

Christiane Lourenço Nogueira

**DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE
CEPAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* NO
ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia na área de concentração em Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Orientadora: Prof.^ª Dr.^ª Maria Luiza Bazzo

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

A ficha catalográfica é confeccionada pela Biblioteca Central.

Tamanho: 7cm x 12 cm

Fonte: Times New Roman 9,5

Maiores informações em:

<http://www.bu.ufsc.br/design/Catalogacao.html>

Dedico este trabalho aos meus pais Orlando e Margarida pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história.

AGRADECIMENTOS

À Professora orientadora Dr^a. Maria Luiza Bazzo pela oportunidade oferecida em todos esses anos de convívio; pela orientação e principalmente por seu exemplo de ética e de profissionalismo.

À professora Rosemeri Maurici da Silva pela colaboração científica.

À Darcita Büerger Rovaris e a todos os funcionários do LACEN/SC, pela atenção, disposição e parceria, imprescindível para realização deste trabalho.

À enfermeira Mônica Ferreira Gruner pela dedicação, paciência e parceria na coleta das amostras de pacientes internados no Hospital Nereu Ramos.

À Simone Senna, não só pela ajuda e dedicação profissional na realização deste trabalho, mas também pelo ótimo convívio e pela amizade que construímos nesses anos.

À todos os colegas e integrantes do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias e do Laboratório de Hemopatias e Oncologia Experimental, pelo ótimo convívio durante esses anos.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação irrestrita e pela sólida formação que me proporcionou a concretização de mais esta conquista.

Ao meu namorado Lucas Welter, pelo amor, carinho, paciência e, principalmente apoio nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A Tuberculose (TB), doença infectocontagiosa causada pelo *M. tuberculosis*, é um grave problema de saúde pública, sendo responsável por cerca de 1,5 milhões de mortes/ano no mundo. Embora o Estado de Santa Catarina apresente uma das mais baixas taxas de incidência (27,6/100.000 habitantes) do país, alguns municípios, como Itajaí (77,3 casos novos/100.000 habitantes) apresentam taxas iguais e/ou superiores às do Brasil (43/100.000 habitantes) e de outros países, nos quais a situação é muito grave. Em relação ao controle da TB, o Estado de Santa Catarina conta com o Hospital Nereu Ramos (hospital de referência) e com o LACEN/SC (laboratório de referência). A oportunidade de associar informações diagnósticas rápidas e dados de epidemiologia molecular representa um avanço importante no controle da doença. Diante disso, este trabalho teve como objetivos avaliar, por meio da PCR (IS6110 e 16S rRNA), a inclusão de pérolas de vidro como modificação no protocolo de rotina utilizado no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias/UFSC para tratamento das amostras de escarro; e estudar a epidemiologia molecular de cepas circulantes de *M. tuberculosis* no Estado de Santa Catarina pela metodologia *Spoligotyping*. De março/2010 a março/2011 foram obtidos 406 isolados clínicos, sendo que 120 amostras de escarro foram utilizadas para a avaliação do protocolo modificado para tratamento das amostras. A utilização das pérolas de vidro demonstrou um incremento na sensibilidade da PCR para detecção de *M. tuberculosis*, especialmente nas amostras paucibacilares. Entre os casos incluídos no estudo, 85% dos indivíduos residiam nas regiões do Vale do Itajaí, da Grande Florianópolis e do Nordeste Catarinense, sendo predominante os indivíduos brancos, adultos jovens, do sexo masculino, com baixa escolaridade, desempregados ou com baixa qualificação profissional. Cerca de 50% da população apresentou algum tipo de agravo associado, sendo 23,1% coinfectados com HIV, 37,6% etilistas e 35,2% dependentes químicos. Nas análises pelo *Spoligotyping*, observou-se grande variedade de genótipos circulantes, dos quais 13,3% ainda não haviam sido descritos no SpolDB4. A linhagem LAM foi a mais frequente (40,1%), seguida da T (23,4%), da *Harleem* (12,8%), da U (3,7%), da X (2,7%) e da S (1,7%), sendo as subfamílias LAM9 (20,0%), H3 (9,6%) e T2/T3 (8,4%) as mais frequentemente identificadas. Os perfis mais frequentes são similares com cepas

circulantes em Portugal, Itália e outros países europeus, o que reflete a influência da colonização do Estado na população de cepas de *M. tuberculosis*. Algumas subfamílias e SITs (*Spoligotyping International Types*), encontrados em baixa frequência, ocorreram exclusivamente em certas regiões do Estado. A utilização do protocolo modificado para tratamento das amostras de escarro possibilitou uma melhora no diagnóstico molecular da TB realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias/UFSC em parceria com o Hospital Nereu Ramos e o LACEN/SC. Além disso, o estudo epidemiológico molecular forneceu, pela primeira vez, dados sobre a estrutura populacional de *M. tuberculosis* circulantes no Estado de Santa Catarina.

Palavras-chave: tuberculose, diagnóstico molecular, epidemiologia molecular

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), an infectious disease caused by *M. tuberculosis*, is a worldwide health problem, accounting for about 1.5 million deaths per year. Although Santa Catarina State has one of the lowest incidence rates in the country (27.6/100,000), some cities like Itajai (77.3/100,000 inhabitants) have equal and/or greater rates than Brazil incidence (43/100.000 population) and other countries where the TB is a serious health problem. The Nereu Ramos Hospital (reference hospital in TB) and the Central Laboratory of Public Health (CLPH) (reference laboratory for TB diagnosis) are the most important responsible for TB control in Santa Catarina State. The opportunity to associate rapid diagnostic information and molecular epidemiology data represents an important advance in TB control. So, this study evaluated by PCR (16S rRNA and IS6110) the use of glass beads as a modification of a routine protocol for sputum treatment being used in the Laboratory of Molecular Biology and Mycobacteria (LMBM) at the Federal University of Santa Catarina. Moreover, the molecular epidemiology of *M. tuberculosis* strains present in Santa Catarina State was analyzed using the Spoligotyping method. The study comprised 406 clinical samples (March/2010 - March/2011), from which 120 sputum samples were used in order to evaluate the proposed modification of sputum treatment in the routine protocol. The results showed that the modified protocol using glass beads has greatly improved the PCR sensitivity for *M. tuberculosis* detection in sputum samples, particularly paucibacilli cases. Among all the cases included in this study, 85% lived in the Itajai Valley, in Florianópolis Metropolitan Area or in Northeast region Caucasians, young adults, males, individuals with low education level and unemployed were the predominant profile found. About 50% of the analyzed population had some condition associated with TB, from which 23.1% were co-infected with HIV, 37.6% used excess alcohol and 35.2% used illicit drugs. The Spoligotyping method evidenced a great variability of *M. tuberculosis* genotypes in Santa Catarina, 13.3% of which were not registered in the SpolDB4. LAM lineage was the most frequently (40.1%) followed by T (23.4%), Harleem (12.8%), U (3.7%), X (2.7%) and S (1.7%) lineages. LAM9 (20.0%), H3 (9.6%) and T2/T3 (8.4%) were the most frequently sublineages among all analyzed strains. The most frequent genotypes identified in this study were very similar to those found in Portugal, Italy and other European countries, which

reflects the colonization of Santa Catarina State. Some sublineages and SITs (Spoligotyping International Types) were found in a low incidence and occurred exclusively in certain State regions. In conclusion, the modified protocol for sputum treatment improved the TB molecular diagnosis performed by the LMBM, which assists both Nereu Ramos Hospital and CLPH. Moreover, the molecular epidemiology study provided the first insight into the population structure of *M. tuberculosis* in Santa Catarina State.

Keywords: tuberculosis, molecular diagnosis, molecular epidemiology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estimativa mundial de casos novos para todas as formas de tuberculose a cada 100.000 habitantes (WHO, 2011).....	43
Figura 2:	Representação proporcional do grau de pobreza (A) e de casos de tuberculose (B) no mundo, mostrando a íntima relação entre a pobreza e a ocorrência dessa doença (disponíveis em www.worldmapper.org e adaptado de BENATAR; UPSHUR, 2010).....	44
Figura 3:	Esquema representativo da amplificação das sequências DRs utilizadas na metodologia <i>Spoligotyping</i> . Adaptado de SANTOS; KIPNIS; KIPNIS, 2007.....	66
Figura 4:	Distribuição geográfica dos casos de TB incluídos no estudo.....	87
Figura 5:	Distribuição por sexo e faixa etária da população estudada no Estado de Santa Catarina.....	88
Figura 6:	Distribuição dos agravos associados à TB na população estudada do Estado de Santa Catarina..	91
Figura 7:	Distribuição dos casos de TB extrapulmonar (A) e TB pulmonar/extrapulmonar (B) na população estudada.....	94
Figura 8:	Perfil de resistência das cepas de <i>M. tuberculosis</i> incluídas no estudo – (H) isoniazida, (R) rifampicina, (S) estreptomicina, (E) etambutol.....	96
Figura 9:	Revelação da membrana de <i>Spoligotyping</i> apresentando os perfis genéticos de diferentes isolados (A1-A38). (CN) corresponde ao controle negativo e (H37Rv) ao controle positivo da cepa padrão de <i>M. tuberculosis</i>	101
Figura 10:	Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos 406 isolados genotipados por <i>Spoligotyping</i> . O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados.....	106
Figura 11:	Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos isolados da Grande Florianópolis. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados. As subfamílias	

	sublinhadas foram encontradas somente nessa região.....	109
Figura 12:	Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos isolados do Vale do Itajaí. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados. As subfamílias sublinhadas foram encontradas somente nessa região.....	111
Figura 13:	Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos isolados do Nordeste Catarinense. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados. As subfamílias sublinhadas foram encontradas somente nessa região.....	113
Figura 14:	Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos isolados do Sul Catarinense. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados. As subfamílias sublinhadas foram encontradas somente nessa região.....	115
Figura 15:	Distribuição das famílias identificadas nos isolados do Oeste Catarinense. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados.....	116
Figura 16:	Distribuição das famílias identificadas nos 3 isolados da Serra Catarinense. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados.....	117
Figura 17:	Distribuição dos perfis <i>Orphan</i> identificados na população estudada. Os perfis <i>Orphan1</i> , <i>Orphan2</i> , <i>Orphan5</i> e <i>Orphan6</i> já foram descritos no Brasil e os perfis <i>Orphan3</i> e <i>Orphan4</i> foram descritos na Itália e nos Estados Unidos, respectivamente.....	118
Figura 18:	Distribuição dos isolados MDR encontrados na população estudada por região do Estado de Santa Catarina. Cada <i>spoligotype</i> está representado por uma moldura de cor diferente e o número de cepas isoladas está entre parênteses.....	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Amostras clínicas encaminhadas com maior frequência para o diagnóstico laboratorial de micobactérias.....	55
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Comparação dos resultados da baciloscopia com a PCR 16S rRNA e com a PCR IS6110 das amostras de escarro submetidas ao protocolo de tratamento utilizado na rotina do LBMM/UFSC....	84
Tabela 2:	Comparação dos resultados da baciloscopia com a PCR 16S rRNA e com a PCR IS6110 das amostras de escarro submetidas ao protocolo de tratamento modificado.....	85
Tabela 3:	Análise comparativa da sensibilidade da PCR após tratamento das amostras de escarro pelo protocolo utilizado na rotina do LBMM/UFSC e pelo protocolo modificado.....	86
Tabela 4:	Porcentagem de casos de TB incluídos no estudo por regiões do Estado de Santa Catarina.....	87
Tabela 5:	Distribuição da população estudada quanto ao grau de escolaridade.....	89
Tabela 6:	Comparação dos casos notificados como reingresso após abandono na população estudada com grupos de vulnerabilidade.....	93
Tabela 7:	Comparação dos casos de TB extrapulmonar ou TB pulmonar/extrapulmonar com grupos de vulnerabilidade na população estudada.....	95
Tabela 8:	Comparação dos casos de TB-MDR com grupos de vulnerabilidade na população estudada.....	97
Tabela 9:	Comparação do desfecho abandono do tratamento com grupos de vulnerabilidade na população estudada.....	98
Tabela 10:	Comparação do desfecho óbito por TB com a sensibilidade aos antimicrobianos na população estudada.....	98
Tabela 11:	Comparação do desfecho óbito por TB com a forma da doença na população estudada.....	99
Tabela 12:	Comparação do desfecho óbito por TB com grupos de vulnerabilidade na população estudada.....	99

Tabela 13:	Representação de todos os <i>spoligotypes</i> obtidos no estudo.....	102
Tabela 14:	<i>Spoligotypes</i> com perfil <i>Orphan</i> registrados no SpolDB4 e identificados na população estudada.....	107
Tabela 15:	Subfamílias e SITs identificados somente na região da Grande Florianópolis.....	110
Tabela 16:	Subfamílias e SITs identificados somente no Vale do Itajaí.....	112
Tabela 17:	Subfamílias e SITs identificados somente no Nordeste Catarinense.....	113
Tabela 18:	Subfamílias e SITs identificados somente no Sul Catarinense.....	115
Tabela 19:	Subfamílias e SITs identificados somente no Oeste Catarinense.....	117
Tabela 20:	Associação entre TB-MDR e as subfamílias na população estudada.....	121
Tabela 21:	Associação entre institucionalização em penitenciárias e as subfamília na população estudada.....	122
Tabela 22:	Associação entre presença de HIV/Aids e as subfamílias na população estudada.....	123
Tabela 23:	Associação entre a dependência química e as subfamílias na população estudada.....	125
Tabela 24:	Associação entre o alcoolismo e as subfamílias na população estudada.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo de <i>Calmette-Guerin</i>
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CRPHF	Centro de Referência Professor Hélio Fraga
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DOTS	<i>Direct Observed Treatment Strategy</i> (Estratégia de Tratamento Diretamente Observado)
DR	<i>Direct Repeats</i> (Repetições Diretas)
E	Etambutol
H	Isoniazida
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IUATLD	<i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina
LAM	<i>Latin-American-Mediterranean</i>
LBMM/UFSC	Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da Universidade Federal de Santa Catarina
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i> (Unidades Repetitivas Intercaladas de Micobactérias)
MNT	Micobactérias Não-Tuberculosas
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PT	Prova Tuberculínica
R	Rifampicina

RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição)
S	Estreptomicina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SI	Seqüências de Inserção
SIT	<i>Spoligotyping International Type</i>
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificações
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Droga Resistente
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (Número Variável de Repetições em <i>Tandem</i>)
Z	Pirazinamida

SUMÁRIO

1. Introdução.....	27
2. Revisão da Literatura.....	31
2.1 Histórico.....	31
2.2 Agente Etiológico.....	34
2.3 Genoma de <i>M. tuberculosis</i>	37
2.4 Transmissão e Patogênese.....	37
2.5 Manifestações clínicas.....	40
2.6 Epidemiologia.....	41
2.7 Tuberculose e HIV.....	46
2.8. Tratamento.....	47
2.9 Resistência aos Antimicrobianos.....	49
2.10 Diagnóstico.....	52
2.10.1. Radiológico.....	52
2.10.2 Imunológico.....	52
2.10.3 Laboratorial.....	54
2.11 Epidemiologia Molecular.....	62
2.11.1 RFPL da sequência IS6110.....	63
2.11.2 MIRU-VNTR.....	64
2.11.3 Spoligotyping.....	65
3. Objetivos.....	69
4. Material e Métodos.....	71
4.1 Tipo e local de estudo.....	71
4.2 Critérios de Inclusão.....	71
4.3 Critérios de Exclusão.....	72
4.4 Baciloscopia.....	72
4.5 Cultura.....	72

4.6	<i>Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos</i>	72
4.7	<i>Tratamento das amostras de escarro</i>	73
4.7.1	Protocolo utilizado na rotina do LBMM/UFSC.....	73
4.7.2	Protocolo Modificado	73
4.8	<i>Extração de DNA</i>	74
4.8.1	Método da Guanidina	74
4.8.2	Método CTAB	75
4.9	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	76
4.9.1	Gene 16S rRNA.....	76
4.9.2	Sequência de inserção IS6110	76
4.9.3	Detecção dos Fragmentos Amplificados pela PCR	77
4.10	<i>Spoligotyping</i>	78
4.10.1	Reação de Amplificação	78
4.10.2	Hibridização dos Produtos da PCR e Detecção	78
4.10.3	Análise dos <i>spoligotypes</i>	79
4.11	<i>Análise Estatística</i>	80
4.12	<i>Considerações Éticas</i>	80
4.13	<i>Fluxograma da metodologia do estudo</i>	81
5.	Resultados	83
5.1	<i>Amostragem</i>	83
5.2	<i>Comparação dos Protocolos de tratamento de escarro</i>	83
5.2	<i>Descrição da população estudada</i>	86
5.3	<i>Perfis de Spoligotyping</i>	100
5.3.1	Famílias/subfamílias encontradas nas regiões do Estado de Santa Catarina.....	108
5.3.2	Perfis <i>Orphan</i> encontrados nas regiões do Estado de Santa Catarina.....	118
5.3.3	Perfis desconhecidos encontrados nas regiões do Estado de Santa Catarina.....	119
5.3.4	<i>Spoligotypes</i> , TB-MDR e agravos associados.....	120

6. Discussão.....	127
6.1 <i>Comparação dos Protocolos de tratamento de escarro</i>	127
6.2 <i>População estudada</i>	131
6.3 Spoligotyping	145
7. Conclusão	161
8. Perspectivas	163
9. Referências	165
10. Anexos.....	191

1. Introdução

A tuberculose (TB) humana, causada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*, é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica que afeta principalmente os pulmões (PANDOLFI *et al.*, 2007).

Embora o Relatório de Controle Global da Tuberculose, publicado no ano de 2011, aponte uma queda significativa nos índices da doença, a TB ainda é um problema de saúde pública mundial, visto que, em 2010, ocorreram 12 milhões de casos no mundo, dos quais 8,8 milhões eram casos novos. A TB é considerada a segunda causa de morte ocasionada por doenças infecciosas, perdendo somente para o HIV. Dentre os 22 países responsáveis por 85% dos casos mundiais de TB, o Brasil ocupa a 22^a posição e concentra 35% de todos os casos de TB que ocorrem nas Américas (WHO, 2011a; WHO, 2011c).

O diagnóstico precoce da doença associado com o início imediato do tratamento tem um papel vital no controle da TB. No Brasil, o diagnóstico é realizado por meio dos métodos convencionais, que incluem a baciloscopia e a cultura (BRASIL, 2011b). A baciloscopia apresenta baixa sensibilidade, detectando somente 20 a 80% dos casos de TB (STEINGART; RAMSAY; PAI, 2007). Já a cultura, quando realizada em meio sólido, apesar de apresentar melhor sensibilidade, necessita de 6 a 8 semanas para obtenção do resultado (NEONAKIS *et al.*, 2008). Os métodos automatizados de cultura em meio líquido, diminuem o tempo de liberação de um resultado positivo para 15 dias; contudo, somente os laboratórios de referência do país utilizam esta

metodologia (PARSONS *et al.*, 2011). Em Santa Catarina, somente o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) realiza cultura em meio líquido MGIT[®] 960 (*Beckton and Dickinson*, EUA); os demais laboratórios da rede pública ainda utilizam o meio sólido *Ogawa-Kudoh*[®] (Laborclin, Brasil).

Diante das limitações dos testes diagnósticos convencionais e da importância da detecção precoce do bacilo no bloqueio da cadeia de transmissão da TB, o Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias/UFSC auxilia o Hospital Nereu Ramos e o LACEN/SC, referências em TB no Estado, no diagnóstico de TB por meio da utilização de metodologias moleculares.

Na tentativa de auxiliar o diagnóstico convencional, aumentando a sensibilidade da PCR na detecção de *M. tuberculosis* diretamente de amostras de escarro, o presente estudo avaliou a inclusão das pérolas de vidro como uma modificação no protocolo utilizado para tratamento das amostras de escarro no LBMM/UFSC.

Além do diagnóstico precoce e acurado, o estudo epidemiológico molecular é uma importante ferramenta para o melhor entendimento do curso da TB na população local, o que auxilia na compreensão da dinâmica de transmissão da doença e, conseqüentemente, no estabelecimento de medidas estratégicas mais precisas para o controle e prevenção da TB. O Estado de Santa Catarina, entretanto, não apresenta estudos nessa área, nem mesmo dados robustos sobre as linhagens de *M. tuberculosis* circulantes na região. Portanto, o estudo também teve como objetivo analisar a epidemiologia molecular das cepas de *M. tuberculosis* circulantes em Santa Catarina, pelo método de tipagem molecular *Spoligotyping*.

A oportunidade de associar informações diagnósticas rápidas, dados de epidemiologia molecular e geolocalização da doença representa um avanço importante no conhecimento para o controle da TB em Santa Catarina.

2. Revisão da Literatura

2.1 Histórico

A TB é uma das mais antigas doenças infectocontagiosas da humanidade. Relatos e registros desta doença datam da pré-história, podendo ser *M. tuberculosis* o patógeno responsável pelo maior número de óbitos ao longo da história da humanidade (DANIEL, 2006).

Presume-se que o gênero *Mycobacterium* originou-se há mais de 150 milhões de anos e que um progenitor primitivo de *M. tuberculosis* co-evoluiu com os primeiros homínídeos na África Oriental há três milhões de anos (HAYMAN, 1984; GUITIERREZ *et al.*, 2005).

Estudos encontraram a presença do material genético de *M. tuberculosis* em tecidos de múmias egípcias e peruanas, comprovando a causa de anormalidades esqueléticas (SALO *et al.*, 1994; ARRIAZA *et al.*, 1995; NERLICH *et al.*, 1997). Isto mostra que além de ser uma doença secular, a TB sempre apresentou ampla distribuição geográfica ao longo da história da humanidade (LEÃO; PORTAELS, 2007).

A epidemia de TB na Europa, conhecida como a Grande Peste Branca, provavelmente iniciou-se no século XVII e estendeu-se pelos próximos 200 anos. A morte por TB era considerada inevitável e, em 1650, era a principal causa de óbitos na população. A epidemia propagou-se pelos oceanos por meio da exploração e colonização dos continentes (BATES; STEAD, 1997; LEÃO; PORTAELS, 2007). No Brasil, acredita-se que a TB foi introduzida pelos portugueses e missionários jesuítas, a partir do ano de 1507 (RUFFINO-NETO, 1999).

No final do século XIX, com a descoberta de seu agente causal por Hermann Henrich Robert Koch, a patogenia da TB foi elucidada. A doença passou a ser associada com a pobreza e as más condições sanitárias e de trabalho da época (LEÃO; PORTAELS, 2007).

No início do século XX, iniciaram-se as campanhas de prevenção, educação e conscientização da população em relação a TB. No Brasil, as ações políticas de controle da TB foram assumidas por instituições estatais e filantrópicas, como a Liga Brasileira Contra a Tuberculose – atual Fundação Ataulpho de Paiva – e a Liga Paulista Contra a Tuberculose (HIJJAR *et al.*, 2007; LEÃO; PORTAELS, 2007; FERNANDES *et al.*, 2011). Em 1914, após a I Guerra Mundial, uma conferência sobre TB foi realizada em Paris com a participação de diversos países da Europa e das Américas, estabelecendo a *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (IUATLD) (LEÃO; PORTAELS, 2007). No Brasil, em 1920, a Reforma Carlos Chagas, deu origem ao Departamento Nacional de Saúde Pública, que acionou a intervenção do Estado no combate à TB, além do Instituto Brasileiro para a Investigação da Tuberculose, criado em 1927, na Bahia (FERNANDES *et al.*, 2011).

Paralelo às ações, Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram, no Instituto Pauster, na França, a vacina BCG (*M. bovis* – *Bacille Calmette-Guérin*), com uma cepa atenuada de *M. bovis*. Esta vacina foi aplicada pela primeira vez em 1921 e é, até hoje, utilizada como forma de prevenção das formas graves da doença e da TB infantil (LEÃO; PORTAELS, 2007).

Na década de 40, com o advento da quimioterapia, a história da TB começou a mudar. A estreptomicina (S) foi o primeiro fármaco

efetivo contra *M. tuberculosis*, seguido do ácido para-aminosalicílico. O uso combinado destes fármacos aumentou a eficácia do tratamento, o que levou à diminuição dos índices de mortalidade da doença (LEHMANN, 1964; SCHATZ *et al.*, 1944; HIJJAR *et al.*, 2007; LEÃO; PORTAELS, 2007). Na década de 50, com a descoberta da isonizida (H), um fármaco micobactericida, e da rifampicina (R) surgiu uma nova era no tratamento da TB, que passou a ser ambulatorial, tornando desnecessária, na maioria das vezes, a internação do paciente (DANIEL, 2006).

No Brasil, em 1970, foi criado o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), o qual atua até hoje, com o objetivo de promover a integração dos diferentes níveis do governo. O PNCT visa a redução da morbidade, mortalidade e de problemas socioeconômicos decorrentes da doença (RUFFINO-NETTO, 1999; FERNANDES *et al.*, 2011).

Em torno de 1985, os casos de TB começaram a aumentar novamente no mundo, devido a uma série de fatores, como o declínio das atividades dos programas de controle, o advento da Aids, o aumento da população carcerária e de moradores de rua, o abuso de drogas, o aglomerado populacional e o movimento migratório. A diminuição das ações dos programas de controle ocorreu, pois a TB foi encarada como uma doença em fase de erradicação (RUFFINO-NETTO, 2002; LEÃO; PORTAELS, 2007).

A TB foi considerada, por muitos autores, como uma doença reemergente no mundo. Esta afirmativa pode ser válida para países europeus e para os Estados Unidos, contudo não é válida para o Brasil,

no qual a doença não é um problema de saúde pública emergente e tampouco reemergente. A TB é, neste país, uma doença que sempre esteve presente, porém foi negligenciada durante anos (RUFFINO-NETTO, 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, na década de 90, oito milhões de novos casos de TB ao ano, sendo 95% concentrados nos países em desenvolvimento. No ano de 1993, diante da alta incidência e mortalidade da TB, a OMS declarou esta doença em estado de emergência. A estratégia de terapia diretamente observada, DOTS (*Direct Observation Therapy Strategy*), foi estabelecida como ferramenta fundamental no controle da doença. A OMS uniu-se com instituições de alto nível científico e/ou poder econômico, como o Banco Mundial, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), IUATLD, *Royal Netherlands Tuberculosis Association* e *American Thoracic Association* para formar o Plano Global *STOP TB* (WHO, 2001b).

O *STOP TB* tem como principais metas até 2015, deter e começar a reverter a incidência mundial da doença; reduzir em 50% a prevalência e o número de mortes, em relação a 1990; e, até 2050, eliminar a TB como problema de saúde pública, ou seja, limitá-la a um caso por milhão de habitantes (RUFFINO-NETTO, 2002; WHO, 2011b).

2.2 Agente Etiológico

A TB é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, do gênero *Mycobacterium*, que compõe a família *Mycobacteriaceae*, da subordem *Corynebacterineae*, da ordem *Actinomycetales*, da subclasse

Actinobacteridae e classe *Actinobacteria*, do domínio *Bactéria* (BARRERA, 2007; EUZEBY, 2011).

O gênero *Mycobacterium* é constituído pelo *M. leprae*, por espécies que compõem o Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e por outras micobactérias denominadas Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) (BROSCH *et al.*, 2002; BARRERA, 2007).

O Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, agente da TB humana; *M. bovis*, principal agente da TB bovina; *M. bovis-Bacille Calmette-Guérin (BCG)* – derivado do *M. bovis*, utilizado na vacinação antituberculosa; *M. bovis* subsp *caprae*, causador de TB em caprinos; *M. africanum*, agente da TB humana encontrado mais frequentemente no continente Africano; *M. microti*, que causa TB em roedores; *M. pinnipedii*, agente da TB em leões marinhos e no homem; e *M. canettii*, variante de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália. Estas espécies são muito similares, apresentando 99,9% de identidade genética e, por isso, estão incluídas em um mesmo complexo. No entanto, apresentam diferenças quanto aos reservatórios naturais, patogenicidade e características fenotípicas e epidemiológicas (NIEMANN; RICHTER; RÜSCH-GERDES, 2000; BROSCH *et al.*, 2002; ROSEMBERG; TARANTINO, 2002; COUSINS *et al.*, 2003).

Embora *M. tuberculosis* seja o mais comum agente causador da TB em humanos, *M. bovis* é responsável por 0,5 a 7,2% dos casos de TB humana em países industrializados e por 10 a 15% dos novos casos em países em desenvolvimento (de la RUA-DOMENECH, 2006).

Estes microrganismos apresentam forma bacilar com dimensões que variam de 0,2 a 0,6 μm de largura e 1 a 10 μm de comprimento. São delgados, retos ou ligeiramente curvos, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e são incapazes de formar esporos, conídeos ou cápsulas (LEÃO *et al.*, 2004).

Embora muitas vezes classificado como Gram-positivo, *M. tuberculosis* não se cora pela coloração de Gram, sendo corado pelos métodos de coloração de *Ziehl-Neelsen* e de *Kinyoun*. Ambas as técnicas utilizam a carbolfucsina, a qual confere coloração vermelha às micobactérias. Por resistirem ao descoloramento subsequente com solução álcool-ácido, receberam a designação “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) (GUTIERREZ *et al.*, 2001; ROSEMBERG; TARANTINO, 2002).

Esta característica tintorial deve-se ao alto teor de lipídios – cerca de 60% – que compõe a sua parede celular, formada por uma espessa camada de peptidoglicano (ácido N-glicolilmurâmico), o qual se encontra covalentemente ligado às cadeias de arabinogalactano (polissacarídeo), que por sua vez, estão esterificados na sua extremidade com ácidos graxos de cadeia longa, os ácidos micólicos. Esses são os principais responsáveis por conferir às micobactérias resistência à descoloração por álcool-ácido, assim como a resistência à ação de diversos agentes químicos e antibióticos e a capacidade de formar de biofilmes (ROSEMBERG; TARANTINO, 2002).

