linha para o tratamento da TB Isoniazida (H), Rifampicina (R), Estreptomicina (S) e Etambutol (E), foi realizado simultaneamente a identificação da espécie, onde foi realizado o método das proporções indireto como descrito por Canetti, Rist e Grosset, tendo a primeira leitura com 28 dias e resultado final com 42 dias de incubação<sup>23</sup>.

---

23 - Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília, DF; 2008, p. 323-365.



Todos os isolados após a identificação e TS foram ressuspensas em água e armazenadas em criotubos em freezer a -20°C.

Para os testes de biologia molecular foi realizado repique em LJ das cepas armazenadas e incubação por 30 dias a 35°C, após esse prazo as amostras foram analisadas em relação ao crescimento bacteriano para extração do DNA.

As suspensões bacterianas foram neutralizadas por aquecimento 80°C por 30 minutos na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e enviadas ao Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para extração do DNA e em seguida encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular – Departamento de Farmácia Social / Faculdade de Farmácia da UFMG onde foram realizadas as técnicas de RFLP e MIRU.

### 3.5 Extração do DNA

Para a extração do DNA foram retiradas duas alçadas do crescimento micobacteriano do LJ e transferidos para um *ependorf* contendo 500µL de tampão TE. A inativação bacteriana foi realizada por aquecimento por 30 minutos a 80°C (em *heat block*). Em seguida foi adicionado 70µL da solução de lisozima 10mg/mL e o material foi incubado a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Após este procedimento foi adicionado 90µL da mistura (1400 µL SDS 10% + 400µL de proteinase K) e incubado a 65°C por 15 minutos.

Foram adicionados 100µL de NaCl 5M com 100µL de CTAB previamente aquecidos e o tubo de reação foi homogeneizado no vórtex até se obter uma mistura branca leitosa e incubado em *heat block* a 65°C por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 700µL de clorofórmio/álcool-isoamil (24:1), homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm 4°C por 20 minutos. Aproximadamente 600µL da fase aquosa foram transferidas para um *ependorf*, onde foram adicionados 10µL de RNase e incubado por 1 hora a 37°C. Em seguida adicionou-se 450µL de isopropanol, misturado por inversão e incubado por no mínimo 2 horas ou *overnight* a -20°C.

Após esse período o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 30 minutos. Desprezou-se o sobrenadante por inversão. O sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70% previamente resfriado. Centrifugado novamente, sendo o etanol desprezado por inversão. Os tubos foram deixados para secar por quatro horas e posteriormente adicionado 50µL de tampão TE e estocado a -20°C.

### 3.6 Verificação da presença de DNA extraído

As amostras de DNA foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular da Farmácia Social – Faculdade de Farmácia / UFMG, onde foi preparado um Gel de Agarose a 1% (80 mL TBE 1x + 0,8g Agarose), adicionado 5 mL da amostra em cada canaleta e realizada corrida a 120 Volts por 45 minutos para verificar presença de bandas. Os DNA foram ainda dosados em espectrofotômetro utilizando-se 2  $\mu$ L da cada amostra (Figura 4).

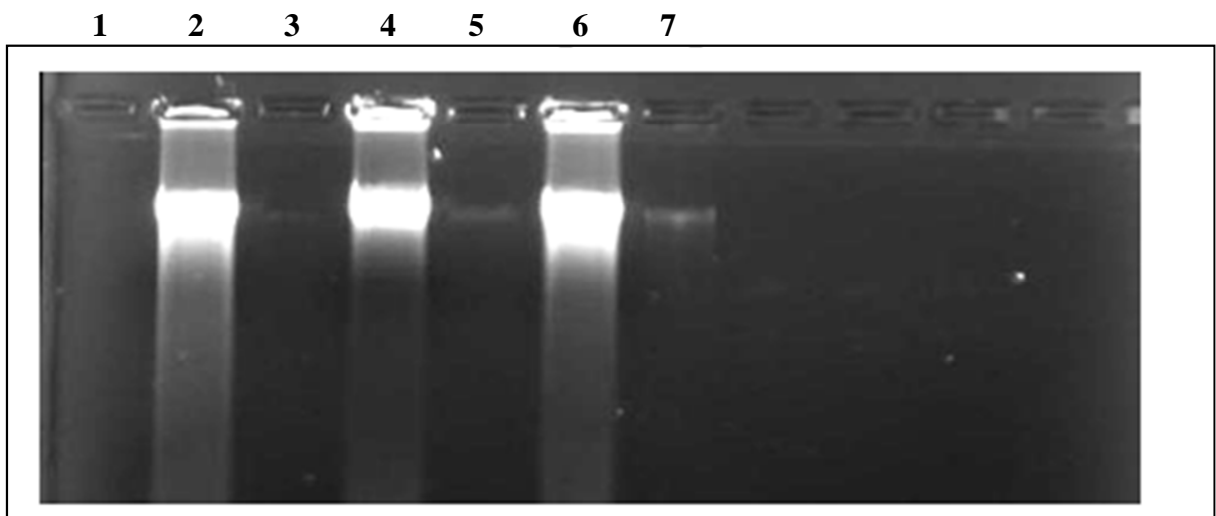


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose a 1% com o perfil de extração do DNA. Corrida com 120V por 1 hora - Canaleta 1 branco, canaletas 2, 4 e 6 com DNA extraído.

### 3.7 Preparação da Sonda IS6110

Para a marcação da sonda foi realizado o processo de purificação do DNA realizando 10 reações de PCR utilizando os primers **INS1** (5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC) e **INS2** (5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA). Em seguida juntou-se os 50 $\mu$ L de cada reação (x 10 = volume total 500  $\mu$ L) em um tubo de Eppendorf esterilizado.

Foi adicionar 50 $\mu$ L (0,1 volume) de acetato de sódio 3M e 1,1mL (2 volumes) de etanol PA resfriado a -20°C, sendo misturado por inversão e mantido a -20°C por 18-24 horas. Após este período o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C e desprezado o sobrenadante lavando-se o sedimento com etanol 70% resfriado previamente. O material foi centrifugado novamente com 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C e desprezado o sobrenadante deixando o sedimento secar a temperatura ambiente (4h) ou centrifugar no Concentrator Plus a 60°C por 30 min. Após este processo o material foi ressuscendido em 500  $\mu$ L de tampão TE

e distribuído em alíquotas de quatro tubos (150  $\mu$ L + 150  $\mu$ L + 150  $\mu$ L + 50  $\mu$ L), sendo estoquado a -20°C até o momento de uso.

### 3.8 Programa da PCR

Foi utilizada uma programação em termociclador com 95°C por 10 minutos e em seguida trinta ciclos com as temperaturas: 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por um minuto, finalizando a 72°C por 10 minutos e 4°C infinitamente.

### 3.9 Marcação da Sonda IS6110

Foi utilizado uma alíquota de 150  $\mu$ L do DNA sonda e colocado no termociclador com programação para sonda (99°C por 10 minutos). Após este período o material foi esfriado rapidamente em um banho de gelo, mantendo o DNA sonda no gelo e adicionado 2 $\mu$ L (x 10 = volume total 20  $\mu$ L) da mistura do hexanucleotídeo (vial 5), mais 2  $\mu$ L (x 10 = volume total 20  $\mu$ L) da mistura do dNTP (vial 6), 1 $\mu$ L (x 10 = volume total 10  $\mu$ L) da enzima Klenow (vial 7) e centrifugado brevemente incubando em Banho Maria a 37°C por 18-24 horas.

Após este período o material foi retirado e acrescentado 2  $\mu$ L (x 10 = volume total 20  $\mu$ L) da solução de EDTA 0,2M. Foi realizada uma precipitação do DNA sonda com 2,5 $\mu$ L (x 10 = volume total 25  $\mu$ L) de cloreto de lítio 4M e 75 $\mu$ L (x 10 = volume total 750  $\mu$ L) de etanol 100% PA resfriado a -20°C. Homogeneizado e deixado a -20°C *overnight* (18 a 20 horas).

Na seqüência o material foi centrifugado com 12.000rpm por 30 minutos a 4°C, lavando o sedimento com 100 $\mu$ L (x 10 = volume total 1000 $\mu$ L) de etanol 70% frio. Centrifugado novamente com 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C, desprezado o sobrenadante e deixado o sedimento secar a temperatura ambiente (4h) ou centrifugar no Concentrator Plus a 60°C por 30 min. O material foi suspenso novamente em 500 $\mu$ L (x 10 = volume total 500 $\mu$ L) de tampão TE/SDS 0,1% e colocado em geladeira (2 a 8°C) 18 a 20 horas, alíquotando para 10 tubos com 50  $\mu$ L (cada 50  $\mu$ L podendo revelar até 4 géis).

### 3.10 Análise RFLP-IS6110

Após a extração do DNA genômico foi realizada a restrição por enzima *PvuII* utilizando-se aproximadamente 5 $\mu$ g de DNA da amostra e água se necessário para um volume final de

18µL. A esta solução foi adicionada uma mistura de enzima contendo 1 µL Enzima PVU II + 2µL Tampão 10x. Após a homogeneização foi realizada uma centrifugação e o material colocado em banho-maria por 4 horas a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de 4 µL de solução de arraste e centrifugado rapidamente.

Foi preparado um gel a 1% em tampão TBE 1x concentrado (1g de agarose - Ultra Pura em 100 mL de tampão TBE 1x concentrado). O volume total da solução DNA/Enzima (25 µL) foi aplicado em cada canaleta do gel, sendo a 1ª, 9ª e 18ª reservadas para a cepa controle *M. tuberculosis* (14.323) e as outras canaletas contendo as amostras. Foi realizada uma corrida por 20 horas (*overnight*) a 32V. Em seguida o gel foi visualizado em transluminador sob luz ultravioleta e fotografado (Figura 6).

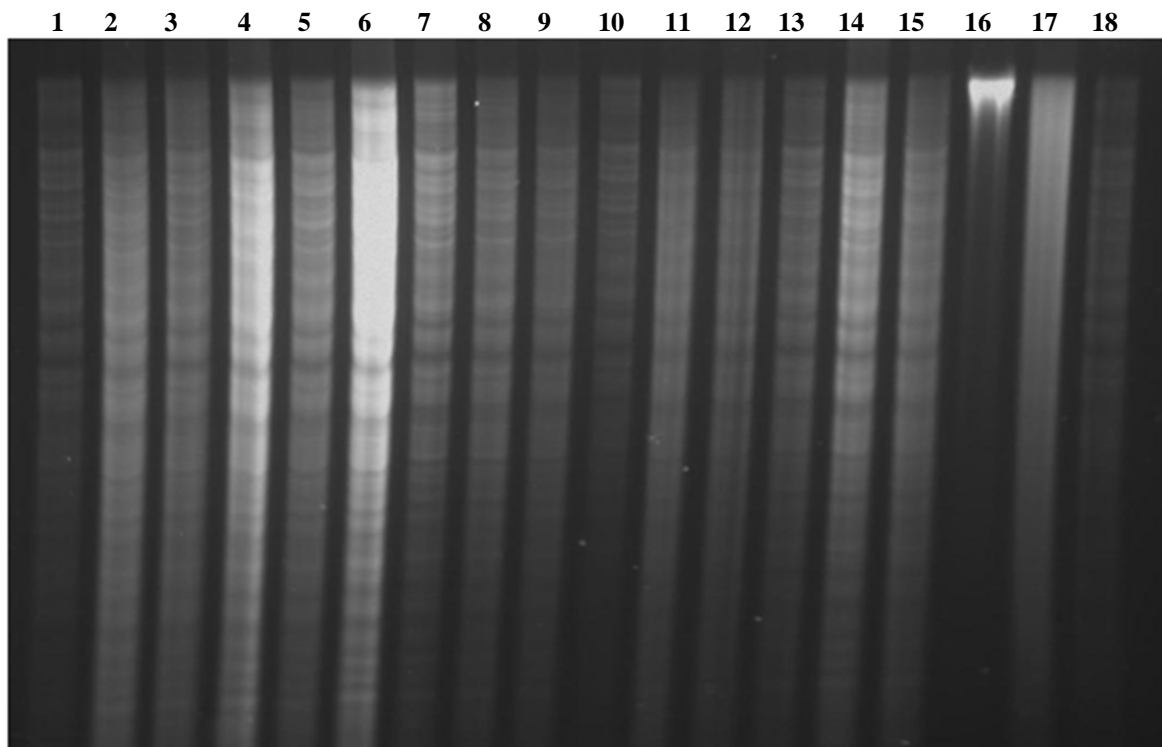


Figura – 5 Eletroforese em gel de agarose a 1% de corrida do DNA de *M. tuberculosis* após enzima de restrição. Corrida a 32V por 16h. Canaletas 1, 9 e 18 com cepa padrão *M. tuberculosis* (Mt14323). Canaletas: 2 a 8 e 11 a 17 amostras de DNA. Na amostra 16 não foi visualizada restrição.

Para realizar a transferência o gel foi cortado e adaptado ao tamanho da membrana. Em seguida foi colocado em um recipiente e lavado com solução HCl 0,25M por 7 minutos (despurinação). Todo o líquido foi desprezado e adicionou-se solução de desnaturação por 7 minutos desprezando-se novamente a solução. Em seguida foi adicionada uma solução de

Neutralização por 7 minutos. Após este procedimento a solução foi desprezada e adicionou-se a solução saturada de cloreto de sódio (SSC) 20x durante 30 minutos.

A membrana foi colocada em um recipiente com solução de 20x SSC, após dois minutos de exposição a membrana foi colocada sobre o gel e em cima dela foi adicionado papel de filtro e um peso, ficando em repouso por 18 a 24 horas.

A hibridação foi realizada com uma solução de 20 mL aliqotado em dois tubos de 10 mL. A membrana foi colocada em uma garrafa do forno de hibridação com 10 mL de solução de hibridação por 1 hora a 42°C. Em seguida a solução foi trocada por solução de hibridação 10 mL mais sonda marcada e a membrana ficaram no forno por 18 horas a 42°C.

Após este período a membrana foi lavada por duas vezes com 20 mL de SSC 2x/SDS 0,1% durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida lavada mais duas vezes com 20 mL de SSC 0,5x/SDS 0,1% durante 15 minutos à 68°C e posteriormente lavados com 20 mL de tampão de lavagem por 5 minutos à temperatura ambiente. A membrana ficou exposta a uma solução tampão por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida esta solução tampão foi substituída por outra solução (10 mL) com 2µL da anti-digoxigenina AP (anti-DIG-AP) da Roche® e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente.

Após este período a membrana foi lavada por duas vezes com 20 mL do tampão de lavagem por 15 minutos cada. Em seguida foi colocada em um recipiente contendo tampão com MgCl<sub>2</sub> por 5 minutos. Esta solução foi desprezada e adicionou-se uma solução reveladora contendo 40 mL de Tampão + MgCl<sub>2</sub> + 90 µL NBT + 70 µL BICP (para cada membrana). Incubada em ambiente escuro. O Processo foi interrompido após 18 a 24 horas desprezando a solução e adicionando Tampão TE pH 8.0 suficiente para umedecer a membrana. Em seguida a membrana foi retirada e deixada para secar a temperatura ambiente e fotografada no transluminador com luz branca (Figura 7).

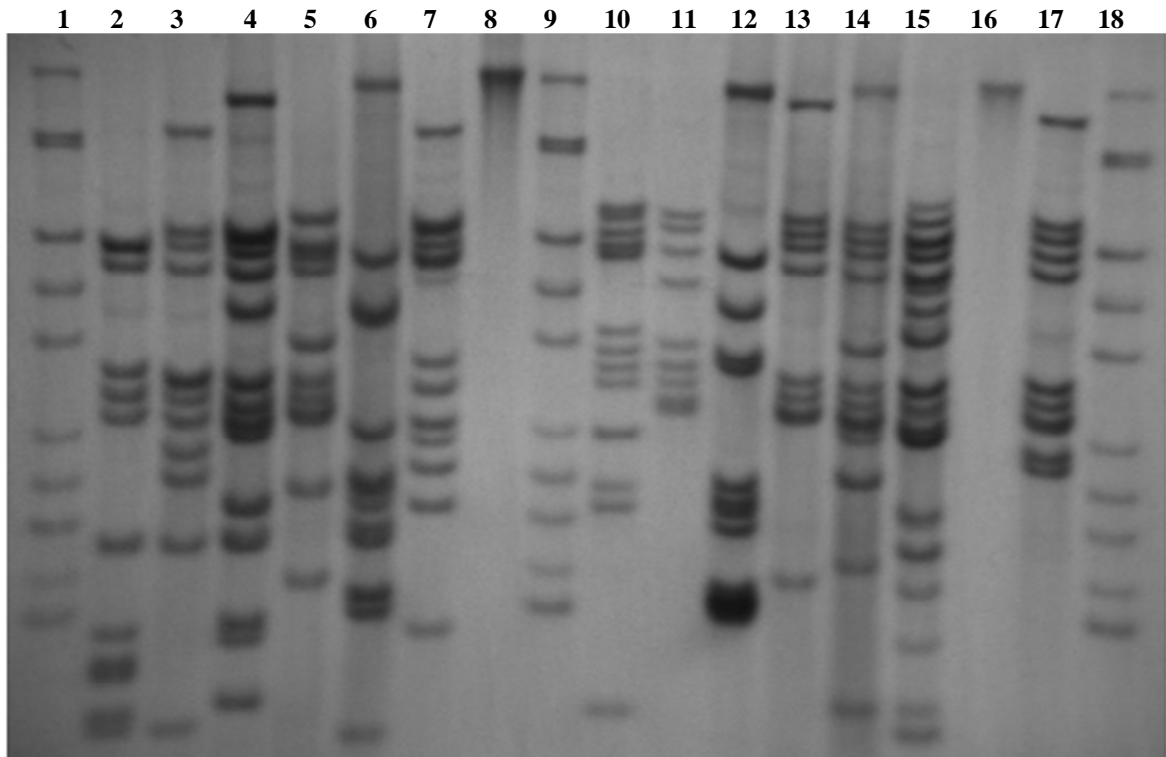


Figura – 6 RFLP do *M. tuberculosis* em membrana após revelação. Canaletas 1, 9 e 18 com *M. tuberculosis* (Mt14323). Canaletas: 2 a 8 e 11 a 17 com DNA de amostras. Na canaleta 16 não ocorreu revelação.

Os resultados das membranas foram digitalizados e analisados pelo software *BioNumerics* 7.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Foi construído um dendrograma único com todas as análises e um dendrograma específico para os isolados de cada município para mostrar o grau de similaridade dos isolados pelo método de grupo de par de média aritmética não ponderada (*Unweighted pair group method of arithmetic average* – UPGMA) e o índice de *Dice* com 1,0% de tolerância e 1,5% de otimização. Como controle interno das reações foi utilizada uma cepa padrão de *M. tuberculosis* Mt14.323, sendo disposta em cada gel na 1ª, 9ª e 18ª canaletas.

Cepas com padrão de RFLP-IS6110 com similaridade superior 85% foram considerados infecção recente e *cluster* com 100% de similaridade.

Alguns autores relatam em seus estudos que na infecção recente o perfil de similaridade no dendrograma deve ser superior a 85%<sup>24,25</sup>.

24 - BORGDORFF, M.W.; VAN DE HOF, S.; KALISVAART, N.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D. Influence of Sampling on *clustering* and Associations With Risk Factors in the Molecular Epidemiology of Tuberculosis. **American Journal of Epidemiology**. 2011; 174(2): 243-251.

25 - FOK, A.; NUMATA, Y.; SCHULZER, M.; FITZGERALD, M.J. Risk factors for *clustering* of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**. 2008 May; 12(5): 480-492.

### 3.11 Análise do MIRU-VNTR

A padronização do MIRU-VNTR utilizada nesse trabalho foi baseada em 12 *loci* utilizando-se método manual. Cada *locus* foi amplificado separadamente com técnica de PCR e os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% com 120V e 2h de corrida. Como controle foi utilizado a cepa H37Rv (Supply, 2005). As informações do MIRU-VNTR foram lançadas no digitalizados e analisados pelo software *BioNumerics* 7.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) para a construção do dendrograma e avaliação da diversidade alélica de cada *loci*.

A extração do DNA das cepas do *M. tuberculosis* seguiu o mesmo protocolo utilizado para o RFLP. *Primers*: MIRU2, MIRU4, MIRU10, MIRU16, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU26, MIRU27, MIRU31, MIRU10, MIRU40. Todos os DNA das cepas de cada paciente foram amplificado por todos os MIRU. Utilizando-se o marcador de massa molecular de 100 a 1000 pb e como controle positivo a cepa padrão de H37Rv.

Para cada reação foi calculado os volumes necessários para elaboração do MIX da PCR utilizando-se as soluções nas seguintes concentrações: Buffer 10x, MgCl<sub>2</sub> 50μM, dNTP 25 μM, primers INS1 25pmol e INS2 25pmol, água para completar o volume e por último colocar a Taq 5U, sendo o volume final de cada reação 45μL. A cada solução de MIX foi adicionada 5μL de solução de DNA diluído 1:100. Após este procedimento o material foi colocado no termociclador com as condições de amplificação específica para cada MIRU. No final da reação as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 2% durante por 2 horas e 30 minutos a 110V. Após este período o gel foi fotografado sob luz UV no transluminador. Foi realizada, posteriormente a medida de peso molecular para cada amostra e comparada com a tabela de repetição de cada MIRU, obtendo-se valores numéricos para cada amostra (Figura 8).

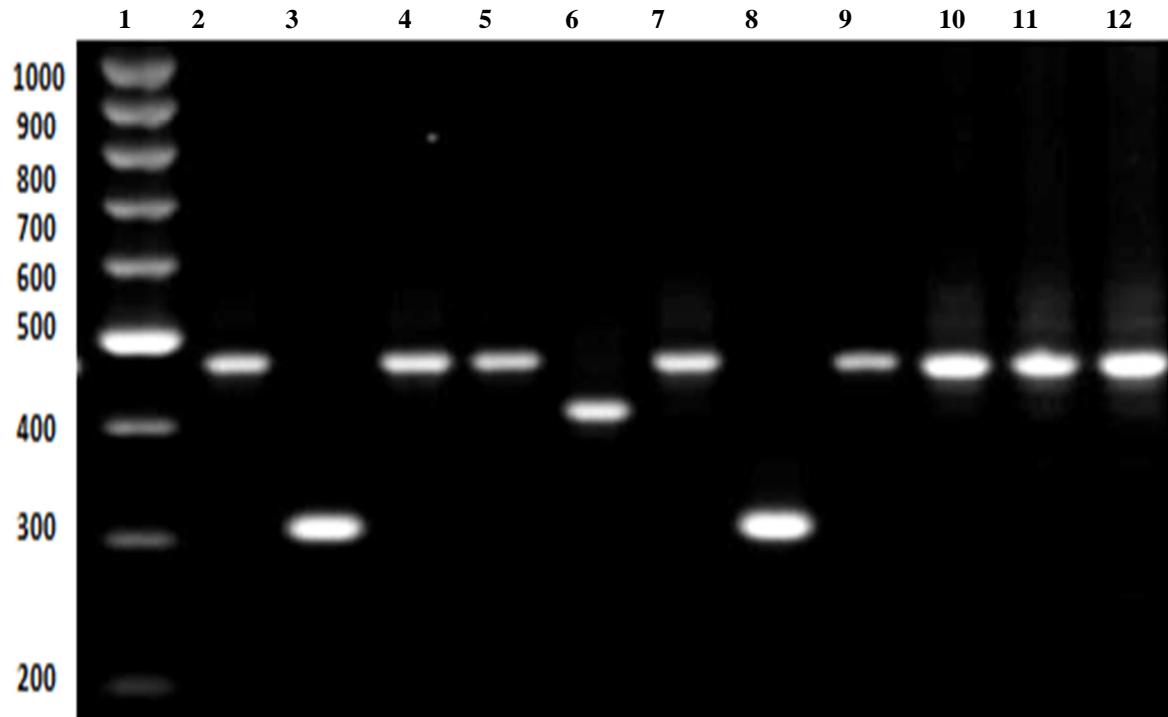


Figura – 7 Eletroforese de gel de agarose a 1% para visualização de resultado do MIRU 23 Corrida por 2h a 120V. Canaleta 1: Marcador com 100pb. Canaletas de 2 a 12 com resultado para MIRU 23.