2.3 Genoma de *M. tuberculosis*

O genoma da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* é composto por 4.411.529 pb (pares de bases), contém em torno de 4.000 genes e apresenta um conteúdo de GC (guanina e citosina) de 65,6% uniformemente distribuído ao longo do genoma (COLE *et al.*, 1998).

A maior parte da recombinação gênica ocorre por meio dos transposons, que são elementos inerentemente instáveis com capacidade de ocasionar diferentes tipos de rearranjos, como transposição, deleção, inversão e duplicação. O genoma de *M. tuberculosis* é rico em transposons, particularmente as sequências de inserção (SI), definidas como fragmentos de DNA capazes de movimentar-se de forma independente no genoma, inserindo-se em localizações múltiplas no DNA cromossomal ou plasmidial. Até hoje, já foram descritas 56 SI no genoma de *M. tuberculosis*, entre elas a IS6110, que é a mais detalhadamente descrita e a mais abundante, sendo que o seu número de cópias varia de acordo com a linhagem da cepa analisada. Desta forma, essas sequências são geradoras de polimorfismo genético e, portanto, são frequentemente utilizadas em métodos moleculares para discriminação de cepas (COLE *et al.*, 1998; MÖNSTROM *et al.*, 2002).

2.4 Transmissão e Patogênese

A TB é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica que acomete principalmente os pulmões (TB pulmonar), podendo também atingir outros sítios anatômicos (TB extrapulmonar) ou ocorrer de maneira disseminada (TB miliar) (PANDOLFI *et al.*, 2007).

A transmissão da TB ocorre através das vias respiratórias por meio da inalação de núcleos secos de gotículas contendo bacilos expelidos pelo espirro, tosse ou fala de portadores de TB pulmonar ativa e bacilíferos. Desta maneira, os pacientes bacilíferos representam a principal fonte de infecção e são os responsáveis pela disseminação da doença (BRASIL, 2011a; CAMPOS, 2006). Estima-se que um paciente com TB pulmonar ativa e bacilífero, se não tratado, em um ano pode infectar de 10 a 15 pessoas, sendo que o risco de contágio entre contatos intradomiciliares ou institucionais é de 5 a 20% e de 0,2 a 2% entre contatos casuais (WHO, 2011c).

Após a inalação, os bacilos atingem os alvéolos pulmonares, iniciando o processo patológico da doença, caso consigam ultrapassar os mecanismos de defesa inespecíficos e multiplicar-se dentro do macrófago alveolar, o que gera uma reação inflamatória local e a formação de um foco pulmonar (CAMPOS, 2006; PANDOLFI *et al.*, 2007). Neste ambiente intracelular, o pH é ácido e o oxigênio é rarefeito, portanto o bacilo deprime seu metabolismo e sua multiplicação. Nesta fase há infecção, porém ainda não há o aparecimento de sinais e sintomas. Em seguida, devido à quimiotaxia, muitos macrófagos migram para essa região formando um tubérculo inicial. Apesar da maioria desses macrófagos não conseguirem destruir os bacilos, eles liberam enzimas e citocinas que geram uma reação inflamatória local, formando um centro caseoso. Nas lesões caseosas, nas quais o pH é ácido e a tensão de oxigênio é muito baixa, o metabolismo do bacilo se deprime, promovendo um estado de latência. Nesta fase, a lesão pulmonar torna-se calcificada, sendo esta forma a responsável pelas recidivas da doença. O centro caseoso existente no granuloma dessa lesão aumenta pelo

processo de liquefação, formando a cavidade tuberculosa. Na lesão intracavitária, o pH é neutro e a oferta de oxigênio e de nutrientes é alta, possibilitando condições ideais para a multiplicação do bacilo. A liquefação continua até o momento que o tubérculo se rompe, permitindo que os bacilos se espalhem nos bronquíolos. A partir de então os bacilos são eliminados pela via respiratória, contribuindo para a transmissão da doença, além de se disseminarem para outros sistemas do corpo (CAMPOS, 2006; CAMPOS, 2007; HARVEY *et al.*, 2007; TORTORA *et al.*, 2009).

A partir de um foco pulmonar ocorre a disseminação linfática até o gânglio satélite (foco ganglionar) e, em seguida, a disseminação hematogênica, resultando na TB disseminada ou em formas pulmonares e extrapulmonares da doença. O pulmão é o primeiro órgão a ser atingido, possuindo condições ideais para o crescimento bacteriano e, em 90% dos casos é a localização da doença, sendo a forma pulmonar a principal responsável pela transmissibilidade inter-humana (GUTIERREZ *et al.*, 2001, ROSEMBERG, TARANTINO, 2002, CAMPOS, 2006).

Estima-se que em cerca de 90% das pessoas imunocompetentes, as defesas imunes mediadas por células são eficazes e não permitem o desenvolvimento da doença. Porém, em 5% das pessoas infectadas, as defesas imunes são ineficientes, o que resulta no desenvolvimento da doença. Nos demais 5%, o bacilo permanece em estado de latência, podendo ser reativado tardiamente devido a um processo de imunossupressão e, com isso, levar ao desenvolvimento da doença

(CAMPOS, 2006; LOPES *et al.*, 2006; HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2007).

Dentre os grupos mais vulneráveis ao desenvolvimento da TB, destacam-se os moradores de rua, os presidiários, as pessoas que vivem com HIV/Aids e os indígenas, os quais apresentam, respectivamente, 60, 40, 30 e 4 vezes maior o risco de adoecer por TB em relação à população geral brasileira (DIVE, 2011). A dependência química, sobretudo de álcool e do *crack*, e o tabagismo também têm sido apontados como importantes fatores predisponentes para o desenvolvimento da TB (NAVA-AGUILERA *et al.*, 2009; REHM *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2010).

2.5 Manifestações clínicas

Alguns pacientes com TB pulmonar não demonstram nenhum indício da doença; outros apresentam sinais e sintomas aparentemente simples que são ignorados durante alguns meses ou anos. Contudo, na maioria dos casos, os sinais e sintomas mais frequentes são tosse seca, no início e, em seguida, com presença de secreção por mais de 4 semanas, transformando-se, na maioria das vezes, em uma tosse produtiva purulenta; hemoptise; astenia; febre baixa, geralmente vespertina; sudorese noturna; inapetência; palidez; emagrecimento acentuado; rouquidão; e prostração. Nos casos graves os pacientes podem apresentar dispnéia; hemoptise maciça e empiema pleural (BRASIL, 2011b; CDC, 2011).

A TB também pode manifestar-se em diferentes formas extrapulmonares, cujos sinais e sintomas estão relacionados com o órgão

acometido, contudo a ocorrência é maior entre os imunocomprometidos, especialmente nos indivíduos com HIV/Aids (BRASIL, 2011a). Dentre as formas extrapulmonares da doença, as mais frequentes são a pleural, linfática, osteoarticular, peritoneal, pericárdica, ganglionar, geniturinária, meníngea, oftálmica, cutânea e intestinal, embora praticamente qualquer local do organismo possa ser afetado pela doença. Dessas, a TB pleural é a forma mais comum nos indivíduos HIV soronegativos e, em cerca de 20% dos casos, está associada com lesão pulmonar ativa (ROSEMBERG; TARANTINO, 2002; LOPES *et al.*, 2006). Nos indivíduos com HIV/Aids, a TB ganglionar periférica é a forma extrapulmonar mais frequente. Deve-se considerar também a importância da neurotuberculose, que apresenta quadro clínico de meningite ou meningoencefalite, sendo responsável por 3% dos casos de TB e por até 10% dos casos em indivíduos com HIV/Aids (BRASIL, 2011a).

2.6 Epidemiologia

No ano de 2011, o Relatório de Controle Global da Tuberculose apontou uma queda significativa na incidência, na prevalência e na mortalidade da doença no mundo. Verifica-se, desde 2002, uma redução de 1,3% ao ano na incidência global da TB, variando de menos de 1% no leste do Mediterrâneo a 1,8% na África e 3,7% nas Américas. Já a redução do número absoluto de casos passou a ser observada somente a partir de 2006, quando a incidência da doença excedeu o índice de crescimento populacional. Acredita-se que até 2015, seja alcançada a

meta de redução de 50% da incidência global em relação do ano de 1990. Entretanto, apesar da prevalência global da doença também se encontrar em declínio desde 1990, notavelmente a partir de 1997, a OMS acredita que a meta de redução de 50% da TB nas Américas, seja pouco provável até o ano de 2015 (WHO, 2011a).

Dentre os índices de avaliação da doença, a taxa de mortalidade global apresentou a maior queda, alcançando um declínio de 40% entre os anos de 1990 e 2010. Contudo, a TB é considerada a segunda causa de morte ocasionada por doenças infecciosas e a primeira causa de morte nos indivíduos HIV soropositivos. Pressupõe-se que, todas as regiões do Globo, com exceção da África, alcancem uma redução de 50% na taxa de mortalidade até o ano de 2015 (WHO, 2011a).

A China foi o país que apresentou maior desempenho na redução dos índices da doença. De 1990 a 2010, as taxas de prevalência e de mortalidade foram reduzidas 50% e 80%, respectivamente, e a incidência caiu 3,4% ao ano (WHO, 2011a). No Brasil, a taxas de incidência e de mortalidade foram reduzidas 26% e 32%, respectivamente, neste mesmo período, e a taxa de redução da incidência foi de 1,4% ao ano e da mortalidade foi de 2,0% ao ano (BRASIL, 2011c).

Todo esse progresso alcançado ocorreu devido ao financiamento externo, como da Fundação *Bill Gates* que investe bilhões de dólares anualmente no combate da TB, especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Entretanto, isso não é motivo de complacência, pois a TB ainda é um problema de saúde pública mundial e milhares de pessoas contraem a doença a cada ano, muitas evoluindo ao óbito (WHO, 2011a).

A OMS estimou, em 2010, uma prevalência de 12 milhões de casos (178/100.000 habitantes) e uma incidência mundial de 8,8 milhões de casos, o que representa 128 casos novos por 100.000 habitantes (Figura 1). Oitenta e cinco por cento desses casos ocorreram em países pobres ou com recursos limitados localizados na Ásia (59%) e na África (26%) e, cerca de 1,0 a 1,2 milhões (12–14%) em co-infectados com o vírus HIV, dos quais 82% estavam localizados no continente Africano (WHO, 2011a; PARSONS *et al.*, 2011).

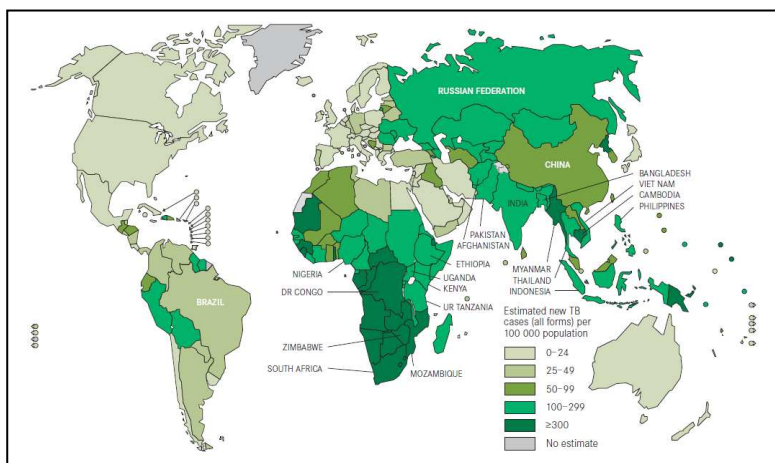


Figura 1. Estimativa mundial de casos novos para todas as formas de tuberculose a cada 100.000 habitantes (WHO, 2011).

O principal fator responsável pelo grande número de casos de TB em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento é a pobreza, que está diretamente relacionada às precárias condições sanitárias, grande concentração populacional, dificuldade de acesso aos serviços de saúde e a má-nutrição (PARSONS *et al.*, 2011). Noventa e cinco por cento dos casos de TB e 98% dos casos de óbito por TB ocorrem em países que

apresentam altos índices de pobreza (Figura 2), nos quais a doença representa, ainda, um grande impacto na economia do país, pois 17% dos óbitos ocorrem em pessoas na faixa etária economicamente ativa, dos 15 aos 49 anos (BENATAR; UPSHUR, 2010).

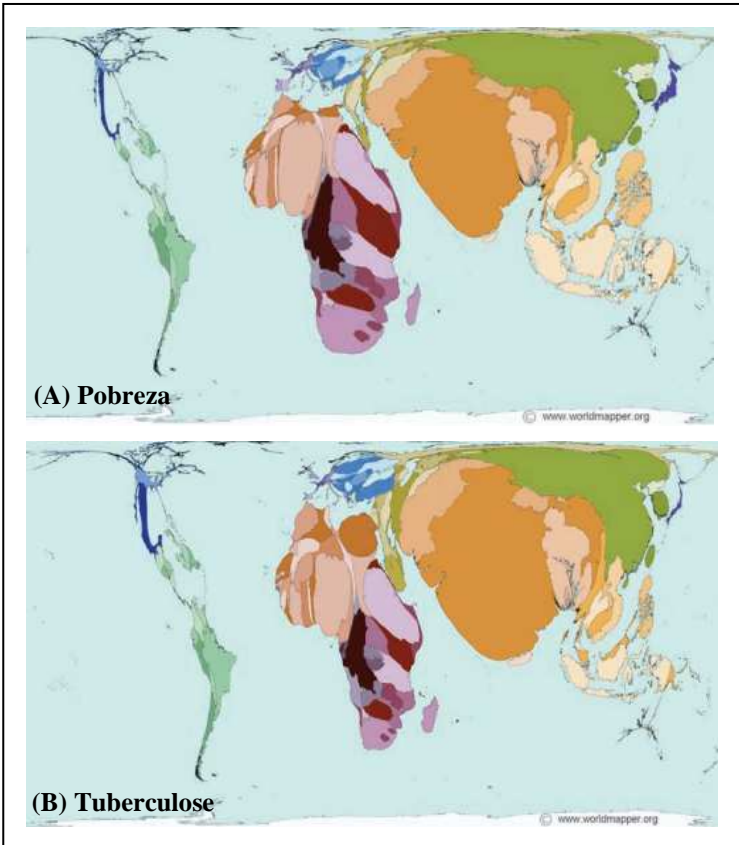


Figura 2. Representação do grau de pobreza (A) e de casos de tuberculose (B) no mundo. O tamanho dos continentes são proporcionais ao grau de pobreza e ao número de casos de TB, mostrando a íntima relação entre a pobreza e a ocorrência dessa doença. Adaptado de BENATAR; UPSHUR, 2010.

No ano de 2010 ocorreram 1,4 milhões de mortes por TB (20 mortes/100.000 habitantes), sendo 0,35 milhões (0,32 – 0,39 milhões) nos indivíduos HIV soropositivos, uma taxa de letalidade duas vezes maior em relação aos não co-infectados (WHO, 2010b; PARSONS *et al.*, 2011; KWAN; ERNST, 2011).

A OMS identifica 22 países, situados principalmente no sudeste Asiático, oeste do Pacífico e África, como os detentores da maior carga de TB, sendo responsáveis por 82% dos casos mundiais. A Índia ocupa a primeira posição, com 26% de todos os casos de TB no mundo, e, juntamente com a China, totalizam 38% dos casos mundiais. Dos países das Américas, apenas o Brasil integra esta relação, ocupando a 22^o posição, concentrando 35% de todos os casos de TB que ocorrem neste continente (WHO, 2011a; BRASIL, 2011c).

No Brasil, segundo a OMS, no ano de 2010 ocorreram 70.000 – 100.000 casos novos (36 – 51/100.000 habitantes) de TB e a taxa de mortalidade foi de 2,6 mortes/100.000 habitantes. Dentre os casos novos, 18.000 (15.000 – 22.000) ocorreram em indivíduos HIV soropositivos (9,3 casos/100.000 habitantes) (WHO, 2011a).

Os casos de TB estão concentrados nas capitais e regiões metropolitanas do Brasil, nas quais a incidência média, estimada em 67,2 casos novos/100.000 habitantes, é maior que a incidência nacional (43/100.000 habitantes). Nesses locais, o crescimento urbano desordenado formando bolsões de pobreza e miséria, o aglomerado populacional, a má nutrição, as maiores taxas de co-infecção TB/HIV, os problemas sociais relacionados à dependência química e a precariedade de acesso aos serviços de saúde são fatores que

sinergicamente atuam no desenvolvimento da TB (BRASIL, 2011c; MONTEIRO *et al.*, 2006; HIJJAR *et al.*, 2007).

Em Santa Catarina, estimou-se 1.700 casos novos em 2010, dos quais cerca de 20% ocorreram em indivíduos HIV soropositivos. O Estado possui uma das mais baixas taxas de incidência de TB (27,6/100.000 habitantes) do país, porém alguns municípios apresentam taxas iguais e/ou superiores às do Brasil (43/100.000 habitantes) e de outros países, nos quais a situação da TB é muito grave, como por exemplo, Itajaí com 77,3 casos novos/100.000 habitantes. Florianópolis apresenta uma média de 48,3 casos novos/100.000 habitantes, sendo o município com maior número de casos do Estado (DIVE, 2011; BRASIL, 2011c; WHO, 2011a).

2.7 Tuberculose e HIV

O aumento da prevalência global do HIV trouxe sérias implicações para os programas de controle da TB, particularmente em países com alta prevalência dessa doença (KWAN; ERNST, 2011).

A infecção pelo HIV exerce grande influência no curso natural da TB. Enquanto nos indivíduos imunocompetentes a chance de uma infecção evoluir para doença ativa é de 10% ao longo de suas vidas, nos indivíduos HIV positivos a chance aumenta para 10% ao ano (HOUBEN *et al.*, 2011).

O HIV não só tem contribuído para um crescente número de casos de TB, como também tem sido um dos principais responsáveis pelo aumento da mortalidade entre os indivíduos HIV soropositivos (SANTOS; BECK, 2009; KWAN; ERNST, 2011; WHO 2011c).

Especialmente em países com elevada prevalência da TB, a progressão para doença ativa geralmente é a primeira manifestação da infecção pelo vírus HIV (KWAN; ERNST, 2011). Desta forma, é frequente a descoberta da soropositividade para o HIV durante o diagnóstico de TB. Estima-se que, no Brasil, embora a oferta de testagem para HIV seja de aproximadamente 70%, somente 50% dos que realizam o teste têm acesso ao seu resultado em momento oportuno. Desses, a prevalência de positividade é de 15% (BRASIL, 2011a).

Logo, o controle da co-infecção TB/HIV exige a implantação de um programa que permita reduzir a incidência de ambas as doenças. Aos pacientes com TB, deve-se, por meio da oferta do teste anti-HIV e de programas de monitoramento, garantir o acesso precoce ao diagnóstico da infecção pelo vírus HIV e ao tratamento antirretroviral, se pertinente. E aos indivíduos que vivem com HIV, deve-se garantir o diagnóstico precoce da TB ativa, naqueles com manifestações clínicas sugestivas, o acesso à realização da prova tuberculínica e o tratamento da infecção latente, quando indicado (BRASIL, 2011a).

2.8. Tratamento

Uma vez diagnosticada, a TB é uma doença curável, desde que seja empregado o tratamento adequado, de modo regular e no período mínimo de seis meses. No ano de 2009, segundo dados do SINAN, 70,5% e 39,7% dos casos novos de TB em indivíduos soronegativos e soropositivos para o vírus HIV, respectivamente, evoluíram para cura (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011c).

De modo geral, o esquema terapêutico antituberculose deve ter atividade bactericida precoce a fim de diminuir a infectividade dos pacientes bacilíferos; deve prevenir a emergência de bacilos resistentes; e deve ser capaz de eliminar os bacilos em estado de latência, evitando, assim, a recidiva da doença (BRASIL, 2011a).

O MS (Ministério da Saúde) preconiza dois esquemas básicos compostos pelos fármacos de primeira linha, rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) e etambutol (E). Ambos os esquemas são indicados para casos novos e retratamento (seja recidiva ou retorno após abandono) de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar, exceto a forma meningoencefálica. São compostos por duas fases de tratamento, uma intensiva, com duração de 2 meses, e outra de manutenção, de 4 meses. Um esquema é indicado para adultos e adolescentes (>10 anos) e consiste na administração de R, H, Z e E, em um comprimido de dose fixa combinada, por 2 meses consecutivos; seguidos de R e H por mais 4 meses. O outro esquema é indicado para crianças e consiste na administração de R, H e Z por 2 meses consecutivos, seguido de R e H por mais 4 meses. Em ambos os esquemas a dose a ser administrada varia de acordo com o peso do paciente. Para o tratamento de TB meningoencefálica, utiliza-se o mesmo esquema terapêutico básico para adultos e adolescentes e para crianças, porém, em ambos os esquemas, prolonga-se a fase de manutenção (BRASIL, 2011a).

Dentre os fármacos que compõem esses esquemas terapêuticos, H e R, efetivos tanto nas lesões caseosas quanto nas cavitárias, são os que possuem maior poder bactericida, diminuindo rapidamente a infectividade dos pacientes. A rifampicina é o fármaco com maior

atividade nas lesões caseosas, sendo essencial, na redução da ocorrência de recidiva da doença. Já Z é ativo somente em meio ácido, como no interior dos macrófagos, atuando, na eliminação dos bacilos persistentes e na esterilização das lesões; e o E é um fármaco bacteriostático utilizado em associação com medicamentos mais potentes para prevenir a emergência de bacilos resistentes (CAMPOS, 2007; BRASIL, 2011a).

Além destes esquemas terapêuticos, o MS preconiza também o tratamento da TB latente com isoniazida, se descartada doença ativa, por um período mínimo de 6 meses (BRASIL, 2011a).

No Brasil, todos os fármacos para o tratamento da TB ativa ou latente são fornecidos gratuitamente a todos os pacientes registrados no Sistema Nacional de Agravos Notificáveis (SINAN) e acompanhados nas Unidades de Saúde (CAMPOS, 2007; BRASIL, 2011a).

2.9 Resistência aos Antimicrobianos

O aumento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos disponíveis para o tratamento da doença, representa hoje um grande desafio para todos os setores da sociedade envolvidos no combate da TB (ZAGER, 2008).

A deterioração do sistema de saúde pública associada às baixas condições sócio-econômicas de algumas regiões tem levado a crescentes taxas de abandono ao tratamento (MATTEELLI, 2007; ZAGER, 2008). No Brasil, em 2010, as taxas de abandono foram de 6,1% nos indivíduos HIV soronegativos e de 11,5% nos soropositivos (BRASIL, 2011c).

O abandono do tratamento e o uso incorreto dos fármacos contribuem para a ocorrência da resistência adquirida – seleção de bacilos mutantes primariamente resistentes em uma população selvagem. Cada população micobacteriana apresenta diferentes proporções de bacilos resistentes aos diferentes fármacos tuberculostáticos. É por esse motivo que se utilizam esquemas terapêuticos com diferentes fármacos simultaneamente, pois bacilos naturalmente resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro. Essa conduta terapêutica representa uma forma de evitar a seleção de bacilos resistentes (MATTEELLI, 2007; ZAGER, 2008; BRASIL, 2011b).

A OMS define a monorresistência como a resistência de *M. tuberculosis* a um dos antibióticos de primeira linha e a multirresistência (TB-MDR) como a resistência a pelo menos R e H – os dois fármacos mais efetivos na terapia antimicobacteriana. Estima-se que 20% de todos os casos novos de TB sejam TB-MDR, porém a taxa de detecção desses pacientes por meio da realização do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos, ainda é, em alguns países, muito baixa (WHO, 2011a). No Brasil, no ano de 2010, foram notificados 607 casos de TB-MDR, o que representa 33% dos casos estimados. Em Santa Catarina, de 2002 a 2009 foram notificados nos SINAN 77 casos de TB-MDR (BRASIL, 2011c).

A TB extensivamente resistente (TB-XDR) é a TB causada por micobactérias que, além de resistentes a R e I, são resistentes a uma fluoroquinolona e a um fármaco injetável de segunda linha (WHO, 2010). Segundo dados da OMS, 114 países já reportaram casos de TB-XDR. No Brasil, já foram notificados 90 casos, sendo 37 localizados no

Estado do Rio de Janeiro e 27 em São Paulo. Em Santa Catarina, 2 casos foram notificados, dos quais um evoluiu a óbito e outro encontra-se em tratamento (WHO, 2010; BRASIL, 2011c).

A TB-MDR e a TB-XDR não respondem aos esquemas básicos de tratamento com os fármacos de primeira linha. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) opta, mais uma vez, pela estratégia de tratamento padronizado, o qual se encontra descrito no Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil (2011). Os medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento da TB-MDR e da XDR-TB são: injetáveis (estreptomicina – 1ª linha –, amicacina e capreomicina – 2ª linha), orais de 2ª linha (terizidona ou cicloserina, etionamida e ácido paraminossalicílico) e fluoroquinolonas (ofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina). Além de mais demorados e mais caros, esses tratamentos costumam apresentar mais efeitos adversos, devido a maior toxicidade desses fármacos, e menor taxa de cura (WHO, 2010; WHO, 2011a).

As elevadas taxas de resistência adquirida e a permanência desta situação sem o devido controle acarretam um subsequente aumento da transmissão de isolados resistentes para a comunidade, com aumento da taxa de TB resistente primária (MATTEELLI, 2007; ZAGER, 2008). Este cenário reforça a necessidade de adoção de medidas para o controle da disseminação das cepas MDR e XDR, incluindo a utilização de testes rápidos para detecção dessas cepas, o que agiliza o início de um tratamento adequado e, conseqüentemente, diminui a cadeia de transmissão de cepas resistentes.

2.10 Diagnóstico

2.10.1. Radiológico

A radiografia de tórax é um método diagnóstico de escolha na avaliação inicial dos pacientes. É de grande importância na investigação da TB, já que diferentes achados radiológicos, muitas vezes, sugerem e diferenciam TB ativa (primária, pós-primária e secundária) de uma infecção passada (sequela de TB) (DALEY *et al.*, 2011; BRASIL, 2011a). O exame radiológico pulmonar permite, também, a detecção da forma pleural da doença; a exclusão de uma doença pulmonar associada que necessite de tratamento concomitante; e a avaliação da evolução radiológica, sobretudo naqueles pacientes que não respondem ao tratamento (ROY; ELLIS, 2010; BRASIL, 2011a).

Apesar da importância do exame radiológico, é indispensável a solicitação de um exame bacteriológico a todos os pacientes com suspeita de TB, visto que até 15% dos casos de TB pulmonar não apresentam alterações radiológicas, principalmente nos indivíduos imunossuprimidos (DALEY *et al.*, 2009; DALEY *et al.*, 2011).

2.10.2 Imunológico

A prova tuberculínica (PT), também conhecida como PPD (*Purified Protein Derivative* – derivado purificado de fração protéica antigênica do bacilo) ou reação de *Mantoux*, é um exame complementar utilizado na identificação dos indivíduos que tiveram contato com *M. tuberculosis*. Desta forma, a PT evidencia apenas a infecção por

micobactérias, sendo indicada para a investigação de infecção latente por *M. tuberculosis*; porém não caracteriza a presença de doença ativa, exceto na viragem tuberculínica (BRASIL, 2011a).

Consiste na inoculação intradérmica de um derivado protéico de *M. tuberculosis* a fim de avaliar a resposta imune celular a estes antígenos (CONDE *et al.*, 2009). Esta inoculação causa uma infiltração nodular, plana e irregular, acompanhada de área eritematosa, de extensão mais ou menos delimitada. Entre 48 e 72 horas após sua aplicação, o maior diâmetro transverso da área do enduredo palpável deve ser medido com uma régua milimetrada transparente e o resultado deve ser registrado em milímetros (CONDE *et al.*, 2009; CDC, 2010; BRASIL, 2011a).

A grande desvantagem da PT é a possibilidade de existência de resultados falsos negativos. A anergia em imunossuprimidos, como nos indivíduos com HIV/Aids, especialmente quando a contagem de células TCD4⁺ é inferior a 100 células/ mm³, e nos pacientes em terapia com imunossupressor, pode resultar em diminuição da sensibilidade do teste (FISK *et al.*, 2003; DUARTE, 2009; CDC, 2010). Reações falso-positivas também podem ocorrer, como nos indivíduos infectados por outras micobactérias ou em vacinados pela BCG, principalmente se vacinados (ou revacinados) após o primeiro ano de vida (WANG *et al.*, 2002; WEIR *et al.*, 2006, FARHAT *et al.*, 2006; CDC, 2010).

Desta forma, a PT como investigação de TB latente é indicada apenas para indivíduos que apresentam alto risco de desenvolver doença ativa, como os contatos recentes de pacientes bacilíferos, os dependentes químicos, os desnutridos, os HIV soropositivos, os pacientes que

iniciarão terapia imunossupressora e os que apresentam outras condições médicas que comprometam seu sistema imunológico (HOWARD *et al.*, 2002; HWANGA *et al.*, 2009; CDC, 2010). A PT também é indicada para diagnóstico de TB doença em crianças (BRASIL, 2011b).

Na última década, testes imunossorológicos para o diagnóstico de TB latente têm despertado o interesse de muitos pesquisadores. Esses testes são denominados IGRA (*Interferon Gamma Release Assay*) e baseiam-se na detecção de intérferon-gama. Uma meta-análise de 38 estudos mostrou que os IGRAs possuem alta especificidade, mesmo em indivíduos vacinados com a BCG, porém, assim como a PT, não distingue TB latente de doença ativa (PAI; ZWERLING; MENZIES, 2008).

2.10.3 Laboratorial

No Brasil, o diagnóstico laboratorial de micobactérias é coordenado nacionalmente pelo Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF) no Rio de Janeiro, e nos Estados pelos Laboratórios de Referência Estaduais – Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN). Alguns municípios brasileiros apresentam um Laboratório de Referência Municipal, vinculado à Secretaria Municipal de Saúde. Há também os Laboratórios Locais, que são unidades laboratoriais muitas vezes inseridas nas unidades básicas de saúde, unidades hospitalares e prisionais, que integram a rede estadual ou municipal de laboratórios de saúde pública (BRASIL, 2011a).

A TB ativa é diagnosticada laboratorialmente pela detecção do bacilo em amostras do trato respiratório, no caso de TB pulmonar, ou

em amostras de outros sítios anatômicos, no caso de TB extrapulmonar. O diagnóstico laboratorial é realizado por meio de métodos bacteriológicos, que incluem a baciloscopia, a cultura, a identificação da micobactéria e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (Quadro 1).

Quadro 1. Amostras clínicas encaminhadas com maior frequência para o diagnóstico laboratorial de micobactérias no Brasil.

Tuberculose Pulmonar	Tuberculose Extrapulmonar
Escarro	Urina
Lavado brônquico Lavado bronco-alveolar	Líquidos: pleural, sinovial, peritoneal, pericárdico, ascítico e líquido cefalorraquidiano
Fragmento de tecido pulmonar (biópsia pulmonar)	Secreções ganglionares e de nódulos
Aspirado transtraqueal	Fragmentos de tecidos: biópsias cutâneas, de ossos e de órgãos
Lavado gástrico	Secreções purulentas da pele, nariz, ouvido, olhos, garganta Sangue e aspirado de medula Aspirados de gânglios e de tumores

Fonte: BRASIL, 2001.

A cultura, a identificação e o teste de sensibilidade são procedimentos centralizados nos Laboratórios de Referência Nacional e Estaduais, visto que exigem recursos humanos, ambientais e materiais mais especializados. O MS vem implementando a descentralização da baciloscopia para os laboratórios locais, assim como a descentralização da cultura para os laboratórios municipais e locais (BRASIL, 2011a).

Baciloscopia

A baciloscopia consiste na visualização microscópica do BAAR após fixação em lâmina e coloração específica, geralmente pelo método de *Ziehl-Neelsen*, do material a ser analisado, que pode ter origem pulmonar ou extrapulmonar (BRASIL, 2008).

Por ser uma metodologia de execução rápida, fácil, de baixo custo e que permite estimar o número de bacilos presentes na amostra clínica, favorece a ampla cobertura diagnóstica. No caso de TB pulmonar, identifica a principal fonte de infecção, os pacientes bacilíferos, permitindo a pronta atuação na interrupção da cadeia de transmissão. Além disso, a baciloscopia é muito importante para o acompanhamento do tratamento e para determinar se a terapia está sendo eficiente. No entanto, apresenta como principal desvantagem a sensibilidade limitada, sendo necessários pelo menos 5000 bacilos por mL de amostra para obter-se um resultado positivo (GANGULY, 2002; GARG *et al.*, 2003; RAMACHADRAN; PARAMASIVAN, 2003; BRASIL, 2008).

Cultura

O isolamento das micobactérias em meio de cultura é um método mais sensível do que a baciloscopia tanto para a TB pulmonar quanto para a TB extrapulmonar, detectando a partir de 10 a 100 bacilos viáveis/mL de amostra (BRASIL, 2008). É considerado o método de referência (padrão-ouro) para avaliação de novas metodologias diagnósticas (BRASIL, 2011a).

Os métodos clássicos para cultura de micobactérias baseiam-se na semeadura de amostras clínicas em meios de cultura sólidos, sendo os meios à base ovo, *Löwenstein-Jensen* e *Ogawa-Kudoh* (Laborclin[®], Brasil), os mais comumente utilizados (BRASIL, 2011a). As espécies do CMTB apresentam colônias não pigmentadas e de crescimento lento, dividindo-se, em condições laboratoriais favoráveis, a cada 12 a 24 horas. Isso ocorre em parte porque sua superfície hidrofóbica promove o crescimento aglomerado, retardando a captação dos nutrientes (LEÃO *et al.*, 2004; CAMPOS, 2006; BRASIL, 2008). Desta maneira, a principal desvantagem dos meios sólidos é o tempo de detecção do crescimento bacteriano, que varia de 14 a 30 dias, podendo, em amostras paucibacilares, estender-se por até oito semanas (BRASIL, 2008; BRASIL, 2011a). Além disso, o crescimento lento do bacilo tem um importante significado clínico, pois é um dos fatores que condiciona a evolução crônica da doença (CAMPOS, 2006).

O advento da epidemia do HIV/Aids promoveu um aumento significativo da TB pulmonar com baciloscopia negativa e das formas extrapulmonares e disseminadas, normalmente paucibacilares e rapidamente progressivas. Este novo contexto exigiu o desenvolvimento de sistemas mais rápidos e sensíveis para o isolamento de micobactérias. Diante disso, a partir de 1980, foram desenvolvidos sistemas comerciais de cultivo, baseados em meios líquidos. Esses novos métodos encurtaram o tempo de detecção da positividade, uma vez que a incubação passou a ser monitorada por um sistema informatizado que detecta o crescimento celular (BRASIL, 2008; BRASIL, 2011a).

A cultura em meio líquido utilizando sistemas automatizados e com monitoração contínua é recomendada para laboratórios que apresentam grande volume de amostras clínicas, como hospitais e Laboratórios de Referência (BRASIL, 2008). O LACEN/SC utiliza o sistema automatizado BACTEC-960[®]-MGIT[™] (*Becton & Dickinson*, EUA). Os tubos de cultura são compostos pelo meio líquido *Middlebrook 7H9*, acrescido de antibióticos e enriquecido com OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase). Estes tubos contêm um composto fluorescente, o rutênio, que é sensível à presença do oxigênio dissolvido no meio. Inicialmente, uma grande quantidade do oxigênio dissolvido inibe as emissões do composto e pouca fluorescência pode ser detectada. Posteriormente, com o crescimento bacteriano há consumo de oxigênio, o que ocasiona a emissão da fluorescência e sua detecção pelo equipamento. Este sistema reduz o tempo de detecção da positividade para cerca de 15 dias (BECTON & DICKINSON, 2011).

Segundo o Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil, a cultura de micobactérias deve ser solicitada quando o paciente apresentar suspeita clínica e/ou radiológica, porém baciloscopia repetidamente negativa; em casos de suspeita de TB extrapulmonar, quando o paciente apresentar dificuldades de obtenção de amostra (por exemplo, crianças) e em casos de suspeita de micobacterioses (BRASIL, 2011a).

Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

O Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) é um teste laboratorial realizado para detectar a resistência/sensibilidade dos

isolados de *M. tuberculosis* aos fármacos utilizados no tratamento da TB (BRASIL, 2008).

Os métodos fenotípicos disponíveis pelos laboratórios do país são: o método das proporções, que utiliza meio sólido e, portanto, tem seu resultado após 42 dias de incubação (CANETTI *et al.*, 1963); e os métodos que utilizam o meio líquido, com resultados disponíveis após 5 a 13 dias. Ambos os métodos avaliam a inibição do crescimento bacteriano na presença de antimicrobianos. Normalmente, os fármacos testados são: estreptomicina, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol (BRASIL, 2011b).

O LACEN/SC realiza o TSA qualitativo e automatizado no BACTEC-960[®]-MGIT[™] (EUA) para os seguintes fármacos: estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol. O teste é baseado no crescimento de *M. tuberculosis* em 5 tubos, dos quais 4 tubos testes, que apresentam um dos fármacos testados, e 1 tubo controle de crescimento (sem adição de fármaco). A análise da fluorescência do tubo contendo o fármaco é comparada à fluorescência do tubo controle. Esta comparação é realizada automaticamente pelo equipamento, o qual interpreta os resultados utilizando um algoritmo específico e libera os resultados de sensibilidade como S (sensível) ou R (resistente) (BECTON & DICKINSON, 2011).

No LACEN/SC, todas as amostras que apresentarem resultados compatíveis com TB-MDR (resistência a pelo menos isoniazida e rifampicina) são encaminhadas ao CRPHF. Além de confirmar os resultados de resistência aos fármacos de primeira linha, o CRPHF realiza também no BACTEC-960[®]-MGIT[™] (Becton & Dickinson,

EUA), o teste de sensibilidade para amicacina, canamicina, capreomicina e ofloxacina, fármacos utilizados no tratamento de TB resistente e de algumas espécies de MNT.

Métodos Moleculares

As metodologias moleculares começaram a ser empregadas no final da década de 80, com o objetivo de aprimorar o diagnóstico, aumentando a sensibilidade na detecção do bacilo, especialmente a partir do escarro, já que este é a amostra biológica mais facilmente obtida para análise. O aumento na sensibilidade das técnicas diagnósticas implica na rápida detecção do bacilo e, conseqüentemente, no bloqueio da cadeia de transmissão da TB (EISENACH *et al.*, 1991; CRAWFORD *et al.*, 1994; JONAS; LONGIARU, 1997; FLORES *et al.*, 2005; NEONAKIS *et al.*, 2008).

Vários ensaios moleculares para detecção de micobactérias têm sido descritos, incluindo as metodologias *in house* e os *kits* comerciais. Os métodos *in house* são desenvolvidos e padronizados nos diversos laboratórios de pesquisa. São mais baratos do que os *kits* comerciais, porém para serem disponibilizados na rotina necessitam de estudos de validação interlaboratorial e análises de custo-efetividade. Já os *kits* comerciais são produzidos em larga escala e geralmente caracterizam-se por uma maior reprodutibilidade de resultados (ROSSETTI *et al.*, 1997; DROBNIOWSKI *et al.*, 2003; FLORES *et al.*, 2005; PARSONS *et al.*, 2011).

Estão disponíveis no mercado diversos *kits* comerciais capazes de detectar o CMTB em isolados e em amostras clínicas, como o Cobas®

Amplicor *M. tuberculosis* (Roche, Alemanha), o *Amplified* MTD (Gen-Probe Inc., EUA) e o GenoType[®] *Mycobacterium Direct* (Hain Lifescience, Alemanha). Alguns testes comerciais, além da detecção do CMTB, também fornecem informações a respeito da sensibilidade aos antimicrobianos, como o GeneXpert[®] (Cepheid, EUA) e GenoType[®] MTBDRplus (Hain Lifescience, Alemanha); e outros, permitem a identificação de algumas espécie de micobactérias, como o INNO-LiPA *Mycobacteria* v2[®] (Innogenetics, Bélgica) e o GenoType[®] *Mycobacterium direct* (Hain Lifescience, Alemanha). Embora forneçam resultados em, geralmente, até 8 horas, esses kits comerciais apresentam elevado custo e, por isso, são metodologias implementadas em laboratórios de regiões de baixa prevalência da TB, ou seja, em países desenvolvidos (PARSONS *et al.*, 2011).

Dentre as técnicas moleculares utilizadas para o diagnóstico da TB, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), que tem demonstrado grande potencial na detecção rápida da micobactéria, tanto em meios de cultura quanto em amostras clínicas (DROBNIIEWSKI *et al.*, 2003; ASSIS, 2007). Entretanto, algumas revisões e estudos interlaboratoriais têm apontado uma grande variabilidade na sensibilidade e na especificidade de diferentes abordagens que utilizam a PCR (NOORDHOEK *et al.*, 1994; NOORDHOEK *et al.*, 1996; DROBNIIEWSKI *et al.*, 2003; NOORDHOEK *et al.*, 2004; FLORES *et al.*, 2005).

De modo geral, os testes diagnósticos que utilizam métodos moleculares, tantos os comerciais quanto os *in house*, apresentam como maior vantagem a rapidez em sua realização e liberação do resultado,

porém não devem substituir os métodos convencionais de diagnóstico. Somente a detecção de DNA de *M. tuberculosis* não significa necessariamente doença ativa, portanto, os dados moleculares precisam ser interpretados juntamente com os dados clínicos dos pacientes (WATTERSON; DROBNIIEWSKI, 2000).

2.11 Epidemiologia Molecular

A epidemiologia molecular é a integração de técnicas baseadas na caracterização da sequência de ácidos nucleicos de um patógeno, com abordagens epidemiológicas convencionais, para identificar determinantes da distribuição, transmissão e manifestação da doença na população, visando a possibilidade de intervenção e prevenção (FOXMAN; RILEY, 2001; MURRAY; ALLAND, 2002).

O desenvolvimento de técnicas de epidemiologia molecular contribuiu muito para o conhecimento da genética populacional da TB. Diversas metodologias podem ser utilizadas para verificar polimorfismos no DNA de *M. tuberculosis*, o que permite a diferenciação de cepas. As técnicas de genotipagem de *M. tuberculosis* mais utilizadas nesses estudos são o RFLP da sequência de inserção IS6110 e os métodos baseados na PCR, o *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRUs) e o *Spoligotyping* (FOXMAN; RILEY, 2001; KREMER *et al.*, 1999).

2.11.1 RFPL da sequência IS6110

A técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição) da sequência de inserção IS6110 é considerada padrão-ouro na genotipagem de *M. tuberculosis* (van EMBDEN *et al.*, 1993).

Este método baseia-se na digestão do DNA genômico bacteriano com enzimas de restrição, que geram fragmentos de diferentes tamanhos. Estes fragmentos são separados em gel de agarose, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e hibridizados com sondas de DNA específicas para a sequência IS6110. As cepas são, então, tipadas de acordo com o padrão eletroforético de bandas, gerado por diferenças na localização das sequências IS6110 no cromossomo e no número de cópias deste elemento (van SOOLINGEN *et al.*, 1991; PANDOLFI, 2007). É uma metodologia amplamente utilizada devido ao seu alto poder discriminatório (KREMER *et al.*, 1999).

Entretanto, quando aplicada em cepas com baixo número de cópias da sequência IS6110, geralmente inferior a cinco, tem sua capacidade de discriminação diminuída. Neste caso, mesmo cepas não relacionadas epidemiologicamente, podem apresentar padrões idênticos, havendo a necessidade da utilização de métodos de genotipagem complementares (van SOOLINGEN *et al.*, 1991; van SOOLINGEN *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 1996; GOULDING *et al.*, 2000). Além disso, é uma técnica laboriosa e demorada, sendo necessárias semanas de incubação para cultivar um número de organismos que possam fornecer

quantidades de DNA suficientes para sua realização (KREMER *et al.*, 1999).

Diante dessas limitações, outras técnicas, de execução mais rápida e fácil, têm sido utilizadas em substituição ao RFLP-IS6110. Dentre elas, destacam-se as metodologias baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), como o MIRU-VNTR e o *Spoligotyping* (CRONIN *et al.*, 2001; PANDOLFI, 2007; van SOOLINGEN *et al.*, 2007).

2.11.2 MIRU-VNTR

Método baseado no número variável de repetições em tandem (*Variable number of tandem repeats* – VNTR) de unidades repetitivas de DNA (40 – 100 pb) micobacteriano (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* – MIRUs), onde as diversas estirpes clínicas apresentam, em diferentes loci, polimorfismo no número de repetições desses elementos (SUPPLY *et al.*, 2000).

Este método utiliza a PCR com iniciadores específicos para a amplificação dos múltiplos loci MIRUs (SUPPLY *et al.*, 2006). A análise das seqüências é realizada pelo sistema de capilaridade (ALLIX; SUPPLY; FAUVILLE-DUFAUX, 2004), eletroforese em gel (MAZARS *et al.*, 2001) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (EVANS *et al.*, 2004). A cada cepa tipada é atribuído um número correspondente ao número de repetições do locus MIRU, formando a base de um sistema de codificação (SUPPLY *et al.*, 2006).

Relativamente à genotipagem pelo método de RFLP-IS6110, o método MIRU-VNTR é mais rápido e fácil, sendo que seu poder

discriminatório é proporcional ao número de loci analisados, variando de 12, 15 ou 25 loci. Sua grande vantagem é a possibilidade de ser realizado de forma automatizada, o que facilita a tipagem em estudos que apresentam grande número de amostras (SUPPLY *et al.*, 2001; PANDOLFI, 2007).

2.11.3 *Spoligotyping*

O *Spacer oligonucleotide typing*, conhecido como *Spoligotyping*, é uma das técnicas mais versáteis de genotipagem para o CMTB. Baseia-se na metodologia PCR e analisa uma região cromossômica de 36 pb específica para o CMTB, o locus DR (*Direct Repeats*). A análise é realizada por meio da determinação da ausência ou presença de espaçadores específicos, que são sequências não repetitivas de 34 a 41 pb localizadas entre as sequências DRs. O *spoligotyping* explora o polimorfismo existente na região DR, uma vez que as diferentes cepas de *M. tuberculosis* variam no número de DRs e na presença ou ausência dos espaçadores (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

O polimorfismo dessa região cromossômica é provavelmente produto de uma recombinação homóloga entre DRs vizinhas ou distantes, assim como de transposições do elemento de inserção IS6110, o qual está presente no locus DR de muitas linhagens de *M. tuberculosis* (KAMERBEEK *et al.*, 1997; van EMBDEN *et al.*, 2000).

A metodologia utiliza os oligonucleotídeos específicos DRa e DRb-biotinilado para amplificação das regiões espaçadoras entre as sequências DRs, resultando em fragmentos de diversos tamanhos,

dependendo da presença ou ausência das regiões DR no genoma da cepa analisada (Figura 3). Os amplicons biotinizados são submetidos a hibridização em uma membrana que contém 43 oligonucleotídeos imobilizados, os quais são específicos para determinadas sequências espaçadoras. A detecção da hibridização é realizada por meio de uma reação de quimiluminescência e os diferentes padrões de hibridização são interpretados pela presença ou ausência de cada sequência espaçadora analisada (KAMERBEEK *et al.*, 1997; SANTOS; KIPNIS; KIPNIS, 2007). Os resultados podem ser apresentados como um código binário, positivo quando determinado espaçador está presente e negativo quando está ausente (MATHEMA *et al.*, 2006).

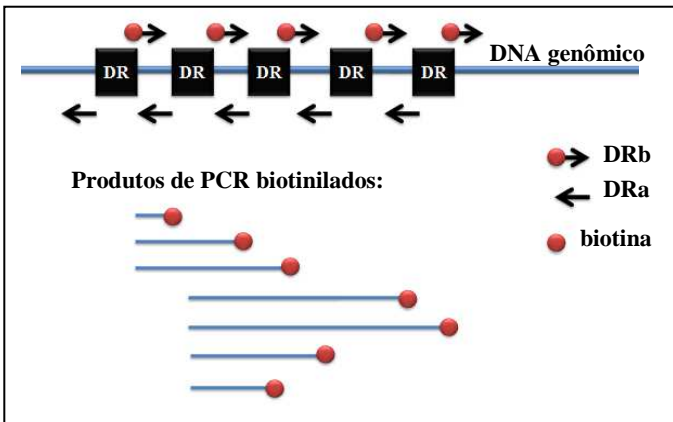


Figura 3. Esquema representativo da amplificação das sequências DRs utilizadas na metodologia *Spoligotyping*. Adaptado de SANTOS; KIPNIS; KIPNIS, 2007.

Esta metodologia é simples, rápida, robusta e altamente reprodutível. Apresenta como grande vantagem a expressão dos resultados em códigos binários, sendo facilmente analisados por meio de

programas de computadores, o que facilita a comparação de resultados intra e interlaboratoriais (MATHEMA *et al.*, 2006). Seu poder discriminatório é menor do que o do RFLP-IS6110, quando cepas com alto número de cópias de IS6110 são analisadas; entretanto, é maior para a avaliação de cepas com baixo número de cópias IS6110 (KANDUMA *et al.*, 2003).

Visando facilitar a avaliação da distribuição global do CMTB estabeleceu-se um banco mundial de padrões de *Spoligotyping*, que pode ser acessado livremente, denominado SITVIT *Database* (Institute Pasteur de La Guadeloupe, França). Este banco de dados é constituído por 72.000 isolados clínicos do CMTB obtidos de 160 países. Os *spoligotypes* comuns a mais de um isolado são designados como *Shared Types* (ST) e a eles são atribuídos um número *Shared International Type* (SIT) (DEMAY *et al.*, 2012). Os padrões genéticos que foram reportados em somente um isolado clínico são designados *Orphan*. Seu livre acesso e a facilidade da apresentação dos dados permitem a ampla utilização das informações para o estabelecimento de análises e comparações genéticas e epidemiológicas (BRUDEY *et al.*, 2006).

Muitas famílias de cepas foram identificadas baseadas no padrão de *Spoligotyping* e, então, agrupadas em três Grupos Genéticos Principais (PGG – *Principal Genetic Group*). O PGG1 inclui as famílias *East African Indian* (EAI), *Beijing* e *Central Asian* (CAS). O PGG2 inclui as famílias *Harleem*, *Latin American and Mediterranean* (LAM) e X. A família T e outras famílias não muito bem caracterizadas estão classificadas no PGG3 (RASTOGI; SOLA, 2007). As três famílias genóticas principais, LAM, *Harleem* e T são as mais frequentes na

África, América Central, Europa e América do Sul. Estas famílias englobam 80% dos isolados brasileiros incluídos no banco de dados *on line*. Na América Latina, o genótipo LAM parece ser dominante, sendo o genótipo *Beijing* bem menos comum (BRUDEY *et al.*, 2006).

3. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar um método modificado para o tratamento das amostras de escarro e estudar a epidemiologia molecular de cepas circulantes de *M. tuberculosis* no Estado de Santa Catarina.

Objetivos específicos

- Analisar a adição de pérolas de vidro como modificação no protocolo de tratamento das amostras de escarro de pacientes internados no Hospital Nereu Ramos, localizado em Florianópolis, Santa Catarina;
- Realizar a PCR de sequências específicas de *M. tuberculosis* diretamente de amostras de escarro tratadas com o protocolo utilizado na rotina do LBMM/UFSC e com o protocolo modificado;
- Comparar os resultados das PCRs com a cultura (padrão-ouro);
- Caracterizar as cepas isoladas de *M. tuberculosis* com a metodologia molecular de *Spoligotyping*;
- Analisar a frequência dos tipos de cepas de *M. tuberculosis* circulantes no Estado de Santa Catarina;

- Comparar os padrões de *Spoligotyping* obtidos no Estado de Santa Catarina com o banco mundial de *spoligotypes*;
- Analisar os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes obtidos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN);
- Correlacionar a tipagem obtida pelo *Spoligotyping* com os dados clínico-epidemiológicos dos indivíduos incluídos no estudo.

4. Material e Métodos

4.1 Tipo e local de estudo

Estudo transversal de caracterização molecular de amostras provenientes do Laboratório Central do Estado de Santa Catarina – LACEN/SC e Hospital Nereu Ramos, realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da Universidade Federal de Santa Catarina (LBMM/UFSC).

4.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo isolados de *M. tuberculosis* provenientes do LACEN/SC do período de março de 2010 a março de 2011. As cepas foram identificadas como *M. tuberculosis* pelo LACEN/SC a partir dos seguintes testes fenotípicos: presença de fator corda em meio líquido, inibição do crescimento na presença de PNB e produção de niacina.

Para comparação dos protocolos de tratamento do escarro foram incluídas amostras de pacientes do Hospital Nereu Ramos com diagnóstico laboratorial de TB pulmonar (baciloscopia positiva e/ou cultura positiva), idade superior a 14 anos e que concordaram em participar deste estudo mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

4.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídas do estudo as cepas identificadas como Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) a partir dos testes fenotípicos realizados pelo LACEN/SC.

4.4 Baciloscopia

A baciloscopia foi realizada pelo método de *Ziehl-Neelsen* no LACEN/SC conforme as recomendações do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

4.5 Cultura

As amostras foram semeadas em meio sólido *Ogawa-Kudoh* (Laborclin[®], Brasil) e incubadas a 37°C durante 28 dias para o isolamento do *M. tuberculosis*.

4.6 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

A determinação fenotípica da sensibilidade dos isolados foi realizada de forma qualitativa e automatizada no BACTEC-960[®]-MGIT[™] (BD-EUA) no setor de Tuberculose do LACEN/SC. Os fármacos testados foram a estreptomicina, a isoniazida, a rifampicina e o etambutol. Os testes de sensibilidade para os fármacos de segunda linha

(ofloxacino, canamicina, capreomicina e amicacina) foram realizados no CRPHF, somente nas amostras de TB-MDR.

4.7 Tratamento das amostras de escarro

4.7.1 Protocolo utilizado na rotina do LBMM/UFSC

Em um tubo de vidro contendo 200 μL de N-acetil-cisteína (100 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados, com o auxílio de uma pipeta Pasteur graduada (Plastlabor, Brasil), cerca de 400 μL de escarro. Após agitação em vórtex por 2 minutos, adicionou-se 400 μL de solução NaOH 0,2 N com 1% de Dodecil-sulfato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA). Após mais uma agitação em vórtex por cerca de 3 minutos, foram adicionados 200 μL de acetato de potássio 5M, pH 5,0, seguida da agitação em vórtex por 1 minuto. Todo o conteúdo do tubo foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 3000 x g por 15 minutos e a 4°C (KUBICA *et al.*, 1963). Cerca de 500 μL do sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão no líquido remanescente. Esse sedimento foi reservado para a extração de DNA.

4.7.2 Protocolo Modificado

O protocolo modificado foi realizado seguindo os mesmos passos do protocolo de rotina, entretanto adicionou-se pérolas de vidro de 1 e 2 mm (Sigma-Aldrich, EUA) ao tubo de vidro. Além disso, para a realização da centrifugação, todo o conteúdo do tubo de vidro foi

filtrado (filtro simples com tamis de gaze de 11 fios por cm²) para um tubo cônico. As pérolas de vidro que ficaram retidas no filtro foram lavadas com 1,0 mL do tampão GTE (glicose 50 mM, tris pH 8,0, EDTA 10 mM).

4.8 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por dois métodos distintos, o método utilizando Guanidina (para a extração diretamente de amostras de escarro) e o método enzimático utilizando CTAB (para os isolados clínicos).

4.8.1 Método da Guanidina

Na extração de DNA realizada pela Guanidina utilizou-se 1,0 mL de Guanidina 5M (isotiocianato de guanidina 5M, Tris 0,1 M pH 6,4, EDTA 0,5 M pH 8,0, Triton X 100) e 200 µL do precipitado obtido após o tratamento do escarro com o protocolo de rotina ou com o modificado. Esta mistura foi submetida a agitação *overnight* a temperatura ambiente. No dia seguinte, foram adicionados 50 µL de solução de sílica, o tubo foi homogeneizado por inversão e o sobrenadante foi descartado após centrifugação a 1300 x g por 1 minuto. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com 500 µL de solução de lavagem (isotiocianato de guanidina 5 M e Tris 0,1 M pH 6,4), duas vezes com 500 µL de etanol 70% e uma vez com 500 µL de acetona PA. Entre cada lavagem, foi realizada uma centrifugação a 1300 x g durante 1 minuto. Após as lavagens, o sedimento foi submetido à secagem a

56°C e reidratado com 25 µL de Tampão TE pH 7,5 (10 mM Tris-Cl pH 7,5 e 1,0 mM EDTA). Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 9000 x g por 5 minutos para sedimentação da sílica. O sobrenadante (DNA) foi transferido para um microtubo livre de RNase e DNase (LIPPKE *et al.*, 1987).

4.8.2 Método CTAB

A extração de DNA utilizando o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) foi realizada conforme metodologia descrita por van Soolingen e *cols.* (1994). Algumas colônias de *M. tuberculosis* foram transferidas para uma solução de 400 µL de TE 1X (10 mM Tris/1,0 mM EDTA, pH 8,0) e inativadas em banho-maria a 80°C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 50 µL de lisozima (10 mg/mL) e os tubos foram incubados *overnight* a 37°C. No dia seguinte, adicionou-se uma solução de 70 µL de SDS (10%) e 5 µL de proteinase K (10 mg/mL). A mistura foi incubada a 65°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de NaCl 5 M e 100 µL de uma mistura de CTAB/NaCl (4,1% NaCl/10% CTAB) para a complexação de proteínas e lipídios. A mistura foi novamente incubada a 65°C por 10 minutos. Um volume de 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi adicionado e após centrifugação (7250 x g por 5 minutos) ocorreu a separação das fases. A partir da fase aquosa, o DNA foi precipitado com 450 µL de isopropanol seguido de resfriamento *overnight* a -20°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 7250 x g por 15 minutos. O DNA precipitado foi

lavado com etanol 70% e secado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensão em TE 1X e armazenado a -20°C.

4.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As PCRs para amplificação do gene 16S rRNA e da sequência de inserção IS6110 foram realizadas utilizando-se os DNAs extraídos diretamente das amostras de escarro.

4.9.1 Gene 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F-285 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (ROGALL *et al.*, 1990) e Myc-264 (3'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-5') (BÖDDINGHAUS *et al.*, 1990), que amplificam um fragmento de 1027 pb (WALÉRIA-ALEIXO *et al.*, 2000). A amplificação foi realizada em um termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf, Alemanha) sob as seguintes condições: 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo adicional de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 10 minutos. Em todas as reações foram utilizados controles positivo (DNA extraído da cepa H37Rv) e negativo (ausência de DNA).

4.9.2 Sequência de inserção IS6110

O DNA extraído das amostras de escarro tratadas pelo protocolo de rotina e pelo protocolo modificado também foi submetido à

amplificação pela PCR da sequência de inserção IS6110. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores INS1 (5'CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC 3') e INS2 (5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA 3') que amplificam um fragmento de 244 pb (van EMBDEN *et al.*, 1993). A amplificação foi realizada em um termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf, Alemanha) sob as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 96°C por 3 minutos, 38 ciclos de 96°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 8 minutos. Em todas as reações foram utilizados controles positivo (DNA extraído da cepa H37Rv) e negativo (ausência de DNA).

4.9.3 Detecção dos Fragmentos Amplificados pela PCR

Os produtos da reação de amplificação do gene 16S rRNA e da sequência IS6110 foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 e 2%, respectivamente. Os géis foram corados pelo brometo de etídio (1 µg/ml), visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV- 20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT[®], Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com marcadores de tamanho molecular (50 pb e 100 pb).