### 3.12 Fatores associados à ocorrência de cepas em *clusters*

Foram analisados os dados dos questionários como endereço, município e nome da mãe para avaliação de relação epidemiológica entre as cepas agrupadas em *cluster*.

### 3.13 Cálculo amostral para estudos de genotipagem do *M. tuberculosis*

Foi usada neste estudo descritivo uma amostragem de conveniência. Sendo considerada para o cálculo amostral a população em MG com 19.719.285 de habitantes, total de casos de TB 5.782 com taxa de prevalência de 29,3 por 100 mil habitantes e 4.792 casos novos de TB com taxa de incidência de 24,3 por 100 mil habitantes, dados referentes ao ano de 2007.



Tabela 2 – Tamanho amostral para a frequência em uma população para estudo descritivo

<b>Sample Size for Frequency in a Population</b>	
Population size(for finite population correction factor or $fpc$ )( $N$ ):	19500000
Hypothesized % frequency of outcome factor in the population ( $p$ ):	25%/±5
Confidence limits as % of 100(absolute +/- %)( $d$ ):	5%
Design effect (for cluster surveys- $DEFF$ ):	$\frac{1}{\dots}$
<b>Sample Size(<math>n</math>) for Various Confidence Levels</b>	
<u>Confidence Level(%)</u>	<u>Sample Size</u>
95%	289
80%	124
90%	203
97%	354
99%	498
99.9%	813
99.99%	1136

Equation

$$\text{Sample size } n = [DEFF * N * p * (1-p)] / [(d^2 / Z^2 * 1-\alpha/2 * (N-1) + p * (1-p))]$$

**Results from OpenEpi, Version 2, open source calculator-SSPropor**  
 file:///C:/Program%20Files/OpenEpi/SampleSize/SSPropor.htm  
 Source file last modified on 11/09/2007 21:52:00

### 3.14 Comparação entre RFLP-6110 e MIRU-VNTR

O poder discriminatório descrito por Hunter & Gaston (1988)<sup>10</sup> foi utilizado para determinar se o método de tipagem molecular foi capaz de distinguir duas amostras selecionadas aleatoriamente de uma população. Para esse cálculo, foi usada a fórmula disponível no endereço eletrônico [http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/discriminatory\\_power/](http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/), que se baseia no número total de isolados avaliados por determinado método de tipagem molecular. O valor de D, que é o índice do poder discriminatório e pode variar de 0 a 1, onde 0 significa que todos os isolados de determinada população possuem tipos idênticos, ao passo que D igual a 1 indica que o método de tipagem foi capaz de distinguir cada isolado de uma determinada população de todos os demais. A taxa de *clusters* foi calculada de acordo com a equação descrita por Bidovec-Stojkovic *et al.* (2011)<sup>11</sup>, onde  $T = (n_c - c) / n$ , em que  $n_c$  é o número total de amostras agrupadas,  $c$  é o número de agrupamentos encontrados e  $n$  é o número total de casos na amostra.

Todas as variáveis foram analisadas pelo método da proporção binomial com Pontuação de Wilson corrigida para o tamanho amostral, calculado pelo software OpenEpi versão 3.0.

### **3.15 Considerações Éticas**

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número ETIC 216-08.

#### 4 NOTA EXPLICATIVA

Seguindo as orientações do Programa de Pós-Graduação de Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (PrPGCASA/UFMG) na tese de doutorado deve conter um artigo aceito em uma revista indexada (artigo - I) e outro a ser submetido (artigo – II).

Apresentamos para esta defesa:

**Artigo - I** respondendo ao primeiro objetivo específico intitulado: “Características da tuberculose no Estado de Minas Gerais: avaliação de 2002 a 2009”. **Publicado no *Jornal Brasileiro de Pneumologia*** – ISSN 1806-3713 – 2013: 39(3): 357-364 - Qualis B2, Fator de Impacto = 1,391.

**Artigo – II** respondendo aos demais objetivos específicos intitulado: “**Estudo Comparativo de IS6110 Restriction Length Polymorphism e Variable Number Tandem Repeat – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units de *Mycobacterium tuberculosis* isolados no estado de Minas Gerais, Brasil**” a ser submetido na revista *BMC Infectious Diseases*, Qualis A1, Fator de Impacto em 3,030.

## 5 ARTIGO 1

## Artigo Original

## Características da tuberculose no estado de Minas Gerais entre 2002 e 2009\*

Characteristics of tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil: 2002-2009

Cláudio José Augusto, Wânia da Silva Carvalho, Alan Douglas Gonçalves, Maria das Graças Braga Ceccato, Silvana Spindola de Miranda

## Resumo

**Objetivo:** Analisar o perfil de casos de tuberculose no estado de Minas Gerais entre 2002 e 2009, segundo características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais, assim como presença de comorbidades e mortalidade. **Métodos:** Estudo epidemiológico descritivo com levantamento de dados dos casos notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação e Sistema de Informação de Mortalidade entre 2002 e 2009. **Resultados:** Foram notificados 47.285 casos de tuberculose nos anos estudados, com média de incidência 22,3/100.000 habitantes. Os indivíduos com tuberculose eram predominantemente da faixa etária de 20-49 anos (62,4%), do sexo masculino (67,0%) e tinham baixa escolaridade (18,5%). Casos novos, de recidiva e de retratamento representaram, respectivamente, 83,7%, 5,7% e 5,7% do total de casos. As proporções de cura, abandono do tratamento e tuberculose multirresistente foram, respectivamente, 73,1%, 11,2% e 0,2%, enquanto o coeficiente de mortalidade foi 12,9%. O tratamento diretamente observado (TDO) foi administrado em 21,8% dos casos. A baciloscopia e a cultura de escarro somente foram realizadas em 73,9% e 12,9% dos casos, respectivamente. A radiografia de tórax foi realizada em 90,5% dos casos. A forma pulmonar prevaleceu (83,9%). A comorbidade com alcoolismo, infecção pelo HIV e diabetes mellitus foi identificada em 17,2%, 8,3% e 3,8% dos casos, respectivamente. **Conclusões:** No período estudado, o número de casos novos, de abandono e de óbitos foi elevado, as comorbidades foram relevantes, e os exames básicos não foram realizados adequadamente para o diagnóstico da tuberculose. São necessários o trabalho multiprofissional, ampliação da estratégia TDO, maior conhecimento da distribuição da tuberculose em Minas Gerais e melhorias nos bancos de dados para que haja um melhor controle da doença no estado.

**Descritores:** Tuberculose/epidemiologia; Tuberculose/mortalidade; Sistemas de informação.

## Abstract

**Objective:** To analyze the profile of tuberculosis cases reported between 2002 and 2009 in the state of Minas Gerais, Brazil, according to sociodemographic, clinical, and laboratory characteristics, as well as to comorbidities and mortality. **Methods:** This was a descriptive, epidemiological study based on data obtained from the Brazilian Case Registry Database and the Brazilian Mortality Database for the 2002-2009 period. **Results:** There were 47,285 reported cases of tuberculosis, corresponding to a mean incidence of 22.3/100,000 population. The individuals diagnosed with tuberculosis were predominantly in the 20- to 49-year age bracket and male (62.4% and 67.0%, respectively). Individuals with a low level of education accounted for 18.5% of the cases. New cases, cases of recurrence, and cases of retreatment accounted for 83.7%, 5.7%, 5.7%, respectively. The rates of cure and treatment noncompliance were 66.2% and 11.2%, respectively; multidrug-resistant tuberculosis was identified in 0.2% of the cases; and the mortality rate was 12.9%. The directly observed treatment, short-course (DOTS) strategy was applied in 21.8% of the cases. Sputum smear microscopy and culture were performed in only 73.9% and 12.9% of the cases, respectively. Chest X-rays were performed in 90.5% of the cases. Pulmonary tuberculosis was the predominant form (in 83.9%). Comorbidity with alcoholism, HIV infection, and diabetes mellitus were identified in 17.2%, 8.3%, and 3.8%, respectively. **Conclusions:** During the study period, the numbers of new cases, cases of treatment noncompliance, and deaths were high, comorbidities were common, and there was a failure to perform adequately basic tests for the diagnosis of tuberculosis. Multidisciplinary approaches, expanded use of the DOTS strategy, better knowledge of the distribution of tuberculosis, and improvements in the databases are needed in order to achieve better control of the disease in the state of Minas Gerais.

**Keywords:** Tuberculosis/epidemiology; Tuberculosis/mortality; Information systems.

\* Trabalho realizado na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.  
Endereço para correspondência: Silvana Spindola de Miranda, Faculdade de Medicina, 2º andar, Departamento de Clínica Médica, Avenida Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, CEP 30130-100, Belo Horizonte, MG, Brasil.  
Tel. 55 31 3244-8598. E-mail: spindola@medicina.ufmg.br  
Agência financiadora: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).  
Recebido para publicação em 11/11/2012. Aprovado, após revisão, em 1/2/2013.



## Introdução

Mesmo com o avanço da medicina, a tuberculose continua considerada como a doença infectocontagiosa que causa o maior número de óbitos em adultos no mundo. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo e que, a cada ano, esse faça adoecer aproximadamente 9,4 milhões de pessoas, causando óbitos em 1,7 milhões. Em 2009 no Brasil, foram notificados 71.686 novos casos e cerca de 4.800 óbitos, o que classifica o país em 19º lugar entre os 22 países onde se estima que ocorram 80% do total de casos de tuberculose no mundo.<sup>(1,2)</sup>

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde do Brasil tem incentivado o controle da tuberculose, utilizando as metas recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS): diagnosticar pelo menos 70% dos casos esperados; tratar corretamente 100% dos casos diagnosticados; curar pelo menos 85% dos mesmos; e manter o abandono de tratamento em percentuais considerados aceitáveis (até 5%). Entre os estados brasileiros, Minas Gerais ocupa o 5º lugar em relação ao número de casos de tuberculose notificados no Brasil.<sup>(2)</sup>

O estado de Minas Gerais é uma das 27 unidades federativas do Brasil e possui uma extensão territorial de 586.528,29 km<sup>2</sup>. Com uma população de 19.595.309 habitantes, é o segundo estado mais populoso do Brasil, com uma densidade populacional de 32,73 habitantes/km<sup>2</sup> e 853 municípios. Os municípios mineiros representam 51,50% dos existentes na região Sudeste e 15,50% dos existentes no Brasil. O estado está subdividido em 28 Gerências Regionais de Saúde, possuindo atualmente 25 municípios prioritários para o controle da tuberculose. Minas Gerais ainda possui 3.553 Equipes de Saúde da Família, que atendem 829 municípios.<sup>(3,4)</sup>

Algumas doenças podem favorecer o surgimento da tuberculose. Entre as comorbidades relacionadas a essa enfermidade, podem ser citadas como as três principais a infecção pelo HIV, o alcoolismo e o diabetes mellitus (DM). O perfil epidemiológico da tuberculose tem sido alterado no decorrer dos anos pelo HIV. A coinfeção tuberculose/HIV vem ocasionando um aumento da mortalidade, alterando a resistência aos medicamentos antituberculoze e o risco de transmissão devido ao abandono do tratamento.<sup>(5,6)</sup>

Estudos apontam que o DM pode favorecer o desenvolvimento da tuberculose e ser responsável por mais de 10% dos casos da doença devido

à imunossupressão, assim como que o risco de adoecimento por tuberculose é cerca de três vezes maior nos pacientes com DM do que naqueles sem a doença.<sup>(7,8)</sup> Justifica-se, assim, a necessidade de se aumentar os esforços para identificar e tratar os diabéticos com *Mycobacterium tuberculosis* latente antes que a doença passe à fase ativa.<sup>(7,8)</sup> O alcoolismo também está associado com a tuberculose pulmonar, demonstrando um maior risco de adoecimento e dificuldade no tratamento.<sup>(9)</sup>

Diante do contexto apresentado, conhecer as características relacionadas à tuberculose poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias, visando o controle dessa doença segundo as metas preconizadas da OMS. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o perfil da tuberculose no estado de Minas Gerais segundo as características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais, assim como a presença de comorbidades e a taxa de mortalidade, durante o período entre 2002 e 2009.

## Métodos

Estudo epidemiológico descritivo, com levantamento de dados dos casos notificados em relação ao município de residência no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde entre os anos de 2002 a 2009 no estado de Minas Gerais. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número ETIC 216-08.

Foram incluídos todos os casos notificados no período, e foram excluídos 341 casos devido a informações incompletas e/ou ignoradas, tais como idade, sexo, município de residência e tratamento anterior.

A incidência, definida com base nos casos de tuberculose notificados no SINAN, foi calculada utilizando-se a taxa média de casos novos de tuberculose pela média da estimativa da população.

Foram analisadas características sociodemográficas (sexo, idade e escolaridade), clínicas (forma da doença, tipo de entrada e motivo de encerramento) e laboratoriais (baciloscopia, cultura de escarro, radiografia de tórax e prova tuberculínica [PT]), assim como a presença de comorbidades (infecção pelo HIV, DM e alcoolismo). A referência utilizada para os resultados da PT foi a seguinte: não reator, enduração de 0 a 4 mm; reator fraco, enduração de 5 a 9 mm; e

reator forte, endureção  $\geq 10$  mm,<sup>(11)</sup> pois essas informações estão assim descritas no SINAN.

Os dados sobre a população (por 1.000 pessoas) foram obtidos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, segundo estimativas e o censo de 2010.<sup>(12)</sup>

Em relação às características clínicas, foram avaliadas a forma da doença (pulmonar, extrapulmonar e associação das formas), tipo de entrada (casos novos, recidiva, reingresso após abandono e transferência) e situação de encerramento (cura, abandono de tratamento, transferência, mudança de diagnóstico, tuberculose *multidrug resistant* [MDR, multirresistente] e óbito). Os dados de mortalidade foram obtidos pelo Sistema de Informação de Mortalidade (SIM).

As informações obtidas foram organizadas em um banco de dados, utilizando-se o TabWin 3.5, disponibilizado pelo Departamento de Informática do Ministério da Saúde, e, para viabilizar as análises, foram utilizados os programas estatísticos *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), e *OpenEpi*, versão 2.3. Realizou-se uma análise descritiva das informações obtidas desse banco de dados, que incluiu a descrição da população, distribuições de frequências e medidas estatísticas das características selecionadas. Os intervalos foram calculados usando intervalos de confiança para

proporções binomiais pelo método baseado no intervalo de escore de Wilson.<sup>(13)</sup>

## Resultados

Durante o período analisado, foram notificados 47.285 casos de tuberculose. A taxa média de incidência foi de 22,3/100 mil habitantes (Figura 1).

A maioria dos casos de tuberculose foi observada na faixa etária de 20-49 anos, o que corresponde a 29.526 casos (62,40%), seguida por pacientes acima de 65 anos (5.356 casos; 11,30%). O sexo masculino foi mais frequente (31.690 casos; 67,00%; Tabela 1).

O nível de escolaridade com maior incidência foi o de ensino fundamental II incompleto (9.288 casos; 18,50%), seguido por ensino fundamental I incompleto, com 8.267 casos (16,50%; Tabela 1).

Em relação ao tipo de entrada, 39.581 eram casos novos (83,70%), 2.686 eram casos de recidiva (5,70%), 2.697 eram casos de reingresso após abandono (5,70%), 1.980 eram casos de transferência (4,20%), e não havia informações a respeito de 341 casos (0,70%; Figura 2).

O tratamento diretamente observado (TDO) foi declarado em 10.317 casos (21,80%).

A baciloscopia na primeira amostra dos casos notificados foi positiva em 53,80% dos casos e, em 26,10%, não foi solicitado esse procedimento.

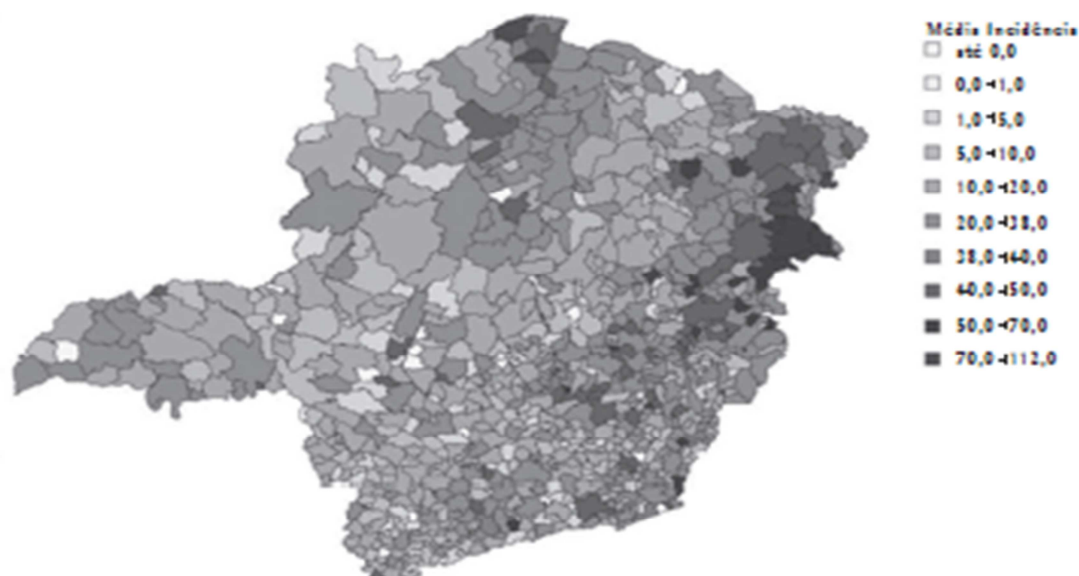


Figura 1 - Distribuição espacial da média de incidência de tuberculose em Minas Gerais por municípios, 2002-2009. Fonte: SINAN-MG; acesso em 05-03-2011.



Dos pacientes que realizaram a cultura, essa foi positiva em 2.743 (66,7%), sendo que 41.227 (87,1%) não realizaram esse exame. A radiografia de tórax foi realizada em 42.343 (89,5%) dos casos notificados, sendo que 38.495 (81,4% do

total de casos) foram considerados como casos suspeitos de tuberculose. A PT não foi realizada em 37.044 casos (78,3%). Em relação ao número total de casos, os resultados da PT foram os seguintes: não reator, em 5,4%; reator fraco, em 1,9%; e reator forte, em 11,6% (Tabela 2).

Tabela 1 – Frequência de tuberculose de acordo com faixa etária, sexo e escolaridade, Minas Gerais, 2002-2009.

Variáveis	n	Q%	IC95%
<b>Faixa etária, anos</b>			
< 1	266	0,6	0,5-0,7
1-4	356	0,7	0,6-0,8
5-9	420	0,9	0,8-1,0
10-14	549	1,2	1,1-1,3
15-19	2.055	4,3	4,2-4,5
20-24	12.757	29,0	28,7-29,5
25-29	15.769	32,4	32,9-32,8
30-34	8.757	18,5	18,2-18,9
35-39	4.286	9,1	8,8-9,3
≥ 40	1.070	2,3	2,1-2,4
<b>Sexo</b>			
Masculino	31.690	67,0	66,6-67,4
Feminino	15.595	33,0	32,6-33,4
<b>Escolaridade</b>			
Analfabeto	4.097	8,7	8,4-8,9
Ensino fundamental incompleto/completo	20.102	42,5	42,1-43,0
Ensino médio incompleto/completo	5.254	11,1	10,8-11,4
Ensino superior incompleto/completo	1.706	3,6	3,4-3,8
Ignorado/sem branco/sem informação	16.126	34,1	-

Fonte: SINAN-MG; acesso em 05-03-2011.

As formas pulmonar, extrapulmonar e a sua associação, respectivamente, foram encontradas em 39.669 casos (83,9%), 8.509 (18,0%) e 1.973 (4,2%). Nos pacientes com a forma pulmonar da doença, dos 41.642 resultados da primeira e segunda baciloscopias de escarro, 33.505 (80,5%) foram positivos, confirmando o diagnóstico da forma pulmonar, sendo que, para os menores que 15 anos, essa proporção foi de 6,9% (479/6.989). A maior frequência entre as comorbidades foi o alcoolismo, em 8.112 casos (17,2%); seguido pela infecção pelo HIV, em 3.915 (8,2%) e DM, em 1.786 (3,8%). Ainda em relação à forma pulmonar da doença associada à presença de comorbidades, foram observadas proporções de 15,0%, 4,5% e 3,2%, respectivamente, para alcoolismo, infecção pelo HIV e DM.

Em relação à situação de encerramento pelo SINAN, a cura ocorreu em 34.611 casos (73,1%), seguida por abandono do tratamento, em 5.311 casos (11,2%); transferência, em 2.558 (5,4%); mudança de diagnóstico, em 1.334 (2,8%); tuberculose MDR, em 79 (0,2%); e sem informação/ignorado, em 2.715 (5,7%); Figura 3). Foram registradas 677 mortes, com um coeficiente de mortalidade de 3,5% (677/19.220.578).

O número de óbitos por tuberculose, com base nos dados do SIM, foi de 2.488, tendo

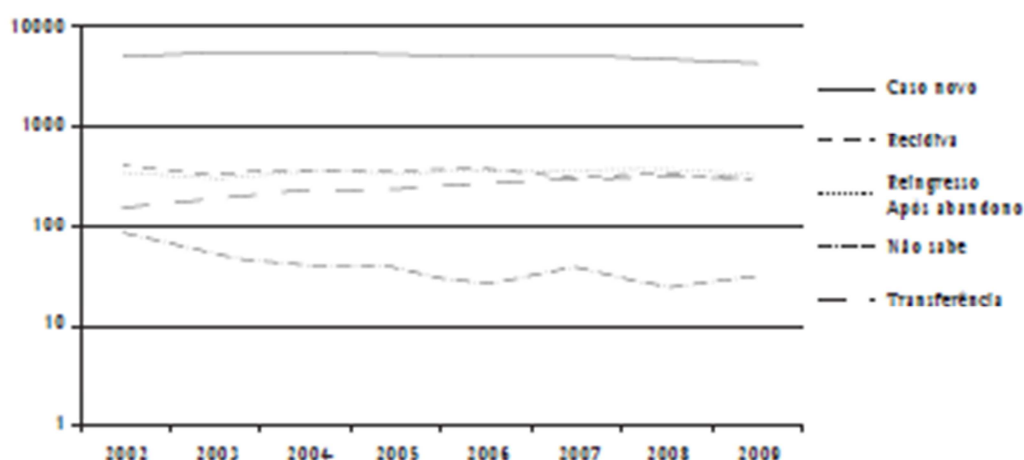


Figura 2 – Perfil da tuberculose referente ao tipo de entrada, Minas Gerais, 2002-2009. Fonte: SINAN-MG; acesso em 05-03-2011. Número de casos em escala logarítmica (log10).

**Tabela 2** – Frequência na realização de exames dos casos diagnosticados com tuberculose, Minas Gerais, 2002-2009.

Exames	n	Q%	IC95%
<b>1ª baciloscopia de escarro</b>			
Positivo	25.461	53,8	53,4-54,3
Negativo	9.497	20,1	19,7-20,4
Não realizado	12.222	26,1	25,7-26,5
Ignorado/branco	4	-	-
<b>2ª baciloscopia de escarro</b>			
Positivo	6.077	27,3	26,7-27,9
Negativo	3.226	14,5	14,1-15,0
Não realizado	12.942	58,1	57,5-58,8
Ignorado/branco	25.029	-	-
<b>Cultura de escarro</b>			
Positivo	2.742	5,8	5,6-6,0
Negativo	1.370	2,9	2,7-3,0
Em andamento	1.941	4,1	3,9-4,3
Não realizado	41.227	87,2	86,9-87,5
Ignorado/branco	4	-	-
<b>Radiografia de tórax</b>			
Suspeito	28.495	82,3	81,9-82,6
Normal	3.284	7,0	6,8-7,2
Outra patologia	564	1,2	1,1-1,3
Não realizado	4.452	9,5	9,2-9,8
Ignorado/branco	489	-	-
<b>Prova tuberculínica</b>			
Não reator	2.551	5,5	5,3-5,7
Reator fraco	904	1,9	1,8-2,1
Reator forte	5.485	11,9	11,6-12,2
Não realizado	27.044	80,6	80,2-80,9
Ignorado/branco	1.201	-	-

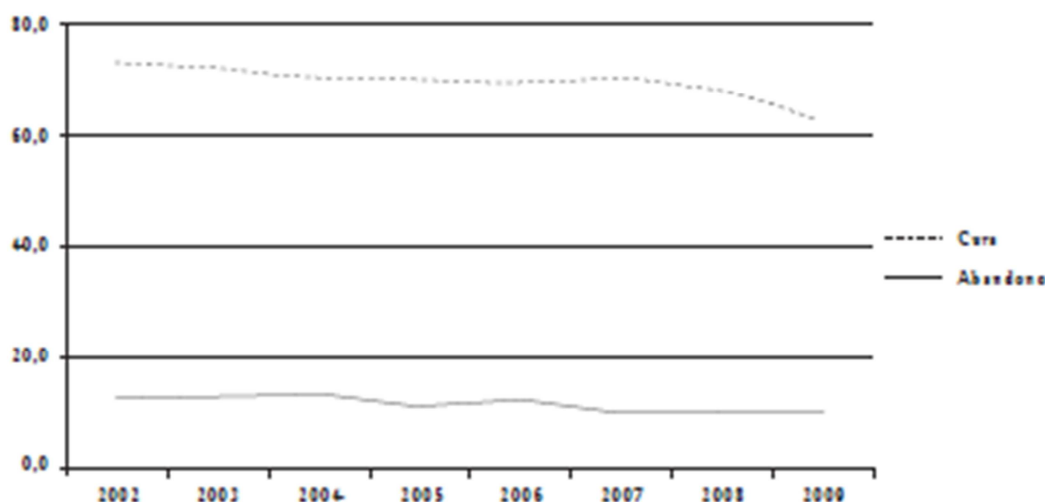
Fonte: SINAN-MG; acesso em 25-04-2011.

como causa a tuberculose pulmonar, em 2.215 óbitos (89,00%); tuberculose miliar, em 142 (5,80%); tuberculose no sistema nervoso central, em 58 (2,30%); e tuberculose em outros órgãos, em 72 (2,90%). O coeficiente de mortalidade foi 12,90‰ (2.488/19.220.578).

## Discussão

A incidência média (definida com base somente nos casos notificados) no estado para o período analisado foi de 22,3/100.000 habitantes, o que coloca Minas Gerais em 24º lugar na classificação entre os estados brasileiros,<sup>(12)</sup> inclusive já alcançando o índice preconizado como meta de desenvolvimento do milênio, de uma incidência de 25,6 casos por 100.000 habitantes até 2015.<sup>(13)</sup> Porém, ao analisarmos a distribuição da doença entre os municípios, observa-se uma realidade diferente, pois 92 municípios apresentaram uma incidência igual ou superior à média nacional de 28,3/100.000 habitantes. Isso demonstra que, em Minas Gerais, a priorização não deve somente ser restrita às regiões metropolitanas sinalizadas pelo programa de controle da tuberculose, uma vez que altas taxas de incidência são encontradas em municípios menores.

No presente estudo, a tuberculose predominou na população economicamente ativa (20-49 anos) e em idosos acima de 65 anos, principalmente em homens, na proporção 2:1, com baixa escolaridade, o que está em concordância com resultados de outros estudos.<sup>(12,13)</sup>



**Figura 3** – Perfil da tuberculose referente ao tipo de encerramento (cura e abandono), Minas Gerais, 2002-2009. Fonte: SINAN-MG; acesso em 05-03-2011.



Em relação ao tipo de entrada, os casos novos representaram 83,79%, e de acordo com o observado (Figura 2), praticamente todos os tipos de entrada se mantiveram estabilizados durante os oito anos do estudo, cabendo ressaltar que a incidência calculada está diminuindo principalmente pelo aumento da população, uma vez que o número absoluto de casos novos não teve uma redução expressiva no decorrer dos anos. Para uma efetiva redução dos casos novos, é necessário o desenvolvimento de um processo que identifique áreas com diferentes necessidades e ações, nas quais o programa de controle da tuberculose irá investir na busca de pacientes sintomáticos respiratórios e na identificação de população de risco para a tuberculose latente. Ao se identificar e tratar corretamente esses casos, ocorrerá uma real redução do número de casos novos.

No reingresso após o abandono do tratamento, observamos uma notificação de somente 5,79%; porém, o abandono do tratamento durante o período estudado foi de 11,20%. Isso mostra que os pacientes que abandonaram não retornaram para um novo tratamento. Uma ação de busca ativa desses casos deve ser realizada dentro da Equipes de Saúde da Família.

O Programa Nacional de Controle da Tuberculose, consoante à recomendação da OMS, estabeleceu parâmetros de cura para a tuberculose pulmonar de 85% e de abandono de até 5%.<sup>(2)</sup> De acordo com os resultados observados na evolução da tuberculose em Minas Gerais (Figura 3), pouco tem sido alcançado com relação à cura (66,20%) e ao abandono (11,89%), o que reforça a necessidade da implementação e ampliação do TDO, que teve um baixo percentual de cobertura.<sup>(11)</sup>

Foi observado que aproximadamente 30% dos pacientes não realizaram a baciloscopia, o que mostra a baixa solicitação desse exame pelos profissionais de saúde. Sendo a baciloscopia um exame de fácil execução e baixo custo, que é necessário para a cobertura de pacientes sintomáticos respiratórios, percebe-se a ineficiência das ações no controle da tuberculose, já que a forma pulmonar teve maior frequência (84%), como mostrado em outros estudos.<sup>(12)</sup> Mesmo para os pacientes que realizaram o exame, observa-se uma positividade inferior (53,89%) ao valor nacional no ano de 2009 (64%), reforçando a necessidade da implantação de um controle de qualidade nos laboratórios em Minas Gerais.<sup>(12)</sup>

Os resultados mostram que a maioria dos pacientes não realizou cultura de escarro (87,20%). Apesar de a cultura de escarro ser um exame mais complexo, de maior custo, com tempo maior de realização e menor acesso, ela é de fundamental importância para a avaliação de casos de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa. A cultura permite não só o diagnóstico mas também a identificação das micobactérias e a determinação de resistência às drogas, principalmente para os pacientes com comorbidades, entre elas, o alcoolismo, a infecção pelo HIV e o DM. É de fundamental importância conhecer o perfil de resistência das cepas que circulam em Minas Gerais devido ao alto abandono (11,90%), principalmente para indicar o tratamento adequado.<sup>(4),13,12)</sup> A baixa incidência de tuberculose MDR (0,20%) poderia estar subestimada, uma vez que o exame de cultura e o teste de sensibilidade não foram realizados em uma grande parte dos casos.

A radiografia de tórax, que é uma ferramenta de grande importância na investigação da tuberculose pulmonar e na identificação de apresentações atípicas nos pacientes imunossuprimidos, foi o procedimento mais realizado (90,50%). Os achados sugestivos são indispensáveis para a solicitação do exame bacteriológico (baciloscopia e cultura),<sup>(12)</sup> o que não foi observado nesse levantamento, pois somente 73,90% realizaram a baciloscopia e 12,90%, a cultura. Destacamos ainda que a falta de realização da cultura, além de não possibilitar a identificação correta da espécie bacteriana, tampouco indica sua resistência às drogas para a definição do tratamento.

Na população em estudo, a PT foi solicitada em 80,60% e parece ter sido utilizada como parâmetro de diagnóstico, já que os exames bacteriológicos não foram solicitados.

A maior prevalência de comorbidades, como alcoolismo, infecção pelo HIV e DM, mostra a necessidade de um acompanhamento por uma equipe de multiprofissionais devido à possibilidade de um agravamento das doenças, além de ações, como o TDO, nas unidades básicas de saúde para evitar o abandono.<sup>(5-7,8,10)</sup>

A forma pulmonar da doença teve maior frequência do que a forma extrapulmonar quando relacionada a todas as comorbidades avaliadas (alcoolismo, HIV e DM). Desses pacientes, 80,40% tiveram resultados positivos nas duas amostras de escarro (baciloscopia), o que mostra uma boa sensibilidade do exame. Já para os pacientes



com idade inferior a 15 anos, a positividade da baciloscopia foi de apenas 6,80% dos casos pulmonares, o que pode estar relacionado a lesões abacilíferas e à dificuldade de expectoração.<sup>(11)</sup>

De acordo com os dados do SIM e do SINAN, houve uma grande diferença em relação à mortalidade (12,90% vs. 3,50%), o que mostra uma grande diferença entre os sistemas, justificando a necessidade de ações que permitam disponibilizar os dados de forma compatível e atualizada em uma mesma plataforma de maneira automática. A mortalidade é uma das principais formas de avaliação do programa de controle da tuberculose e a meta estipulada pela OMS é que essa deve ser inferior a 50% até 2015. Assim, estratégias devem ser desenvolvidas a fim de possibilitar uma interação entre programas de notificação, com o cruzamento de dados, possibilitando o uso de informações mais fidedignas.

Atualmente, métodos epidemiológicos para avaliar a distribuição do *M. tuberculosis* em uma comunidade têm sido utilizados, como as técnicas de biologia molecular *restriction fragment length polymorphism*<sup>(13,14)</sup> e *mycobacterial interspersed repetitive units*,<sup>(15,17)</sup> que possibilitam a avaliação de infecção recente (busca ativa) ou tardia (busca em população de risco), assim como *spoligotyping*, que avalia a distribuição das famílias da micobactéria.<sup>(13,14)</sup> Assim, os investimentos podem ser mais bem direcionados na busca de casos sintomáticos respiratórios ou de indivíduos com comorbidades que necessitam de tratamento preventivo da infecção latente.

Uma das limitações do estudo foi a utilização de dados secundários, que podem afetar a qualidade dos resultados.<sup>(14)</sup>

Em conclusão, no período estudado, o número de casos novos, de abandono e de óbitos por tuberculose foram elevados, as comorbidades foram relevantes, e os exames básicos não foram realizados adequadamente para o diagnóstico da tuberculose no estado de Minas Gerais. Assim, são necessários um trabalho conjunto envolvendo profissionais de saúde, gestores, a sociedade civil e seus segmentos organizados na luta contra a tuberculose; a ampliação da estratégia TDO; o gerenciamento da comorbidade tuberculose/HIV e de tuberculose MDR; o conhecimento da distribuição da doença no estado, com a melhoria e a associação dos dados no SIM e no SINAN; e a realização de estudos epidemiológicos e dos

perfis moleculares do bacilo para um melhor controle da tuberculose em Minas Gerais.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, à Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e à Coordenação de Pneumologia Sanitária da Secretaria Estadual de Minas Gerais. Agradecemos também ao Professor Antonio Ruffino Netto a correção do artigo.

## Referências

1. Pulmonar [homepage on the Internet]. São Paulo: Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia; Museu da Tuberculose. [cited 2011 Aug 25]. Available from: <http://www.pulmonar.org.br/top-paginas?http://pagina.siticoos=9&tpagina=111>
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Epidemiology, Strategy, Financing. Geneva: World Health Organization; 2010.
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage on the Internet]. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [cited 2011 Aug 25]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/>
4. Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais [homepage on the Internet]. Belo Horizonte: Secretaria Estadual de Saúde. [cited 2011 Ago 25]. Available from: <http://www.saude.mg.gov.br>
5. Prado TN, Cass AL, Marques M, Maciel EL, Golub JE, Miranda AB. Epidemiological profile of adult patients with tuberculosis and AIDS in the state of Espírito Santo, Brazil: cross-referencing tuberculosis and AIDS databases. *J Bras Pneumol*. 2011;37(1):93-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-3712011000100014> PMID:21290437
6. Boletim Epidemiológico - AIDS e DST. 27º - 52ª semanas epidemiológicas de julho a dezembro de 2007; 01º - 26ª - semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2008. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
7. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 12 observational studies. *PLoS Med*. 2008;5(7):e152. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0050152> PMID:18620914 PMCID:2459204
8. Faurholt-Jepsen D, Ranga N, Praygod G, Kidola J, Faurholt-Jepsen M, Aabye MG, et al. The role of diabetes co-morbidity for tuberculosis treatment outcomes: a prospective cohort study from Mwanza, Tanzania. *BMC Infect Dis*. 2012;12:165. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2324-12-165> PMID:22829693 PMCID:3462148
9. Baker MA, Hamrick AD, Jeon CY, Hart JE, Kapur A, Lönnroth K, et al. The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review. *BMC Med*. 2011;9:81. <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7015-9-81> PMID:21722362 PMCID:3155828
10. Caron-Ruffino M, Ruffino-Netto A. Association of alcoholism and pulmonary tuberculosis [Article in Portuguese]. *Rev Saude Publica*. 1979;13(2):183-94. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101979000200003> PMID:542793

11. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Educação a Distância. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: EAD/ENSP, 2008;(2)160.
12. Agresti A, Coull BA. Approximate is better than 'exact' for interval estimation of binomial proportions. *Am Stat.* 1998;52(2):119-26.
13. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
14. Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Léry-Préault V, Nguyen S, Guccidan JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28(12):2668-73. PMID:2177747 PMCID:268253
15. van Brubden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):406-9. PMID:8381814 PMCID:262774
16. Sola C, Fillard I, Logrand B, Lesjean S, Leont C, Supply P, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol.* 2003;3(2):125-33. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348\(03\)00011-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00011-X)
17. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardeña-Oclonax M, Rüsch-Gordon S, Willery B, et al. Proposal for Standardization of Optimized *Mycobacterium tuberculosis* Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4402-4510. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01392-06> PMID:17005750 PMCID:1698431
18. Ceeli CM. Sistemas de Informação em Saúde e uso de dados secundários na pesquisa e avaliação em saúde. *Cad Saúde Colet.* 2010;18(3):335-6.

### ***Sobre os autores***

#### ***Claudio José Augusto***

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; e Pesquisador em Saúde e Tecnologia. Fundação Ezequiel Dias – FUNED – Belo Horizonte (MG) Brasil.

#### ***Wânia da Silva Carvalho***

Professora Associada I. Departamento de Farmácia Social, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.

#### ***Alan Douglas Gonçalves***

Pesquisador em Saúde e Tecnologia. Fundação Ezequiel Dias – FUNED – Belo Horizonte (MG) Brasil.

#### ***Maria das Graças Braga Ceccato***

Professora Adjunta I. Departamento de Farmácia Social, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.

#### ***Silvana Spindola de Miranda***

Professora Associada IV de Clínica Médica/Pneumologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil.

## 6 ARTIGO 2

### **Estudo Comparativo de IS6110 *Restriction Length Polymorphism e Variable Number Tandem Repeat – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* de *Mycobacterium tuberculosis* isolados no estado de Minas Gerais, Brasil**

Cláudio José Augusto <sup>1,2</sup>, Wânia da Silva Carvalho <sup>3</sup>, Silvana Spíndola de Miranda <sup>4</sup>

1 – Fundação Ezequiel Dias – FUNED / Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais

2 – Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto / Faculdade de Medicina / Universidade Federal de Minas Gerais

3 – Faculdade de Farmácia / Departamento de Farmácia Social / Universidade Federal de Minas Gerais

4 – Faculdade de Medicina / Departamento de Clínica Médica / Universidade Federal de Minas Gerais

#### **Resumo**

#### **Introdução**

A genotipagem de DNA do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) tem sido amplamente aplicada para a investigação das relações epidemiológicas entre casos de tuberculose em vários países desde que técnicas de tipagem do DNA foram desenvolvidas na década de 1990 como o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-IS6110 – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) e o número variável de repetições em sequência – Unidades repetitivas intercaladas de micobactérias com 12 e 24 *locus* (MIRU-VNTR – *Variable Number Tandem Repeat – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*). A aplicação desses métodos tem permitido o avanço no conhecimento sobre a transmissão e/ou propriedades patogênicas importantes das micobactérias e fornece novos e poderosos instrumentos para combater e proteger contra doenças causadas por esses patógenos. Este estudo objetivou genotipar as cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes diagnosticados como casos novos de TB em Minas Gerais e comparar a similaridade, poder discriminatório e concordância dos *clusters* dos resultados das técnicas de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR 12 *loci*.

## **Métodos**

Trata-se de estudo transversal retrospectivo com análise de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de casos novos de TB no ano de 2007 em Minas Gerais, utilizando as técnicas moleculares RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR para analisar o índice de similaridade, o poder discriminatório, concordâncias e formação de *cluster* entre elas.

## **Resultados**

Das 204 amostras avaliadas, 32,3% foram similares pelo RFLP-IS6110 e 50,9% pelo MIRU-VNTR. O nível de discriminação dos dois métodos não difere substancialmente: RFLP-IS6110 resultou em 191 padrões distintos em comparação com 176 no MIRU-VNTR. A concordância global, definida como isolados de perfis únicos ou identicamente distribuídos em grupos por ambos os métodos, foi de 87,7% (179/204), sendo considerados 171 como perfis únicos e 8 isolados em *cluster* e o coeficiente *Kappa* 0,76. Dos restantes 25 casos, 2,5% (5/204) casos foram agrupados apenas por RFLP-IS6110 e 9,8% (20/204) apenas por MIRU-VNTR.

A taxa de *cluster* do RFLP-IS6110 foi menor que a do MIRU-VNTR, sendo 3,2% e 4,3% respectivamente. A relação epidemiológica entre as cepas agrupadas foi confirmada em 4 pacientes (31%) no RFLP-IS6110 em comparação com 14% no MIRU-VNTR.

## **Conclusões**

Concluimos que poucos isolados foram semelhantes. O RFLP-IS6110 mostrou-se altamente discriminatório podendo ser usado em Minas Gerais. A comparação entre as duas técnicas mostrou um poder discriminatório do RFLP-IS6110 ligeiramente superior ao MIRU-VNTR e teve maior relação epidemiológica quando os *clusters* foram analisados.

**Palavras-Chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, RFLP-IS6110, MIRU-VNTR

## 6.1 Introdução

No Brasil, são registrados por ano cerca de 71.000 casos novos de tuberculose (TB), com um coeficiente de incidência de 36,7 casos/100 mil habitantes e 4.600 óbitos, classificando o país em 16º lugar entre os 22 países com 80% da carga da doença no mundo [1]. Em Minas Gerais (MG) no ano de 2007 foram identificados 4.810 casos novos de TB com coeficiente de incidência de 25 casos/100 mil habitantes e 276 óbitos. O percentual de cura encontrado entre os casos novos foi de 56%, o abandono de tratamento 7,2% e a proporção de Tuberculose Multidroga Resistente (TBMDR) primário foi de 1,8%[2]. Neste cenário tão importante quanto o tratamento e a descoberta de casos novos é a investigação sobre a diversidade genética de isolados clínicos do *M. tuberculosis* que pode ser útil na informação sobre a origem e a transmissão de cepas circulantes.

A genotipagem de DNA *M. tuberculosis* tem sido amplamente aplicada para a investigação das relações epidemiológicas entre casos de TB em vários países desde de que técnicas de tipagem do DNA foram desenvolvidos na década de 1990[3,4]. O polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-IS6110 – *Restriction Fragment Length Polymorfism*) revolucionou os estudos sobre a transmissão de *M. tuberculosis*. A análise dos padrões de banda do RFLP-IS6110 requer aplicação de *software* de alto custo, profissionais especializados, e constitui-se me método trabalhoso[5]. A sua vantagem, entretanto é a estabilidade genética[6]. O número variável de repetições em sequência – Unidades Repetitivas Intercaladas de Micobactérias (VNTR-MIRU *Variable Number Tandem Repeat – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) 12 e 24 *locus* foi favoravelmente avaliado e proposto como o novo padrão ouro para a análise de *M. tuberculosis*[7]. Suas vantagens estão relacionadas a necessidade de pequena quantidade de DNA, uma vez que a técnica se baseia na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com maior praticidade e simplicidade. Sua desvantagem esta relacionada a instabilidade genética devido a mutações silenciosas que podem alterar rapidamente o perfil genético da bactéria[8,9]. A aplicação de métodos de tipagem molecular tem avançado significativamente no conhecimento sobre a transmissão e/ou propriedades patogênicas das micobactérias e fornece novas e poderosas ferramentas para combater e proteger contra a doença [10]. Portanto, em Minas Gerais (MG), o estudo de métodos moleculares ainda é pouco explorado e sua utilização torna-se necessária para o conhecimento do perfil genético, rota de transmissão e disseminação da tuberculose nessa região. Este estudo tem como objetivos genotipar as cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes diagnosticados como casos novos de TB em MG e comparar comparar a



similaridade, poder discriminatório e concordância dos *clusters* dos resultados entre as técnicas de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR 12 *loci*.

## 6.2 Métodos

### A Coorte

No Brasil durante o ano de 2007 realizou-se o II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos, tendo sido em MG selecionados e sorteados de forma randômica 20 municípios com população superior a 25.000 habitantes com mais de 10 casos novos de TB por ano, sendo incluída o município de Belo Horizonte capital do estado. Após a seleção dos municípios participantes foi elaborado um protocolo de busca de sintomático respiratório em Unidades Básicas de Saúde (UBS).

Nesse mesmo ano foram obtidas 471 culturas positivas referentes aos pacientes com diagnóstico de caso novo de TB. Foram excluídos 9,3% (44/471) dos casos por contaminação ou por ser *Micobactéria* não tuberculosa. Foi possível extrair o DNA de 427 amostras, sendo que dessas 70,5% (301/427) tiveram o resultado pela técnica de RFLP-IS6110 e 47,7% (204/427) com resultado completo pelo MIRU-VNTR. Assim para o estudo comparativo entre as técnicas foram incluídos 204 isolados para tipagem por RFLP-IS6110[3] e MIRU-VNTR [7].

A Fundação Ezequiel Dias (FUNED), que é o laboratório central de saúde pública do estado de MG, referência estadual para o diagnóstico laboratorial de todos os casos de TB; disponibilizando exames de cultura, teste de sensibilidade (TS) aos fármacos e identificação associadas as técnicas de biologia molecular. A análise molecular deste estudo foi realizada no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Farmácia Social da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### Coleta dos dados

Os dados foram coletados nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) e Unidade Hospitalar, não houve interferência na rotina do atendimento e acompanhamento dos pacientes. Os profissionais destas unidades de saúde foram treinados para o preenchimento do questionário sócio-demográfico (nome, sexo, idade, endereço, município). A ficha de notificação de casos de TB do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) para a verificação de vínculo epidemiológico foi também analisada.

### **Técnica de RFLP-IS6110 IS6110**

Para a realização do RFLP-IS6110 foi utilizado 3µL de enzima *PvuII* na proporção de 1:2 (enzima e tampão) para a restrição do DNA genômico. Em cada gel foram utilizados três controles da cepa *M. tuberculosis* (Mt 14.323) distribuídas nas 1ª, 9ª e 18ª canaletas. A transferência para membrana ocorreu de forma manual. A membrana foi colocada em contato com o gel por 24 horas. Após a transferência a membrana passou por processo de revelação colorimétrica com solução de fosfatase e *Nitroblue tetrazolina*, sendo então fotografada. Foram considerados como *cluster* cepas com 100% de similaridade e como infecção exógena (infecção recente) quando os resultados do RFLP-IS6110 foram superiores a 80% de similaridade[11,12].