4.10 Spoligotyping

4.10.1 Reação de Amplificação

Foram utilizados os oligonucleotídeos DRa (5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3') e DRb (3' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 5'), que pareiam nas extremidades das sequências DR, para amplificação das sequências espaçadoras entre duas DRs. Para cada reação, utilizou-se 50 a 100 ng de DNA molde, 25 pmoles de cada oligonucleotídeo, 200 µM de desoxiribonucleosídeos trifosfato (Invitrogen™ Life Technologies), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen™ Life Technologies). As amplificações pela PCR foram realizadas em um termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemanha) sob as seguintes condições: um ciclo inicial de 96°C por 3 minutos, 20 ciclos de 96°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos (KAMERBEEK *et al.*,1997).

4.10.2 Hibridização dos Produtos da PCR e Detecção

Os produtos amplificados foram hibridizados com um conjunto de 43 oligonucleotídeos imobilizados em uma membrana comercial, cada um correspondendo a uma das sequências únicas dos espaçadores dentro do locus DR (Ocimum Biosolutions, Índia).

Para a hibridização, 20 µL dos produtos da PCR desnaturados (94°C por 10 minutos) foram diluídos em 150 µL de SSPE 2X (0,02 M

Na₂HPO₄·2H₂O, 0,36 M NaCl, 2 mM EDTA – pH 7,4)/SDS 0,1%. As amostras diluídas foram aplicadas em canais paralelos de um miniblotter (Ocimum Biosolutions, Índia), de modo que ficassem perpendiculares às linhas de oligonucleotídeos previamente imobilizados. A hibridização foi realizada por 60 minutos a 60°C em forno giratório (Marconi, Brasil). Em seguida, a membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2X/SDS 0,5% por 10 minutos a 60°C. Após as lavagens, a membrana foi incubada com 7,5 µL de um conjugado de estreptavidina-peroxidase (Roche Applied Science, Alemanha) diluído em 30 mL de SSPE 2X/SDS 0,5% por 50 minutos a 35°C. A membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2X-SDS 0,5% por 10 minutos a 42°C e 2 vezes com 250 mL de SSPE 2X por 5 minutos à temperatura ambiente (KAMERBEEK *et al.*, 1997).

A detecção foi realizada pela sensibilização de um filme autoradiográfico através de uma reação de quimiluminescência, utilizando o kit ECLTM (Amersham Biosciences, Inglaterra).

4.10.3 Análise dos *spoligotypes*

Os *spoligotypes* encontrados foram classificados em SIT (*Spoligotyping International Type*) com base no banco de dados internacional SITVIT *Database* – Institute Pasteur de La Guadeloupe, França (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/outilsConsultation.jsp>) –, cuja versão disponível (SpolDB4) apresenta 2.800 SITs de 160 países. Os *spoligotypes* com perfil desconhecido foram analisados pelo Spotclust

(http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_spotclust.html), possibilitando determinar a porcentagem de similaridade com as subfamílias já descritas.

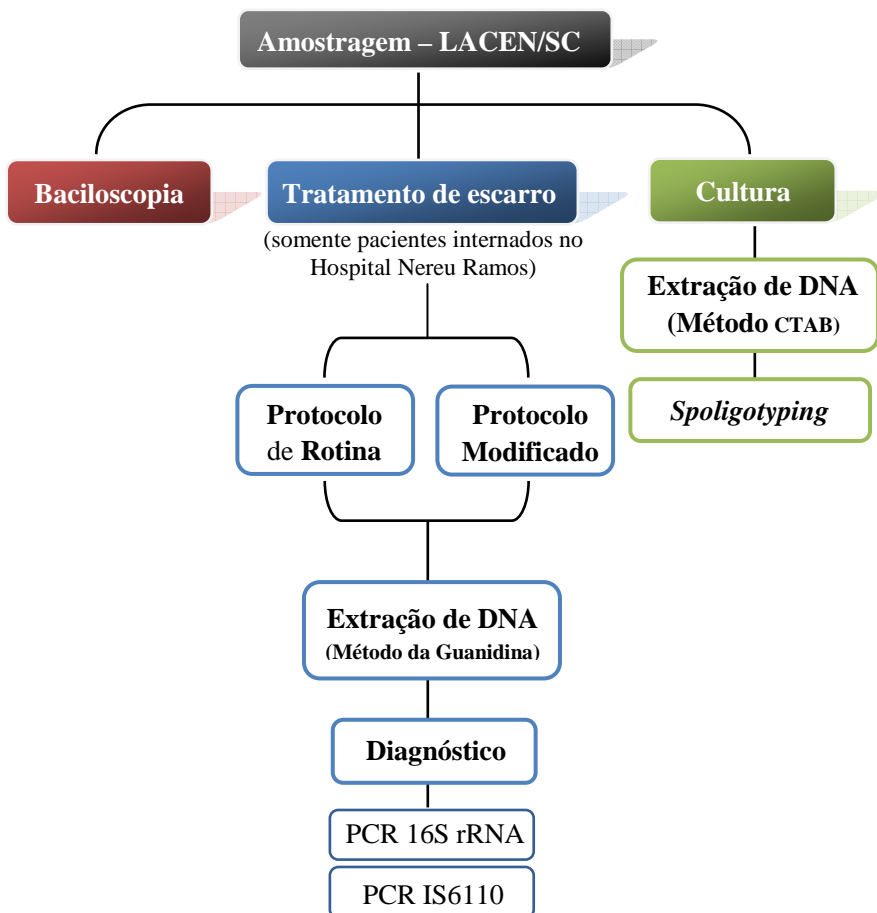
4.11 Análise Estatística

As variáveis nominais foram sumarizadas como números absolutos e percentuais e as variáveis numéricas foram sumarizadas como média e desvio padrão. As associações entre as variáveis foram avaliadas através do teste de Qui-quadrado de Pearson e Exato de Fischer, conforme apropriado, em um nível de significância de 5%.

4.12 Considerações Éticas

As amostras utilizadas neste estudo fazem parte do projeto “Tuberculose e doença pulmonar causadas por micobactérias em indivíduos soropositivos ao HIV: epidemiologia molecular e avaliação de técnicas diagnósticas” (168/07), aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina no dia 16 de outubro de 2007.

4.13 Fluxograma da metodologia do estudo



5. Resultados

5.1 Amostragem

No período do estudo, foram obtidos 406 isolados clínicos provenientes do LACEN/SC, sendo 88,9% (361/406) isolados de escarro, 4,2% (17/406) de lavado broncoalveolar, 1,6% (7/406) de biópsia de linfonodo, 1,6% (7/406) de líquido pleural, 1,6% (7/406) de líquido cefalorraquidiano, 0,6% (3/406) de secreção de abscesso, 0,5% (2/406) de sangue, 0,2% (1/406) de secreção gástrica e 0,2% (1/406) de biópsia de pulmão.

5.2 Comparação dos Protocolos de tratamento de escarro

Das 406 amostras analisadas no estudo, 120 escarros de pacientes internados no Hospital Nereu Ramos foram processados para comparação do protocolo de tratamento da amostra utilizado na rotina do LBMM/UFSC com o protocolo modificado proposto no presente estudo.

A eficiência da adição de pérolas de vidro como modificação do protocolo utilizado na rotina do LBMM/UFSC foi avaliada por meio da detecção de *M. tuberculosis* diretamente nas amostras de escarro pela PCR.

Para comparação dos protocolos de tratamento do escarro, 60 amostras foram submetidas ao protocolo de tratamento utilizado na rotina do LBMM/UFSC e 60 amostras ao protocolo modificado.

Os dois grupos distintos de amostras de escarro foram pareados de acordo com o resultado da baciloscopia (negativa, +,++ e +++) e a comparação da sensibilidade das reações de amplificação foi realizada somente entre amostras que apresentaram o mesmo resultado de baciloscopia. Das 120 amostras de escarro, 81,7% (49/60) de cada grupo analisado apresentaram baciloscopia positiva.

Entre as 60 amostras submetidas ao protocolo utilizado na rotina do LBMM/UFSC, 36% (4/11) das amostras que apresentaram baciloscopia negativa foram detectadas pela PCR IS6110 e nenhuma dessas foi detectada pela PCR 16S rRNA. Das amostras com baciloscopia positiva, 8% (4/49) não foram detectadas pela PCR IS6110 e nem pela PCR 16S rRNA (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação dos resultados da baciloscopia com a PCR 16S rRNA e com a PCR IS6110 das amostras de escarro submetidas ao protocolo de tratamento utilizado na rotina do LBMM/UFSC.

N ^o de amostras de escarro*	Baciloscopia	PCR	
		16S rRNA	IS6110
34	+	+	+
11	+	-	+
4	+	-	-
4	-	-	+
7	-	-	-

*Todas as amostras foram positivas na cultura; (-) DNA não detectado e (+) DNA detectado.

Cem por cento das amostras submetidas ao protocolo modificado foram amplificadas pela PCR IS6110. Porém, 16 amostras (16/60), das quais 6 apresentaram baciloscopia positiva e 10

baciloscopia negativa, não foram detectadas pela PCR 16S rRNA (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação dos resultados da baciloscopia com a PCR 16S rRNA e com a PCR IS6110 das amostras de escarro submetidas ao protocolo de tratamento modificado.

N ^o de amostras de escarro*	Baciloscopia	PCR	
		16S rRNA	IS6110
43	+	+	+
6	+	-	+
1	-	+	+
10	-	-	+

*Todas as amostras foram positivas na cultura; (-) DNA não detectado e (+) DNA detectado.

Quando comparados os resultados com a cultura, a sensibilidade da PCR das amostras submetidas ao protocolo utilizado na rotina do LBMM/UFSC foi de 56,7% (IC 95%: 44,1 – 69,2) para a PCR 16S rRNA e de 81,7% (IC 95%: 71,9 – 91,5) para a PCR IS6110. A sensibilidade da PCR das amostras submetidas ao protocolo modificado foi de 73,3% (IC 95%: 62,1 – 84,5) para a PCR 16S rRNA e de 100% para a PCR IS6110. A análise das PCRs (16S rRNA e IS6110), após tratamento das amostras pelo protocolo utilizado na rotina do LBMM/UFSC e pelo protocolo modificado, demonstrou um incremento no rendimento da reações, apresentando diferença estatisticamente significativa para o alvo IS6110 ($p=0,001$), porém não apresentou significância estatística para o alvo 16S rRNA ($p=0,052$) (Tabela 3).

Tabela 3. Análise comparativa da sensibilidade da PCR após tratamento das amostras de escarro pelo protocolo utilizado na rotina do LBMM/UFSC e pelo protocolo modificado.

PCR	Protocolo de rotina LBMM/UFSC		Protocolo Modificado	
	Nº de amostras	Sensibilidade (%)	Nº de amostras	Sensibilidade (%)
16S rRNA positiva	34		44	
16S rRNA negativa (<i>p</i> = 0,052)	26	56,7	16	73,3
IS6110 positiva	49		60	
IS6110 negativa (<i>p</i> = 0,001)	11	81,7	-	100

5.2 Descrição da população estudada

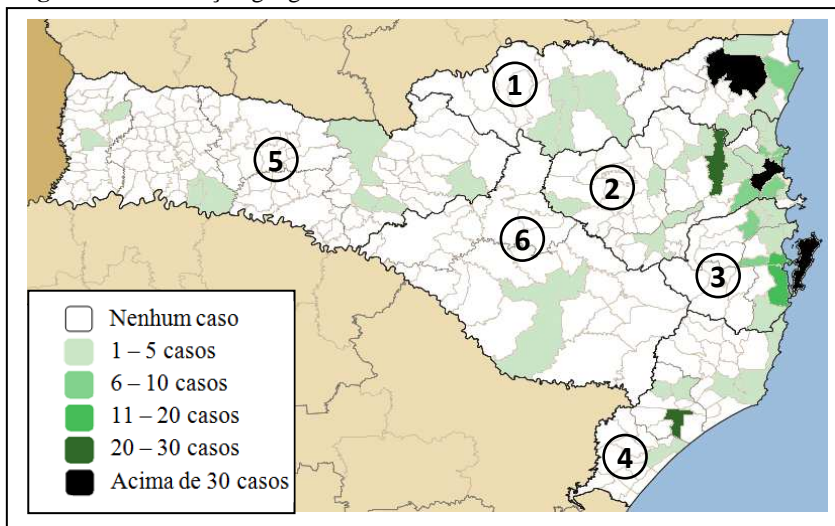
Os dados demográficos, laboratoriais e clínico-epidemiológicos dos indivíduos foram extraídos do SINAN. Dos 406 casos incluídos no estudo, 3,9% (16/406) não foram notificados no sistema, portanto não houve nenhum dado adicional, além da idade, sexo e cidade de moradia, pois essas três informações puderam ser obtidas nos registros do LACEN/SC.

Entre os 406 casos de TB, 34,5% residiam no Vale do Itajaí, 33,0% na Grande Florianópolis, 19,2% no Nordeste Catarinense, 9,9% no Sul Catarinense, 2,7% no Oeste Catarinense e 0,74% na Serra Catarinense. Os municípios que apresentaram maior número de casos foram Florianópolis (19,2%), Itajaí (14,0%), Joinville (15,3%) e Criciúma (6,4%) (Tabela 4, Figura 4 e Anexo 2).

Tabela 4. Porcentagem de casos de TB incluídos no estudo por regiões do Estado de Santa Catarina.

Região do Estado de Santa Catarina	Porcentagem de casos de TB no estudo
Vale do Itajaí	34,5% (140/406)
Grande Florianópolis	33,0% (134/406)
Nordeste Catarinense	19,2% (78/406)
Sul Catarinense	9,9% (40/406)
Oeste Catarinense	2,7% (11/406)
Serra Catarinense	0,7% (3/406)

Figura 4. Distribuição geográfica dos casos de TB incluídos no estudo.



1 – Nordeste Catarinense, 2 – Vale do Itajaí, 3 – Grande Florianópolis, 4 – Sul Catarinense, 5 – Oeste Catarinense, 6 – Serra Catarinense

Setenta e dois por cento da população estudada (292/406) compreendia indivíduos do sexo masculino e 28,0% (114/406) do sexo feminino. A média de idade encontrada foi de $38,7 \pm 13,7$ anos (mínima de 4 meses e máxima de 85 anos), sendo 4,7% (19/406) menores de 21 anos (um deles menor de 1 ano de idade); 73,9% (300/406) entre 21 e 49 anos e 21,4% (87/406) com 50 anos ou mais (Figura 5).

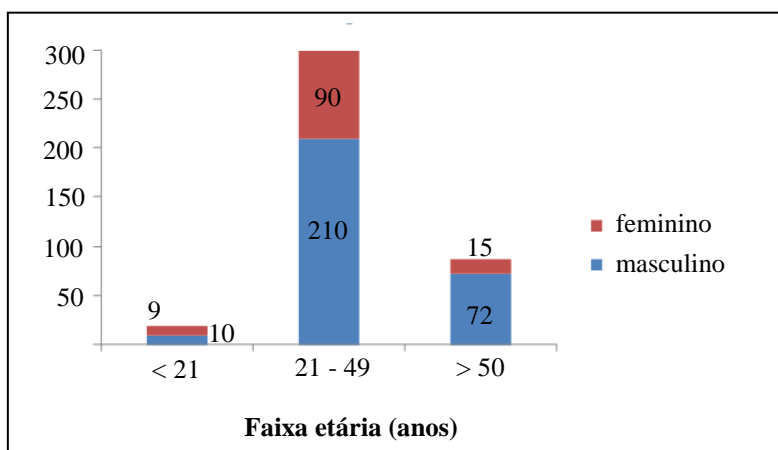


Figura 5. Distribuição por sexo e faixa etária da população estudada no Estado de Santa Catarina.

Dos indivíduos notificados no SINAN, 81,3% (309/380) declararam-se brancos, 11,8% (45/380) negros, 5,8% (22/380) pardos, 0,5% (2/380) mulatos e 0,5% (2/380) amarelos. Para 10 pacientes, essa informação não foi registrada no SINAN. Quanto ao grau de escolaridade, 70,3% (237/337) dos indivíduos estudaram até o ensino fundamental e 5,3% (18/337) iniciaram a educação superior (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição da população estudada quanto ao grau de escolaridade.

Escolaridade		Nº de indivíduos	%
Analfabeto	-	3	0,9
Ensino Fundamental	Incompleto	194	57,6
	Completo	43	12,7
Ensino Médio	Incompleto	32	9,5
	Completo	47	14,0
Ensino Superior	Incompleto	3	0,9
	Completo	15	4,4
Total		337*	100

* Em 53 indivíduos dos 390 casos notificados no SINAN essa variável não foi registrada.

Em relação às atividades exercidas, 30,0% (117/390) dos indivíduos não informaram a sua profissão. Diversas ocupações foram observadas entre os indivíduos do sexo masculino (cabeleireiro, carteiro, cobrador de ônibus, comerciante, cozinheiro, estudante, faxineiro, garçom, mecânico, motorista, pescador, sapateiro e vendedor), sendo que 21,6% (63/292) encontravam-se desempregados e 15,0% (45/292) tinham atividades relacionadas com construção civil. Nos indivíduos do sexo feminino, 24,6% (28/114) dedicavam-se exclusivamente às atividades domésticas e 7,0% (8/114) estavam desempregadas. Somente entre as mulheres foram encontrados indivíduos cuja profissão poderia estar relacionada à TB: uma farmacêutica-bioquímica, uma médica e uma enfermeira.

Aproximadamente 90% (345/390) dos casos notificados no SINAN realizaram a testagem para HIV, dos quais 73,9% (255/345) apresentaram-se soronegativos e 26,1% (90/345) soropositivos. O resultado da testagem de 10 indivíduos não foi registrado no SINAN. A região do Estado que apresentou maior número de coinfeções TB/HIV foi a Grande Florianópolis com 41,1% (37/90), seguida do Vale do Itajaí com 32,2% (29/90), do Nordeste Catarinense com 17,8% (16/90) e do Sul Catarinense com 8,9% (8/90). A cidade que apresentou maior número de casos de coinfeção TB/HIV foi Florianópolis com 25 casos (27,8%), seguida de Joinville com 15 casos (16,7%) e Itajaí com 10 casos (11,1%).

Agravos associados foram notificados em 54,6% (213/390) dos casos notificados, sendo 11,7% (25/213) tabagistas e 84,5% (180/213) dependentes químicos e/ou etilistas e/ou apresentavam HIV/Aids. Dentre os dependentes químicos, 45,3% (34/75) relataram ser usuários de *crack* (Figura 6). Mais de 90% (74/80) dos indivíduos que relataram alcoolismo e mais de 70% (57/80) dos que relataram dependência química eram do sexo masculino. Não houve associação estatisticamente significativa da presença de HIV/Aids com o alcoolismo e nem com a dependência química apesar de 25,0% (39/155) dos indivíduos que relataram esses dois agravos serem coinfectados com o vírus HIV.

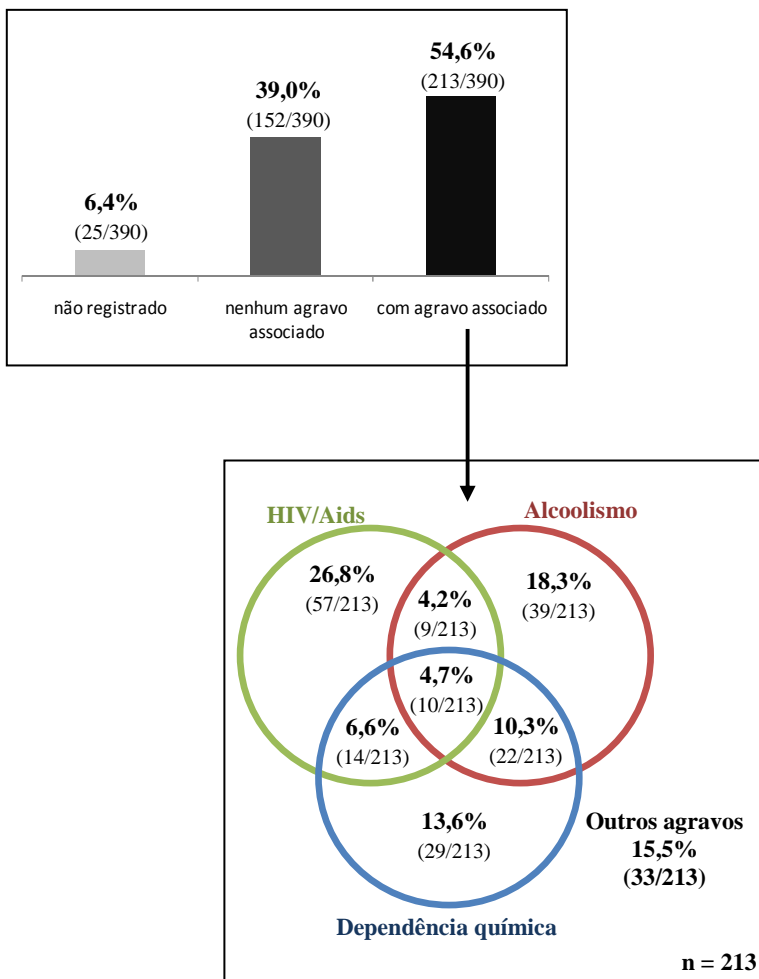


Figura 6. Distribuição dos agravos associados à Tuberculose na população estudada do Estado de Santa Catarina.

Outros agravos associados e registrados no SINAN foram a institucionalização dos pacientes e a falta de moradia fixa. Catorze por cento (54/390) encontravam-se institucionalizados, dos quais 43 pertenciam a penitenciárias, 4 a clínicas de recuperação, 1 a orfanato e para 6 pacientes não foi especificado a instituição. Os presídios que apresentaram maior número de casos foram o de São Pedro de Alcântara (9 casos), Presídio masculino de Florianópolis (6 casos) e de Joinville (6 casos). Quanto à moradia, 2,8% (11/390) dos indivíduos eram moradores de rua, dos quais 10 eram dependentes químicos e/ou etilistas. Não houve associação estatisticamente significativa da presença de HIV/Aids com a institucionalização em presídios e com a falta de moradia fixa.

Setenta e sete por cento (302/390) dos indivíduos foram notificados como caso novo, 10,5% (41/390) como recidiva, 9,2% (36/390) como reingresso após abandono e 2,8% (11/390) como transferência de outros Estados. Dentre os pacientes notificados como reingresso após abandono, 77,8% (28/36) eram etilistas e/ou dependentes químicos e/ou apresentavam HIV/Aids. Verificou-se associação entre os pacientes notificados como reingresso após abandono com alcoolismo ($p=0,022$) e dependência química ($p<0,001$) (Tabela 6). Entretanto, não houve associação estatisticamente significativa entre recidiva e os grupos de vulnerabilidade.

Tabela 6. Comparação dos casos notificados como reingresso após abandono na população estudada com grupos de vulnerabilidade.

AGRAVOS		SINAN		<i>p valor</i>
		Caso novo (n=280)	Reingresso após abandono (n=36)	
HIV/Aids	Sim	66 (23,6%)	10 (27,8%)	0,727
	Não	214 (76,4%)	26 (72,2%)	
Alcoolismo	Sim	57 (20,4%)	14 (38,9%)	0,022
	Não	223 (79,6%)	22 (61,1%)	
Dependênc ia química	Sim	47 (16,8%)	17 (47,2%)	<0,001
	Não	233 (83,2%)	19 (52,8%)	

Foram incluídos somente os indivíduos notificados no SINAN como caso novo ou reingresso após abandono e que apresentavam registro de agravo associado (n=316)

Em relação à análise da forma de apresentação da doença, 89,0% (347/390) dos indivíduos apresentaram TB pulmonar, 7,4% (29/390) TB extrapulmonar e 3,6% (14/390) TB pulmonar/extrapulmonar (Figura 7).

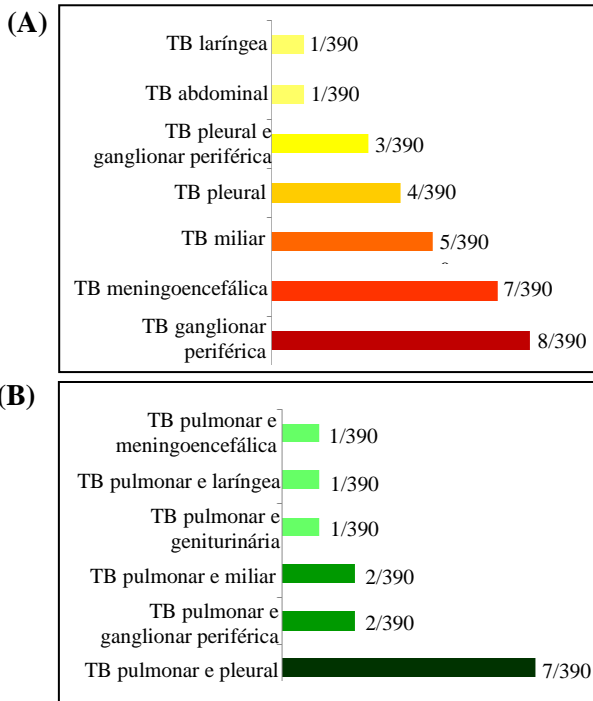


Figura 7. Distribuição do casos de TB extrapulmonar (A) e TB pulmonar/extrapulmonar (B) na população estudada.

Dentre os indivíduos com HIV/Aids, a forma extrapulmonar mais frequente foi a TB ganglionar periférica (7 casos), seguida da TB miliar (4 casos). Os casos em que a TB pulmonar estava associada à infecção pleural foram mais frequentes entre os indivíduos soronegativos (5 casos). Observou-se associação entre a presença de TB pulmonar/extrapulmonar ou TB extrapulmonar e a coinfeção HIV/Aids ($p < 0,001$) (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação dos casos de TB extrapulmonar ou TB pulmonar/extrapulmonar com grupos de vulnerabilidade na população estudada.

AGRAVOS	TB			<i>p valor</i>
	Pulmonar (n=324)	Extrapulmonar ou Pulmonar/Extrapulmonar (n=41)		
HIV/Aids	Sim	64 (19,8%)	26 (63,4%)	<0,001
	Não	260 (80,2%)	15 (36,6%)	
Alcoolismo	Sim	72 (22,2%)	8 (19,5%)	0,846
	Não	252 (77,8%)	33 (80,5%)	
Dependênci a química	Sim	67 (20,7%)	8 (19,5%)	1,000
	Não	257 (79,3%)	33 (80,5%)	

Foram incluídos somente os indivíduos notificados no SINAN e que apresentavam registro de agravo associado (n=365).

Em relação à resistência bacteriana não foi possível realizar o TSA em 4,7% (19/406) das amostras incluídas no estudo, devido à contaminação da cultura. Quarenta e oito amostras (12,4%) apresentaram algum perfil de resistência e 6,0% (23/387) dos isolados eram MDR, os quais foram identificados na Grande Florianópolis (34,8%), no Vale do Itajaí (34,8%) e no Nordeste Catarinense (30,4%) (Figura 8).

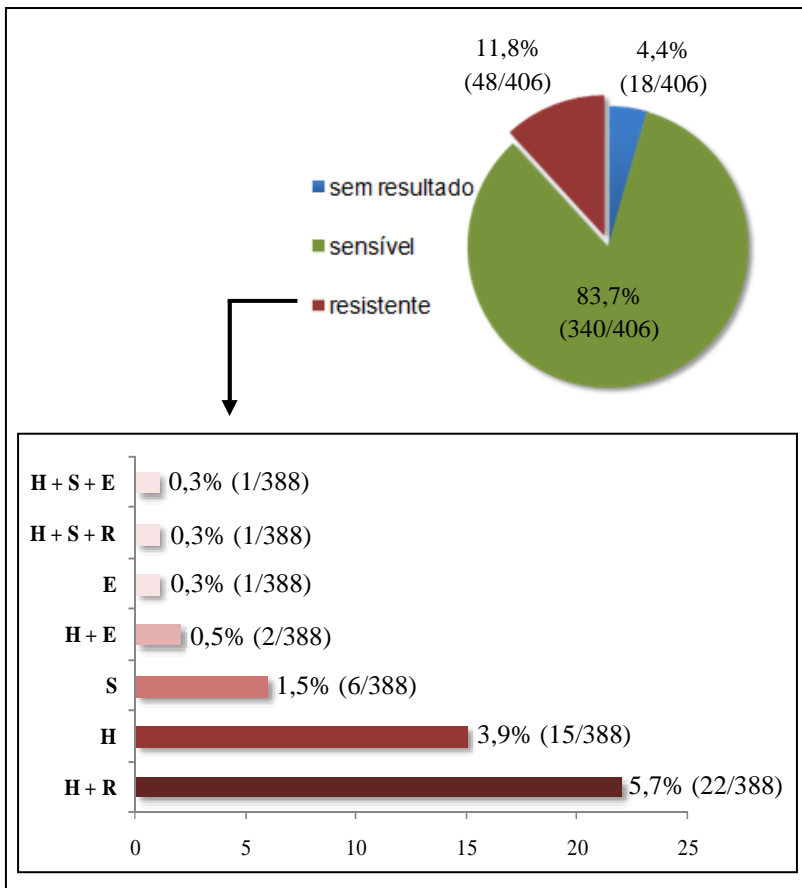


Figura 8. Perfil de resistência das amostras incluídas no estudo – (H) isoniazida, (R) rifampicina, (S) estreptomicina, (E) etambutol.

Observou-se associação dos casos de TB-MDR com a dependência química ($p=0,005$) (Tabela 8). O TSA dos fármacos de 2ª linha foi realizado em 17 amostras identificadas como TB-MDR, das quais uma apresentou resistência a capreomicina e outra a amicacina.

Tabela 8. Comparação dos casos de TB-MDR com grupos de vulnerabilidade na população estudada.

AGRAVOS		TB sensível (n=303)	TB-MDR (n=22)	<i>p valor</i>
HIV/Aids	Sim	73 (24,1%)	8 (36,4%)	0,303
	Não	230 (75,9%)	14 (63,6%)	
Alcoolismo	Sim	64 (21,1%)	5 (22,7%)	0,792
	Não	239 (78,9%)	17 (77,3%)	
Dependência química	Sim	55 (18,2%)	10 (45,5%)	0,005
	Não	248 (81,8%)	12 (54,5%)	

Foram incluídos somente os casos notificados no SINAN e que apresentavam registro de agravo associado e resultado do TSA (n=325).