### **Técnica de MIRU-VNTR 12 loci**

Trata-se de método de tipagem baseado em PCR que atribui o número variável de repetições em seqüência para *loci* de cada MIRU, avaliando o polimorfismo do *M. tuberculosis*. A padronização foi baseada em 12 *loci*[7]. Para monitorar e garantir a qualidade e reprodutibilidade, uma amostra negativa e o DNA do *M. tuberculosis* H37Rv foram utilizados como controle interno negativo e positivo, respectivamente, da reação de PCR. Dez amostras foram duplicadas e colocadas para controle das reações. A diversidade alélica (*h*) que analisa a variação dos diferentes alelos encontrados para mesmo *locus* dentro das amostras foi classificada como: altamente discriminante ( $h > 0,6$ ), moderadamente discriminante ( $0,3 \leq h \leq 0,6$ ) e pouco discriminante para ( $h < 0,3$ )<sup>13</sup>.

### **Análise estatística**

A versão 7.1 do software BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) foi utilizada para a análise molecular dos resultados de tipagem para técnicas de RFLP-IS6110 e MIRU, sendo construído um dendrograma com todas as análises para cada técnica a fim de mostrar o grau de similaridade dos isolados pelo método de grupo de par de média aritmética não ponderada (*Unweighted pair group method of arithmetic average* – UPGMA) e o índice de *Dice* com 1,5% de tolerância e 1,0% de otimização[3].

Padrões de RFLP-IS6110 foram registrados com fotografias digitalizadas, e resultados de tipagem do MIRU 12 *loci* com caracteres em tabela[7].

A significância estatística foi medida para a proporção de relações epidemiológicas confirmada ou sem confirmação de isolados que foram agrupados em RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR em comparação com o subgrupo de isolados agrupados por RFLP-IS6110 mas não por



MIRU-VNTR. A análise de regressão logística foi realizada para modelar a probabilidade de encontrar uma ligação epidemiológica se o isolado agrupado por RFLP-IS6110 foi confirmado ou não por MIRU-VNTR calculando o valor de  $p$  de acordo com o Qui-quadrado de Mantel-Haenszel e *Odss Ration* (OR) Exato de Fischer com Intervalo de Confiança (IC) de 95%. A relação entre a situação epidemiológica e o MIRU-VNTR dentro do mesmo *cluster* foi ajustado para o tamanho do *cluster*. Todas as variáveis foram analisadas pelo software OpenEpi versão 3.0.

O poder discriminatório descrito por Hunter & Gaston (1988)[14] foi utilizado para determinar se o método de tipagem molecular foi capaz de distinguir duas amostras selecionadas randomicamente de uma população. Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula disponível no endereço eletrônico [http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/discriminatory\\_power/](http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/), que se baseia no número total de isolados avaliados por um determinado método de tipagem molecular. O valor de D, que é o índice do poder discriminatório, pode variar de 0 a 1, onde 0 significa que todos os isolados de uma determinada população possuem tipos idênticos e 1 indicar que o método de tipagem foi capaz de distinguir cada isolado de uma determinada população de todos os demais. A taxa de *clusters* foi calculada de acordo com a equação descrita por Bidovec-Stojkovic *et al.* (2011)[15], onde  $T = (n_c - c) / n$ , em que  $n_c$  é o número total de amostras agrupadas,  $c$  é o número de agrupamentos encontrados e  $n$  é o número total de casos na amostra.

### **Agrupamento com base em RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR**

Para a comparação dos dois métodos de genotipagem foram analisadas as diferenças na distribuição de *cluster*, a correlação com os resultados de agrupamento e ligação epidemiológica.

A concordância no agrupamento de casos entre os dois métodos de tipagem foi calculado a partir de: (I) composições de fragmentação e idênticos perfis de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR; e (II) concordância na rotulagem como um *cluster* ou perfil único, de forma independente da composição do agrupamento.

Para comparações de desvio padrão dos isolados, os agrupamentos por RFLP-IS6110 foram considerados como padrão de referência.

### 6.3 Resultados

Das 204 culturas que foram submetidas a análise de genotipagem pelas técnicas de RFLP-IS6110, foi observada uma variação de 1 a 18 cópias do IS6110, sendo que 107 (52,4%) apresentaram de 10 a 14 cópias, 77 (37,7%) com 6 a 9 cópias, 11 (5,3%) tiveram menos de seis cópias, sete (3,6%) com 15 a 17 cópias e duas (1%) com 18 cópias. Foram identificados sete isolados TBMDR primário e todos tiveram de 8 a 15 cópias do IS6110. As amostras com menos de seis cópias não foram agrupadas em *cluster*.

De acordo com os dendrogramas foi observado que 32% (66/204) isolados no RFLP-IS6110 e 50,9% (104/204) isolados do MIRU-VNTR tiveram similaridade igual ou superior a 85%.

Um total de seis (2,9%) dos isolados, foram incluídos no banco de dados e indicados com um “espaço vazio” e tratados como um alelo específico do padrão devido a não amplificação.

Os MIRUs 26 e 40 tiveram um alto poder discriminatório com 9 alelos cada e os MIRUs 20 e 24 com menor poder discriminatório com dois alelos cada (Tabela 1).

Tabela 1 – Diversidade alélica de cada *locus* e o poder discriminatório

Locus	Diversidade Alélica (h)	Número de Alelos	Poder Discriminatório
MIRU 10	0,72	6	Alto
MIRU 16	0,74	7	Alto
MIRU 23	0,65	7	Alto
MIRU 26	0,72	9	Alto
MIRU 27	0,7	5	Alto
MIRU 40	0,64	9	Alto
MIRU 2	0,3	5	Moderado
MIRU 31	0,43	6	Moderado
MIRU 39	0,39	4	Moderado
MIRU 4	0,36	7	Moderado
MIRU 20	0,26	2	Baixo
MIRU 24	0,29	2	Baixo

Poder discriminatório: Alto ( $h > 0,6$ ), Moderado ( $0,3 \leq h \leq 0,6$ ) e Baixo ( $h < 0,3$ )

#### Comparação de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR

A concordância entre as duas técnicas de genotipagem foi de 87,7% (179/204), definido por 8 isolados nos *cluster* e 171 isolados com perfil único em ambos os métodos e pelo coeficiente de *Kappa* houve concordância de 0,76. Das 25 amostras restantes, 2,5% (5/204) foram agrupados apenas por RFLP-IS6110 e 9,8% (20/204) apenas por MIRU-VNTR. Dos *clusters* 25% (3/12) foram concordantes.

No total de 204 genótipos foram encontrados 191 perfis únicos para RFLP-IS6110 e 176 para o MIRU-VNTR. Nesse conjunto de dados, 6,4% (13/204) pertenciam a 5 *clusters* identificados por RFLP-IS6110 e 13,7% (28/204) dos isolados pertenciam a 12 *clusters* do MIRU-VNTR.

A distribuição dos tamanhos de fragmentação na base das duas técnicas de tipagem são altamente semelhantes para os agrupamentos com três ou quatro isolados, já para os grupos formados por dois isolados houve grande diferença devido a maior proporção de agrupamentos apresentadas pelo MIRU\_VNTR (Figura 1).

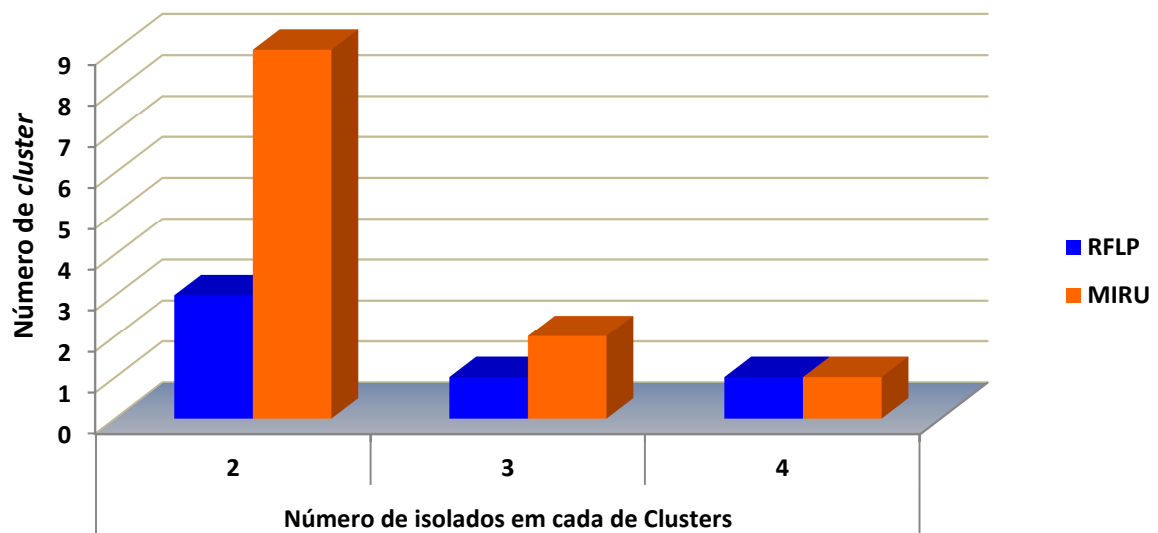


Figura 1 – Distribuição de combinações de *clusters* obtidos pelas técnicas RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR.

Foi observado que o RFLP-IS6110 discriminou mais os isolados bacterianos que o MIRU-VNTR 12 *loci*, agrupando apenas 6,4% das amostras em comparação com 13,7% do MIRU. A taxa de *cluster* do RFLP-IS6110 também foi menor que a do MIRU, sendo 3,2% e 4,3% respectivamente não houve diferença estatística para as taxas de *clusters* entre as técnicas ( $p > 0,005$ ). O poder discriminatório foi calculado para as técnicas de acordo com a tabela 2. Dos *clusters* identificados pelas técnicas dois foram idênticos em ambas, sendo os *clusters* formados pelo RFLP-IS6110 e tiveram relação epidemiológica.

Tabela 2 – Perfis encontrados e poder discriminatório comparando: RFLP-IS6110 versus MIRU

Método	Total de Perfis	Perfis Únicos	Perfis Agrupados	Poder Discriminatório
<b>RFLP-IS6110</b>	204	191	13	0,9994
<b>MIRU-VNTR 12 loci</b>	204	176	28	0,9990

### Composição de *cluster* para RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR.

Dentre os cinco *clusters* do RFLP-IS6110 relacionados a 13 cepas, 60% (3 *clusters*, incluindo um total de 7 isolados) exibiram tamanho e composição idênticos dos *clusters* do MIRU-VNTR, sendo uma amostra pertencente a um *cluster* no RFLP-IS6110 que não teve correspondência nos resultados obtidos no MIRU-VNTR.

A relação epidemiológica entre as cepas agrupadas foi confirmada em quatro pacientes, representando 31% (4/13) no RFLP-IS6110 comparada com 14% (4/28) do MIRU-VNTR, uma diferença significativa ( $p = 0,002$ ) (Figura 2).

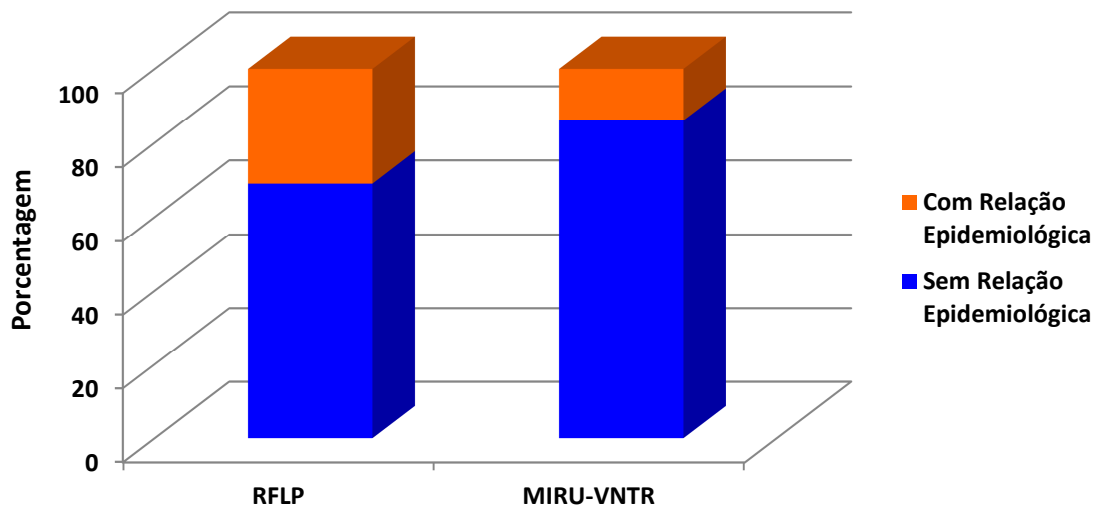


Figura 2 – Distribuição de cepas de *M. tuberculosis* nos *clusters* de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR com e sem relação epidemiológica.

## 6.4 Discussão

Esse é o primeiro estudo de genotipagem de *M. tuberculosis* empregando técnicas de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR, em Minas Gerais, estado com a segunda maior população do Brasil e com regiões em que a incidência de TB pode chegar a 115 por 100 mil habitantes. A esta variação de incidência de TB somam-se a extensão territorial, a quantidade de municípios (853) e as variações das condições sócio-econômicas para ampliar o desafio de controle da doença torna essencial o conhecimento da variabilidade genética e as condições de sua transmissão da no estado.

A alta variabilidade do número de cópias pelo RFLP-IS6110, bem como a estabilidade com o tempo, proporciona a essa técnica de tipagem instrumento útil para o diagnóstico epidemiológico [45], mas pode falhar quando cepas do *M. tuberculosis* têm padrões idênticos com isolados com baixo número de cópias do IS6110. Esse baixo número de cópias é um dos principais fatores que limitam a ampla aplicação desta técnica em países da Ásia como Índia e China e Tailândia [16,17,35,36,37,38]. Porém, no nosso estudo isso não foi relevante, devido ao baixo percentual (5,3%) de isolados com menos de 6 cópias do IS6110. Resultados semelhantes foram descritos em São Paulo, Goiás, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul [29,33,41,42].

Nossos resultados mostraram que o número de cópias do IS6110 variou de 8 a 15 nos isolados TBMDR. Em estudo realizado por ZHENG *et al.*. (2014) foi observado que baixo número de IS6110 de cepas não-Beijing eram TBMDR. Neste estudo isso não foi confirmado, pois a família dos isolados não foi estudada. Assim a genotipagem sistemática pode além de proporcionar análise da cadeia de transmissão, auxiliar na prevenção, propagação de cepas MDR e melhorar a gestão dos programas para o controle da TB[30]. Estudos estão sendo desenvolvido com o objetivo de inferir uma potencial implicação em realação ao número de cópias do IS6110 com mecanismos de resistência aos fármacos, virulência e eficiência na transmissão [34,41,51,52,53].

A maior proporção de isolados com índice de similaridade abaixo de 85% reflete o tipo de amostras coletadas naquele ano (casos novos). Em estudos realizados no Brasil os autores relataram índice de similaridade acima de 85%, demonstrando transmissão recente. Porém, nesses estudos foram incluídos amostragem de vários anos. [REF] 33,41,42

Os MIRUs 26 e 40 foram os mais polimórficos com nove alelos cada. Essa diversidade alélica mostrou-se de acordo com dados encontrados na França, China e outros estudos no Brasil [7,34,33]. Ao contrário os MIRUs 20 e 24, que possuem baixo poder discriminatório e

variação de apenas dois alelos indicando baixa taxa evolutiva nas diferentes famílias, ou seja, pouco poder de diferenciação entre as estirpes. Em nosso trabalho foi observado baixo poder discriminatório do MIRU 24 (0,29) e MIRU 20 (0,26) como descrito por SUPPLY *et al.* (2006), e ZHENG *et al.* (2014) [16,18,34], conseqüentemente a não utilização desses MIRUs não interfere na análise do resultado final.

Embora os resultados aqui apresentados tenham mostrado alto poder discriminatório para ambas as técnicas RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR com valor muito próximo de um [14], foi detecta um nível ligeiramente superior do poder discriminatório RFLP-IS6110 em comparação com MIRU-VNTR, devido ao fato de mais *clusters* terem sido identificados pelo MIRU-VNTR e mais perfis únicos detectados no RFLP-IS6110. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados por Allis-Beguec *et al.*, 2008 [22] na Bélgica e em alguns países como Alemanha, Eslovenia e Brasil [21, 23, 33].

BEER *et al.* em 2013 fizeram na Holanda um estudo comparativo entre RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR com 24 *locus* com isolados em um período de 5 anos [40], eles mostraram que, embora o nível de discriminação não tivesse diferença substancialmente entre os dois métodos, a concordância global, definida como isolados únicos ou identicamente distribuídos em grupos foi de 78,5% . Dos casos restantes, 12% só foram agrupados pelo MIRU-VNTR, apenas 7,7% por RFLP-IS6110 e 1,8% revelaram perfis completamente diferentes pelas duas técnicas. Nosso estudo mostrou resultados semelhantes com uma concordância geral 87,7%, agrupamento apenas pelo MIRU-VNTR de 9,8% e pelo RFLP-6110 de 2,5%.

Em relação aos *clusters*, houve uma concordância de 25%, sendo que dos isolados agrupados por ambas as técnicas 50% (4/8), tiveram relações epidemiológicas confirmadas. A análise separada da técnica do RFLP-IS6110 apresentou relação epidemiológica em 60% dos *clusters* formados e no MIRU-VNTR, a maioria dos agrupamentos formados (75%) não teve relações epidemiológicas[24]. Estes resultados sugerem que, quando o *cluster* foi identificado pelo RFLP-IS6110 houve maior relação epidemiológica do que com o MIRU-VNTR.

Observam-se como vantagens do RFLP-IS6110: a estabilidade genética do IS6110 que pode ser por períodos de até quatro anos e maior veracidade entre as relações epidemiológicas nos agrupamentos obtidos. Porém a quantidade de micobactérias e a qualidade da cultura necessárias para a realização do RFLP-IS6110 são considerados fatores limitantes, ao contrário do MIRU-VNTR que é mais instável e necessita de menor quantidade de DNA.

Embora as técnicas moleculares de genotipagem tenham evoluído muito no decorrer dos anos, cada marcador genético revela apenas pequena parte da informação genômica, e dependendo do marcador, diferentes estirpes exibirão genotipagem com perfis idênticos, sendo a análise

de toda a sequência do genoma a forma mais precisa para a comparação das estirpes. Outro problema amplamente reconhecido é a ocorrência de infecções múltiplas (mistas) que podem também dificultar os estudos moleculares sobre a transmissão da doença e descoberta do caso índice [43]. Assim, justifica-se a utilização de mais de uma técnica para estudo da epidemiologia molecular. Outro método que pode complementar as análises de genotipagem é o *Spoligotyping* [25,26,34], porém não foi realizado neste estudo.

Concluiu-se que poucos isolados foram semelhantes. O RFLP-IS6110 mostrou-se altamente discriminatório podendo ser usado em Minas Gerais. A comparação entre as duas técnicas mostrou um poder discriminatório do RFLP-IS6110 ligeiramente superior ao MIRU-VNTR e com maior relação epidemiológica quando os *clusters* foram analisados.

## Agradecimentos

Agradecemos a todos os profissionais que participaram desse estudo direta ou indiretamente com aplicação dos questionários. Aos profissionais Lida, Isabela, Carla e Ana Lethicia pelo apoio no laboratório de Biologia Molecular e aos profissionais Elza, Adriana, Wesley, Glaydson e Alan no desenvolvimento das atividades microbiológicas.

**Apoio:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

## Referências

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **WHO**, 2012;1:3-24.
2. Brasil. Ministério da Saúde. SINANWEB. Disponível em: <[http: www.sinanweb.gov.br](http://www.sinanweb.gov.br)>. Acesso em: 20 dezembro. 2013.
3. VAN EMBDEN JD, CAVE MD, CRAWFORD JT, DALE JW, EISENACH KD, GICQUEL B, HERMANS P, MARTIN C, MCADAM R, SHINNICK TM, SMALL PM. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J. Clin. Microbiol.** 1993; 31:406–409.

4. GARCIA DE VIEDMA D, MOKROUSOV I, RASTOGI N. Innovations in the epidemiology of tuberculosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2011; 29(Suppl 1):8 – 13.
5. VAN SOOLINGEN D, ARBEIT RD. Dealing with variation in molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*: low-intensity bands and other challenges. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50:749 –751.
6. DE BOER A. S.; BORGDORFF, M. W.; DE HAAS, P. E; NAGELKERKE, N. J. D.; VAN EMBDEN, J. D. A; VAN SOOLINGEN, D. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP-IS6110 patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *Journal Infect Diseases.* 1999; 180: 1238-1244.
7. SUPPLY P, ALLIX C, LESJEAN S, CARDOSO-OELEMANN M, RUSCHGERDES S, WILLERY E, SAVINE E, DE HAAS P, VAN DEUTEKOM H, RORING S, BIFANI P, KUREPINA N, KREISWIRTH B, SOLA C, RASTOGI N, VATIN V, GUTIERREZ MC, FAUVILLE M, NIEMANN S, SKUCE R, KREMER K, LOCHT C, VAN SOOLINGEN D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:4498–4510.
8. SUPLPLY, P.; MAZARS. E.; LESJEAN, S. VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, CAMILLE. Variable Human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiol.* 2000; 36: 762-771.
9. MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYREBNC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001; 98(4):1901-1906
10. MOSTROM, P.; GORDON, M.; SOLA, C.; RIDELL, M.; RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection.* 2002; 8(11): 694-704.



11. FOK, A.; NUMATA, Y.; SCHULZER, M.; FITZGERALD, M.J. Risk factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. *International Journal Tuberculosis Lung Disease*. 2008 May; 12(5): 480-492.
12. BORGDORFF, M.W.; VAN DE HOF, S.; KALISVAART, N.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D. Influence of Sampling on clustering and Associations With Risk Factors in the Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *American Journal of Epidemiology*. 2011; 174(2): 243-251.
13. SOLA, C.; FILLIOL, I.; LEGRAND, E.; LESJEAN, S.; LOCHT, C.; SUPPLY, P.; RASTOGI, N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolution genetics. *Infect Genetic Evolution*. 2003 (3): 125-133.
14. HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal Clinical Microbiology*. 1988 26: 2465-2466.
15. BIDOVEC-STOJKOVICA, U.; ZOLNIR-DOVCA, M.; SUPPLY, P. One year nationwide evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping on Slovenian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Respiratory Medicine*. 2011; 105(S1): 67-73.
16. RADHAKRISHNAN, I.; MANJU, Y.K.; KUMAR, R.A.; MUNDAYOOR, S. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India. *Journal Clinical Microbiology*. 2001; 39:1983.
17. VARMA-BRASIL, M.; KUMAR, S.; ARORA, J.; ANGRUP, A.; ZOZIO, T.; BANAVALLIKER, J.N.; SINGH, U.B.; RASTOGI, N.; BOSE, M. Comparison of spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive units typing and IS6110-RFLP-IS6110 in a study of genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Delhi, North India. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011; 106: 524-535.

18. SUPPLY, P.; ALLIX-BEGUEC, H.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RUSCH-GERDES, S.; WILLERY, E.; SAVINE, E.; HAAS, P.; VAN DEUTEKOM, H.; RORING, S.; BIFANI, P.; KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; VATIN, V.; GUTIERREZ, M.C.; FAUVILLE, M.; NIEMANN, S.; SKUCE, R.; KREMER, K.; LOCHT, C.; VAN SOOLINGEN, D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed unit variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Clinical Microbiology*. 2006; 44: 4498-4510.
19. SUPPLY P, WARREN RM, BANULS AL, LESJEAN S, VAN DER SPUY GD, LEWIS LA, TIBAYRENC M, VAN HELDEN PD, LOCHT C. Linkage disequilibrium between minisatellite *loci* supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol. Microbiol*. 2003; 47:529 –538.
20. HIRSH AE, TSOLAKI AG, DERIEMER K, FELDMAN MW, SMALL P. M. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2004; 101:4871– 4876.
21. ROETZER A, SCHUBACK S, DIEL R, GASAU F, UBBEN T, DI NAUTA A, RICHTER E, RUSCH-GERDES S, NIEMANN S. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* typing methods in a 4-year study in Schleswig-Holstein, Northern Germany. *J. Clin. Microbiol*. 2011; 49:4173– 4178.
22. ALLIX-BEGUEC C, FAUVILLE-DUFAUX M, SUPPLY P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*. 2008; 46:1398 –1406.
23. BIDOVEC-STOJKOVIC U, ZOLNIR-DOVC M, SUPPLY P. One year nationwide evaluation of 24-*locus* MIRU-VNTR genotyping on Slovenian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Respir. Med*. 2011; 105(Suppl 1):S67–S73.
24. VAN DEUTEKOM H, SUPPLY P, DE HAAS PE, WILLERY E, HOIJNG SP, LOCHT C, COUTINHO RA, VAN SOOLINGEN D. Molecular typing of

- Mycobacterium tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unitvariable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4473– 4479.
25. OELEMANN MC, DIEL R, VATIN V, HAAS W, RUSCH-GERDES S, LOCHT C, NIEMANN S, SUPPLY P. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:691– 697.
26. HANEKOM M, VAN DER SPUY GD, GEY VAN PITTIUS NC, MCEVOY CR, HOEK KG, NDABAMBI SL, JORDAAN AM, VICTOR TC, VAN HELDEN PD, WARREN RM. Discordance between mycobacterial interspersed repetitiveunit-variable-number tandem-repeat typing and IS6110 restriction fragment length polymorphism genotyping for analysis of Mycobacterium tuberculosis Beijing strains in a setting of high incidence of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:3338 –3345.
27. FERDINAND, S.; MILLET, J.; ACCIPE, A.; CASSADOU, S.; CHAUD, P.; LEVY, M.; THÉODORE, M.; RASTOGI, N. Use of genotyping based clusterin to quantify recent tuberculosis transmission in Guadeloupe during a seven years period: analysis of risk factors and access to health care. *BMC Infectious Diseases.* 2013; 13: 364.
28. DALE, J.W.; NOR, R.M.; RAMAYAH, S.; TANG, T.H.; ZAINUDDIN, Z.F. Molecular Epidemiology of tuberculosis in Malaysia. *Journal Clinical Microbiology.* 1999; 37: 1265-1268.
29. FERRAZOLI, L.; PALACI, M.; MARQUES, L.R.; JAMAL, L.F.; AFIUNE, J.B.; CHIMARA, E.; MARTINS, M.C.; SILVA TELLES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.; PALHARES, M.C.; SPADA, D.T.; RILEY, L.W. Transmission of tuberculosis in na endemic urban setting in Brazil. *International Journal Tuberculosis Lung Disease.* 2000; 4: 18-25.

30. PERIZZOLO, P. F.; COSTA, E. R. C.; RIBEIRO, A. W.; SPIES, F. S.; RIBEIRO, M. O.; DIAS, C. F.; UNIS, G.; SILVA, P. A.; GOME, H. M.; SUFFYS, P.; ROSSETTI, M. L. R. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. *Tuberculosis*. 2012; 92: 56-59.
31. NOGUTI, E.N.; LEITE, C.Q.; MALASPINA, A.C.; HIRATA, M.H.; MAMIZUKA, E.M.; CARDOSO, R.F. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic stting in northwestern state of Parana in Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 779-785.
32. COSTA, E. R. D.; LAZZARINI, L. C. O.; PERIZZOLO, P. F.; DIAZ, C.A.; SPIES, F. S.; COSTA, L. L.; RIBEIRO, A.W.; BARROCO, C.; SCHUCH, S. J.; PEREIRA, M. A. S.; DIAS, C. F.; GOMES, H. M.; UNIS, G.; ZAHA, A.; SILVA, P. E. A.; SUFFYS, P. N. *Mycobacterium tuberculosis* of the RD<sup>Rio</sup> Genotype is the Predominant Cause and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *Journal Clinical Microbiology*. 2013; 51(4): 1071-1077.
33. PEREIRA, A. M.; SANTOS, L. C.; FERNANDES, H. B.; ALVES, S. L. A. A.; KIPNIS, P. J.; KIPNIS, A. Análise Molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos em Goiânia, Goiás, por meio do RFLP-IS6110-IS6110 e do 15 *loci* MIRU-VNTR. *Revista de Patologia Tropical*. 2013; 42(3): 275-288.
34. ZHENG, C.; ZHAO, YUDING,; ZHU, GUOQIANG,; LI, S.; SUN, H.; FENG, Q.; LUO, M.; WU, F.; XUENFENG, L.; HILL, V.; RASTOGI, N.; SUN, Q. Suitability of IS6110-RFLP and MIRU-VNTR for Differentiating Spoligotyped Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Sichuan in China. *BioMed Research International*. Vol. 2014, Article ID 763204, 11 pages, 2014. doi:10.1155/2014/763204.
35. THONG-ON, A.; SMITTIPAT, N.; JUTHAYOTHIN, T. *et al.*. Variable number tandem repeats typing of *Mycobacaterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 in Thailand. *Tuberculosis*. 2010; 10(1): 9-15.
36. JOSEPH, B.V; SOMAN, S.; RADHAKRISHMAN, *et al.*. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kerala, India using IS6110-RFLP,

- spoligotyping and MIRU-VNTRs. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013; 16:157-164.
37. ZHAO, Y.; FENG, Q.; TANG, K.; *et al.*. The population structure of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Sichuan in China. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(4): 718-724.
38. RADHAKRISHANAN, I.; MANJU, Y.K.; KUMAR, R.A.; MUNDAYOOR, S. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(4): article 1683.
39. PERIZZOLO, P.F.; DALA COSTA, E.R.; RIBEIRO, A.W. *et al.*. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. *Tuberculosis*. 2012; 92(1):56-59.
40. BEER, J.L.; VAN INGEN, J.; VRIES, G.; ERKENS, C.; SEBEK, M.; MULDER, A.; SLOOT, R.; VAN DEN BRANDT, A.M.; ENAIMI, M.; KREMER, K.; SUPPLY, P.; VAN SOOLINGEN, D. Comparative Study of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism and Variable-Number Tandem-Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in the Netherlands, Based on a 5-Year Nationwide Survey. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(4): 1193-1198.
41. FANDINHO, F.C.O.; KRITSKI, A.L.; HOFER, C.; CONDE JR. H.; FERREIRA, R.M.C.; SAAD, M.H.F.; SILVA, M.G.; RILEY, L.W.; FONSECA, L.S. RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000; 94: 271-275.
42. BORGES, M.; CAFRUNE, P.I.; POSSUELO, L.G.; VALIM, A. R.M.; RIBEIRO, M.O.; ROSSETTI, M.L. Molecular Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain from an outpatient clinic in Porto Alegre, (RS). *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2004; 30(4): 448-454.

43. SMALL, P.M.; HOPEWELL, P.C.; SINGH, S.P.; PAZ, A.; PARSONNET, J.; RUSTON, D.C.; SCHECTER, G.F.; DALEY, C.L.; SCHOOLNIK, G.K. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *New England Journal of Medicine*. 1994; 330: 1703-1709.
44. VAN RIE, A.; WARREN, R.; RICHARDSON, M.; VICTOR, T.C.; GIE, R.P.; ENARSON, D.A.; BEYERS, N.; VAN HELDEN, P.D. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *New England Journal of Medicine*. 1999; 341: 1174-1179.
45. MOSTROM, P.; GORDON, M.; SOLA, C.; RIDELL, M.; RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002; 8:694-704.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de RFLP-IS6110 apesar de ser bem trabalhosa teve boa reprodutibilidade em nosso laboratório podendo ser considerado com fator dificultador o software para interpretação dos resultados devido ao custo. Já o MIRU-VNTR apesar de ser mais rápido e necessitar de pequena quantidade de DNA, mostrou dificuldade na padronização do MIRU 20 e 24 que em vários momentos não apresentaram ampliações sendo necessárias várias repetições.

Houve a necessidade de acréscimo do Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% na quantidade de 5 $\mu$ L por reação, para evitar a formação de bandas inespecíficas na Reação em Cadeia da Polimerase.

Vários trabalhos mostram a perspectiva de otimização do MIRU-VNTR a fim de melhorar o poder discriminatório com menor quantidade de reações utilizando somente alguns MIRUs e ETRs com maior grau de discriminação.

Para análise mais completa será necessário a implantação da técnica de *Spoligotyping* para melhorar avaliação das linhagens das cepas circulantes em cada região.

## **8 PERSPECTIVAS**

Realizar as técnicas moleculares de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR na rotina laboratorial do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas/Diagnóstico de Micobactérias da FUNED, para ampliar o conhecimento da diversidade genética das cepas circulantes no estado e sua transmissão, contribuindo para o programa de controle da TB estadual.



## 9 REFERÊNCIAS

ALLAND, D.; LACHER, D.W.; HAZBON, M.H.; MOTIWALA, A.S.; QI, W.; FLEISHAMANN, R.D.; WHITTAM, T.S. Role of Large Sequence Polymorphisms (LSPs) in Generating Genomic Diversity among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and the Utility of LSPs in Phylogenetic Analysis. **Journal Clinical Microbiology**. 2007, 45(1): p.39.

AUGUSTO, C.J; CARVALHO, W.S; GONÇALVES, A.D.; CECCATO, M.G.B.; MIRANDA, S.S.; Características da tuberculose no estado de Minas Gerais entre 2002 a 2009. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 2013; 39(3): 357-364.

BARLETTA, F.; OTERO, L.; COLLANTES, J.; ASTO, B.; JONG, B.C.; SEAS, C.; RIGOUTS, L. Genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* complex in patients with no known risk factors for MDR-TB in the North-eastern part of Lima, Peru. **BMC Infectious Diseases**. 2013; 13: 397.

BEER, J.L.; VAN INGEN, J.; VRIES, G.; ERKENS, C.; SEBEK, M.; MULDER, A.; SLOOT, R.; VAN DEN BRANDT, A.M.; ENAIMI, M.; KREMER, K.; SUPPLY, P.; VAN SOOLINGEN, D. Comparative Study of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism and Variable-Number Tandem-Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in the Netherlands, Based on a 5-Year Nationwide Survey. **Journal of Clinical Microbiology**. 2013; 51(4): 1193-1198.

BORGDORFF, M.W.; VAN DE HOF, S.; KALISVAART, N.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D. Influence of Sampling on *clustering* and Associations With Risk Factors in the Molecular Epidemiology of Tuberculosis. **American Journal of Epidemiology**. 2011; 174(2): 243-251.

BIDOVEC-STOJKOVICA, U.; ZOLNIR-DOVCA, M.; SUPPLY, P. One year nationwide evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping on Slovenian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Respiratory Medicine**. 2011 105(S1): 67-73.

Brasil. Ministério da Saúde. SINANWEB. Disponível em: <<http://www.sinanweb.gov.br>>. Acesso em: 13 abril. 2013.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Helio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2 ed. Rio de Janeiro; 1994, 74p.

Brasil. Ministério da Saúde. Uma Proposta de Integração – Ensino Serviço. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, 2002. p.17-66.

Brasil. Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 2010; p. 14-28.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília, DF; 2008, p. 323-365.

Brasil. Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde / Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília - DF, 2008.

COLE, S. T.; Comparative mycobacterial genomics. **Genomics**, 1998, 1:567-571.

COSTA, E. R. D.; LAZZARINI, L. C. O.; PERIZZOLO, P. F.; DIAZ, C.A.; SPIES, F. S.; COSTA, L. L.; RIBEIRO, A.W.; BARROCO, C.; SCHUCH, S. J.; PEREIRA, M. A. S.; DIAS, C. F.; GOMES, H. M.; UNIS, G.; ZAHA, A.; SILVA, P. E. A.; SUFFYS, P. N. *Mycobacterium tuberculosis* of the RD<sup>Rio</sup> Genotype is the Predominant Cause and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil. **Journal Clinical Microbiology**. 2013; 51(4): 1071-1077.

COWAN, L.S.; MOSHER, L.; DIEM, L.; MASSEY, J.P.; CRAWFORD, J.T. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. **Journal Clinical Microbiology**. 2002; 40: 1592-1602, 2002.

COWAN, L.S.; DIEM, L.; MONSON, T.; WAND, P.; TEMPORADO, D.; OEMIG, T.V.; CRAWFORD, J.T. Evaluation fo a Two-Step Approach for Large-Scale, Prospective Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, feb. 2005, p.688-695.

DALCOMO, M.P.; ANDRADE, M.K.N.; PICON, P.D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Revista de Saúde Pública**. 2007; 41(1): 34-42.

DALE, J.W.; NOR, R.M.; RAMAYAH, S.; TANG, T.H.; ZAINUDDIN, Z.F. Molecular Epidemiology of tuberculosis in Malaysia. **Journal Clinical Microbiology**. 1999; 37: 1265-1268.

DONOGHUE, H.; SPIGELMAN, M.; GREENBLATT, C.L.; LEV-MAOR, G.; BAR-GAL, G.K.; MATHESON, C.; VERNON, K.; NERLICH, A.G.; ZINK, A.R. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. **Lancet Infect Disease**, 2004; 4: p.584-592.

FERDINAND, S.; MILLET, J.; ACCIPE, A.; CASSADOU, S.; CHAUD, P.; LEVY, M.; THÉODORE, M.; RASTOGI, N. Use of genotyping based *clusterin* to quantify recent tuberculosis transmission in Guadeloupe during a seven years period: analysis of risk factors and access to health care. **BMC Infectious Diseases**. 2013; 13: 364.

FERRAZOLI, L.; PALACI, M.; MARQUES, L.R.; JAMAL, L.F.; AFIUNE, J.B.; CHIMARA, E.; MARTINS, M.C.; SILVA TELLES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.; PALHARES, M.C.; SPADA, D.T.; RILEY, L.W. Transmission of tuberculosis in na endemic urban setting in Brazil. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**. 2000; 4: 18-25.

FILLIOL, I.; SOLA, C.; LEGRAND, E.; RASTOGI, N. Genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in the Guiana-Antilles region. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, 1990 dec; 92(5): 292-298.

FOK, A.; NUMATA, Y.; SCHULZER, M.; FITZGERALD, M.J. Risk factors for *clustering* of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**. 2008 May; 12(5): 480-492.

GROENEN, P.M.; BUNSCHOTEN, A.E.; VAN SOOLINGEN, D.; VAN EMBDEN, J.D. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat *cluster* of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Molecular Microbiology**, 1993, dec; 10(5): 1057-1065.

GUTACKER, M.M.; MATHEMA, B.; SOINI, H.; SHASSHKINA, E.; KREISWIRTH, B.N.; GRAVISS, E.A.; MUSSER, J.A.M. Single-Nucleotide Polymorphism-Based Population Genetic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strains from 4 Geographic Sites. **The Journal of Infectious Diseases**, 2006; 193: p.121-128.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal Clinical Microbiology**. 1988 26: 2465-2466.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; D VAN SOOLINGEN; KUIPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal Clinical Microbiology**, 1997; 35(4): p.907.

MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYREBNC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2001; 98(4):1901-1906.

MOSTROM, P.; GORDON, M.; RIDELL, M.; RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. **Clinical Microbiology Infect**. 2002; 8(11): 694-704.

MOSTOWY, S.; COUSINS, D.; BRINKMAN, J.; ARANAZ, A.; BEHR, M.A. Genomic Deletions Suggest a Phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **The Journal of Infectious Diseases**, 2002; 186: p.74-80.

Museu digital da tuberculose [home Page on the internet]. São Paulo: Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia. [updated 2011 Jan 23; cited 2011 Ago 25]. Available from: <<http://www.sppt.org.br>>.

NOGUTI, E.N.; LEITE, C.Q.; MALASPINA, A.C.; HIRATA, M.H.; MAMIZUKA, E.M.; CARDOSO, R.F. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Parana in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2010; 105: 779-785.

OELEMANN, M.C.; GOMES, H.M.; WILLERY, E.; POSSUELO, L.; BATISTA LIMA, K.V.; ALLIX-BEGUEC, C.; LOCHT, C.; GOGUET DE LA SALMONIERE, Y.O.; GUTIERREZ, M.C.; SUFFYS, P.; SUPPLY, P. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. **PLoS One**. 2011; 6: 18256.

PEREIRA, A. M.; SANTOS, L. C.; FERNANDES, H. B.; ALVES, S. L. A. A.; KIPNIS, P. J.; KIPNIS, A. Análise Molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos em Goiânia, Goiás, por meio do RFLP-IS6110 e do 15 loci MIRU-VNTR. **Revista de Patologia Tropical**. 2013; 42(3): 275-288.

PERIZZOLO, P. F.; COSTA, E. R. C.; RIBEIRO, A. W.; SPIES, F. S.; RIBEIRO, M. O.; DIAS, C. F.; UNIS, G.; SILVA, P. A.; GOME, H. M.; SUFFYS, P.; ROSSETTI, M. L. R. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. **Tuberculosis**. 2012; 92: 56-59.

RADHAKRISHNAN, I.; MANJU, Y.K.; KUMAR, R.A.; MUNDAYOOR, S. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India. **Journal Clinical Microbiology**. 2001; 39:1983.

SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K.E. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 1997; 94: 9869-9874.

SOLA, C.; FERDINAND, S.; MAMMINA, C.; NASTASI, A.; RASTOGI, N. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily Based on Spoligotyping and Variable Number of Tandem DNA Repeats and Comparison with a Spoligotyping Database for Population-Based Analysis. **Journal Clinical Microbiology**, 2001; 39(4): 1559-1565.

SOLA, C.; FILLIOL, I.; LEGRAND, E.; LESJEAN, S.; LOCHT, C.; SUPPLY, P.; RASTOGI, N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolution genetics. **Infect Genetic Evolution**. 2003 (3): 125-133.

SUPPLY, P.; MAGDALENA, J.; HIMPENS, S.; LOCHT, C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. **Molecular Microbiology**, 1997; 28(5): 991-1103.

SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; SOOLINGEN, D.; LOCHT, C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. **Journal Clinical Microbiology**. 2001; 30(10): p. 3563-3571.

SUPPLY, P. *Multilocus* Variable number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* – **Technical Guide**. Institut de Biologie / Institut Pasteur de Lille. 2005.

SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RUSCH-GERDES, S.; WILLERY, E. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2006; 44(12): 4498–4510.

SUPPLY, P. *Multilocus* Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical Guide, Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille. 2005. Available from: [http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU – VNTR typingmanualv6.pdf](http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU%20-%20VNTR%20typingmanualv6.pdf).

SUPPLY, P.; ALLIX-BEGUEC, H.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RUSCH-GERDES, S.; WILLERY, E.; SAVINE, E.; HAAS, P.; VAN DEUTEKOM, H.; RORING, S.; BIFANI, P.; KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; VATIN, V.;

GUTIERREZ, M.C.; FAUVILLE, M.; NIEMANN, S.; SKUCE, R.; KREMER, K.; LOCHT, C.; VAN SOOLINGEN, D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed unit variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal Clinical Microbiology**. 2006; 44: 4498-4510.

THIERRY, D.; BRISSON-NOEL, A.; VICENT-LEVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. **Journal Clinical Microbiology**. 1990 28(12): 2668-2673.

THIERRY, D.; CAVE, M.D.; EISENACH, K.D.; CRAWFORD, J.T.; BATES, J.H.; GICQUEL, B.; GUESDON, J.L. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Nucleic Acids Research**. 1990 18(1): 188.

TSOLAKI, A.G.; GAGNEUX, S.; PYM, A.S.; LA SALMONIERE, Y.O.L.G.; KREISWITH, B.N.; VAN SOOLINGEN, D.; SMALL, P.M. Genomic Deletions Classify the Beijing/W Strains as a Distinct Genetic Lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**. 2005; 43(7): p.3185.

VAN EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T.; DALE, J.W.; GICQUEL, B. *et al.*. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. **Journal Clinical Microbiology**. 1993; 31: 406-409.

VARMA-BRASIL, M.; KUMAR, S.; ARORA, J.; ANGRUP, A.; ZOZIO, T.; BANAVALLIKER, J.N.; SINGH, U.B.; RASTOGI, N.; BOSE, M. Comparison of spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive units typing and IS6110-RFLP in a study of genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Delhi, North India. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2011; 106: 524-535.

World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **WHO**, 2012;1:3-24.