Até a finalização do presente estudo, 68 casos ainda estavam em tratamento, contudo entre os casos encerrados 69,0% (222/322) evoluíram para cura, 17,1% (55/322) abandonaram o tratamento, 9,9% (32/322) foram a óbito e 4,0% (13/322) foram transferidos para outros Estados. Observou maior frequência de abandono do tratamento entre homens do que entre mulheres, numa relação de 3,5:1. Além disso, foi observada associação do abandono ao tratamento com a coinfeção HIV/Aids ($p<0,001$), com o alcoolismo ($p=0,004$) e com a dependência química ($p<0,001$) (Tabela 9).

Quinze indivíduos foram a óbito devido a TB: 6 casos eram TB-MDR, 4 apresentavam TB extrapulmonar ou TB pulmonar/extrapulmonar, 8 tinham HIV/Aids, 4 eram etilistas e 6 eram dependentes químicos. Observou-se associação de óbito por TB com TB-MDR ($p<0,001$), com TB extrapulmonar ou TB

pulmonar/extrapulmonar ($p=0,039$), com HIV/Aids ($p=0,002$) e com dependência química ($p=0,019$) (Tabelas 10, 11 e 12).

Tabela 9. Comparação do desfecho abandono do tratamento com grupos de vulnerabilidade na população estudada.

AGRAVOS	DESFECHO			<i>p valor</i>
	Cura (n=203)	Abandono (n=53)		
HIV/Aids	Sim	32 (15,8%)	22 (41,5%)	<0,001
	Não	171 (84,2%)	31 (58,5%)	
Alcoolismo	Sim	40 (19,7%)	21 (39,6%)	0,004
	Não	163 (80,3%)	32 (60,4%)	
Dependência química	Sim	29 (14,3%)	27 (50,9%)	<0,001
	Não	174 (85,7%)	26 (49,1%)	

Foram incluídos somente os indivíduos notificados no SINAN com situação de encerramento de cura ou abandono e que apresentavam registro de agravo associado (n=256).

Tabela 10. Comparação do desfecho óbito por TB com a sensibilidade aos antimicrobianos na população estudada.

TB	DESFECHO		<i>p valor</i>
	Cura (n=207)	Óbito por TB (n=14)	
Sensível	205 (99,0%)	8 (57,1%)	<0,001
MDR	2 (1,0%)	6 (42,9%)	

Foram incluídos somente os indivíduos notificados no SINAN com situação de encerramento de cura ou óbito por TB e com TB-MDR ou TB sensível a isoniazida, rifampicina, estreptomicina e etambutol (n=221).

Tabela 11. Comparação do desfecho óbito por TB com a forma da doença na população estudada.

TB	DESFECHO		<i>p valor</i>
	Cura (n=222)	Óbito por TB (n=15)	
Pulmonar	204 (91,9%)	11 (73,3%)	
Extrapulmonar ou Pulmonar/Extrapulmonar	18 (8,1%)	4 (26,7%)	0,039

Foram incluídos somente os indivíduos notificados no SINAN com situação de encerramento de cura ou óbito por TB (n=237).

Tabela 12. Comparação do desfecho óbito por TB com grupos de vulnerabilidade na população estudada.

AGRAVOS		DESFECHO		<i>p valor</i>
		Cura (n=203)	Óbito por TB (n=15)	
HIV/Aids	Sim	32 (15,8%)	8 (53,3%)	0,002
	Não	171 (84,2%)	7 (46,7%)	
Alcoolismo	Sim	40 (19,7%)	4 (26,7%)	0,510
	Não	163 (80,3%)	11 (73,3%)	
Dependência química	Sim	29 (14,3%)	6 (40,0%)	0,019
	Não	174 (85,7%)	9 (60,0%)	

Foram incluídos somente os indivíduos notificados no SINAN com situação de encerramento de cura ou óbito por TB e que apresentavam registro de agravado associado (n=218).

5.3 Perfis de Spoligotyping

A análise dos 406 isolados pela metodologia molecular de *Spoligotyping* permitiu a identificação de 111 diferentes *spoligotypes* (Figura 9): 84,7% (344/406) dos isolados pertencem a 74 *Spoligotypes International Type* (SIT), 2,0% (8/406) a 6 diferentes perfis *Orphan* e 13,3% (54/406) a 31 diferentes perfis ainda não registrados no SpolDB4 (perfis desconhecidos). Dentre os 74 SIT, foram identificadas 7 famílias e 32 sub-famílias (LAM1, LAM2, LAM3, LAM5, LAM6, LAM9, LAM1-LAM4, LAM11_ZWE, LAM3 and S/convergent, T1, T1 (T4-CE1 ancestor), T2, T2-T3, T3, T4-CEU1, T5, T5_RUS1, H1, H3, H3-LAM6, H3-LAM9, H3-T3, H4, U, U (LAM3?), U (likely H3), U (likely LAM), X1, X2, X3, S, BOVIS1_BCG). Nenhuma família de *East African Indian* (EAI), *Central and Middle Eastern Asia* (CAS) e *Beijing* foi encontrada (Tabela 13).

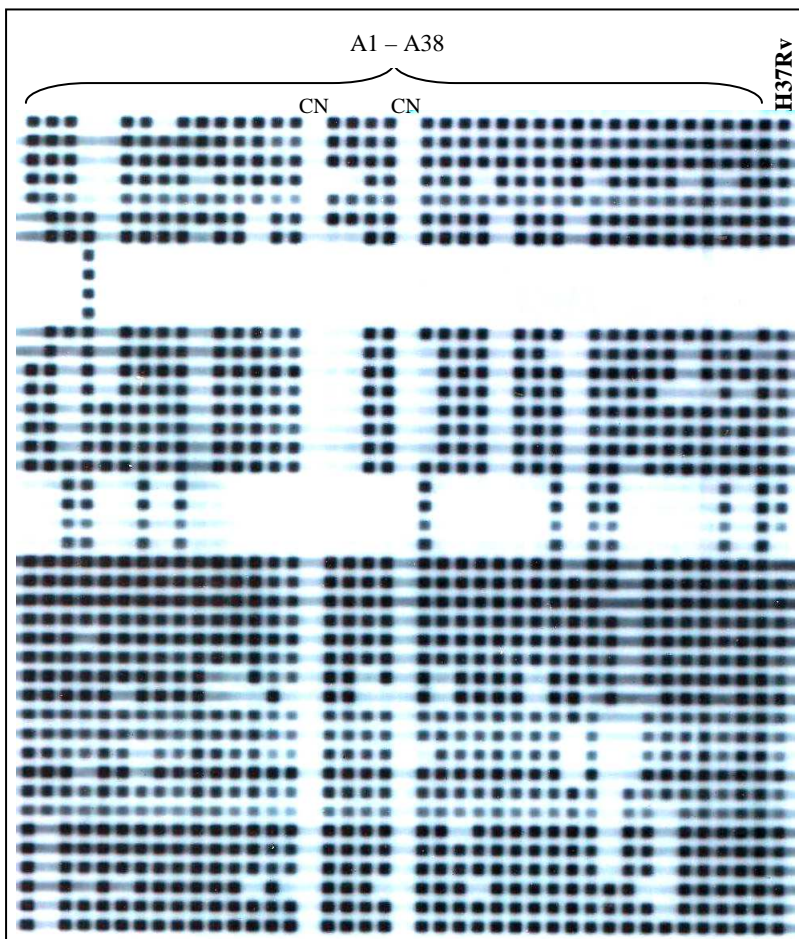


Figura 9. Revelação da membrana de *Spoligotyping* apresentando os perfis genéticos de diferentes isolados (A1-A38). (CN) corresponde ao controle negativo e (H37Rv) ao controle positivo da cepa padrão de *M. tuberculosis*.

(39/406), da T2/T3 com 8,4% (34/406), da T1 com 8,1% (33/406), da LAM6 com 5,9% (24/406), da LAM2 com 5,7% (23/406) e da LAM5 com 3,7% (15/406). As demais subfamílias encontradas representaram, cada uma, menos de 3,0% dos isolados analisados (Anexos 3 a 9).

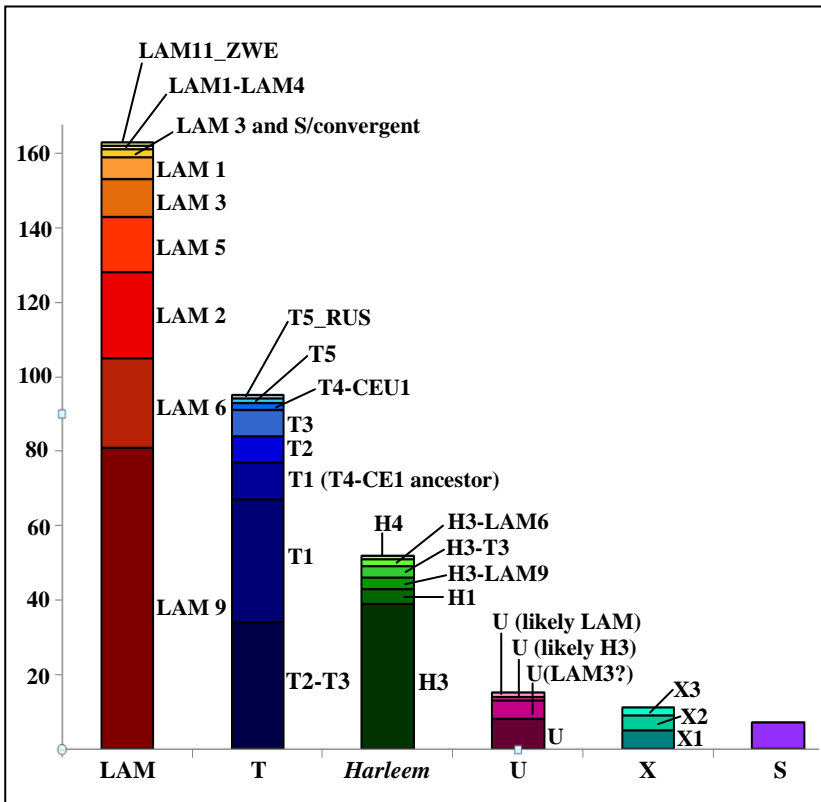


Figura 10. Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos 406 isolados genotipados por *Spoligotyping*. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados.

Em relação aos 74 SIT identificados, o SIT42/LAM9 foi o mais frequente, representando 9,6% dos isolados (39/406), seguido do

SIT73/T2-T3 com 8,4% (34/406), SIT50/H3 com 7,6% (31/406), SIT64/LAM6 com 5,7% (23/406), SIT 216/LAM9 com 4,93% (20/406), SIT53/T1 com 4,9% (20/406), SIT17/LAM2 com 4,4% (18/406) e o SIT93/LAM5 com 3,7% (15/406). Os demais SIT identificados representaram, cada um, menos de 3,0% dos isolados analisados (Anexos 3 a 9).

Os perfis *Orphan* foram identificados em 8 isolados, sendo 4 descritos somente no Brasil, um na Itália e um nos Estados Unidos da América (Tabela 14).

Tabela 14. *Spoligotypes* com perfil *Orphan* registrados no SpolDB4 e identificados na população estudada.

<i>Spoligotype</i>	Distribuição* mundial	Região	Município	Nº isolados (%)
<i>Orphan1</i>	BRA (Brasília)	Vale do Itajaí Sul	Itajaí Tubarão	1 (0,2%)
				1 (0,2%)
				2 (0,5%)
<i>Orphan2</i>	BRA (Santos)	Vale do Itajaí	Itajaí	1 (0,2%)
				1 (0,2%)
<i>Orphan3</i>	ITA (Roma)	Grande Florianópolis	Canelinha	1 (0,2%)
				1 (0,2%)
<i>Orphan4</i>	USA (Washington)	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
				1 (0,2%)
<i>Orphan5</i>	BRA (Brasília)	Vale do Itajaí	Timbó	1 (0,2%)
				1 (0,2%)
<i>Orphan6</i>	BRA (Brasília)	Vale do Itajaí	Balneário Camboriú	2 (0,5%)
				2 (0,5%)
				Total: 8 (2,0%)

*As siglas referentes aos países estão descritas no Anexo 11

Entre os *spoligotypes*, 13,3% (54/406) dos isolados não foram identificados pelo banco de dados SpoIDB4. Dentre esses isolados, observou-se 31 *spoligotypes* diferentes (Unk1 – Unk 31), sendo 9 grupos clonais: o Unk4 com 9 isolados (2,2%), o Unk6 com 4 (1,0%), o Unk7 com 3 (0,7%), o Unk9 com 2 (0,5%), Unk18 com 3 (0,7%), o Unk19 com 2 (0,5%), Unk21 com 4 (1,0%), o Unk26 com 3 (0,7%) e o Unk31 com 2 isolados (0,5%) (Anexo 10).

Estes *spoligotypes* foram analisados pelo Spotclust, para determinar a porcentagem de similaridade com as subfamílias já descritas. Dos 54 isolados com perfis não identificados, 28 (51,8%) apresentaram similaridade igual ou superior a 98,0% com a subfamília LAM9, incluindo os grupos clonais Unk4, Unk6, Unk9, Unk19 e Unk21. Os grupos clonais Unk7 e Unk18 apresentaram 99,9% de similaridade com as subfamílias LAM8 e LAM7, respectivamente. O *spoligotype* Unk8 apresentou 98,0% de similaridade com a cepa padrão H37Rv, o Unk25 95,0% de similaridade com a LAM10, o Unk20 99,9% com a EAI1 e o Unk30 99,9% com EAI3 (Anexo 10).

5.3.1 Famílias/subfamílias encontradas nas regiões do Estado de Santa Catarina

Grande Florianópolis

Na Grande Florianópolis (134 isolados) foi possível classificar 110 isolados em família/subfamília, pois os demais apresentaram perfil *Orphan* ou desconhecido. A família LAM foi a mais frequente, representando 39,5% (53/134) dos isolados, seguida da T com 23,9%

(32/134), da H com 11,2% (15/134), da X com 4,5% (6/134) e da U com 3,0% (4/134). As subfamílias LAM9 (12,7%), LAM6 (10,4%) e H3 (8,2%) foram as mais frequentes nesta região (Figura 11).

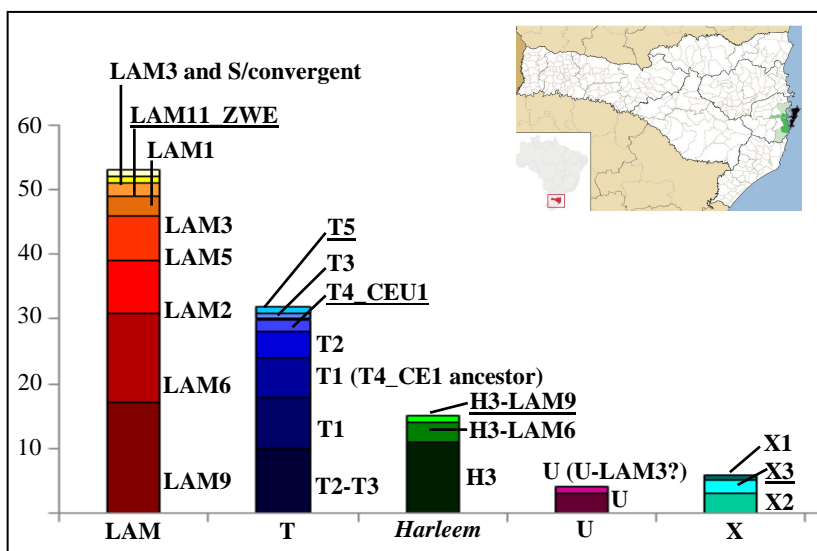


Figura 11. Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos isolados da Grande Florianópolis. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados. As subfamílias sublinhadas foram encontradas somente nessa região.

As subfamílias LAM11_ZWE, T4_CEU1, T5, H3-LAM9 e X3, assim como alguns *spoligotypes* foram encontrados somente na Grande Florianópolis (Figura 11 e Tabela 15).

Tabela 15. Subfamílias e SITs identificados somente na região da Grande Florianópolis.

Subfamília	SIT	Distribuição Mundial*	n**
LAM2	1691	MEX, PRT, VEN, ZAF	1
LAM3	130	AUT, BEL, BRA , CUB, ESP, ITA, MDG, NLA, USA, ZAF	1
LAM6	95	BRA , GBB, GUF, USA, ZAF	1
LAM9	162	ARG, FIN, FXX, GMB, ITA, USA, VEA, VEN,	1
	388	BRA , DZA, JPN, RUS, USA, VEN,	1
	822	BGD, BGR, BRA , GLP, USA	1
LAM11_ZWE	59	AUT, BEL, BRA , COM, DNK, FXX, CBR, GLP, GRC, ITA, KEN, MDG, MUS, MWI, NLA, NZL, PRT, REU, RUS, SWE, TZA, USA, ZAF, ZMB, ZWE	1
T1	373	AUT, BEL, BRA , CZE, FIN, FXX, GRC, ITA, NLA, USA, ZAF	1
	453	BRA , ESP, GUF, PRT, SWE, USA	1
	1223	ESP, MDG, USA	1
T2	153	AUT, BRA , CUB, ETH, FIN, ITA, NLA, SWE, USA	1
T4_CEU1	39	ARM, AUT, BEL, CZE, DEU, FXX, GBR, ITA, NLD, POL, USA, VNM, ZAF	2
T5	44	ARG, AUS, AUT, BEL, BRA , CMR, CZE, DEU, DNK, EGY, ESA, ESP, EST, FIN, FXX, GBR, GLP, GUF, IDN, IND, ITA, ITAS, NLD, POL, PRT, USA, VEN, ZAF, ZWE	1
H3	3	ARG, AUT, BRA , CUB, FXX, GLP, HTI, ITA, MEX, NLA, POL, SUR, USA, VEA, ZAF	1
	741	AUT, BRA , NLA, POL, USA	1
H3-LAM9	335	AUT, BEL, BGD, CZE, ESA, FXX, ITA, MTQ, ROM, RUS, SWE, USA, VNM	3
U	396	BRA , ITA, PRT	1
	450	BRA , CMR, CZE, DNK, FXX, ITA, MEX, NLA, USA	1
	1758	BRA , PRT	1
X2	886	USA	1
X3	92	ARG, AUS, AUT, BGD, BRA , CUB, DNK, GBR, GNB, GUF, IND, ITA, MEX, MWI, NLA, NOR, NZL, NZL, TUR, TWN, USA, ZAF, ZMB, ZWE	2

*As siglas referentes aos países estão descritas no Anexo 11; **(n): número de isolados.

Vale do Itajaí

Dos 140 isolados do Vale do Itajaí, foi possível classificar 115 isolados em família/subfamília, já que o restante apresentou perfil *Orphan* ou desconhecido. A família LAM foi a mais prevalente, representando 38,6% (54/140) dos isolados, seguida da T com 25,7% (36/140), da H com 12,8% (18/140), da U com 3,6% (5/140) e da X com 1,4% (2/140). As subfamílias LAM9 (22,9%), T2-T3 (14,3%) e H3 (7,9%) foram as mais frequentes e as subfamílias H4 e U (likely H3), assim como os *spoligotypes* SIT1933/LAM9, SIT52/T2, SIT124/U e SIT825/U foram encontrados somente na região do Vale do Itajaí (Figura 12 e Tabela 16).

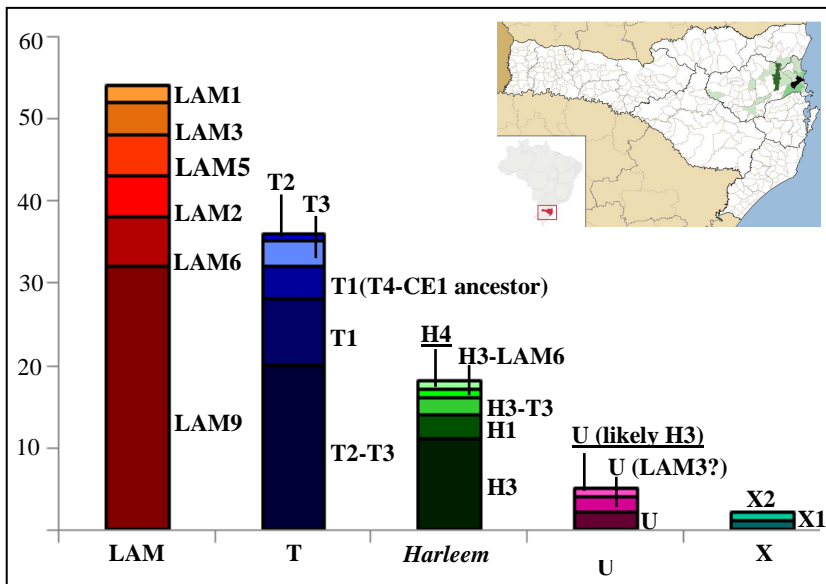


Figura 12. Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos isolados do Vale do Itajaí. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados. As subfamílias sublinhadas foram encontradas somente nessa região.

Tabela 16. Subfamílias e SITs identificados somente no Vale do Itajaí.

Subfamília	SIT	Distribuição Mundial*	n**
LAM9	1933	ITA, USA	3
T2	52	ARM, AUS, AUT, BEA, BEL, BRA , CAF, CAN, CHN, CIV, CMR, COA, CUB, CZA, CZE, DEU, DNK, DZA, ESA, ESP, ETH, FIN, FXX, GBR, GLP, HUN, IND, ITA, JPN, KEN, MDG, MEX, MTQ, MYS, NLA, NLD, NOR, NZL, PAK, POL, ROM, RUS, SAL, SWE, THA, TUR, TWN, UGA, USA, VEM, ZAF, ZMB	1
H4	777	ARM, BGR, BRA , FIN, GEO, KAZ, NLA, RUS, SAU, SWE, TUR, USA	1
U	124	AUT, BEL, BRA , DEU, FIN, FXX, GLP, IND, NLA, RUS, TWN, USA	1
U	825	AUT, BRA , GBB, USA	1
U (likely H3)	237	AUT, BEL, BRG, BRA , CMR, DEU, FIN, FXX, GBR, GUF, IDN, ITA, MDG, POL, PRT, RUS, SWE, USA, ZAF	1

*As siglas referentes aos países estão descritas no Anexo 11; ***(n): número de isolados

Nordeste Catarinense

No Nordeste Catarinense (78 isolados), foi possível classificar 67 isolados em família/subfamília, pois os demais apresentaram perfil *Orphan* ou desconhecido. A família LAM foi a mais prevalente, representando 35,9% (28/78) dos isolados, seguida da T com 21,8% (17/78), da H com 19,2% (15/78), da U com 5,1% (4/78), da X com 2,6% (2/78) e da BOVIS1_BCG com 1,3% (1/78). As subfamílias LAM9 (20,0%), H3 (20,0%) e T1 (14,1%) foram as mais frequentes e as subfamílias LAM1-LAM4, T5_RUS1 e BOVIS1_BCG, assim como alguns *spoligotypes* foram encontrados somente no Nordeste Catarinense (Figura 13 e Tabela 17).

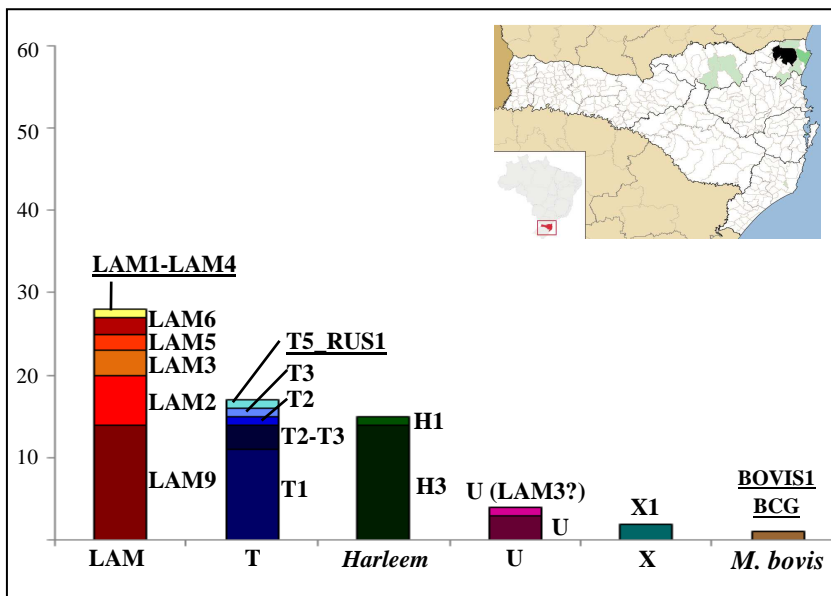


Figura 13. Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos isolados do Nordeste Catarinense. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados. As subfamílias sublinhadas foram encontradas somente nessa região.

Tabela 17. Subfamílias e SITs identificados somente no Nordeste Catarinense.

Subfamília	SIT	Distribuição Mundial*	n**
LAM2	1661	MEX, PRT, VEN, ZAF	1
LAM3	211	ARG, BRA , ESP, FXX, MDG, MEX, PRT, USA, ZAF	2
LAM9	150	ARG, BEL, BRA , DZA, EGY, FIN, FXX, GUF, ITA, MAR, MEX, PRT, RUS, VEM, ZAF	1
	1844	ARG, ZAF	1
LAM1-LAM4	1321	ARG, BRA , GUF, IND, PRT, USA	1
T1	370	AUT, BRA , EST, SWE, USA	1
	1202	BRA , LBY, MDG	1
T5_RUS1	254	AUT, AZE, BEL, BRA , DEU, DNK, ESP, FIN, FXX, GEO, ITA, KAZ, RUS, LVA, NLD, POL, RUS, TWN, TZA, USA, ZAF	1

Subfamília	SIT	Distribuição Mundial*	n* *
U	534	BRA, ESP, GNB	1
	780	FXX, ZWE	1
	956	BRA, USA	1
BOVIS1_ BCG	482	ARG, AUT, BEA, BEL, BRA, CZE, DEU, DNK, ESC, ESP, FRB, FXX, GBA, GBR, GLP, GUF, IRB, ITA, MEX, NAM, NLA, NOR, NZL, PRT, RUS, SAU, SWE, TWN, USA, VEN, ZAA, ZAF, ZMB	1

*As siglas referentes aos países estão descritas no Anexo 11; ***(n): número de isolados

Sul Catarinense

No Sul Catarinense (40 isolados), a família LAM foi a mais frequente, representando 50,0% (20/40) dos isolados, seguida da T com 22,5% (9/40), da S com 15,0% (6/40), da U com 5,0% (2/40), da X com 2,5% (1/40) e da H com 2,5% (1/40). Somente um isolado não pode ser classificado em família/subfamília, pois apresentou perfil *Orphan*. As subfamílias LAM9 (32,5%) e T1 (15,0%) foram as mais frequentes e a subfamília U (likely LAM), assim como os *spoligotypes* SIT392/T2 e SIT34/S foram identificados apenas no Sul Catarinense (Figura 14 e Tabela 18).

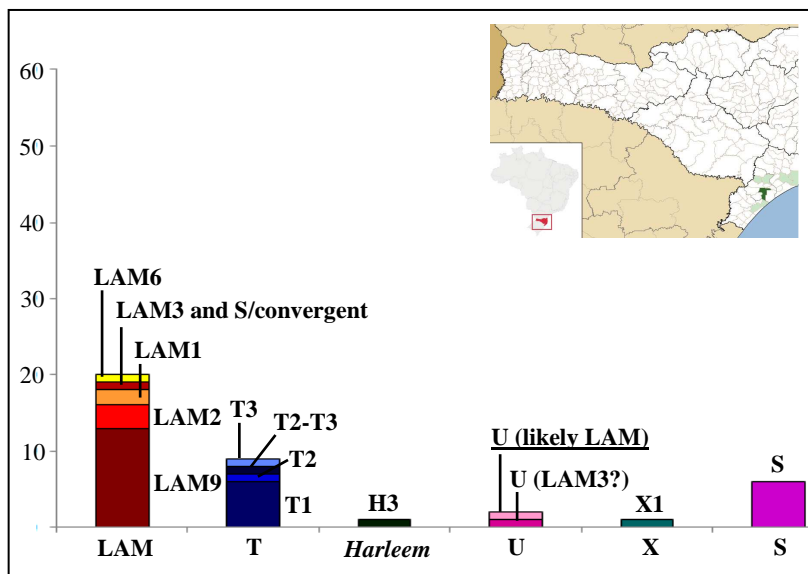


Figura 14. Distribuição das famílias/subfamílias identificadas nos isolados do Sul Catarinense. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados. As subfamílias sublinhadas foram encontradas somente nessa região.

Tabela 18. Subfamílias e SITs identificados somente no Sul Catarinense.

Subfamília	SIT	Distribuição Mundial*	n**
T2	392	ARG, BRA	1
U (likely LAM)	29	ESP, FXX, GLP, PRT, USA	1
S	34	ARG, AUS, AUT, BEL, BGR, BRA, CAN, CUB, DEU, DZA, EGY, FIN, FXX, GBB, GBR, GEO, GLP, GRC, GUF, HTI, IDN, IND, IRN, ITA, ITAS, KEN, LBY, MAR, MDG, MEX, MOZ, MWI, NLA, NZL, PRT, REU, SAL, SWE, THA, TUR, USA, VEN, VNM, ZAA, ZAF, ZMB	6

*As siglas referentes aos países estão descritas no Anexo 11; **(n): número de isolados

Oeste Catarinense

No Oeste Catarinense (11 isolados), a família LAM foi a mais prevalente, representando 63,6% (7/11) dos isolados, seguida da H com 18,2% (2/11), da T com 9,1% (1/11) e da S com 9,1% (1/11). Seis subfamílias foram identificadas no Oeste Catarinense, sendo a LAM9 a mais frequente (45,4%). Os *spoligotypes* SIT157/T3 e SIT71/S foram identificados somente nesta região (Figura 15 e Tabela 19).

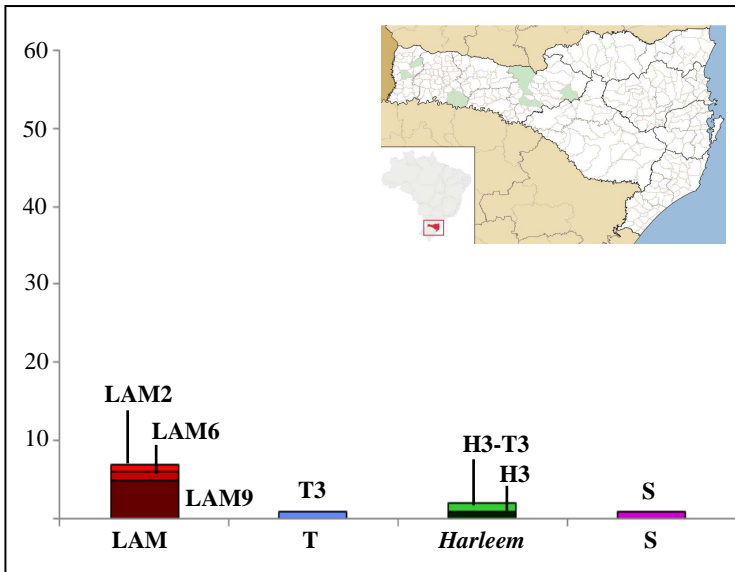


Figura 15. Distribuição das famílias identificadas nos isolados do Oeste Catarinense. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados.

Tabela 19. Subfamílias e SITs identificados somente no Oeste Catarinense.

Subfamília	SIT	Distribuição Mundial*	n**
T3	157	BRA, DEU, ITA, PRT, SAL	1
S	71	ARG, BEL, CAN, CUB, FXX, IND, ITA, NLA, USA, VEN, ZAF	1

*As siglas referentes aos países estão descritas no Anexo 11; **(n): número de isolados

Serra Catarinense

Dos 3 isolados provenientes da Serra Catarinense, dois apresentaram *spoligotypes* conhecidos: 1 SIT93/LAM5 e 1 SIT50/H3 (Figura 16).

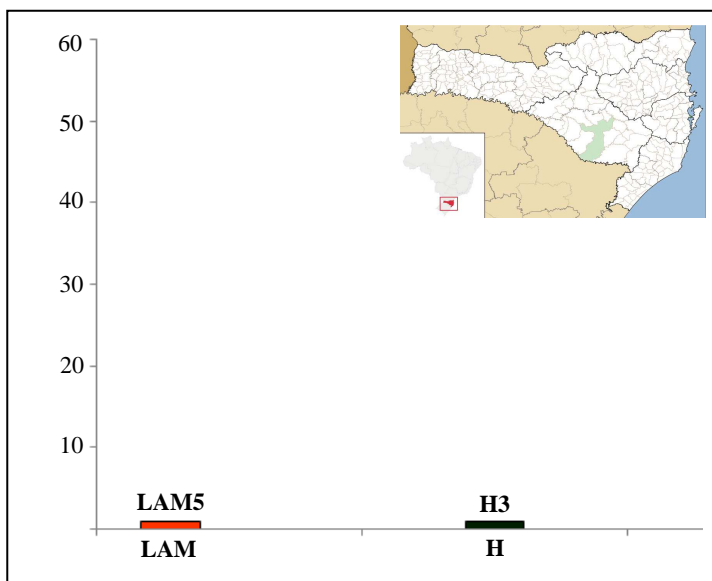


Figura 16. Distribuição das famílias identificadas nos 3 isolados da Serra Catarinense. O eixo das ordenadas representa o número absoluto de isolados.

5.3.2 Perfis *Orphan* encontrados nas regiões do Estado de Santa Catarina

Na Grande Florianópolis, o perfil *Orphan* foi identificado em 0,7% dos isolados (1/134), no Vale do Itajaí em 3,6% (5/140), no Nordeste Catarinense em 1,3% (1/78) e no Sul Catarinense em 2,5% (1/40). O perfil *Orphan1* foi encontrado em 2 isolados, um do Vale do Itajaí e outro do Sul Catarinense; o *Orphan6* foi identificado em 2 isolados do Vale do Itajaí e os demais foram identificados em somente 1 isolado (Figura 17).

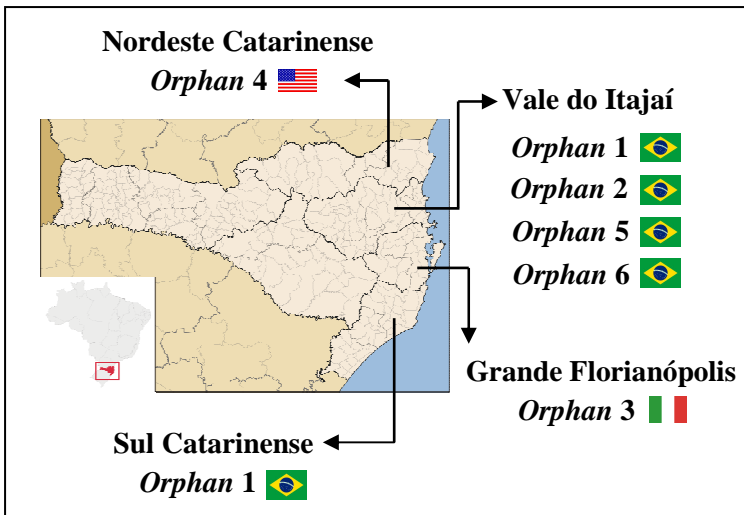


Figura 17. Distribuição dos perfis *Orphan* identificados na população estudada. Os perfis *Orphan1*, *Orphan2*, *Orphan5* e *Orphan6* já foram descritos no Brasil e os perfis *Orphan3* e *Orphan4* foram descritos na Itália e nos Estados Unidos, respectivamente.

5.3.3 Perfis desconhecidos encontrados nas regiões do Estado de Santa Catarina

Perfis desconhecidos foram encontrados na Grande Florianópolis, no Vale do Itajaí, no Nordeste e na Serra Catarinense (Anexo 10).

Na Grande Florianópolis, 23 isolados foram identificados como perfil desconhecido, o que representa 17,2% (23/134) dos isolados da região. Foram encontrados 19 perfis desconhecidos diferentes, sendo 6 grupos clonais: Unk4 (com 2 isolados), Unk7 (com 3 isolados), Unk9 (com 1 isolado), Unk18 (com 1 isolado), Unk21 (com 1 isolado) e o Unk26 (com 1 isolado). Destes grupos clonais, apenas o Unk7 (com 3 isolados) foi encontrado exclusivamente nesta região.

No Vale do Itajaí, 20 isolados apresentaram perfil desconhecido, o que corresponde a 14,3% (20/140) dos isolados da região. Foram encontrados 10 perfis desconhecidos diferentes, sendo 5 grupos clonais: Unk4 (com 6 isolados), Unk6 (com 4 isolados), Unk9 (com 1 isolado), Unk26 (com 2 isolados) e Unk31 (com 2 isolados). Os grupos Unk6 e Unk31 foram encontrados somente nesta região.

No Nordeste Catarinense, 10 isolados foram identificados como perfil desconhecido, o que representa 12,8% (10/78) dos isolados da região. Foram encontrados 7 perfis diferentes, sendo 3 grupos clonais: Unk4 (com 1 isolado), Unk18 (com 2 isolados) e o Unk21 (com 3 isolados).

A Serra Catarinense apresentou somente um perfil desconhecido, o Unk1 (com 1 isolado), o que corresponde a 33,3% (1/3)

dos isolados da região. Este perfil foi encontrado somente na Serra Catarinense.

5.3.4 *Spoligotypes*, TB-MDR e agravos associados

Dentre os 23 isolados TB-MDR, foram identificadas 6 subfamílias e 2 perfis desconhecidos (Figura 18).

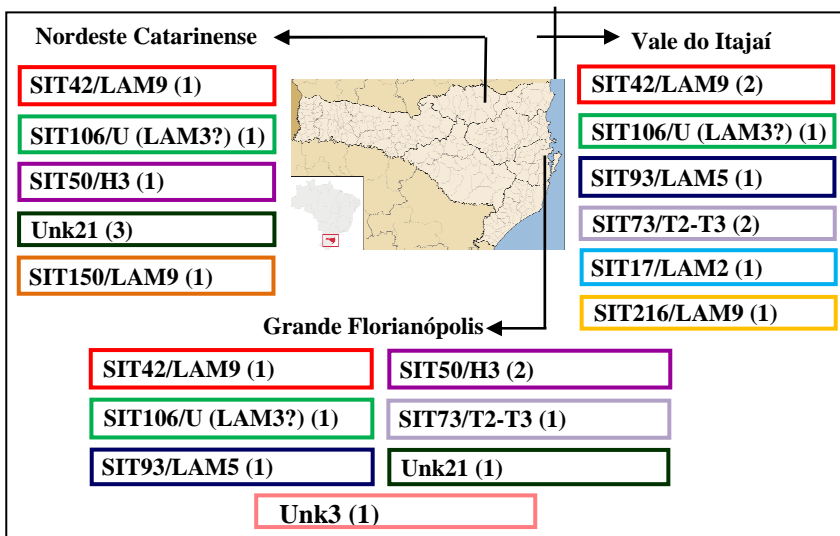


Figura 18. Distribuição dos isolados MDR encontrados na população estudada por região do Estado de Santa Catarina. Cada *spoligotype* está representado por uma moldura de cor diferente e o número de cepas isoladas está entre parênteses.

A subfamília mais frequente foi a LAM9 com 6 isolados (26,1%) – 4 SIT42, 1 SIT150 e 1 SIT216 –, seguida do perfil desconhecido Unk21, com 4 isolados (17,4%). As subfamílias T2-T3,

H3 e U (LAM3?) apresentaram, cada uma, 3 isolados MDR (13,0%), dos quais 3 eram SIT73/T2-T3, 3 SIT50/H3 e 3 SIT106/U (LAM3?). A subfamília LAM5 apresentou 2 isolados (8,7%) MDR, sendo ambos SIT93 e a LAM2 (SIT17) e o perfil desconhecido Unk3 apresentaram, cada um, somente 1 isolado MDR (4,3%) (Figura 18). Houve associação entre MDR e a subfamília H3 (LAM3?) ($p=0,002$) e o perfil desconhecido Unk21 ($p<0,001$) (Tabela 20).

Tabela 20. Associação entre TB-MDR e as subfamílias na população estudada.

Subfamília		TB-MDR		<i>p valor</i>
		Sim (23)	Não (364)	
LAM9	Sim	6 (26,1%)	73 (20,1%)	0,436
	Não	17 (73,9%)	291 (79,9%)	
T2-T3	Sim	3 (13,0%)	28 (7,7%)	0,414
	Não	20 (87,0%)	336 (92,3%)	
H3	Sim	3 (13,0%)	35 (9,6%)	0,484
	Não	20 (87,0%)	329 (90,4%)	
H3 (LAM3?)	Sim	3 (13,0%)	2 (0,5%)	0,002
	Não	20 (87,0%)	362 (99,5%)	
Unk21	Sim	4 (17,4%)	0 (0%)	<0,001
	Não	19 (82,6%)	364 (0%)	

Foram incluídos somente os casos que apresentavam resultados do TSA ($n=387$)

Dentre os 43 casos de institucionalização em penitenciárias, mais de 60% dos isolados pertenceram à família LAM ou apresentaram perfil desconhecido. A família LAM representou 34,9% (15/43) dos isolados, sendo 5 isolados SIT17/LAM2, 4 SIT93/LAM5, 3 SIT42/LAM9, 2 SIT64/LAM6, e 1 SIT150/LAM9. Treze isolados (30,2%) apresentaram perfil desconhecido: 4 Unk4, 3 Unk7, 3 Unk21, 1 Unk9, 1 Unk16 e 1 Unk29. Verificou-se que existe associação entre a institucionalização e a subfamília LAM5 ($p=0,042$) e as cepas de perfil

desconhecido Unk4 ($p=0,002$), Unk7 ($p=0,001$) e Unk21 ($p=0,005$) (Tabela 21).

Tabela 21. Associação entre institucionalização em penitenciárias e as subfamília na população estudada.

Subfamília e Perfis Desconhecidos		Penitenciária		<i>p valor</i>
		Sim (43)	Não (347)	
LAM2	Sim	5 (11,5%)	17 (4,9%)	0,081
	Não	38 (88,5%)	330 (95,1)	
LAM5	Sim	4 (9,3%)	74 (21,3%)	0,042
	Não	39 (90,7%)	273 (78,7%)	
LAM9	Sim	3 (7,0%)	11 (3,2%)	0,192
	Não	40 (93,0%)	336 (96,8%)	
Unk4	Sim	4 (9,3%)	2 (0,6%)	0,002
	Não	39 (90,7%)	345 (99,4%)	
Unk7	Sim	3 (7,0%)	0 (0%)	0,001
	Não	40 (93,0%)	347 (100%)	
Unk21	Sim	3 (7,0%)	1 (0,3%)	0,005
	Não	40 (93,0%)	346 (99,7%)	

Foram incluídos somente os indivíduos registrados no SINAN (n=390)

Nos casos que envolveram os presidiários, 6 indivíduos foram identificados como TB-MDR: 2 isolados SIT42/LAM9, um na Penitenciária de Florianópolis e uma na de Itajaí; 1 isolado SIT150/LAM9 no Presídio de Joinville; e 3 isolados com perfil desconhecido (Unk21), sendo um na Penitenciária da Palhoça (Grande Florianópolis) e 2 na Penitenciária de Joinville (Nordeste Catarinense).

O isolado MDR SIT150/LAM9 e os sensíveis (aos fármacos de primeira linha) Unk7, Unk16 e Unk29 foram encontrados exclusivamente nos presidiários. O isolado Unk7 foi identificado em 3 indivíduos da Penitenciária de São Pedro de Alcântara (Grande

Florianópolis); o Unk16 em um presidiário da Penitenciária de Joinville e o Unk29 em um da Penitenciária de Florianópolis.

Entre os 90 casos de indivíduos com HIV/Aids, mais de 60% dos isolados pertenciam às famílias LAM e T. A família LAM representou 33,3% dos casos (30/90), sendo a LAM9 a subfamília mais frequente com 11 isolados (7 SIT42, 2 SIT216, 1 SIT150 e 1 SIT866), seguida da LAM2 com 5 (4 SIT17 e 1 SIT1691), da LAM5 com 4 (4 SIT93), da LAM6 com 4 (4 SIT64), da LAM3 com 3 (2 SIT33 e 1 SIT130), da LAM1 com 2 (1 SIT20 e 1 SIT 729) e da LAM3 and S/convergent com 1 isolado (SIT4). Vinte e seis isolados (28,9%) pertenciam à família T, sendo a subfamília T2-T3 a mais frequente, com 13 isolados (todos SIT73), seguida da T1 com 6 isolados (3 SIT53, 1 SIT51, 1 SIT244 e 1 SIT370), da T3 com 3 (3 SIT37), da T1 (T4-CE1 ancestor?) com 2 (SIT65), da T2 com 1 (SIT1664) e da T4_CEU1 (SIT39) com 1 isolado. Houve associação entre a presença de HIV/Aids com a subfamília LAM9 ($p=0,034$) e a T2-T3 ($p=0,039$) (Tabela 22).

Tabela 22. Associação entre presença de HIV/Aids e as subfamílias na população estudada.

Subfamília		HIV/Aids		<i>p valor</i>
		Sim (90)	Não (275)	
LAM2	Sim	5 (5,6%)	14 (5,1%)	0,791
	Não	85 (94,4%)	261 (94,9%)	
LAM3	Sim	3 (3,3%)	5 (1,8%)	0,413
	Não	87 (96,7%)	270 (98,2%)	
LAM5	Sim	4 (4,4%)	11 (4,0%)	0,768
	Não	86 (95,6%)	264 (96,0%)	

Subfamília		HIV/Aids		<i>p</i> valor
		Sim (90)	Não (275)	
LAM6	Sim	4 (4,4%)	18 (6,5%)	0,467
	Não	86 (95,6%)	257 (93,5%)	
LAM9	Sim	11 (12,2%)	62 (22,5%)	0,034
	Não	79 (87,8%)	213 (77,5%)	
T1	Sim	6 (6,7%)	21 (7,6%)	0,760
	Não	84 (93,3%)	254 (92,4%)	
T3	Sim	3 (3,3%)	4 (1,5%)	0,370
	Não	87 (96,7%)	271 (98,5%)	
T2-T3	Sim	13 (14,4%)	20 (7,3%)	0,039
	Não	77 (85,6%)	255 (92,7%)	

Foram incluídos somente os indivíduos notificados no SINAN e que apresentavam registro do agravo associado (n=365).

Os 75 casos de indivíduos dependentes químicos apresentaram 70% dos isolados pertencentes às famílias LAM e T. A família LAM representou 36,0% dos casos (27/75), sendo a LAM9 a subfamília mais frequente, com 16 isolados (10 SIT42, 3 SIT216, 1 SIT866 e 2 SIT1076), seguida da LAM6 com 5 (5 SIT64), da LAM5 com 3 (3 SIT93), da LAM3 com 2 (1 SIT33 e 1 SIT211) e da LAM2 com 1 (1 SIT17). Dezesesseis isolados (21,3%) pertenciam à família T, sendo a subfamília T2-T3 a mais frequente, com 6 isolados (6 SIT73), seguida da T1 com 5 isolados (4 SIT53 e 1 SIT373), da T1 (T4-CE1 ancestor?) com 3 (3 SIT65), da T2 com 1 (1 SIT52) e da T3 com 1 isolado (1 SIT37). Não houve associação entre a dependência química e as subfamílias encontradas (Tabela 23).

Tabela 23. Associação entre a dependência química e as subfamílias na população estudada.

Subfamília		Dependente químico		<i>p valor</i>
		Sim (75)	Não (290)	
LAM5	Sim	3 (4,0%)	12 (4,1%)	1,000
	Não	72 (96,1%)	278 (95,9%)	
LAM6	Sim	5 (6,7%)	17 (5,9%)	0,787
	Não	70 (93,3%)	273 (94,1%)	
LAM9	Sim	16 (21,3%)	57 (19,7%)	0,746
	Não	59 (78,7%)	223 (80,3%)	
T1	Sim	5 (6,7%)	22 (7,6%)	0,786
	Não	70 (93,3%)	268 (92,4%)	
T2-T3	Sim	6 (8,0%)	27 (9,3%)	0,724
	Não	69 (92,0%)	263 (90,7%)	
T1 (T4-CE1 ancestor?)	Sim	3 (4,0%)	6 (2,1%)	0,398
	Não	72 (96,0)	284 (97,9%)	

Foram incluídos somente os indivíduos notificados no SINAN e que apresentavam registro do agravo associado (n=365).

Entre os 80 casos de indivíduos pertencente os grupo do alcoolismo, cerca de 70% dos isolados pertenciam às famílias LAM e T. A família LAM representou 40,0% dos casos (32/80), sendo a LAM9 a subfamília mais frequente, com 18 isolados (10 SIT42, 4 SIT216, 2 SIT866, 2 SIT1076), seguida da LAM6 com 5 (5 SIT64), da LAM5 com 4 (4 SIT93), da LAM3 com 3 (2 SIT33e 1 SIT211), da LAM2 com 1 (1 SIT17) e da LAM1-LAM4 com 1 (1SIT1321) isolado. Vinte e quatro isolados (31,3%) pertenciam à família T, sendo as subfamílias mais frequentes a T2-T3 com 8 isolados (8SIT73) e a T1 também com 8 isolados (6 SIT53, 1 SIT1223 e 1 SIT), seguidas da T2 com 3 (1 SIT52, 1 SIT1531 e 1 SIT1664), da T1 (T4-CE1 ancestor?) com 3 (3 SIT65) e

da T3 com 2 isolados (2 SIT37). Não houve associação entre o alcoolismo e as subfamílias identificadas ($p=0,021$) (Tabela 24).

Tabela 24. Associação entre o alcoolismo e as subfamílias na população estudada.

Subfamília		Alcoolismo		<i>p valor</i>
		Sim (80)	Não (285)	
LAM3	Sim	3 (3,8%)	5 (1,8%)	0,380
	Não	77 (96,2%)	280(98,2%)	
LAM5	Sim	4 (5,0%)	11 (3,9%)	0,749
	Não	76 (95,0%)	274 (96,1%)	
LAM6	Sim	5 (6,3%)	17 (6,0%)	1,000
	Não	75 (93,8%)	268 (94,0%)	
LAM9	Sim	18 (22,5%)	55 (19,3%)	0,527
	Não	62 (77,5%)	230 (80,7%)	
T1	Sim	8 (10,0%)	19 (6,7%)	0,314
	Não	72 (90,0%)	266 (93,3%)	
T2	Sim	3 (3,8%)	3 (1,1%)	0,122
	Não	77 (96,2%)	282 (98,9%)	
T2-T3	Sim	8 (10,0%)	25 (8,8%)	0,735
	Não	72 (90,0%)	260 (91,2%)	
T1 (T4-CE1 ancestor?)	Sim	3 (3,8%)	6 (2,1%)	0,417
	Não	77 (96,2%)	279 (97,9%)	

Foram incluídos somente os indivíduos notificados no SINAN e que apresentavam registro do agravo associado (n=365).

6. Discussão

6.1 Comparação dos Protocolos de tratamento de escarro

Considerando que a TB é uma doença de transmissão aérea e interpessoal e que 90% dos casos ocorrem na forma pulmonar, dos quais 60% são bacilíferos, o diagnóstico precoce e o tratamento dos pacientes bacilíferos representa a principal medida de controle da doença. Segundo Storla e *cols.* (2008), quanto maior o tempo entre o aparecimento dos sintomas e o início do tratamento, maior a infectividade dos pacientes e é nesse período que normalmente ocorre a transmissão do bacilo. Grande parte do tempo despendido no diagnóstico da TB deve-se a baixa sensibilidade da baciloscopia (STORLA *et al.*, 2008). Diante disso, ferramentas moleculares, como a PCR, estão sendo utilizadas com o objetivo de aumentar a sensibilidade na detecção do bacilo, especialmente a partir do escarro.

Entretanto, a literatura aponta importante variação na sensibilidade e na especificidade da PCR, devido aos diversos processos de descontaminação e preparação da amostra, de extração e purificação do DNA e de detecção do produto amplificado, além da utilização de diferentes alvos moleculares, da ocorrência de contaminação cruzada e da presença de inibidores (NOORDHOEK *et al.*, 1994; NOORDHOEK *et al.*, 1996; DROBNIIEWSKI *et al.*, 2003; NOORDHOEK *et al.*, 2004; FLORES *et al.*, 2005).

A sensibilidade da PCR na detecção de *M. tuberculosis* em amostras clínicas está diretamente ligada à eficiência da extração do DNA. Os métodos comumente utilizados para extração de DNA podem resultar em baixa quantidade (devido à lise incompleta da parede bacteriana) ou baixa qualidade do DNA (devido à presença de inibidores), o que interfere diretamente na sensibilidade da reação (AMITA *et al.*, 2002). Segundo Rosseti e cols (1997), a escolha dos métodos de extração do DNA e detecção do produto amplificado, aumenta a sensibilidade da PCR, permitindo a detecção de um baixo número de bacilos (1 a 20) na amostra clínica.

Devido a complexa parede celular, composta de moléculas lipofílicas e polissacarídeos, as micobactérias são resistentes a maioria dos protocolos tradicionais de lise celular. A ruptura da parede bacteriana pode ser realizada por processos mecânicos, enzimáticos ou químicos e normalmente é necessária a combinação de mais de um desses processos (AMITA *et al.*, 2002; KÄSER *et al.*, 2009). Após a lise celular, a purificação do DNA é um passo essencial a fim de remover os inibidores da PCR, os quais podem diminuir a sensibilidade da reação (AMITA *et al.*, 2002). Além do uso de diferentes metodologias de extração e purificação do DNA, diferentes métodos de fluidificação e descontaminação do escarro e a falta de padronização destas metodologias contribuem para a variação interlaboratorial da sensibilidade da PCR (NOORDHOEK *et al.*, 1996).

O LBMM/UFSC vem auxiliando o Hospital Nereu Ramos e o LACEN/SC no diagnóstico da TB por meio da realização da PCR diretamente a partir de amostras clínicas, em especial do escarro. O

LBMM/UFSC padronizou um protocolo de tratamento da amostra, assim como a utilização de partículas de sílica na extração e purificação do DNA (LIPPKE *et al.*, 1987). Este protocolo é baseado na técnica descrita por Kubica e *cols.* (1963), que consiste basicamente no tratamento do escarro com N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio, adicionada de dodecil sulfato de sódio (SDS). O N-acetil-L-cisteína, reduz a viscosidade de soluções compostas por mucoproteínas e o hidróxido de sódio destrói a microbiota contaminante (KUBICA *et al.*, 1963). O detergente SDS é considerado um componente essencial para a lise da parede da micobactéria (BAESS, 1974; BANAVAIKER *et al.*, 1998).

Apesar da associação da técnica desenvolvida por Kubica e *cols.* (1963) para fluidificação do escarro, do uso do detergente para lise celular e de uma metodologia de extração e purificação de DNA, o LBMM/UFSC não alcançou sensibilidade satisfatória na detecção molecular de *M. tuberculosis* realizada diretamente em amostra de escarro, especialmente nos casos paucibacilares. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade da PCR, o presente trabalho avaliou a inclusão das pérolas de vidro associadas à intensa agitação como uma modificação no protocolo até então padronizado no laboratório. O protocolo foi modificado baseado em estudos que preconizam a homogeneização prolongada utilizando pérolas de vidro com o objetivo de distribuir de forma uniforme os bacilos na amostra de escarro (SLOSÁREK *et al.*, 1977; DALEY *et al.*, 2009). Este processo mecânico rompe a estrutura do escarro, separa os aglomerados de

micobactérias e concentra os bacilos, aumentando a possibilidade de detecção (DALEY *et al.*, 2009).

Os resultados da comparação dos protocolos demonstraram que o protocolo modificado (inclusão de pérolas de vidro) possibilitou um aumento significativo na sensibilidade da PCR IS6110 ($p=0,001$). Nas etapas do protocolo modificado, o escarro foi submetido à intensa homogeneização com pérolas de vidro em tubo de vidro. A agitação no vórtex, que promove atrito entre as pérolas de vidro e as paredes do tubo, associado com N-acetil-L-cisteína provavelmente auxilia o rompimento do aglomerado de bacilos; aumentando a área de superfície exposta das bactérias e facilitando a ação do SDS e do isotiocianato de guanidina na lise celular.

A PCR IS6110 apresentou maior sensibilidade, o que já era esperado, pois a sequência de inserção IS6110 está presente em até 20 cópias no genoma de *M. tuberculosis*. Entretanto, no diagnóstico laboratorial de micobactérias é importante a utilização de um gene conservado como o 16S rRNA (no gênero *Mycobacterium sp*), pois a literatura reporta casos de cepas de *M. tuberculosis* que perderam a sequência IS6110 (FOMUKONG *et al.*, 1994; AGASINO *et al.*, 1998; MOATTER *et al.*, 1998).

A utilização de amostras não pareadas para a realização das duas metodologias representa uma limitação do estudo, entretanto este fato não invalida os resultados obtidos. Os pacientes hospitalizados normalmente apresentam dificuldade na coleta da amostra, sendo seu volume geralmente restrito. Além disso, essas amostras foram separadas em alíquotas para realização da baciloscopia, da cultura e dos testes

moleculares, logo, não foi possível processar a mesma amostra pelo protocolo de rotina utilizado no LBMM/UFSC e pelo protocolo modificado. A alternativa utilizada foi o pareamento das amostras de acordo com o resultado da baciloscopia, o que possibilitou a comparação entre os resultados obtidos no tratamento do escarro com o protocolo de rotina e com o protocolo modificado.

A utilização do protocolo modificado representou um aumento na sensibilidade da PCR para detecção de *M. tuberculosis* diretamente do escarro, principalmente nos casos paucibacilares (baciloscopia negativa). A otimização do protocolo de tratamento do escarro representou uma importante contribuição no diagnóstico da TB em Santa Catarina, já que 25% dos pacientes são coinfectados com o vírus HIV, os quais normalmente apresentam baciloscopia negativa (DIVE, 2011). Além disso, em Santa Catarina, somente o LACEN/SC utiliza a cultura automatizada; nos demais laboratórios do Estado a cultura é realizada no meio sólido *Ogawa-Kudoh*[®], o que demanda maior período de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Logo, o protocolo modificado de tratamento do escarro implica no início precoce do tratamento da TB, menor tempo de infectividade do paciente e bloqueio da cadeia de transmissão da doença.

6.2 População estudada

O Estado de Santa Catarina, segundo dados do CENSO 2010, tem 6.248.436 habitantes, o que representa 3,3% da população

brasileira. De toda a sua população, 84,0% vivem em área urbana, 49,6% são do sexo masculino e 50,4% do sexo feminino. É predominantemente formada por brancos (88,1%) e descende, na sua maior parte, de portugueses, alemães e italianos. O Estado apresenta 293 municípios, distribuídos em 6 mesorregiões: Grande Florianópolis, onde situa-se sua capital, Florianópolis; Vale do Itajaí; Sul Catarinense; Nordeste Catarinense; Serra Catarinense e Oeste Catarinense. A sua densidade demográfica é de 65,5 hab/km², apresentando uma maior densidade populacional no litoral Catarinense (BRASIL 2012a; BRASIL, 2012b).

Santa Catarina possui uma das mais baixas taxas de incidência de TB (27,6/100.000 hab) do país, porém alguns municípios apresentam taxas semelhantes e/ou superiores às do Brasil, como as cidades de Itajaí (77,3 casos novos/100.000 habitantes) e Florianópolis (42,5 casos novos/100.000 habitantes) (DIVE, 2011; BRASIL, 2011c; WHO, 2011a). Para o controle da TB, o Estado conta com o Hospital Nereu Ramos, referência estadual em doenças infectocontagiosas, e com o LACEN/SC, referência no diagnóstico laboratorial da TB.