## 10 APÊNDICE

### 10.1 Apêndice A - Representatividade das amostras

	NOTIFICAÇÕES DE CASOS NOVOS	CULTURAS POSITIVAS	CONTAMINADAS /SEM CRESCIMENTO	TOTAL	PORCENTAGEM DE COBERTURA	EXTRAÇÃO REALIZADA	RFLP / MIRU - REALIZADOS
BELO HORIZONTE (HJK / HEM / OSWALDO CRUZ)	818	134	11	123	16,4	126	41
BETIM	89	33	1	32	37,1	28	14
CATAGUASES	17	6	0	6	35,3	5	0
CONTAGEM	163	31	3	28	19,0	30	6
COR. FABRICIANO	57	14	3	11	24,6	11	5
GOV VALADARES	112	24	2	22	21,4	22	7
IBIRITÉ	41	12	4	8	29,3	12	2
IPATINGA	80	30	0	30	37,5	29	17
ITAJUBÁ	19	14	2	12	73,7	12	3
JUIZ DE FORA	185	40	2	38	21,6	36	11
MONTES CLAROS	122	37	3	34	30,3	36	9
NOVA LIMA	30	4	0	4	13,3	4	0
PARACATU	13	4	1	3	30,8	4	1
POÇOS DE CALDAS	1	14	1	13	1400,0	13	4
SANTA LUZIA	72	7	2	5	9,7	6	3
SÃO JOÃO DEL REI	10	10	2	8	100,0	13	5
SETE LAGOAS	34	13	3	10	38,2	13	3
TRÊS CORAÇÕES	27	19	1	18	70,4	19	11
UBERABA	54	10	1	9	18,5	10	4
VARGINHA	26	15	2	13	57,7	15	6
<b>TOTAL</b>	<b>1970</b>	<b>471</b>	<b>44</b>	<b>427</b>		<b>444</b>	<b>152</b>

CASOS NOVOS MG 2007

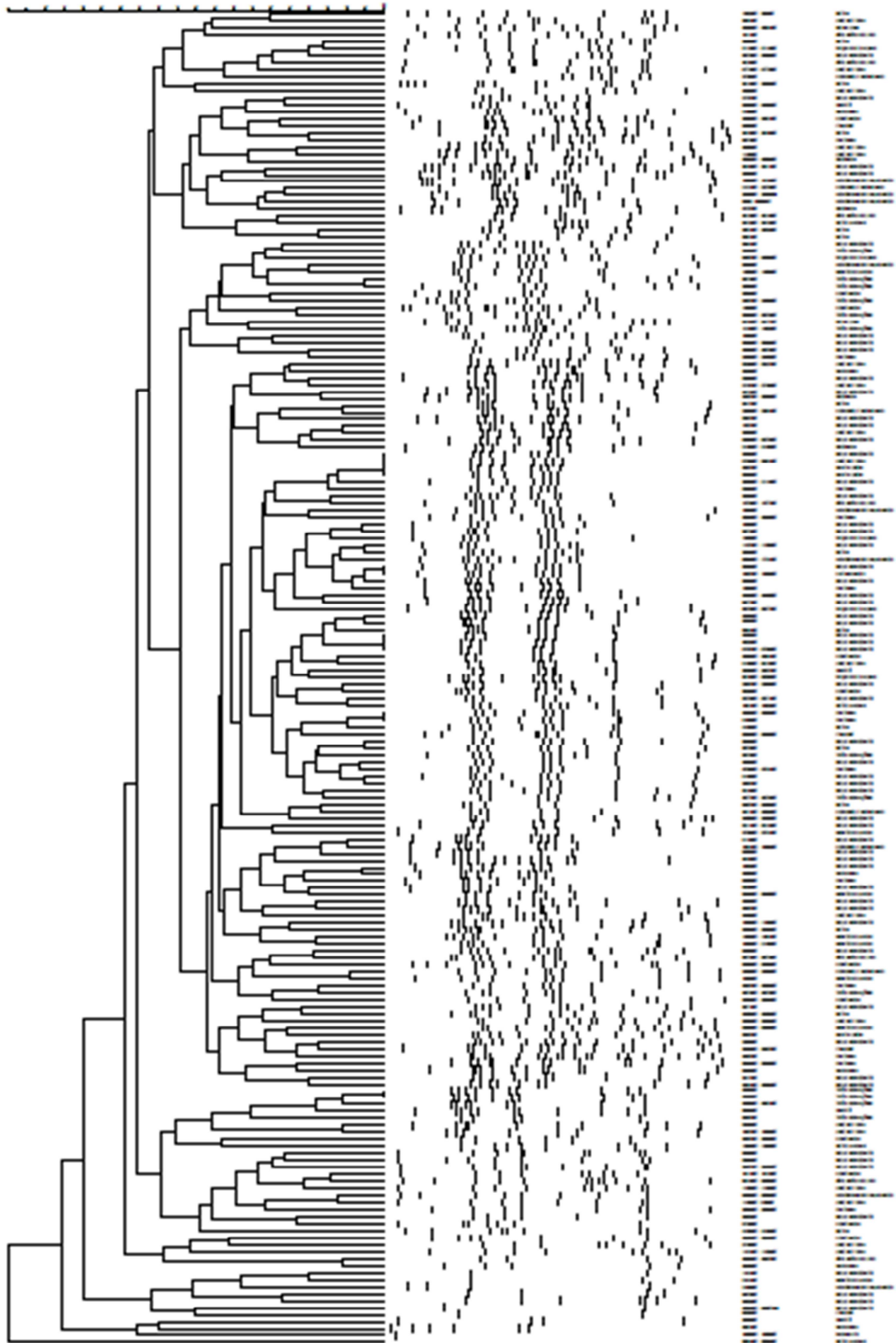
4792

41,1%



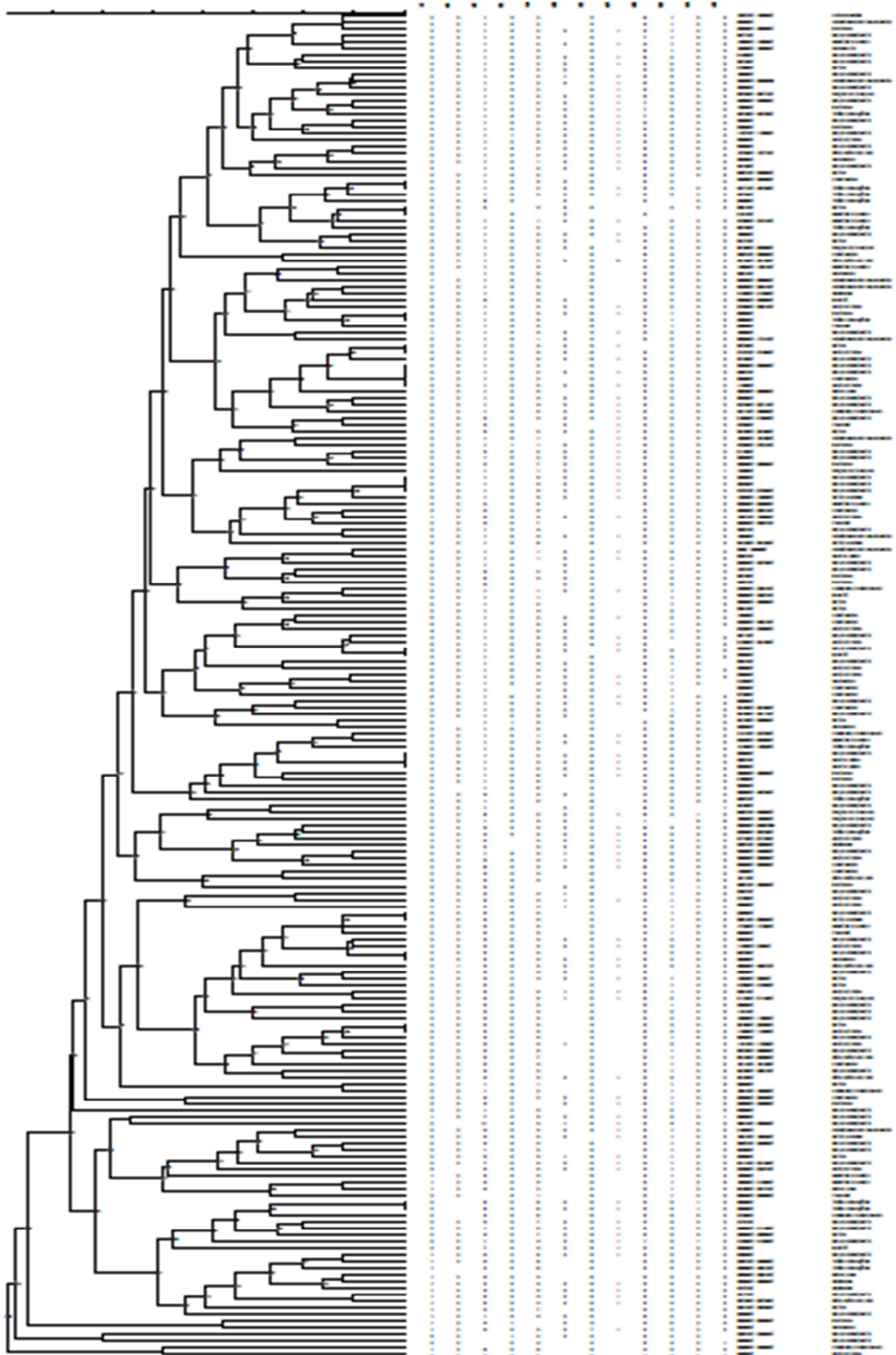
### 10.2 Apêndice – B Dendrograma RFLP-IS6110 / Todos os municípios

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



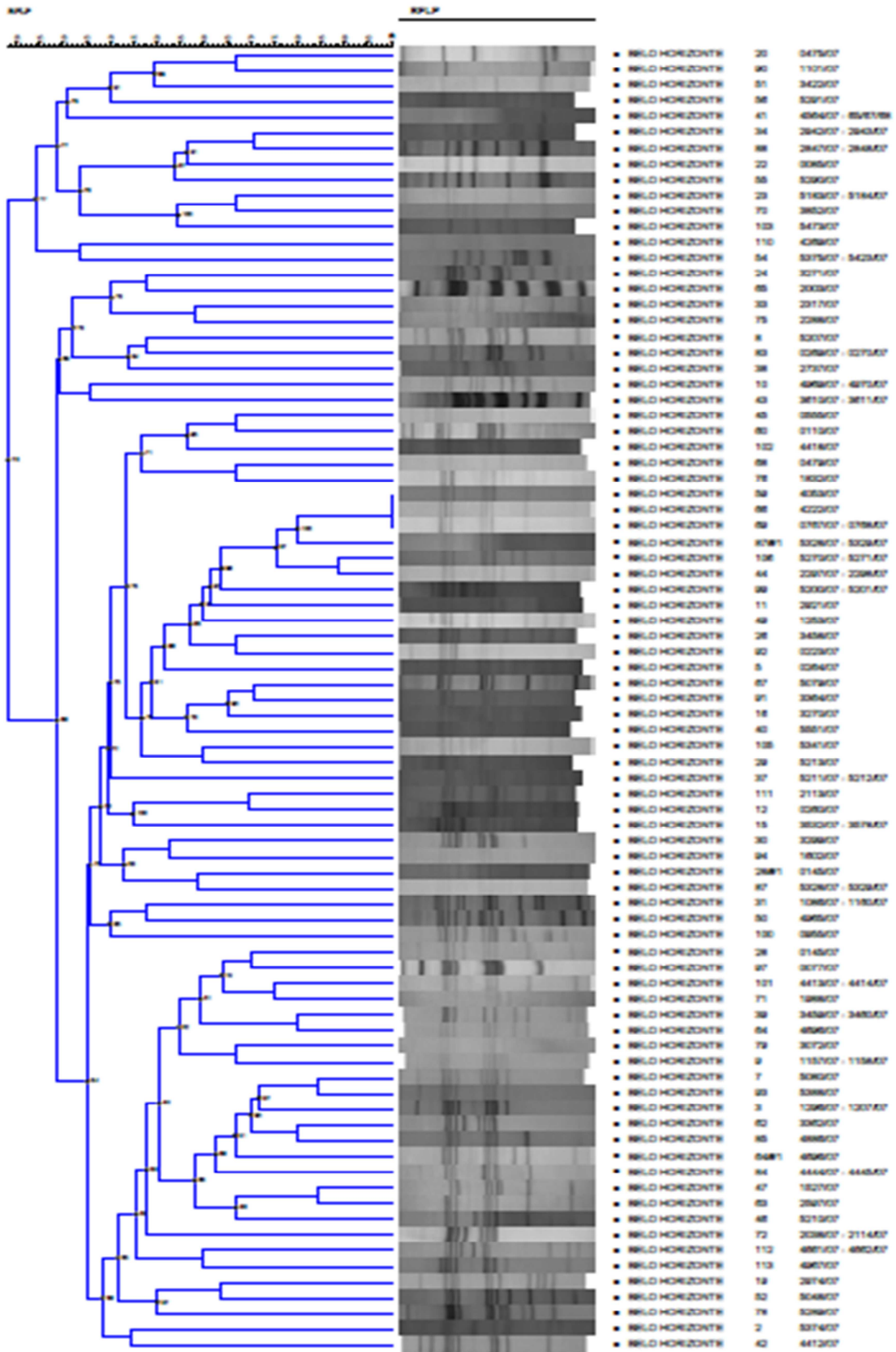
### 10.3 Apêndice – C Dendrograma MIRU-VNTR

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



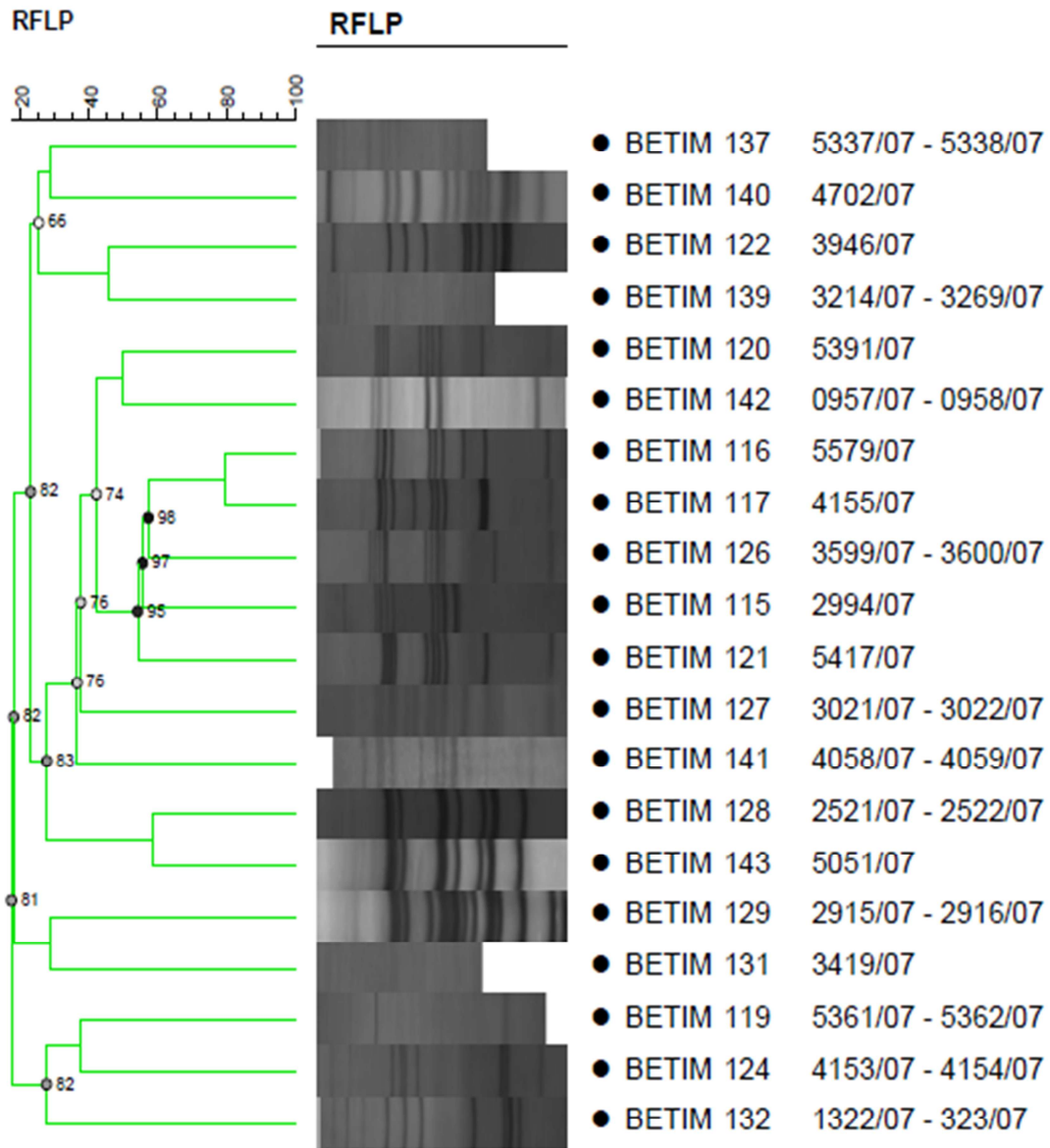
### 10.4 Apêndice – D Dendrograma RFLP-IS6110 – Belo Horizonte

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



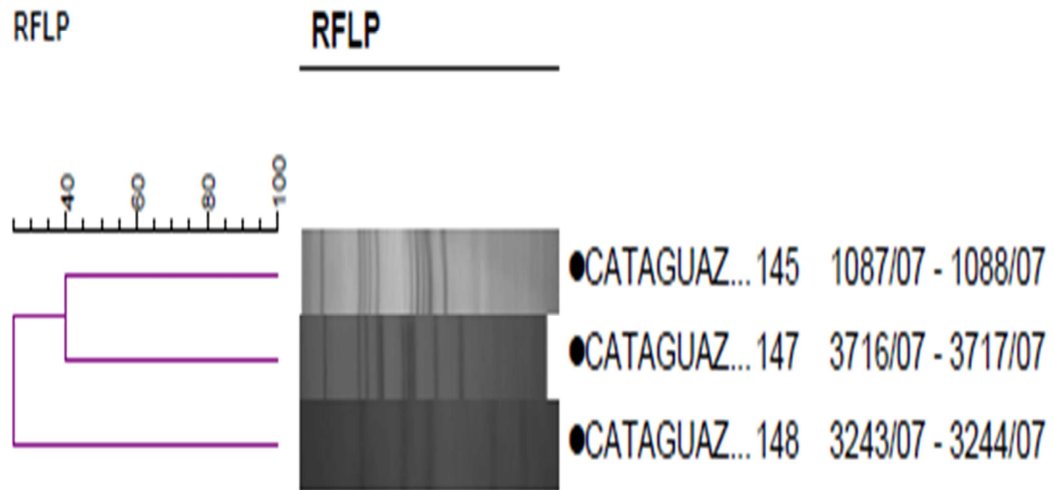
### 10.5 Apêndice – E Dendrograma RFLP-IS6110 – Betim

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



### 10.6 Apêndice – F Dendrograma RFLP-IS6110 – Cataguazes

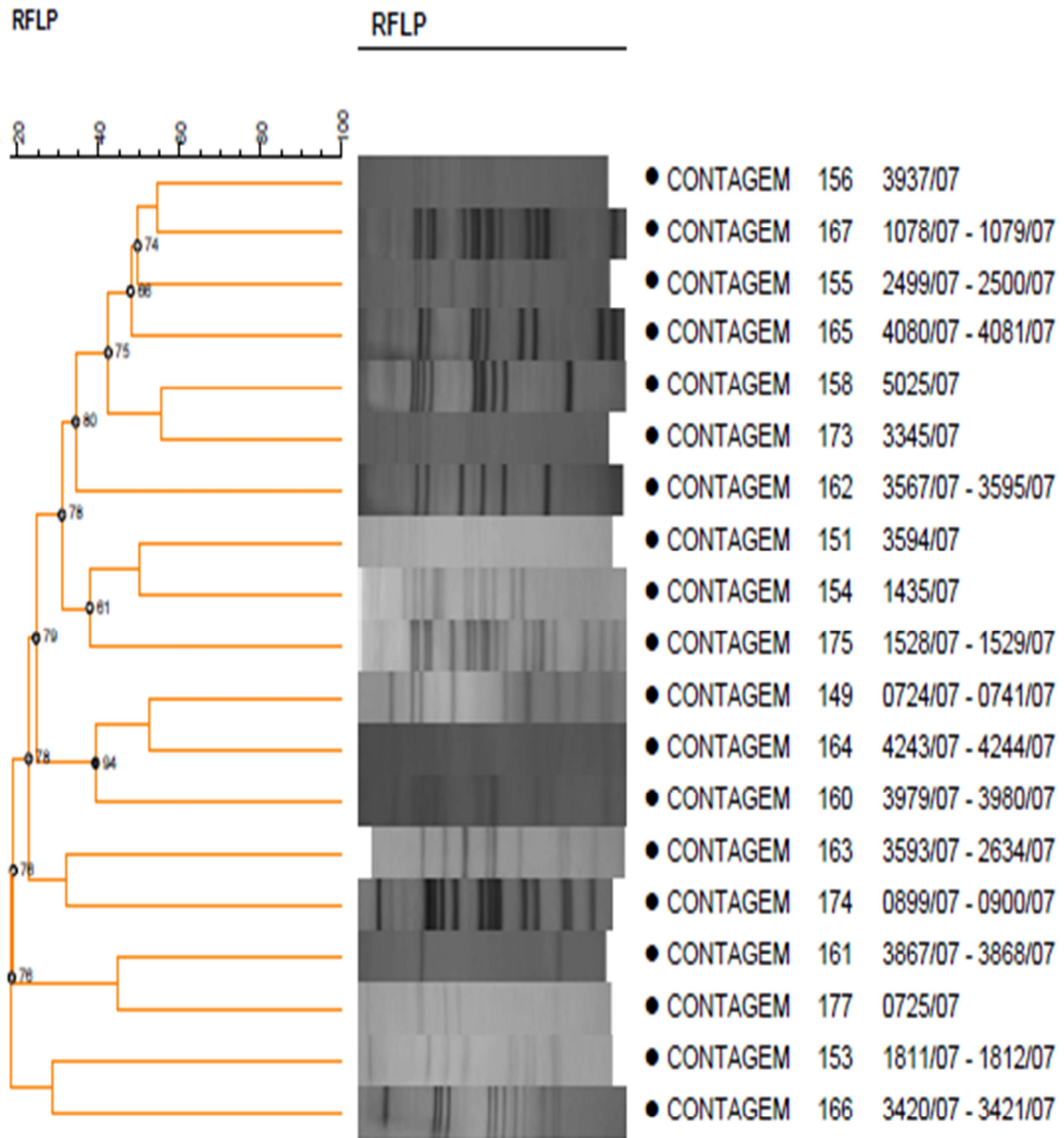
Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.





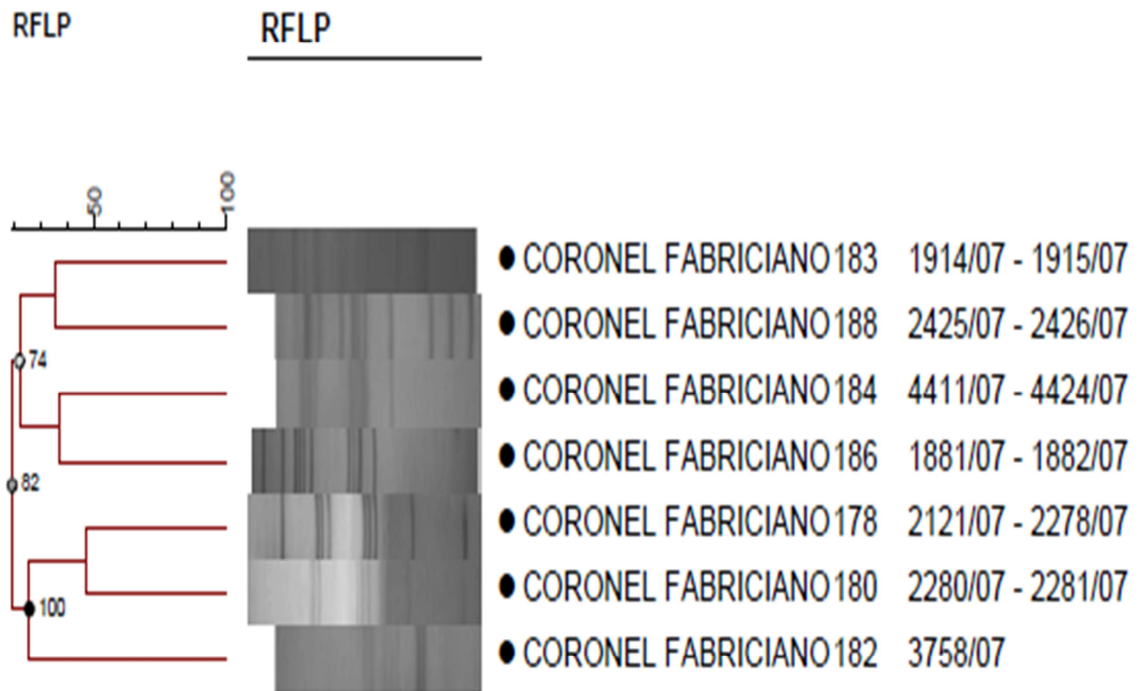
### 10.7 Apêndice – G Dendrograma RFLP-IS6110 – Contagem