No período do estudo, foram analisados 406 isolados clínicos, dos quais aproximadamente 85% residiam no Vale do Itajaí (34,5%), na Grande Florianópolis (33,0%) e no Nordeste Catarinense (19,2%). Além disso, os casos concentraram-se no leste dessas três regiões, principalmente no litoral. Florianópolis (19,2%), na Grande Florianópolis; Itajaí (14,0%), no Vale do Itajaí; e Joinville (15,3%), no Nordeste Catarinense, que apresentam as maiores densidades

demográficas do Estado, concentraram o maior número dos casos de TB incluídos no estudo.

Em 3,9% dos casos não foi possível obter os dados clínico-epidemiológicos dos indivíduos, já que não foram notificados no SINAN. As unidades de saúde tinham como justificativa para a não notificação destes pacientes o não comparecimento às unidades após o diagnóstico ou o óbito antes do início do tratamento da TB. Estas justificativas não são plausíveis, uma vez que assim que o diagnóstico de TB é confirmado, o caso deve ser obrigatoriamente notificado. Além disso, outro problema observado foi o preenchimento irregular dos dados dos pacientes. A notificação fidedigna e o registro completo dos casos de TB são essenciais para o conhecimento real acerca dos indicadores da doença, para identificação de fatores de risco e para o planejamento adequado de medidas de controle.

Seguindo a tendência mundial, na qual a TB é mais prevalente em homens, numa relação homens/mulheres de $1,9 \pm 0,6$, em Santa Catarina 72% dos casos incluídos no estudo são do sexo masculino (NEYROLLES; QUINTANA-MURCI, 2009; ZOCHE; SILVA, 2009; BELO *et al.*, 2010; HINO *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2011; HECK *et al.*, 2011; WHO, 2011a). As diferenças de gênero podem ser causadas por fatores econômicos, culturais e sociais relacionados à exposição. Muitas vezes os homens ainda são os únicos provedores na família, o que poderia resultar em uma maior exposição ao *M. tuberculosis* fora de casa. Outro fator que tem sido relatado como uma das causas ao maior adoecimento dos homens é a maior exposição ao álcool e às drogas

ilícitas (OELTMANN *et al.*, 2009; NEYROLLES; QUINTANA-MURCI, 2009; REHM *et al.*, 2009). Isso pode ser um fato que contribui para o maior acometimento do sexo masculino na população estudada, uma vez que mais de 90% dos pacientes que relataram etilismo e mais de 70% dos que relataram dependência química eram do sexo masculino.

Em relação à faixa etária os casos de TB ocorreram principalmente nos indivíduos entre 21 a 49 anos, concordando com a literatura nacional, que mostra que a doença acomete principalmente os adultos jovens. Essa situação gera complicações sociais importantes, já que essa faixa etária representa o setor mais produtivo da população e, muitas vezes, devido à debilidade física gerada pela doença, ficam impossibilitados de trabalhar (SANTO *et al.*, 2009; BELO *et al.*, 2010; HINO *et al.*, 2011, MIRANDA *et al.*, 2011; HECK *et al.*, 2011; LAFAIETE *et al.*, 2011).

Segundo dados do SINAN, no ano de 2010, a raça amarela/indígena apresentou maior incidência (93,8 casos/100.000 hab) de casos de TB, seguida da raça negra/parda (49,9 casos/100.000 hab) (BRASIL, 2011c). Contudo, cerca de 80% dos indivíduos incluídos no estudo declararam-se brancos, discordando com a realidade do Brasil. Esta discrepância pode ser explicada pela colonização do Estado, predominantemente composta por italianos, alemães e portugueses (BRASIL, 2012a). Estudos realizados no Rio Grande do Sul, que têm a população formada por etnia semelhante à de Santa Catarina, também mostram uma predominância da doença entre brancos, corroborando

com os dados encontrados nesse estudo (COSTA *et al.*, 2011; HECK *et al.*, 2011).

Quanto ao grau de escolaridade, praticamente 70% da população analisada estudaram até o ensino fundamental e somente 5,3% iniciaram a educação superior. Estes dados são concordantes com a literatura, que relata baixa escolaridade na maioria dos casos (SANTO *et al.*, 2009; BENATAR; UPSHUR, 2010; BOWKALOWSKI; BERTOLOZZI, 2010; FREITAS *et al.*, 2011; LAFAIETE *et al.*, 2011).

Quando analisada a ocupação dos indivíduos, observou-se 21,6% de desempregados e o restante, em sua grande maioria, realizavam atividades com baixa qualificação profissional. Entre os homens destacaram-se profissões relacionadas com a construção civil, e entre as mulheres, a ocupação com atividades do lar, dados semelhantes aos relatos da literatura (GAZETTA *et al.*, 2003; SEVERO *et al.*, 2007; BOWKALOWSKI; BERTOLOZZI, 2010).

O grau de escolaridade e a situação profissional caracterizam as baixas condições socioeconômicas da população com TB em Santa Catarina, o que corrobora com a tendência secular da doença em atingir preferencialmente as classes mais desfavorecidas. Situações habitacionais superlotadas, a desnutrição e o acesso reduzido aos serviços de saúde aumentam a transmissão do bacilo, resultando no aumento da prevalência e incidência da doença. Situações que deixam claro a vulnerabilidade da saúde em populações de nível socioeconômico mais baixo, caracteriza a TB não somente como uma

doença crônica importante, mas também como um grave problema de saúde pública (BENATAR; UPSHUR, 2010; PARSONS *et al.*, 2011).

A infecção pelo HIV modificou a epidemiologia da TB no mundo e dificultou ainda mais o seu controle, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença, senão o mais grave em termos de morbidade (KWAN; ERNST, 2011). Afinal, a TB é a primeira causa de morte nos pacientes HIV soropositivos (WHO, 2011a). A coinfeção TB/HIV é bidirecional, pois uma agrava a outra, acelerando a dupla epidemia. Por isso, o PNCT propõe que todos os pacientes com TB ativa sejam submetidos ao teste anti-HIV, possibilitando o início precoce da terapia anti-retroviral e profilaxia das infecções oportunistas, já que a TB pode acelerar o curso da doença (BRASIL, 2011 a).

Desde o início do ano de 1998, até dezembro de 2011, o MS notificou 66.698 casos de Aids no Brasil, dos quais 21,3% ocorreram na região Sul do país. No ano de 2010, foi registrada nesta região uma incidência de 28,8 casos/100.000 habitantes, a maior do Brasil, sendo que Santa Catarina ocupou a quarta posição, com 30,2 casos/100.000 habitantes. No mesmo ano, Florianópolis foi a segunda capital do país que apresentou a maior taxa de incidência, com 57,9 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2011d).

No presente estudo, cerca de 90% dos casos notificados no SINAN realizaram a testagem para o HIV, média acima da nacional, na qual a oferta de testes é de 70%. Além disso, a positividade encontrada (42,3%) também está acima da média nacional (15%), o que pode ser explicado pelo fato do Estado apresentar a quarta maior taxa de

incidência no país (BRASIL, 2011a). Mais de 70% dos casos TB/HIV encontrados ocorreram na região da Grande Florianópolis (41,1%) e no Vale do Itajaí (32,2%). Isso já era esperado, uma vez que municípios dessas regiões apresentam elevadas taxas de incidência de Aids. Os municípios de Biguaçu Florianópolis, São José e Palhoça, pertencentes à região da Grande Florianópolis, e os municípios de Balneário Camboriú, Itajaí, Camboriú, Navegantes e Brusque, pertencentes à região do Vale do Itajaí, fazem parte dos 100 municípios brasileiros com as maiores taxas de incidência da doença.

Outro problema social frequente na população com TB estudada em Santa Catarina foi o alcoolismo (37,6%) e a dependência química de drogas ilícitas (35,2%), com destaque para o *crack*. As taxas de TB são mais altas entre usuários de drogas e/ou entre os que utilizam álcool de forma excessiva (DEISS; RODWELL; GARFEI, 2011). Estudos realizados pela Confederação Nacional dos Municípios do Brasil revelou que 79,8% dos municípios brasileiros enfrentam sérios problemas com a circulação de drogas e 86,9% dos municípios catarinenses apresentam problemas relacionados com o uso de entorpecentes (BITTELBRUN, 2011). Oeltmann e cols. (2009) apontam que o abuso dessas substâncias é um fator que prejudica o controle da TB nos Estados Unidos, assim como no Brasil que além da dependência química, o etilismo também está associado à TB (SANTO *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2010; HECK *et al.*, 2011; HINO *et al.*, 2011; LAFAIETE *et al.*, 2011). A caquexia decorrente do etilismo e/ou do uso de drogas ilícitas leva o indivíduo a um quadro de baixa imunidade, o

que contribui para alta prevalência da TB (FRIEDMAN *et al.*, 2003; DEISS; RODWELL; GARFEI, 2011).

Além desses fatores biológicos, outros fatores geralmente estão associados com a dependência química e com o etilismo, como a infecção pelo vírus HIV, a institucionalização em presídios e a falta de moradia fixa; o que também contribui para a alta prevalência de TB nesse grupo (DEISS; RODWELL; GARFEI, 2011). Na população estudada, 25,0% dos casos que relataram alcoolismo e/ou dependência química eram coinfectados com o HIV. Entretanto, não houve associação estatisticamente significativa da presença de HIV/Aids com o alcoolismo e nem com a dependência química, assim como com a institucionalização em presídios e com a falta de moradia fixa. Deve ser considerado que o número de dependentes químicos e etilistas na população estudada pode estar subestimado, uma vez que, devido ao estigma social, alguns pacientes podem omitir essas informações durante o registro dos dados no SINAN.

Onze por cento dos indivíduos com TB incluídos no estudo encontravam-se institucionalizados em penitenciárias, o que ocasiona um importante problema de saúde pública, especialmente nos países de alta e média endemicidade (DIUANA *et al.*, 2008; LAROUZÉA *et al.*, 2008). Celas super populosas, mal ventiladas, com pouca iluminação solar, além do uso de drogas, da maior prevalência de HIV e da dificuldade de acesso ao sistema de saúde são fatores que favorecem a transmissão de *M. tuberculosis* entre os presidiários. No Brasil, a magnitude do problema é pouco conhecida pela ausência de programas específicos de vigilância epidemiológica na população carcerária.

Estados como Rio de Janeiro e São Paulo realizaram estudos em populações privadas de liberdade demonstrando dados alarmantes em relação à TB. Em São Paulo, a taxa de infecção entre os carcerários se encontra acima de 60% e, no Rio de Janeiro, 4,6 a 8,6% da população carcerária foi diagnosticada com TB ativa (SÁNCHEZ *et al.*, 2007; NOGUEIRA; ABRAHÃO, 2009). O Estado de Santa Catarina não apresenta, ainda, nenhum estudo publicado com dados sobre a incidência da TB em penitenciárias.

A TB que acomete os moradores de rua também é um importante problema social. Na população estudada, 11 indivíduos declaram não possuir moradia fixa, sendo que desses 10 eram dependentes químicos e/ou etilistas. Os estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre apresentam incidências de TB entre 1.576 e 2.750/100.000 habitantes na população de moradores de rua, dados que representam uma incidência 70 vezes maior em relação à média nacional (BRASIL, 2011a). No estudo, poucos casos foram notificados como moradores de ruas, provavelmente devido ao acesso limitado destes indivíduos ao serviço de saúde ou à omissão dessa informação durante o registro dos dados no SINAN. A dependência química (em especial o *crack*), o alcoolismo e a desnutrição são os principais fatores relacionados com a infecção por *M. tuberculosis* em pessoas vivendo na rua (BRASIL, 2011a).

O tabagismo foi identificado como um fator de risco para TB desde o início do século XX; contudo, apenas 11,7% dos indivíduos incluídos no estudo relataram ser fumantes. Revisões sistemáticas

confirmaram a associação entre o uso do tabaco e a TB infecção, a TB doença, a recidiva da TB e a mortalidade pela doença (BATES *et al.*, 2007; CHIANG *et al.*, 2007). No Brasil, estudos observam alta frequência de fumantes entre os indivíduos com TB, variando entre 45,8% e 38,5% dos casos (SILVEIRA *et al.*, 2007; CRUZ *et al.*, 2008). Dados que diferem do presente estudo e do estudo realizado no município catarinense de Tubarão, no qual o percentual de fumantes com TB foi de 15,8% (ZOCHE; SILVA, 2009).

A TB pulmonar foi a forma mais comum na população estudada, ocorrendo em 89,0% dos casos, dado concordante com a literatura, na qual a ocorrência de TB pulmonar varia entre 78,0% e 90,0% (DOMINGOS *et al.*, 2008; SANTO *et al.*, 2009; BELO *et al.*, 2010; BOWKALOWSKI; BERTOLOZZI, 2010; HINO *et al.*, 2011). Como o pulmão é o primeiro órgão a ser atingido e possui condições ideais para o crescimento bacteriano, a grande maioria dos casos de TB ocorre na forma pulmonar (GUTIERREZ *et al.*, 2001, ROSEMBERG; TARANTINO, 2002, CAMPOS, 2006).

A forma extrapulmonar foi identificada em 7,4% da população estudada e em 3,6% dos casos havia simultaneamente TB pulmonar e extrapulmonar. Estes achados são semelhantes aos encontrados em estudos nacionais (DOMINGOS *et al.*, 2008; SANTO *et al.*, 2009; BELO *et al.*, 2010; BOWKALOWSKI; BERTOLOZZI, 2010; HINO *et al.*, 2011). Nos indivíduos com HIV/Aids, a forma extrapulmonar mais frequente foi a TB ganglionar periférica; e entre os soronegativos foi a TB pleural associada à pulmonar. Estes dados concordam com o encontrado na população brasileira, pois segundo dados do SINAN, a

forma extrapulmonar mais frequente entre os pacientes soropositivos é a TB ganglionar periférica (27%) e entre os soronegativos é a pleural (52%) (BRASIL, 2011a).

Ainda quanto a forma da doença, verificou-se que existe associação entre a presença de TB pulmonar/extrapulmonar ou TB extrapulmonar e a coinfeção HIV/Aids ($p<0,001$). Embora a doença pulmonar seja a forma mais frequente de apresentação da TB em todos os estágios da infecção pelo HIV, pacientes com alto grau de imunossupressão apresentam maior chance de desenvolver TB extrapulmonar – de forma isolada ou associada à doença pulmonar (JONES *et al.*, 1993; BURMAN; JONES, 2003; EL-SADR; TSIOURI, 2008; KWAN; ERNST, 2011).

Na população estudada, o abandono do tratamento estava presente nas notificações do SINAN, tanto no tipo de notificação quanto no encerramento dos casos, sendo que 9,2% foram notificados como reingresso após abandono e 17,1% foram encerrados como abandono do tratamento. Estudos mostram que nas diversas regiões do Brasil a taxa de abandono varia de 10 a 27% (PAIXÃO; GONTIJO, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2007; BOWKALOWSKI; BERTOLOZZI, 2010; BELO *et al.*, 2010; HECK *et al.*, 2011). O alcoolismo ($p=0,022$) e a dependência química ($p<0,001$) apresentaram associação com o reingresso após o abandono do paciente. Também foi verificada associação do abandono do tratamento considerado encerramento de caso com o alcoolismo ($p=0,004$) e a dependência química ($p<0,001$).

Sabe-se que o consumo de álcool e outras drogas colaboram e até mesmo induzem ao abandono do tratamento, pois o uso destas substâncias pode propiciar déficits cognitivos que dificultam a compreensão das prescrições e favorecem o esquecimento da tomada dos medicamentos. Além disso, os indivíduos têm dificuldade de deixar a condição de drogaditos e nem sempre têm acesso, apoio ou condições de se submeterem a um tratamento (RAMOS *et al.*, 2010). Belo e cols (2010) relataram que no Estado do Rio de Janeiro, o sexo masculino apresenta o dobro de histórias de abandono ao tratamento da TB em relação ao sexo feminino. Nesse estudo, encontrou-se que a cada mulher, 3,5 homens apresentaram histórico de abandono ao tratamento, situação atribuída principalmente à relação do abuso de substâncias líticas e álcool com o sexo masculino (OELTMANN *et al.*, 2009; NEYROLLES; QUINTANA-MURCI, 2009; REHM *et al.*, 2009).

Observou-se também associação entre o encerramento do caso de TB como abandono do tratamento e a coinfeção TB/HIV ($p < 0,001$). Apesar da causa do abandono entre pacientes HIV soropositivos ainda ser bastante controversa, alguns estudos demonstram que a ocorrência de efeitos adversos nos coinfectados TB/HIV é maior, o que leva a maiores taxas de interrupções do tratamento da TB (YEE *et al.*, 2003); outros estudos, entretanto, mostram que apesar de haver maiores efeitos adversos nos pacientes coinfectados, isso não está relacionado com a interrupção do tratamento da TB (BREEN *et al.*, 2006; MARKS *et al.*, 2009). Mendes e Fensterseifer (2004) discutem o efeito que uma doença incurável exerce no comportamento das pessoas, já que indivíduos

infectados pelo vírus HIV tendem ao isolamento físico e emocional, situação que pode estar relacionada ao abandono do tratamento da TB.

Na população estudada, 6,0% apresentaram resistência a pelo menos dois fármacos utilizados no tratamento (isoniazida e rifampicina). O abandono do tratamento e a terapia incompleta favorecem a resistência micobacteriana e constituem fatores que causam impacto negativo no controle da doença. A magnitude da TB-MDR no mundo ainda não é completamente conhecida, pois o TSA é realizado em menos de 2% dos casos novos e em 6% dos casos de retratamento. Segundo a OMS, 50.000 casos de TB-MDR foram notificados em 2010, representando 18% do total de casos estimados de TB-MDR entre os pacientes com TB pulmonar (WHO, 2011a). No Brasil, a situação é muito semelhante e no ano de 2010 foram notificados 607 casos de TB-MDR representando 33% do total de casos estimados (BRASIL, 2011c). Em Santa Catarina, ainda não há nenhum estudo publicado em relação à prevalência de TB-MDR no Estado. Observou-se, no presente estudo, associação entre TB-MDR e dependência química ($p=0,005$), porém não houve associação com a coinfeção TB/HIV ($p=0,303$), diferindo de algumas regiões do mundo, em que essa associação possui importante significado (SAFWAT *et al.*, 2011; CONNOR, 2011). Entretanto, esses dados concordam com o encontrado no Brasil, pois segundo dados do SINAN referentes ao período de agosto/2000 a agosto/2010, somente 8,3% dos casos de TB-MDR ocorreram em indivíduos HIV soropositivos (2,9% dos casos TB-MDR não possuíam resultados de sorologia para o HIV) e o que parece ter associação com TB-MDR é a

dependência química. No mesmo período, cerca de 40% dos casos de TB-MDR estavam associados ao uso de drogas ilícitas e/ou alcoolismo (BRASIL, 2011c).

De todos os casos encerrados até a finalização do estudo, cerca de 70% evoluíram para cura. Uma vez diagnosticada, a TB é uma doença curável na grande maioria dos casos, desde que seja adotado o tratamento adequado, de modo regular e no período mínimo de seis meses (BRASIL, 2011a). O óbito por TB foi outro tipo de encerramento de caso, o qual mostrou relação com TB-MDR ($p < 0,001$), com TB extrapulmonar ou TB pulmonar/extrapulmonar ($p < 0,001$), com HIV/Aids ($p = 0,002$) e com a dependência química ($p = 0,019$), confirmando que fatores biológicos e comportamentais influenciam as condições de vulnerabilidade e contribuem para a evolução da TB para formas graves e óbito (WAITT; SQUIRE, 2011).

Apesar da maioria dos casos de TB na população estudada concentrarem-se em cidades populosas; cidades como Capivari de Baixo (396,6 hab/km²), no Sul Catarinense, e Chapecó (278,7 hab/km²) no Oeste Catarinense, que também apresentam alta densidade demográfica, apresentaram poucos casos no estudo (BRASIL, 2012a). Isso pode ser explicado pela dificuldade de acesso ao sistema de saúde dessas cidades, tanto na detecção quanto na notificação dos casos. Entretanto, pelas características clinico-epidemiológicas dos pacientes acredita-se que a maior concentração dos casos em determinadas cidades e regiões do Estado sejam justificadas pelos comportamentos sociais (drogadição, alcoolismo e infecção pelo HIV), associados aos bolsões de pobreza, que propiciam a transmissão de *M. tuberculosis*. Portanto, o curso da TB

em Santa Catarina parece seguir o mesmo padrão de outros Estados brasileiros: uma doença multifatorial associada principalmente à pobreza e aos problemas sociais gerando deficiências fisiológicas importantes no organismo.

6.3 Spoligotyping

O estudo da epidemiologia molecular da TB é uma importante ferramenta para o melhor entendimento da doença e sua propagação. Gagnoux e cols. (2006) demonstraram que diferentes grupos étnicos apresentam diferentes susceptibilidades a determinadas cepas de *M. tuberculosis*. Além da genética inerente a cada hospedeiro, a migração de pessoas também é responsável pela variabilidade populacional de *M. tuberculosis* em diferentes regiões do mundo (MOKROUSOV, 2007).

Encontram-se disponíveis diversos estudos que analisam a epidemiologia molecular da TB em diferentes países (ABADÍA *et al.*, 2009; RAMAZANZADEH; FARNIA; AMIRMOZAFARI, 2009; LASUNSKAIA *et al.*, 2010; CEREZO *et al.*, 2011; VARMA-BASIL *et al.*, 2011). No Brasil, Estados como Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul apresentam estudos que mostram o perfil e a distribuição das cepas de *M. tuberculosis* (BORGES *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; BORSUK *et al.*, 2005; TELLES *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2008; CAFRUNE *et al.*, 2009; NOGUTI *et al.*, 2010; MIRANDA *et al.*, 2011; OELEMAN *et al.*, 2011). Gomes e cols (2011) realizaram recentemente a caracterização de

isolados provenientes de 11 Estados brasileiros, dentre eles o Amazonas, Pará, Ceará, Pernambuco, Sergipe, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. Contudo, em Santa Catarina, não há nenhum estudo publicado a respeito das cepas circulantes de *M. tuberculosis* na população. Desta forma, o presente estudo é pioneiro no relato de dados sobre a estrutura populacional destas cepas no Estado.

A técnica de genotipagem escolhida para a caracterização das cepas foi o *Spoligotyping*, que é uma metodologia de simples execução e possibilita a comparação dos perfis encontrados com os depositados no banco mundial de *spoligotypes*, o SpolDB4, facilitando a comparação regional e internacional de genótipos e o monitoramento da circulação de estirpes (DAVID, 2008). Ademais, o seu uso é indicado em situações em que não se conhece a epidemiologia local, pois fornece uma visão global das cepas de *M. tuberculosis* circulantes, permitindo a triagem para posterior execução de uma ferramenta molecular com maior poder discriminatório (de la SALMONIÈRE *et al.*, 1997; DAVID, 2008).

A análise dos 406 isolados permitiu a identificação de 111 *spoligotypes*, sendo 84,7% pertencentes a 74 SITs, incluindo 7 famílias e 32 subfamílias. Práticas econômicas, políticas e sociais seculares da humanidade, desde a colonização do Brasil, resultaram em interações étnicas, as quais provavelmente são responsáveis pela diversidade genética das cepas de *M. tuberculosis* isoladas em Santa Catarina.

As três regiões do Estado com maior número de casos de TB (Grande Florianópolis, Vale do Itajaí e Nordeste Catarinense), destacam-se pela grande movimentação populacional, impulsionada principalmente pelo turismo e pelas indústrias. O turismo no Estado de

Santa Catarina mobiliza 8 milhões de pessoas/ano; no verão de 2008, por exemplo, o Estado recebeu cerca de 4 milhões de visitantes, dos quais 58% eram brasileiros de outros Estados e 12% estrangeiros. Florianópolis (região da Grande Florianópolis) ocupa a quarta posição e Balneário Camboriú (região do Vale do Itajaí) a sexta posição dos destinos mais visitados do Brasil (SC, 2012). No Vale do Itajaí destaca-se, também, a existência de uma cidade portuária, Itajaí. Há relatos desde o século XIX não somente do forte comércio fluvial, mas também do ingresso de colonizadores estrangeiros pelo porto. Hoje, o porto de Itajaí é considerado o segundo porto do planeta em crescimento na movimentação de cargas (SC, 2012). O pólo industrial de Santa Catarina também é responsável pela grande movimentação populacional, já que no Nordeste Catarinense há um complexo eletrometalmecânico com 5312 empresas (localizadas principalmente em Joinville e Jaraguá do Sul) que impulsiona o fluxo migratório para a região (SC, 2012).

Quando analisadas as famílias identificadas no *Spoligotyping*, a linhagem *Latin-American-Mediterranean* (LAM) foi a mais frequente (40,1%), seguida da T (23,4%), da *Harleem* (12,8%), da U (3,7%), da X (2,7%) e da S (1,7%). As famílias LAM, T e Haarlem são as mais frequentemente encontradas na África, na América do Sul e Central e na Europa (BRUDEY *et al.*, 2006).

A família LAM é predominante na América do Sul e representa aproximadamente 45% dos isolados do SpolDB4 dessa região, frequência muito semelhante a encontrada no estudo (40,1%); contudo, diferenças regionais são observadas, variando de 65% na Venezuela a

17,4% na Guiana Francesa (GOMES *et al.*, 2011; BRUDEY *et al.*, 2006). No Brasil, a família LAM também se mostra predominante, apresentando variações entre os Estados, sendo que Sergipe e Ceará apresentam as mais elevadas porcentagens desta família, com 81,6% e 70,0%, respectivamente (GOMES *et al.*, 2011). A predominância da família LAM também é relatada em Portugal, ocorrendo em 51% dos casos de TB, sendo que a estrutura populacional das cepas de *M. tuberculosis* circulantes apresenta maior semelhança com a encontrada na África (Angola, Moçambique, Cabo Verde, Guiné-Bissau, São Tomé) e no Brasil, do que com o restante da Europa (DAVID *et al.*, 2007). Provavelmente essa semelhança entre Brasil, Portugal e África deve-se às estreitas relações que essas nações mantiveram durante séculos, envolvendo descobrimentos, colonização de terras e escravidão (GOMES *et al.*, 2011).

O povoamento do território catarinense está intimamente ligado, nos seus primórdios, aos interesses de navegações portuguesas e espanholas, que tiveram o litoral do Estado como ponto de apoio para atingir, principalmente, a região do Rio da Prata. Com a expansão das expedições bandeirantes, a região passou a ser intensamente percorrida a partir do século XVII e, em 1637, Francisco Dias Velho estabeleceu-se na ilha de Santa Catarina com sua família e seus escravos, dando início a sua povoação. No ano de 1739, Santa Catarina passou a ser, oficialmente, o posto português mais avançado na América do Sul (SC, 2012).

As subfamílias mais frequentes da LAM foram LAM9, LAM6, LAM2 e LAM5, representando aproximadamente 35% dos isolados

incluídos no estudo. A LAM9 (20,0%) foi a subfamília mais frequente entre as sublinhagens encontradas e o SIT42/LAM9 (9,6%) foi o *spoligotype* mais identificado entre os SITs encontrados no estudo. A LAM9 é, provavelmente, a origem da linhagem LAM e aparece como a subfamília mais frequentemente isolada em vários estudos realizados no Brasil; sendo que em alguns desses é o SIT42/LAM9 que também aparece como o *spoligotype* mais frequente (BRUDEY *et al.*, 2006; BORSUK *et al.*, 2005; LAZZARINI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2011). Esta sublinhagem também é uma das mais isoladas em Portugal (19%), com frequências muito semelhantes às encontradas no Brasil e em Santa Catarina. As outras sublinhagens da família LAM são encontradas em diferentes frequências em Portugal e em países europeus que apresentaram, em algum momento da sua história, uma intensa imigração portuguesa, como Bélgica, França, Alemanha, Irlanda, Holanda, Espanha e Suíça, além de regiões e países Africanos (DAVID *et al.*, 2007).

A família LAM possui um aspecto particular que é a significativa proporção de cepas que apresentam uma deleção genética específica chamada RD^{RIO}. Lazzarini e cols. (2007) relataram que no Rio de Janeiro as cepas pertencentes às sublinhagens LAM1 e LAM2 apresentaram exclusivamente o genótipo RD^{RIO}, enquanto as LAM4, LAM5, LAM6 e LAM9 apresentam tanto os genótipos RD^{RIO}, quanto o tipo selvagem. Suspeita-se que as cepas RD^{RIO}, apresentam maior virulência e causam a TB doença na maioria dos casos. Por esse motivo, seria interessante a pesquisa de cepas RD^{RIO} nos isolados catarinenses,

principalmente devido à alta frequência desta família na população estudada (LAZZARINI *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2011).

A família T (23,4%) foi a segunda mais frequente na população estudada, seguida da família H (12,8%). A família T é constituída por mais de 600 SITs pouco classificados e é subdividida em basicamente 5 classes (T1-T5) baseadas nas diferenças de apenas um espaçador específico. Já a família H, subdividida em H1, H2 e H3, foi identificada pela primeira vez em *Harleem*, na Holanda e é caracterizada pela ausência do espaçador 31. Ambas as famílias são amplamente distribuídas pelo mundo, e já foram identificadas nas Américas, na África, na Europa e na Ásia. No Brasil, estudos relatam a identificação de ambas as famílias, porém em frequências diferentes (BRUDEY *et al.*, 2006; NOGUTI *et al.*, 2010). Estudos realizados nas cidades de Londrina (Paraná) e Rio Grande (Rio Grande do Sul) observaram maior prevalência da família H (17 e 31%, respectivamente) em relação à T (11,8 e 20,0%, respectivamente) (SILVA *et al.*, 2009). Entretanto, estudos realizados na cidade de Porto Alegre (Rio Grande do Sul) e nas unidades de saúde do Estado de Minas Gerais, mostraram maior prevalência da família T (10,5 e 27,5%, respectivamente) em relação à H (7,0 e 11,1% respectivamente) (CAFRUNE *et al.*, 2009; MIRANDA *et al.*, 2011). Frequências semelhantes às encontradas em Santa Catarina foram relatadas por Gomes e cols (2011), em um estudo que abrangeu vários Estados brasileiros, mostrando que a família T (18,6%) foi mais frequente que a família H (12,1%). Provavelmente essas diferenças encontradas no Brasil, estão relacionadas às diferentes amostragens utilizadas nos estudos e também às diferenças na colonização e,

principalmente, nos fluxos migratórios de cada região. Apesar da família T ter sido a segunda linhagem mais frequente, a subfamília H3 (9,6%) foi a segunda mais isolada em Santa Catarina, seguida das subfamílias T2/T3 (8,4%) e T1 (8,1%), que também são encontradas em Portugal, o que novamente remete a influência da colonização na população de cepas circulantes no Estado (DAVID *et al.*, 2007).