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



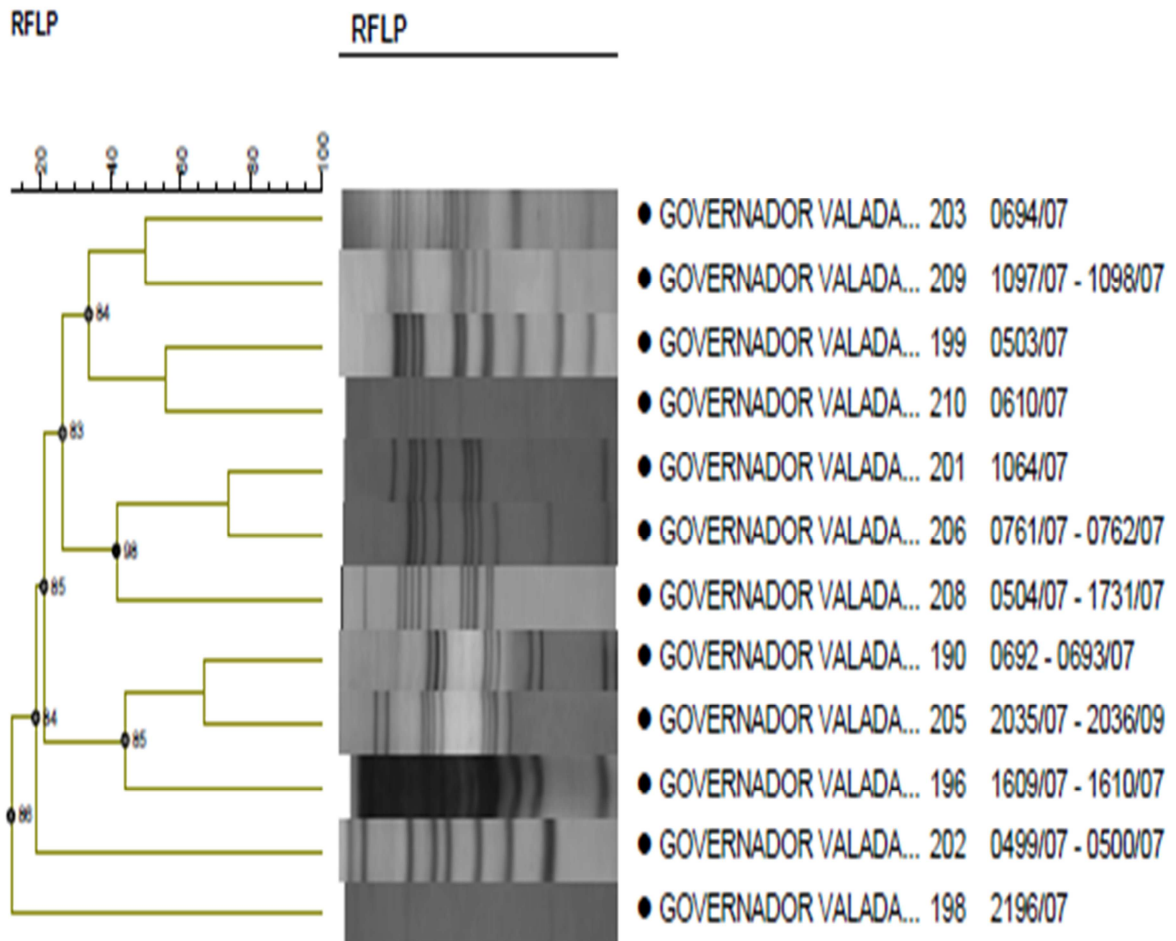
### 10.8 Apêndice – H Dendrograma RFLP-IS6110 – Coronel Fabriciano

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



### 10.9 Apêndice – I Dendrograma RFLP-IS6110 – Governador Valadares

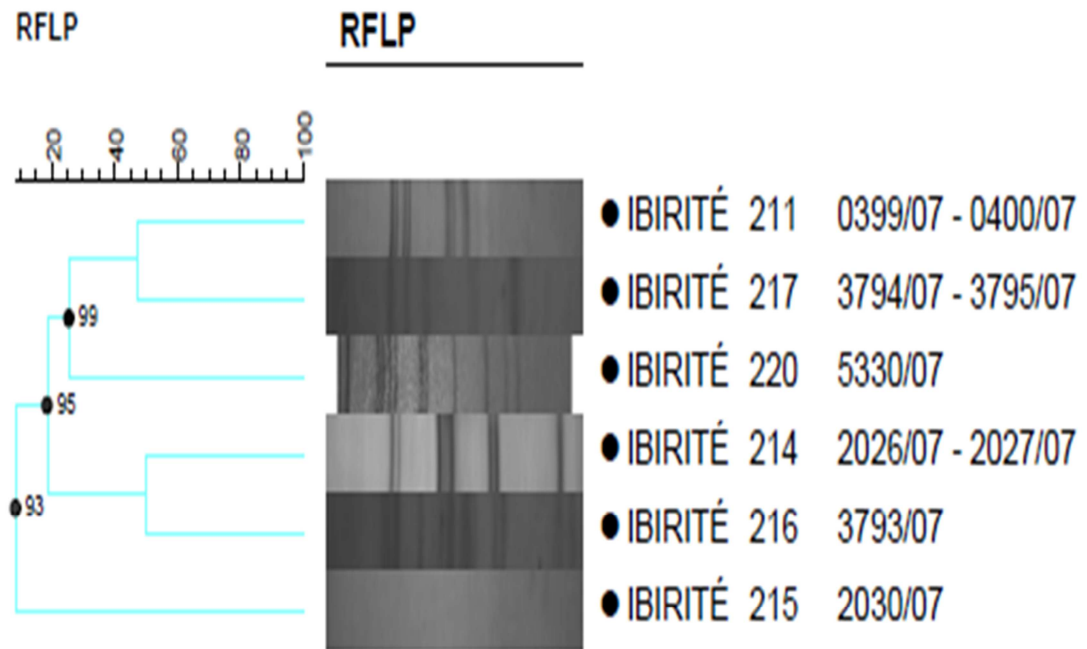
Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.





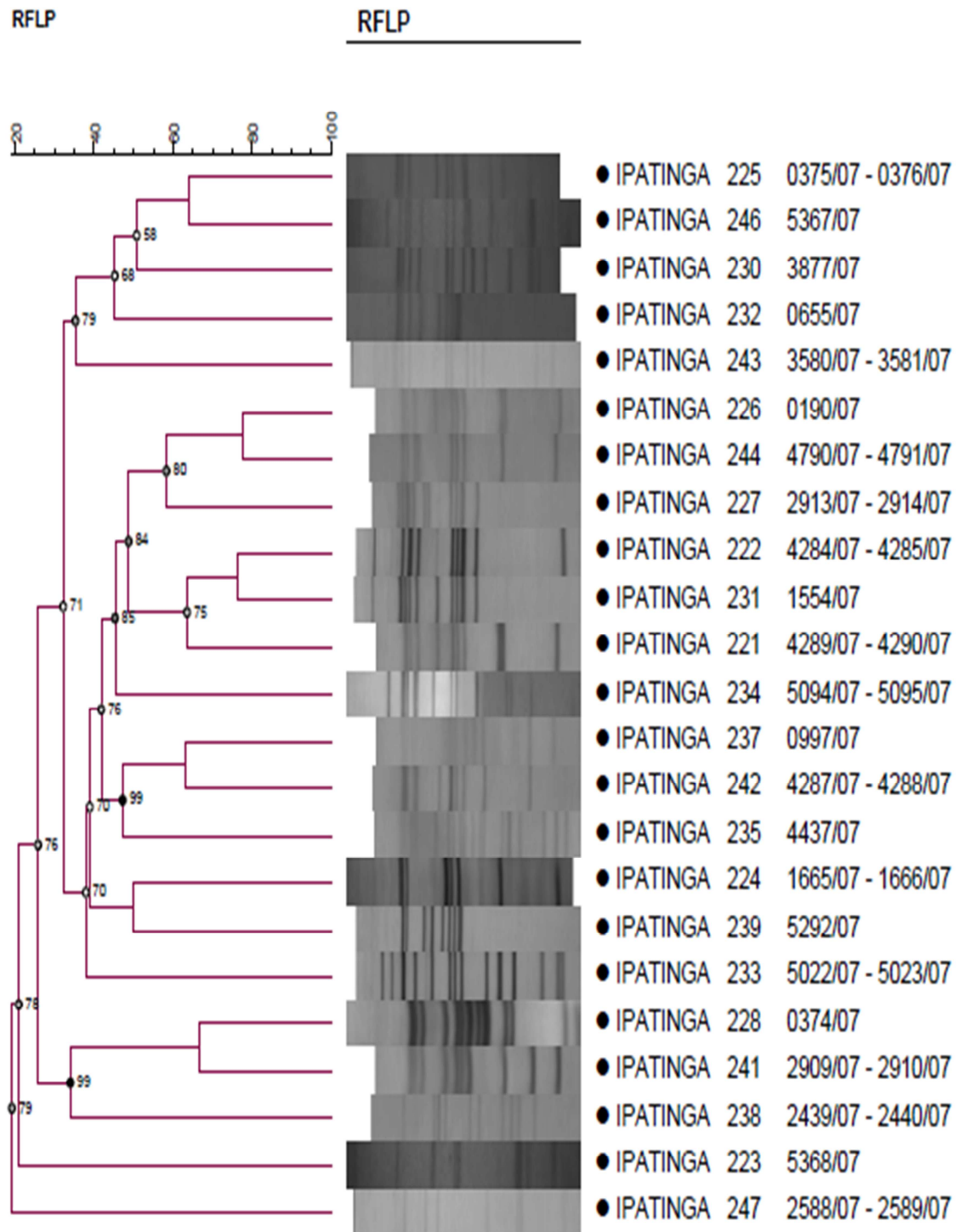
### 10.10 Apêndice – J Dendrograma RFLP-IS6110 – Ibirité

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



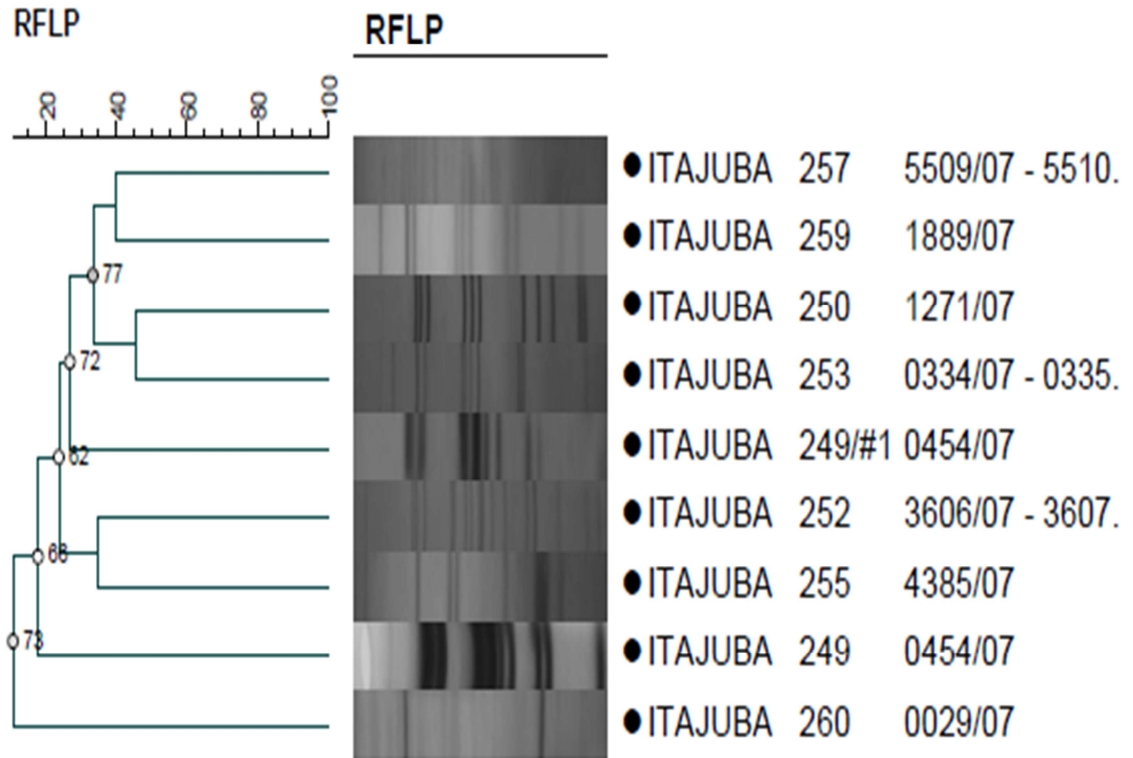
### 10.11 Apêndice – K Dendrograma RFLP-IS6110 – Ipatinga

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



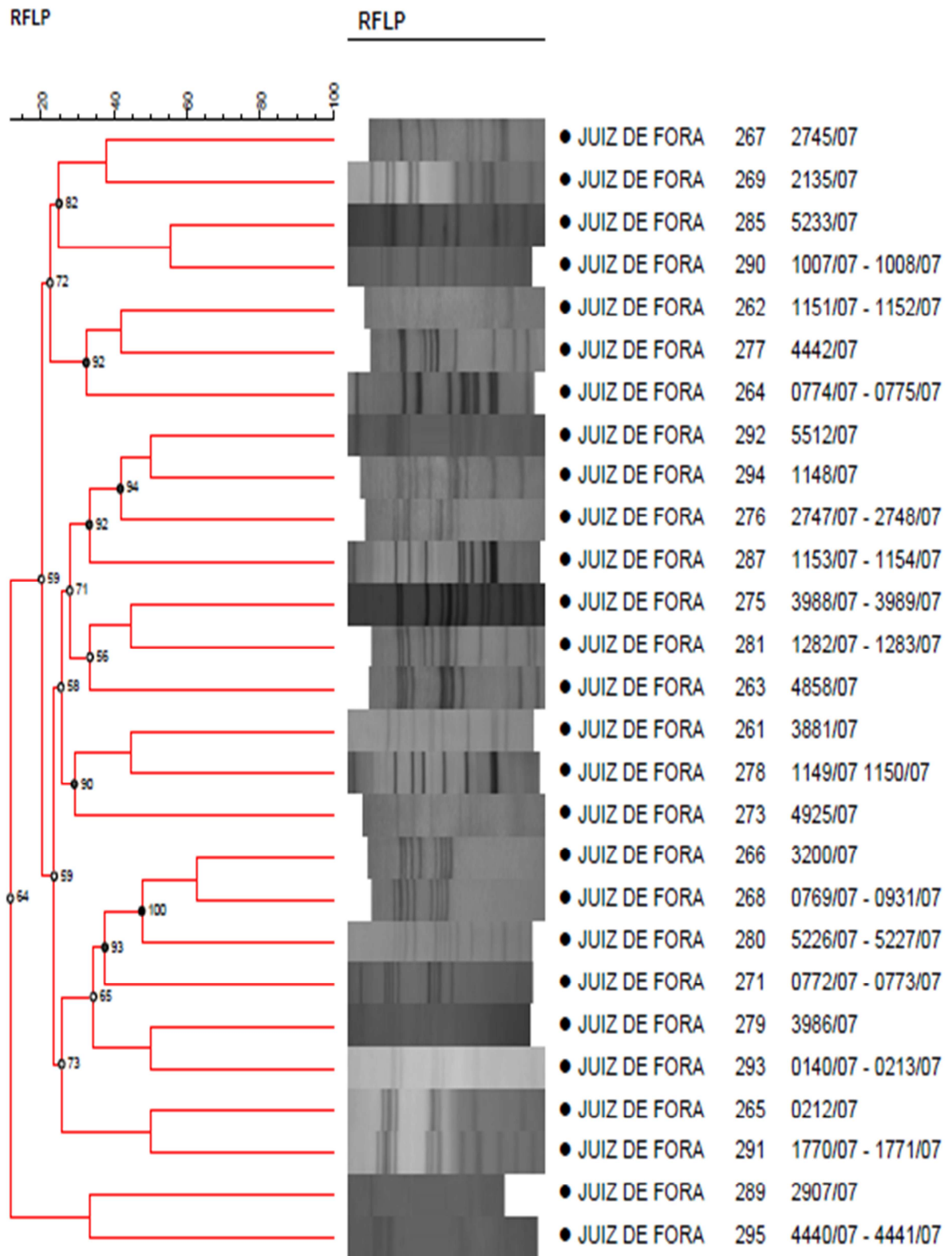
### 10.12 Apêndice – L Dendrograma RFLP-IS6110 – Itajubá

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



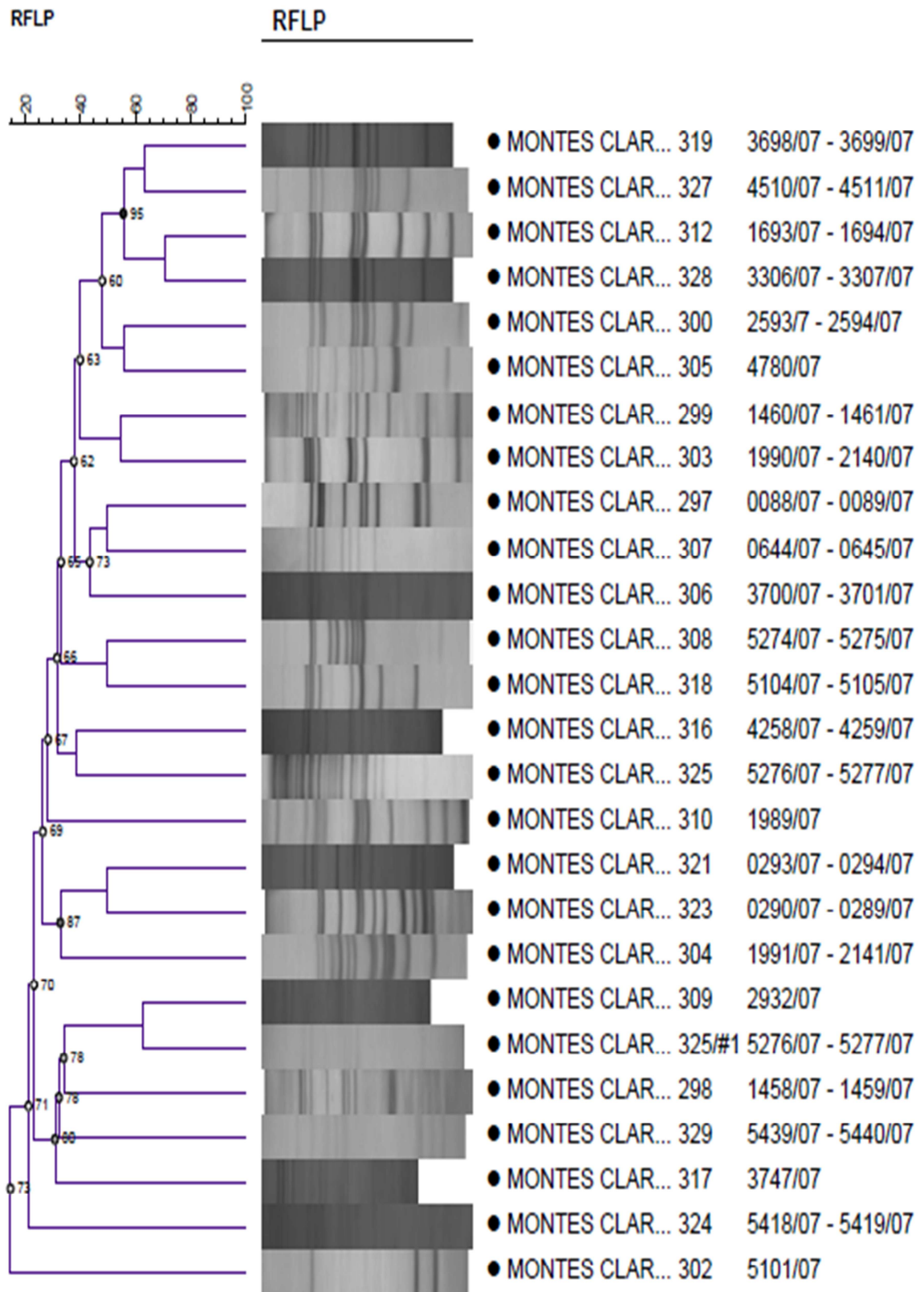
### 10.13 Apêndice – M Dendrograma RFLP-IS6110 – Juiz de Fora

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



### 10.14 Apêndice – N Dendrograma RFLP-IS6110 – Montes Claros

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.

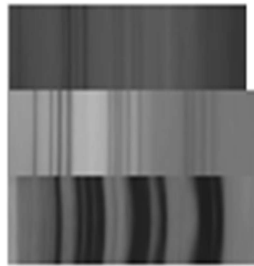
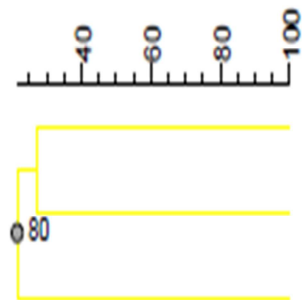


### 10.15 Apêndice – O Dendrograma RFLP-IS6110 – Nova Lima

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.

RFLP

RFLP

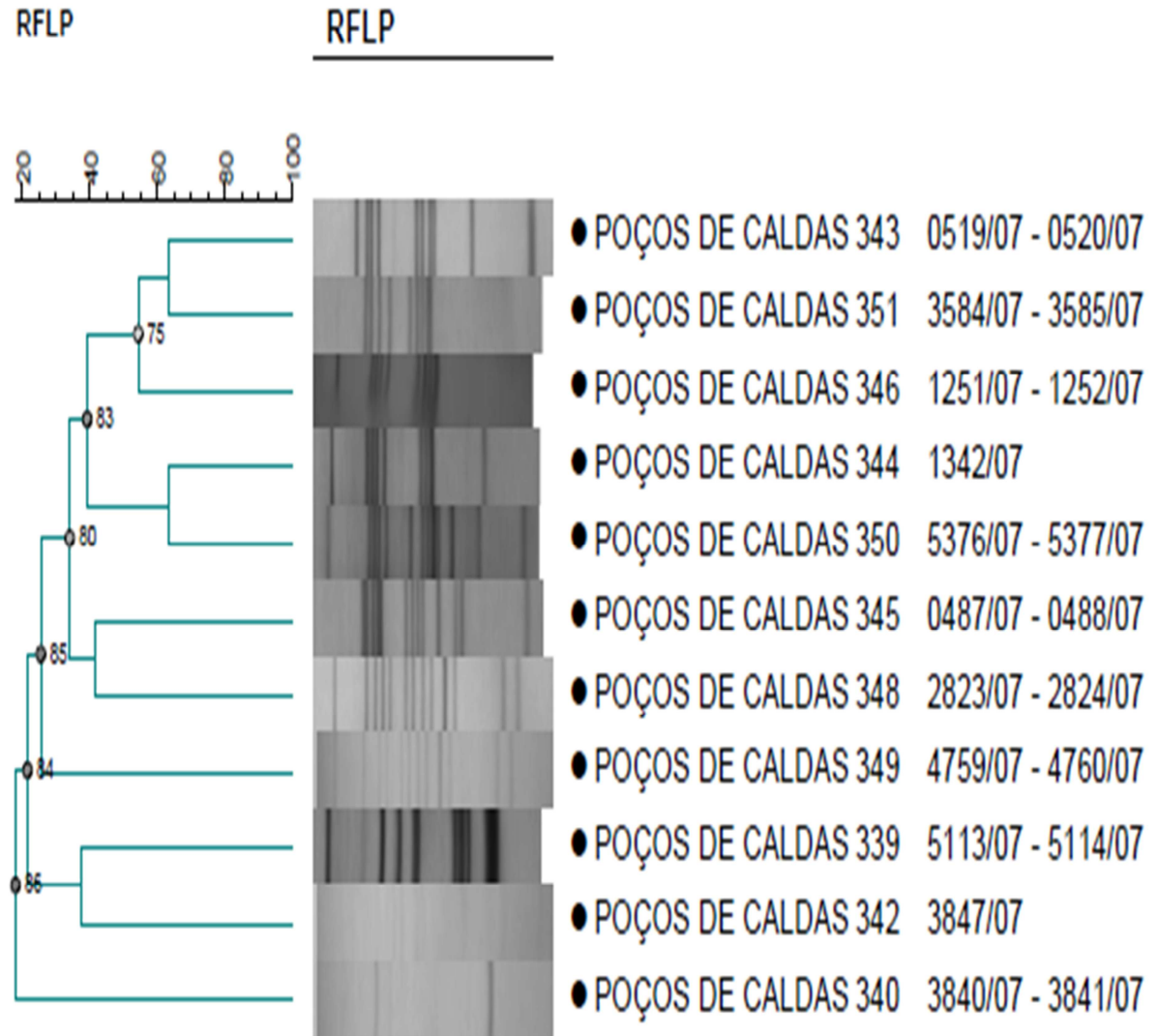


- NOVA LIMA 331 3240/07 - 3241/07
- NOVA LIMA 333 0416/07 - 0417/07
- NOVA LIMA 334 4060/07 - 4061/07



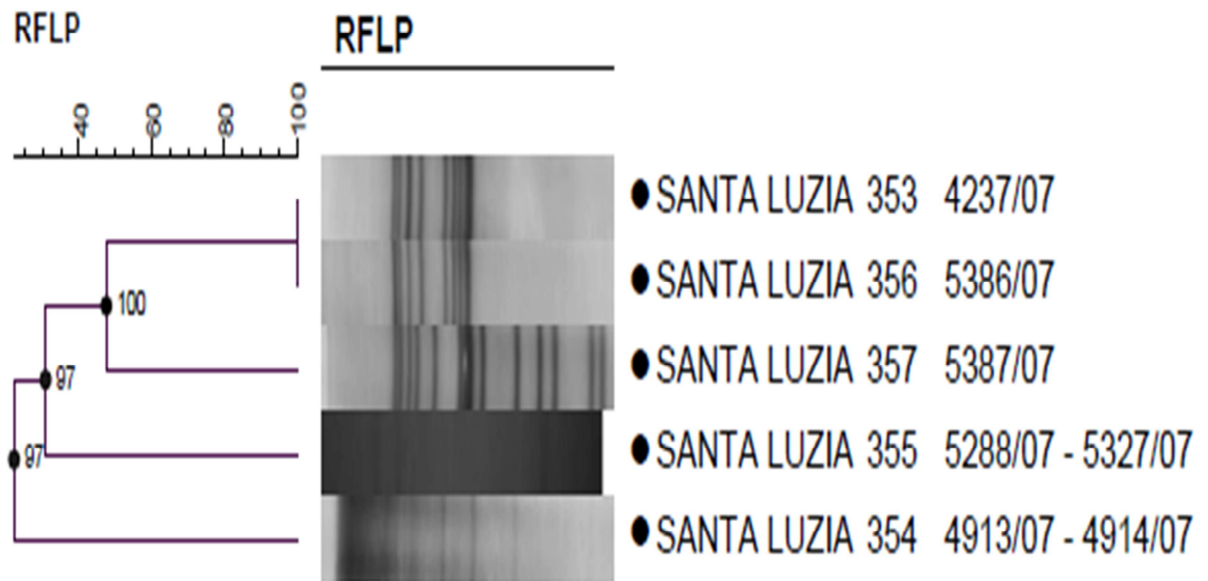
### 10.16 Apêndice – P Dendrograma RFLP-IS6110 – Nova Lima

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



**10.17 Apêndice – Q Dendrograma RFLP-IS6110 – Santa Luzia**

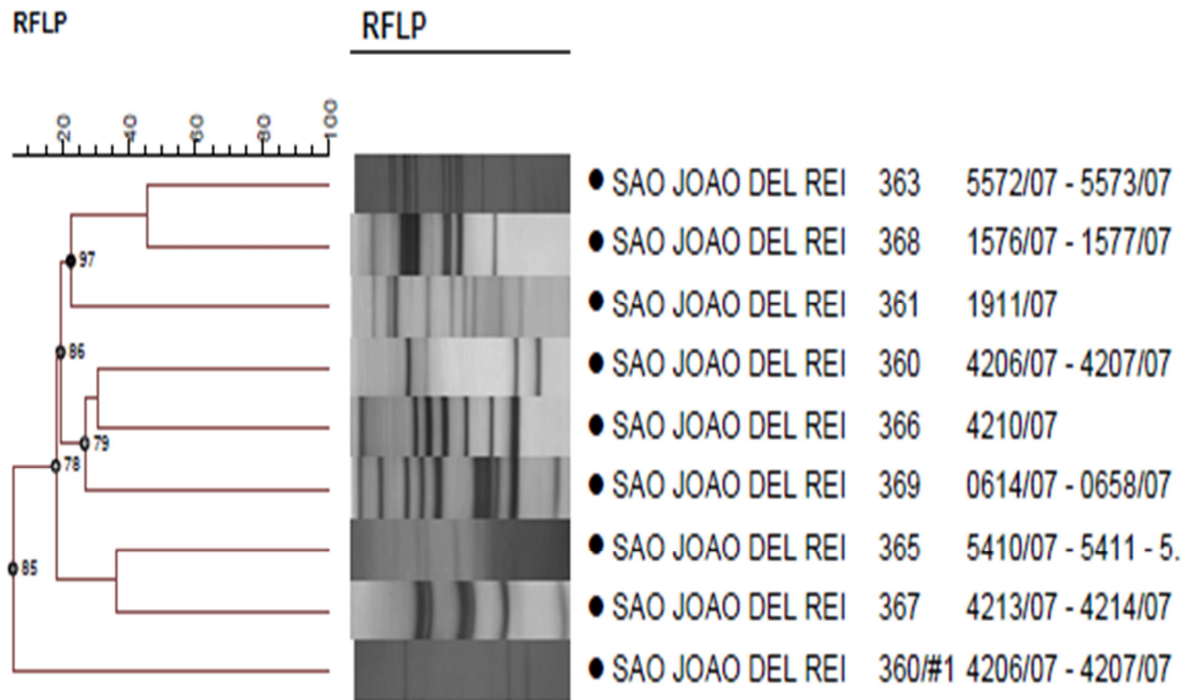
Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.





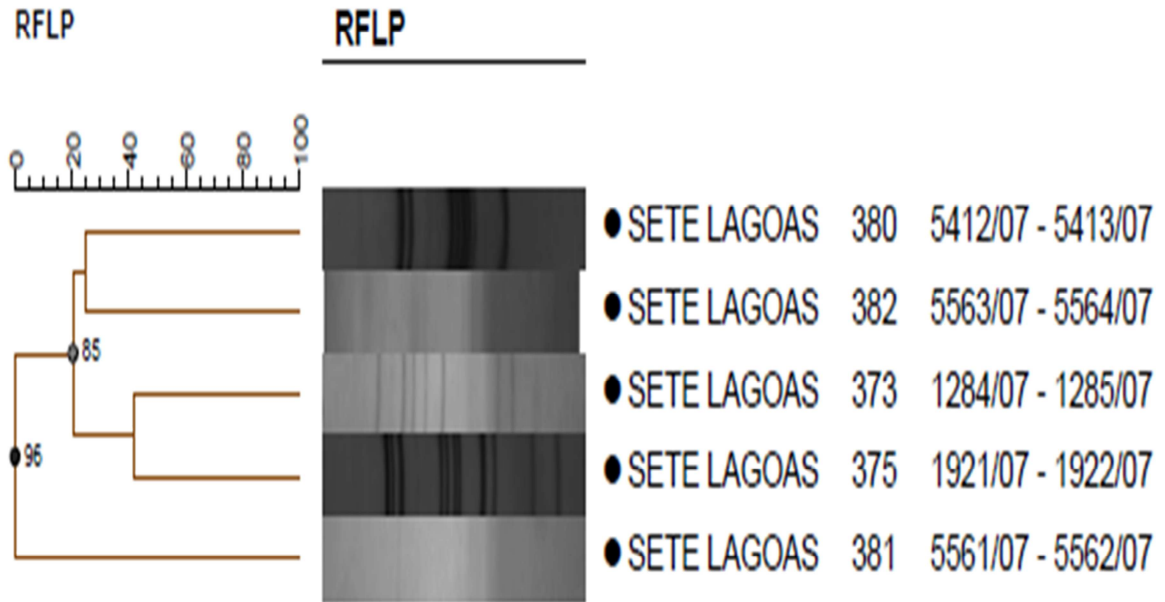
### 10.17 Apêndice – R Dendrograma RFLP-IS6110 – São João Del Rei

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



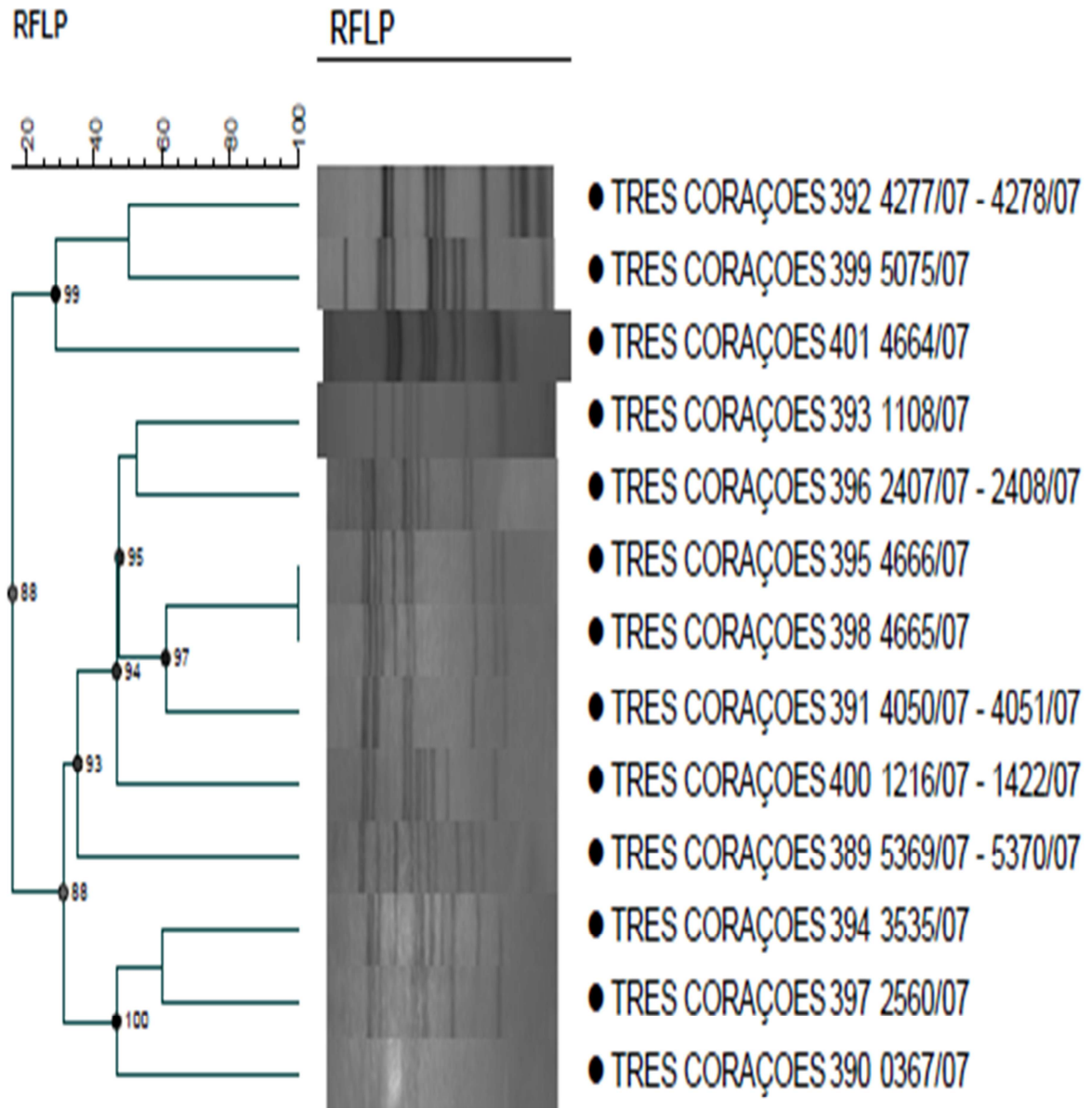
### 10.18 Apêndice – S Dendrograma RFLP-IS6110 – Sete Lagoas

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



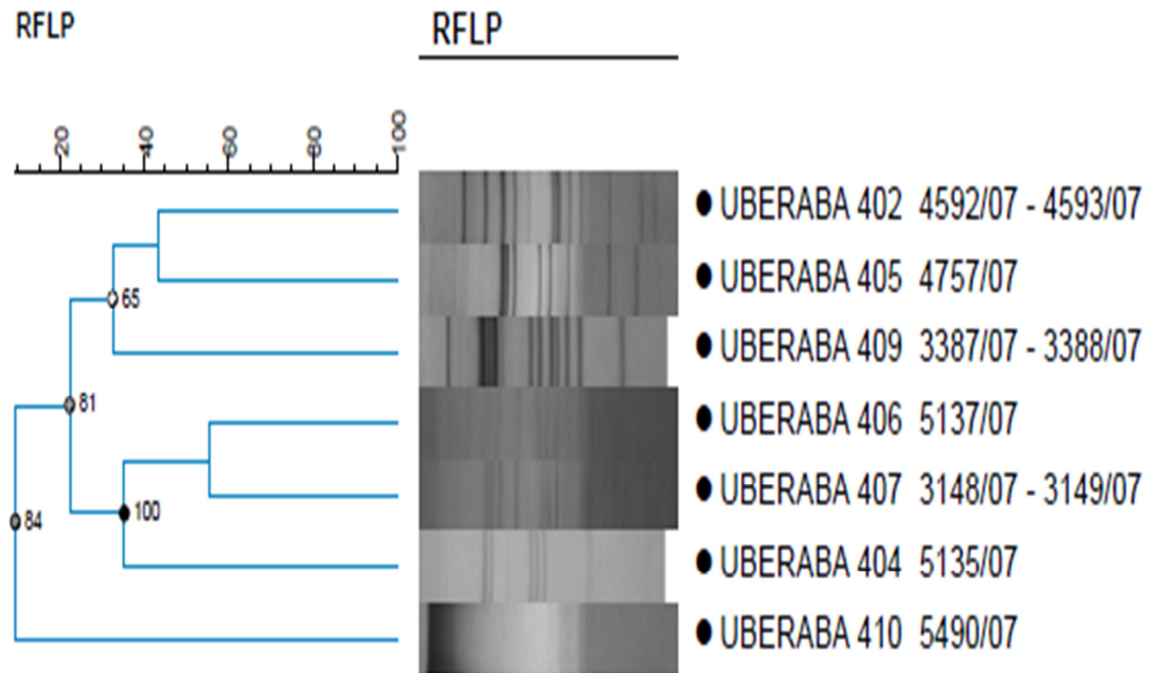
### 10.19 Apêndice – T Dendrograma RFLP-IS6110 – Três Corações

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



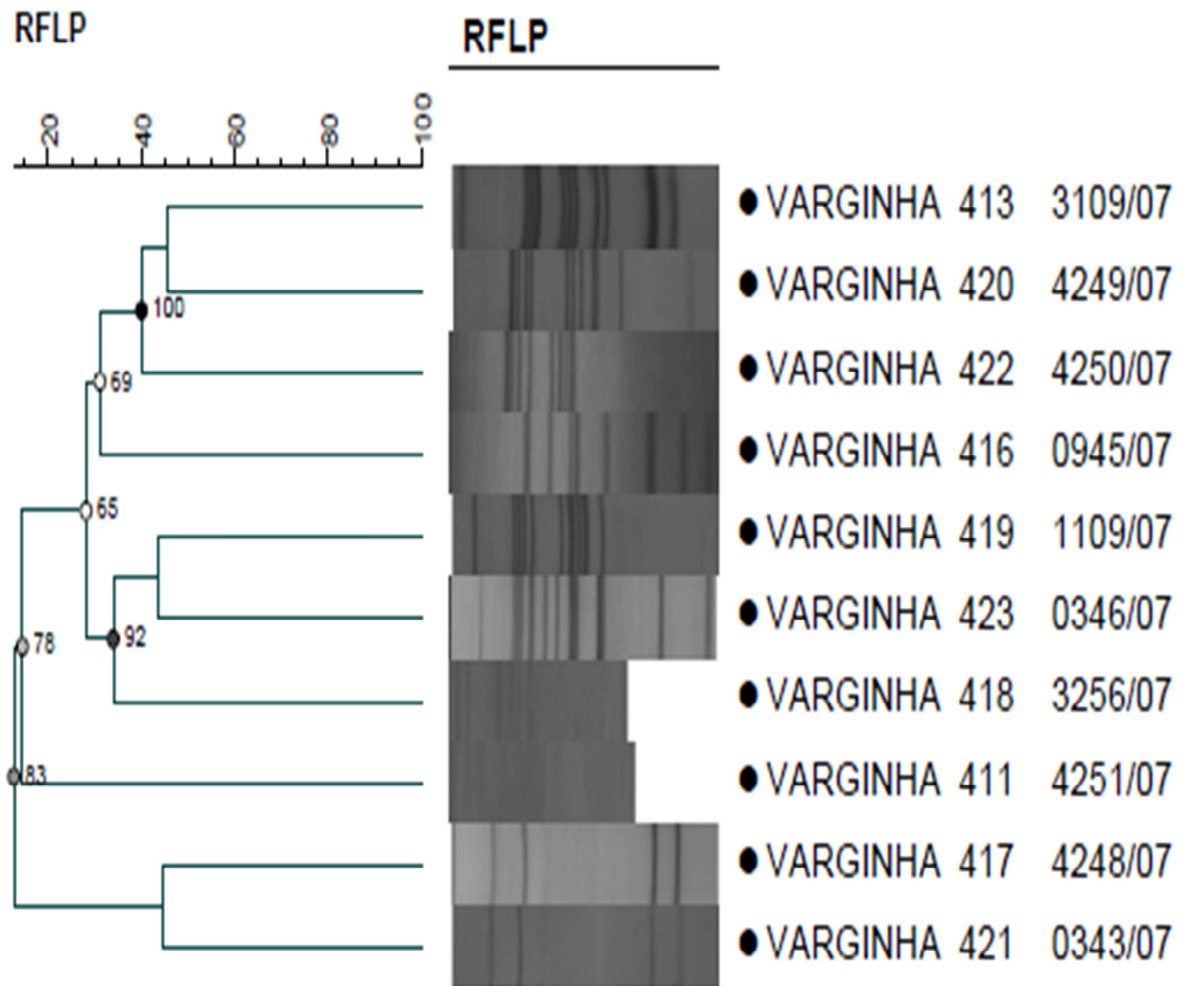
### 10.20 Apêndice – U Dendrograma RFLP-IS6110 – Uberaba

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



### 10.21 Apêndice – U Dendrograma RFLP-IS6110 – Uberaba

Todas as amostras com UPGMA-Tree, Dice, Optimização 1,5% Tolerância de 1,0%.



## 11 ANEXOS

### Anexo A – Aprovação no Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0416.0.203.000-10

Interessado(a): Profa. Silvana Spindola de Miranda  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina - UFMG

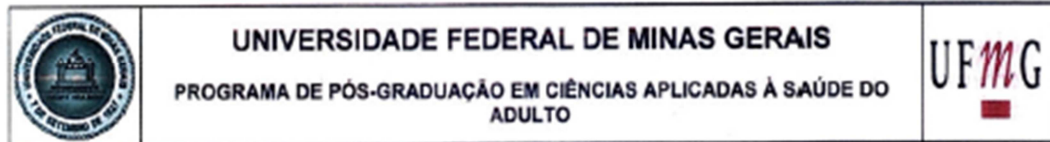
#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de outubro de 2010, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação molecular epidemiológica de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de Minas Gerais, utilizando-se das técnicas Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) e Variable-Number Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU-VNTR)**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG

## Anexo B – Ata de Aprovação da Defesa



## ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO CLAUDIO JOSE AUGUSTO

Realizou-se, no dia 09 de maio de 2014, às 14:00 horas, Sala 022, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **AVALIAÇÃO MOLECULAR EPIDEMIOLÓGICA DE CEPAS DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PROVENIENTES DE MINAS GERAIS, UTILIZANDO-SE DAS TÉCNICAS RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) E VARIABLE-NUMBER TANDEM REPEATS OF MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNIT (MIRU-VNTR)**, apresentada por **CLAUDIO JOSE AUGUSTO**, número de registro 2010659583, graduado no curso de FARMACIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof<sup>ª</sup>. Silvana Spindola de Miranda - Orientadora (UFMG), Prof<sup>ª</sup>. Wania da Silva Carvalho - Coorientadora (UFMG), Prof. Gifone Aguiar Rocha (UFMG), Prof. Enio Roberto Pietra Pedroso (UFMG), Prof. Afranio Lineu Kritski (UFRJ), Prof<sup>ª</sup>. Maria Luiza Bazzo (UFSC).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 09 de maio de 2014.

  
Prof<sup>ª</sup>. Silvana Spindola de Miranda ( Doutora )

  
Prof<sup>ª</sup>. Wania da Silva Carvalho ( Doutora )

  
Prof. Gifone Aguiar Rocha ( Doutor )

  
Prof. Enio Roberto Pietra Pedroso ( Doutor )

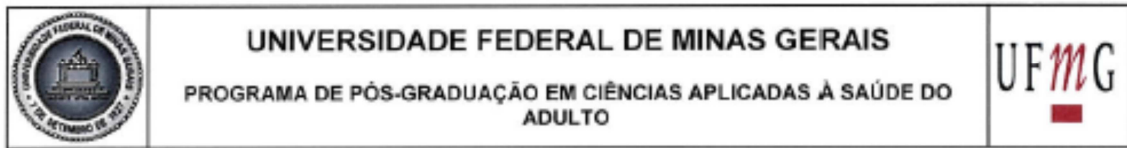
  
Prof. Afranio Lineu Kritski ( Doutor )

  
Prof<sup>ª</sup>. Maria Luiza Bazzo ( Doutora )

ORIGINAL  
 CONF. ETE. UFMG  
 Centro de Pós-Graduação  
 Faculdade de Medicina - UFMG



## Anexo C – Folha de Aprovação da Defesa



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR EPIDEMIOLÓGICA DE CEPAS DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PROVENIENTES DE MINAS GERAIS, UTILIZANDO-SE DAS TÉCNICAS RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) E VARIABLE-NUMBER TANDEM REPEATS OF MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNIT (MIRU-VNTR)**

**CLAUDIO JOSE AUGUSTO**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS CLÍNICAS.

Aprovada em 09 de maio de 2014, pela banca constituída pelos membros:

  
 Prof. Silvana Spindola de Miranda - Orientadora  
 UFMG

  
 Prof. Wania da Silva Carvalho - Coorientadora  
 UFMG

  
 Prof. Gifone Aguiar Rocha  
 UFMG

  
 Prof. Enio Roberto Pietra Pedroso  
 UFMG

  
 Prof. Adriano Lineu Kritski  
 UFRJ

  
 Prof. Maria Luiza Bazzo  
 UFSC

Belo Horizonte, 9 de maio de 2014.



**Anexo D – Desenho das seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores dos 12 *loci* de MIRU estudados**

<b>Locus de MIRU</b>	<b>Seqüência do oligonucleotídeos</b>	<b>Temperatura de Hibridização</b>
<b>02</b>	2F TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT 2R TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT	60°C
<b>04</b>	4F GCGCGAGAGCCCGAACTGC 4R GCGCAGCAGAAACGTCAGC	55°C
<b>10</b>	10F GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC 10R GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	55°C
<b>16</b>	16F TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA 16R CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	55°C
<b>20</b>	20F TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG 20R GGAGACCGCGACCAGGTACTIONGTA	55°C
<b>23</b>	23F CTGTGCGATGGCCGCAACAAAACG 23R AGCTCAACGGGTTGCCCCCTTTTGTC	55°C
<b>24</b>	24F CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT 24R GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	50°C
<b>26</b>	26R TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC 26F CATAGGCGACCAGGCGAATAG	50°C
<b>27</b>	27F TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA 27R GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA	55°C
<b>31</b>	31F ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA 31R GTGCCGACGTGGTCTTGAT	55°C
<b>39</b>	39F CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC 39R CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT	55°C
<b>40</b>	40F GGGTTGCTGGATGACAACGTGT 40R GGGTGATCTCGGCCGAAATCAGATA	55°C