O SIT73/T2-T3 (8,4%) foi o segundo mais frequente na população estudada seguido pelo SIT50/H3 (7,6%). O SIT50/H3 é relatado como um dos *spoligotypes* mais frequentes em diversos estudos brasileiros, sendo que em alguns é até mais frequente que o SIT42/LAM9 (BORSUK *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009; CAFRUNE *et al.*, 2009; NOGUTI *et al.*, 2010; MIRANDA *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2011). No programa SpolDB4 estão registrados mais de 100 isolados com este perfil no Brasil, distribuídos em praticamente todas as regiões. Entretanto, o SIT73/T2-T3, que também se apresentou muito frequente em Santa Catarina (identificado em 34 isolados) é pouco citado nos estudos brasileiros. No SpolDB4 estão registrados apenas 9 isolados brasileiros com este perfil, identificados em Santos, Brasília e Rio de Janeiro. Mundialmente, a maioria dos isolados deste perfil foi identificado na Itália. Estima-se que, entre 1870 e 1970, 28 milhões de italianos emigraram e entre os destinos principais estavam diversos países da América do Sul, incluindo o Brasil. No ano de 1836, os italianos formaram sua primeira colônia em Santa Catarina e nos anos seguintes ocuparam diversas cidades do Estado, o que pode justificar a alta frequência deste genótipo no estudo (SC, 2012).

As famílias U, X e S apareceram com menos frequência na população estudada, representando 8,1% dos isolados. A família X, subdividida em 3 sublinhagens (X1, X2 e X3), é prevalente nos Estados Unidos, Inglaterra e colônias britânicas e a família S é altamente prevalente na região da Sicília e Sardenha, na Itália. Essas famílias são relatadas em poucos estudos brasileiros e representam, de modo geral, sempre uma pequena parcela dos isolados analisados, assim como foi observado neste estudo (SILVA *et al.*, 2009; CAFRUNE *et al.*, 2009; NOGUTI *et al.*, 2010).

Ainda entre os isolados classificados em família/subfamília, foi identificado na região do Nordeste Catarinense o SIT482/BOVIS1_BCG, pertencente à espécie *M. bovis*. Tratava-se de um caso de linfadenite regional pós-vacinal em uma criança de 4 meses de idade. Este caso não foi registrado no SINAN, logo não foi possível nenhuma informação adicional sobre a situação clínica da criança. São raros os relatos de linfadenite regional com ou sem supuração e disseminação hematogênica de *M. bovis*, geralmente comuns em crianças submetidas à terapia antiretroviral (BRASIL, 2011a; NUTTAL *et al.*, 2008).

Cinquenta e quatro isolados (13,3%) não foram classificados em famílias, pois os perfis encontrados não estão descritos no SpolDB4, dado este semelhante ao relatado na literatura nacional, na qual geralmente 10 a 20% dos isolados apresentam perfil desconhecido (BORSUK *et al.*, 2005, SILVA *et al.*, 2009; CAFRUNE *et al.*, 2009; NOGUTI *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2011). Contudo, muitos isolados com perfis desconhecidos (50%) apresentaram

similaridade com a sublinhagem LAM9, o que já era esperado, uma vez esta subfamília foi a mais frequente no estudo. Os outros isolados apresentaram similaridade com as subfamílias LAM7, LAM8, LAM10, EAI1 e EAI3, as quais não foram identificadas entre os isolados com perfil registrado no SpolDB4, fazendo-se necessário, então, o estudo desses isolados com outra metodologia de genotipagem para melhor caracterização dos mesmos.

De modo geral todas as regiões do Estado de Santa Catarina apresentaram maior frequência dos *spoligotypes* pertencentes à família LAM, seguido dos perfis da família T e H, sendo que algumas subfamílias e SITs ocorreram exclusivamente em certas regiões do Estado. Considerando a estável associação entre *M. tuberculosis* e o homem, grupos de subfamílias ou SITs encontrados em Santa Catarina com baixa frequência e ainda não identificados ou raramente identificados no Brasil e na América do Sul podem representar importantes genótipos decorrentes do fluxo migratório internacional (GAGNEUX *et al.*, 2006). Portanto, a análise das famílias/subfamílias quando comparadas entre as regiões do Estado baseou-se na relação dos casos menos frequentes no Brasil e na América do Sul e que ocorram especificamente em uma região.

As subfamílias LAM11_ZWE (SIT59), T5 (SIT44), X3 (SIT92), T4_CEU1 (SIT39) e H3-LAM9 (SIT335), assim como alguns *spoligotypes*, por exemplo SIT1691/LAM2, SIT162/LAM9, SIT1223/T1 e SIT886/X2, foram encontrados somente na região da Grande Florianópolis. O SIT59/LAM11_ZWE apresenta 356 isolados

registrados no SpolDB4, sendo a grande maioria da África (principalmente da África do Sul e Zimbábue); nas Américas, 15 isolados foram identificados nos Estados Unidos e 4 no Brasil (1 em Belo Horizonte, 1 em Brasília, 1 em Fortaleza e 1 no Rio de Janeiro). O SIT44/T5 apresenta 159 registros no SpolDB4, sendo a grande maioria da África do Sul e de países europeus; nas Américas, já foi identificado em países como Venezuela (4 isolados), Argentina, (3 isolados) e Brasil (1 isolado no Rio de Janeiro). O SIT92/X3, com 325 isolados registrados no SpolDB4, apresenta ampla distribuição geográfica e já foi encontrado em países de praticamente todos os continentes; no Brasil já foi identificado em Fortaleza (1), Porto Alegre (2), Brasília (3), Belém (5) e Rio de Janeiro (8). Alguns SITs ainda não haviam sido descritos no Brasil: o SIT39/T4_CEU1 com 112 registros no SpolDB4, encontrado principalmente na África do Sul e, embora menos frequente, já foi identificado em países europeus e nos Estados Unidos; o SIT335/H3-LAM9 (3 isolados), com 33 registros no banco mundial, já foi identificado em países europeus e asiáticos e nos Estados Unidos; o SIT1691/LAM2 com 18 registros, é encontrado principalmente na Venezuela; o SIT162/LAM9 com 16 isolados registrados, foi identificado somente na Venezuela; o SIT1223/T1, que possui apenas 4 registros de identificação, distribuídos em diferentes continentes (1 da África, 2 da Espanha e 1 dos Estados Unidos); e o SIT886/X2 com registro de identificação somente nos Estados Unidos.

As subfamílias H4 (SIT777) e U (likely H3) (SIT237), assim como alguns perfis, por exemplo, SIT52/T2, e SIT1933/LAM9, foram identificados somente na região do Vale do Itajaí. Vinte e dois isolados

estão registrados no SpolDB4 como SIT777/H4, encontrados principalmente na Europa e Ásia, sendo que nas Américas foi identificado somente nos Estados Unidos e no Brasil (1 em Brasília e 1 em Porto Alegre). O SIT237/U (likely H3) com 85 isolados registrados no SpolDB4, já foi relatado em praticamente todos os continentes e nas Américas foi identificado nos Estados Unidos e no Brasil (1 no Rio de Janeiro e 1 em Porto Alegre). O SIT52/T2 que possui 496 registros no banco mundial, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo que nas Américas foi encontrado na Venezuela e no Brasil (3 no Rio de Janeiro, 2 em Brasília e 1 em Goiânia). Somente o SIT1933/LAM9, que apresenta 2 registros no SpolDB4 (1 dos Estados Unidos e 1 da Itália) ainda não havido sido identificado no Brasil.

As subfamílias LAM1-LAM4 (SIT1321) e T5_RUS1 (SIT254) e alguns *spoligotypes*, por exemplo SIT1661/LAM2, SIT1844/LAM9 e SIT780/U, foram identificados somente no Nordeste Catarinense. O SIT1321/ LAM1-LAM4 apresenta 11 isolados registrados no SpolDB4, identificados na Ásia, Europa e nas Américas (Estados Unidos, Argentina, Guiana Francesa e Brasil – Rio de Janeiro e Belém). O SIT254/T5_RUS1 com 116 registros no SpolDB4, foi encontrado principalmente na Ásia e Europa; nas Américas, há 7 registros de identificação nos Estados Unidos e 2 no Brasil (ambos em Brasília). O SIT1661/LAM2 possui 4 registros no SpolDB4, identificados somente na América do Sul (Venezuela e Brasil – Brasília). Dois perfis ainda não tinham sido identificados no Brasil: o SIT1844/LAM9, que possui 5 registros no SpolDB4, sendo 3 identificados na Argentina e 2 na África

do Sul; e o SIT780/U, que apresenta 6 registros, dos quais 5 foram identificados na França e 1 no Zimbábue.

A subfamília U (likely LAM) (SIT29) e os perfis SIT392/T2 e SIT34/S foram identificados somente na região do Sul Catarinense. Desses, somente o SIT 29/U (likely LAM) ainda não havia sido descrito no Brasil; porém já foi identificado em países europeus e nos Estados Unidos. O SIT392/T2, que apresenta 5 registros no SpolDB4, já foi identificado Argentina (1 isolado) e no Brasil (1 do Rio de Janeiro, 1 de Porto Alegre e 2 de Brasília). E o SIT34/S, que possui 584 registros no SpolDB4, apresenta ampla distribuição geográfica mundial e já foi identificado em diversos países, incluindo Estados Unidos, Argentina, Venezuela e Brasil (20 isolados do Rio de Janeiro, 8 de Brasília, 2 de Santos 1 de Porto Alegre).

O Oeste Catarinense, mesmo com baixa frequência dos casos incluídos no estudo, apresentou 2 perfis identificados somente nessa região: o SIT157/T3, que apresenta 21 registros no SpolDB4, dos quais 12 isolados foram identificados no Brasil (Santos, Manaus, Rio de Janeiro e Brasília) e o restante em países europeus e asiáticos; e o SIT71/S, até então não descrito no Brasil, que apresenta 62 registros no SpolDB4, a maioria identificada na África do Sul, além de alguns isolados no Estados Unidos, Argentina e Venezuela.

A Serra Catarinense, região que apresentou menor frequência de casos de TB incluídos no estudo, não apresentou nenhum perfil identificado exclusivamente nessa região.

Alguns perfis identificados no estudo, como por exemplo, SIT335/H3-LAM9, SIT777/H4 e SIT254/T5_RUS1, e que raramente

são encontrados no Brasil, mas são registrados em outros continentes, principalmente na África e Europa, podem ser explicados pela relação histórica que essas regiões mantiveram com o Brasil desde a colonização. Além disso, o fluxo migratório de indivíduos de países asiáticos e africanos para a América do Norte e para a Europa e a relação comercial, assim como, o forte turismo que o Brasil mantém com os países americanos e europeus pode explicar a ocorrência de alguns perfis mais frequentes na Europa e Ásia e encontrados com menor frequência nos Estados Unidos e no Brasil (GOMES *et al.*, 2011). As cepas identificadas nesse estudo, como os perfis SIT1691/LAM2, SIT162/LAM9 e SIT392/T2, e que são encontradas principalmente na América do Sul, podem ser justificadas pelas relações que o Estado mantém com os países vizinhos do Brasil, não só comerciais, como turísticas. Apesar da estável associação entre *M. tuberculosis* e o homem, também não se pode excluir a remota possibilidade de alguns isolados representarem cepas que estão se extinguindo do Brasil e que, num passado remoto, devido às relações históricas, eram mais frequentes (GAGNEUX *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2011).

Além de cepas classificadas em família/subfamília, na população estudada também foram identificados 6 perfis *Orphan* (*Orphan1* – *Orphan6*), que correspondem àqueles *spoligotypes* identificados e registrados no SpolDB4 em somente um isolado. A região do Vale do Itajaí foi a que apresentou a maior frequência destes perfis (5 isolados) e a Grande Florianópolis, o Nordeste Catarinense e o Sul Catarinense apresentaram, cada região, apenas 1 isolado com este

perfil; a Serra Catarinense não apresentou nenhum perfil *Orphan*. Os perfis *Orphan1*, *Orphan2*, *Orphan5* e *Orphan6* já haviam sido identificados no Brasil: O perfil *Orphan1*, identificado no Vale do Itajaí e no Sul Catarinense e os perfis *Orphan5* e *Orphan6*, identificados no Vale do Itajaí, já haviam sido descritos em Brasília; o *Orphan2*, identificado no Vale do Itajaí, já havido sido relatado em Santos. Os perfis *Orphan3* e *Orphan4* identificados na Grande Florianópolis e no Nordeste Catarinense, respectivamente, ainda não haviam sido descritos no Brasil, sendo que o *Orphan3* foi identificado na Itália e o *Orphan4* nos Estados Unidos.

Quanto aos perfis desconhecidos, a Grande Florianópolis foi a região do Estado que apresentou maior frequência dessas cepas, seguida do Vale do Itajaí, do Nordeste Catarinense e da Serra Catarinense. Grupos clonais foram encontrados nestas regiões, sendo a maioria identificada em mais de uma região simultaneamente (Unk4, Unk9, Unk18, Unk21 e Unk26). A análise mais detalhada destas cepas para melhor caracterização destes perfis, utilizando outra ferramenta de genotipagem se faz necessária, pois apesar destes grupos clonais terem sido encontrados em baixa frequência, estão distribuídos em várias regiões do Estado.

Entre os isolados de TB-MDR (23 amostras) incluídos no estudo, foram identificadas 6 subfamílias e 2 perfis desconhecidos, presentes nas regiões com maior número de casos de TB (Vale do Itajaí, Grande Florianópolis e Nordeste Catarinense). O SIT42/LAM9 e SIT106/U (LAM3?) foram encontrados nessas três regiões, assim como os perfis SIT50/H3, SIT93/LAM5, SIT73/T2-T3 e Unk21 foram

encontrados em duas regiões simultaneamente. O fato de cepas TB-MDR idênticas estarem presentes em diferentes regiões, representa um potencial risco para a saúde pública, pois essas cepas estão sendo transmitidas para várias regiões do Estado. Além disso, houve associação entre MDR e a subfamília H3 (LAM3?) ($p=0,002$) e o perfil desconhecido Unk21 ($p<0,001$), o que pode indicar que estas cepas são mais susceptíveis ao desenvolvimento da resistência em relação às demais. Portanto, estudos relacionados com cepas MDR do Estado de Santa Catarina devem ser realizados a fim de elucidar o perfil da resistência das cepas circulantes no Estado, afinal estas representam um potencial agravante no controle da TB.

Os casos que ocorreram em presidiários mostraram associação da institucionalização com a subfamília LAM5 ($p=0,042$) e com as cepas de perfil desconhecido Unk4 ($p=0,002$), Unk7 ($p=0,001$) e Unk21 ($p=0,005$). Foram identificados em indivíduos de diferentes penitenciárias casos de TB-MDR em cepas idênticas incluindo um perfil MDR (SIT150/LAM9) e 3 perfis sensíveis aos fármacos de primeira linha (Unk7, Unk16 e Unk29). Isso indica a grande vulnerabilidade da população carcerária e o risco a que estão expostos, principalmente por estarem circulando cepas MDR idênticas em diferentes presídios. Estudos delineados em população carcerária de Santa Catarina seriam interessantes para melhor análise da circulação das cepas específicas em penitenciárias, como as identificadas nesse estudo.

Quanto aos agravos associados, encontrou-se relação somente da coinfeção TB/HIV com a subfamília LAM9 ($p=0,034$) e com a T2-

T3 ($p=0,039$), o que pode indicar que essas famílias estão acometendo mais frequentemente indivíduos que apresentam um sistema imune debilitado.

7. Conclusão

A utilização do protocolo modificado (inclusão de pérolas de vidro) possibilitou um aumento na sensibilidade da PCR para detecção de *M. tuberculosis* diretamente do escarro, principalmente nos casos paucibacilares, contribuindo para o início precoce do tratamento da TB e o bloqueio da cadeia de transmissão da doença.

A população estudada apresentou altos índices de alcoolismo, drogadição, desemprego e coinfeção TB/HIV. Além disso, os casos concentraram-se principalmente no litoral das regiões da Grande Florianópolis, do Vale do Itajaí e do Nordeste Catarinense. Desta forma, o curso da TB em Santa Catarina é muito semelhante ao de outros Estados brasileiros, caracterizando-se como uma doença multifatorial associada principalmente à pobreza e aos problemas sociais.

A análise por *Spoligotyping* mostrou grande heterogeneidade no perfil das cepas de *M. tuberculosis* circulantes em Santa Catarina; entretanto, em todas as regiões a família LAM foi a mais frequente, seguida da família T e *Harleem*. O perfil de cepas, do Estado (principalmente LAM e T), apresentaram similaridade com as circulantes em Portugal, Itália e outros países europeus, o que provavelmente reflete a influência da colonização de Santa Catarina na população de cepas de *M. tuberculosis*. Diversos perfis, identificados em baixa frequência na população estudada e ainda não identificados ou raramente identificados no Brasil e na América do Sul podem representar importantes genótipos decorrentes do fluxo migratório

internacional. A cidade portuária de Itajaí, assim como o forte turismo nacional e internacional da região contribui para a variedade genética entre as cepas circulantes. Foram encontrados perfis, alguns relacionados com a multirresistência, que ocorreram exclusivamente nos presídios.

A utilização do protocolo modificado para tratamento das amostras de escarro possibilitou uma melhora no diagnóstico molecular da TB realizado no LBMM/UFSC em parceria com o Hospital Nereu Ramos e o LACEN/SC. O estudo epidemiológico molecular contribuiu para o conhecimento da estrutura populacional destas cepas e o melhor entendimento da dinâmica de transmissão da doença no Estado. A oportunidade de associar informações diagnósticas rápidas e dados de epidemiologia molecular representa um avanço importante no controle da TB em Santa Catarina, direcionando investigações futuras.

8. Perspectivas

Diante dos resultados obtidos neste estudo, as principais perspectivas de trabalho são:

- Caracterização das cepas de perfil desconhecido, por meio de um método de genotipagem com maior poder discriminatório;
- Análise das populações privadas de liberdade (presídios), dos grupos de dependentes químicos, etilistas e dos indivíduos coinfectados com TB/HIV, para avaliação da prevalência da doença e das cepas circulantes entre estes grupos;
- Análise da prevalência e do perfil de resistência das cepas circulantes no Estado de Santa Catarina.

9. Referências

ABADÍA, E.; SEQUERA, M.; ORTEGA, D.; MÉNDEZ, M. V.; ESCALONA, A.; MATA, O. M.; IZARRA, E.; ROJAS, Y.; JASPE, R.; MOTIWALA, A. S.; ALLAND, D.; WAARD, J.; TAKIFF, H. E. *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. *BMC Infectious Disease*, v. 9, n. 122, 2009.

AGASINO, C. B.; PONCE DE LEON, A.; JASMER, R. M.; SMALL, P. M. Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains in San Francisco that do not contain IS6110. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 2, n. 6, p. 18-520, 1998.

ALLIX, C.; SUPPLY, P.; FAUVILLE-DUFAUX, M. Utility of Fast Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variabile Number Tandem Repeat Genotyping in Clinical Mycobacteriological Analysis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 39, p. 783-789, 2004.

AMITA, J.; VANDANA, T.; GULERIA, R. S.; VERMA, R. K. Qualitative Evaluation of Mycobacterial DNA Extraction Protocols for Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biology Today*, v. 3, p. 43-50, 2002.

ARRIAZA, B. T.; SALO, W.; AUFDERHEIDE, A. C.; HOLCOMB, T. A. Pre-Columbian tuberculosis in Northern Chile: molecular and skeletal evidence. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 98, p. 37-45, 1995.

ASSIS, N. C. S.; LOPES, M. L.; CARDOSO, N. C.; COSTA, M. M.; SOUSA, C. O.; LIMA, K. V. B. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial*, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2007.

BAESS, I. Isolation and purification of deoxyribonucleic acid from mycobacteria. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, v. 82, n. 6, p. 780-784, 1974.

BANAVALIKER, J. N.; BHALOTRA, B.; SHARMA, D. C.; GOEL, M. K.; KHANDEKAR, P. S.; BOSE, M. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction in clinical specimens. *Indian Journal of Tuberculosis*, v. 45, n. 15, p. 15-18, 1998.

BARRERA, L. The Basics of Clinical Bacteriology. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. *Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care*. 3 ed., 2007.

BATES, J. H.; STEAD, W. W. The history of tuberculosis as a global epidemic. *The Medical Clinics of North America*, v. 77, n. 6, p. 1205-1217, 1997.

BATES, M.N.; KHALAKDINA, A.; PAI, M.; CHANG, L.; LESSA, F.; SMITH, K. R. Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, v.167, n.4, p. 335-342, 2007.

BECKTON & DICKINSON. BACTEC™ MGIT™ 960 - Detecção e teste de sensibilidade para micobactérias. Disponível em: <<http://www.bd.com/brasil/products.asp>>. Acesso em 25 outubro de 2011.

BELO, M. T. C. T.; LUIZ, R. R.; HANSON, C.; SELIG, L.; TEIXEIRA, E. G.; CHALFOUN, T. TRAJMAN, A. Tuberculose e gênero em um município prioritário no estado do Rio de Janeiro. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 36, n. 5, p. 621-625, 2010.

BENATAR, S. R.; UPSHUR, R. Tuberculosis and poverty: what could (and should) be done? *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 14, n.10, p. 1225-1521, 2010.

BITTELBRUN, G. Drogas atingem 86% das cidades. Diário Catarinense, caderno Geral, p. 25, Florianópolis, 8 de novembro de 2011.

BÖDDINGHAUS, B.; ROGALL, T.; FLORHR, T.; BLOCKER, H.; BOTTGER, E. C. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, n.8, p.1751-1759, 1990.

BORGES, M.; CAFRUNE, P. I.; POSSUELO, L. G.; VALIM, A. R. M.; RIBEIRO, M. O.; ROSSETTI, M. L. R. Análise molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de um centro de saúde ambulatorial em Porto Alegre, (RS). *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 30, n. 4, p. 448-454, 2004.

BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, M. M.; MADEIRA, S. G.; LIMA, C.; BOFFO, M.; MATTOS, I.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. *Microbes and Infection*, v. 7, n. 13, p. 1338-1344, 2005.

BOWKALOWSKI, C.; BERTOLOZZI, M. R. Vulnerabilidades em pacientes com tuberculose no distrito Sanitário de santa felicidade – Curitiba, PR. *Cogitare Enfermagem*, v. 15, n. 1, p. 92-99, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Manual TELELAB – Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias*. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil*. Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia da Vigilância Epidemiológica. **Tuberculose: informações gerais.** Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31081>. Acesso em: 16 de outubro de 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2011c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico AIDS/DST, 2011d.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=sc>>. Acesso em 10 de janeiro de 2012a.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/primeiros_dados_divulgados/index.php?uf=42>. Acesso em 10 de janeiro de 2012b.

BREEN, R. A. M.; MILLER, R. F.; GORSUCH, T.; SMITH, C. J.; SCHWENK, A.; HOLMES, W.; BALLINGER, J.; SWADEN, L.; JOHNSON, M. A.; CROPLEY, I.; LIPMAN, M. C. I. Adverse events and treatment interruption in tuberculosis patients with and without HIV co-infection. *Thorax*, v. 61, n. 9, p. 791-794, 2006.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; SOOLINGEN, D. V.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J. R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W. N.; GORI, A.; AL-HAJOI, S. A.; ALLIX, C.; ARISTIMUNO, L. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology*, v. 6, n. 23, 2006.

BURMAN, W. J.; JONES, B. E. Clinical and radiographic features of HIV-related tuberculosis. *Seminars in Respiratory Infections*, v. 18, p. 263-271, 2003.

CAFRUNE, P. I.; POSSUELO, L. G.; RIBEIRO, A. W.; RIBEIRO, M. O.; UNIS, G.; JARCZEWSKI, C. A.; ROSSETTI, M. L. R.; ZAHAE, A. Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum

samples of patients suspected of having tuberculosis. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 55, n. 7, p. 895-900, 2009.

CHIANG, C. Y.; SLAMA, K.; ENARSON, D. A. Associations between tobacco and tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 11, n. 8, p. 258-262, 2007.

CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. *Pulmão*, v. 15, p. 29-35, 2006.

CAMPOS, H. S. Tratamento da Tuberculose. *Pulmão*, v. 16, n. 1, p. 21-31, 2007.

CANETTI, G.; FROMAN, S.; GROSSET, J.; HAUDURROY, P.; LANGEROVA, M.; MAHLER, H. T.; MEISSNER, G.; MITCHISON, D. A.; SULA, L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 29, p. 565-578, 1963.

CDC – Centers for Diseases Control and Prevention. Tuberculosis. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm>>. Acesso em 15 de out., 2011.

CDC – Centers for Diseases Control and Prevention. National center of HIV/Aids, Viral Hepatitis, STD, and TB prevention. Latent Tuberculosis Infection: A Guide for Primary Health Care Providers, 2010.

CEREZO, I.; JIMÉNEZ, Y.; HERNANDEZ, J.; ZOZIO, T.; MURCIA, M. I.; RASTOGI, N. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Disease*, 2011(*In press*).

CRAWFORD, J. T. New technologies in the diagnosis of tuberculosis. *Seminars in Respiratory Infections*, v. 9, p. 62-70, 1994.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.;

CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; McLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

CONDE, M. B. *et al.* III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

CONNOR, M. B. O. Ireland's potential MDR-TB and XDR-TB problem. *Irish Journal of Medical Science*, v.180, n. 2, p. 613, 2011.

COSTA, S. M.; MENDOZA-SASSI, R. A.; TEIXEIRA, T. P.; LEIVAS, V. A.; CÉZAR-VAZ, M. R. Conhecimento dos clientes com tuberculose pulmonar e seus familiares sobre adesão ao tratamento e fatores associados, no município do Rio Grande (RS). *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 16, n. 1, p. 1427-1435, 2011.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1305-1314, 2003.

CRONIN, W. A.; GOLUB, J. E.; MAGDER, L. S.; BARUCH, N. G.; LATHAN, M. J.; MUKASA, L. N.; HOOPER, N.; RAZEQ, J. H.; MULCAHY, D.; BENJAMIN, W. H.; BISHAI, W. R. Epidemiologic usefulness of spoligotyping for secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* with low copy numbers of IS6110. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 3709-3711, 2001.

CRUZ, R. C. S.; ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; CAMPELO, A. R. L.; SILVA, E. J. C.; MAZZA, E.; MENEZES, R. C.; KOSMINSKY, S. Tuberculose pulmonar: associação entre extensão de lesão pulmonar Residual e alteração da função pulmonar. *Revista da Associação Médica do Brasil*, v. 4, n. 5, p. 406-410, 2008.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, v. 100, p. 1862-1870, 2006.

DALEY, P.; MICHAEL, J. S.; KALAISELVAN, S.; LATHA, A.; MATHAI, D.; JOHN, K. R.; PAI, M. A Pilot Study of Short-Duration Sputum Pretreatment Procedures for Optimizing Smear Microscopy for Tuberculosis. *Plos One*, v. 5, n. 4, 2009.

DALEY, C. L.; GOTWAY, M. B.; JASMER, R. M. Radiographic manifestations of tuberculosis: A primer for clinicians, 2009. Disponível em:

<http://www.currytbccenter.ucsf.edu/radiographic/radiographic_ch2.cfm>.

Acesso em 22 de novembro de 2011.

DAVID, S.; RIBEIRO, D. R.; ANTUNES, A.; PORTUGAL, C.; SANCHO, L.; SOUSA, J. G. Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Disease*, v. 7, n. 5, p. 609-617, 2007.

DAVID, S. Utilização estratégica da genotipagem do *M. tuberculosis* no controlo da tuberculose. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, v. 14, n. 4, p. 509-516, 2008.

de la SALMONIÉRE, YVES-OLIVIER G.; LI, H. M.; TORREA, G.; BUNSCHOTEN, A.; van EMBDEN, J.; GICQUEL, B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 9, p. 2210-2214, 1997.

de la RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 86, p. 77-109, 2006.

DEISS, R. G.; RODWELL, T.C.; GARFEIN, R. S. Tuberculosis and Illicit Drug Use: Review and Update. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, n.1, p.72-82, 2011.

DEMAY, C.; BURGUIERE, T.; COUVIN, D. Institut Pasteur de la Guadeloupe. The SITVIT Database. Disponível em: <<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>>. Acesso em 2 de fevereiro de 2012.

DIUANA, V.; LHUILIER, D.; SÁNCHEZ, A. R.; AMADO, G.; ARAÚJO, L.; DUARTE, A. M.; GARCIA, M.; MILANEZ, E.; POUBE, L.; ROMANO, E.; LAROUZÉ, B. Saúde em prisões: representações e práticas dos agentes de segurança penitenciária no Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 24, n. 8, 2008.

DIVE – Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Estado de Santa Catarina. Gerência de agravos. Tuberculose. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br>>. Acesso em 11 de setembro de 2011.

DOMINGOS, M. P.; CAIAFFA, W. T.; COLOSIMO, E. A. Mortalidade, co-infecção por HIV/AIDS e abandono do tratamento como fatores prognósticos para tuberculose em Recife, Pernambuco, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 24, n. 4, p. 887-896, 2008.

DROBNIOWSKI, F. A.; CAWS, M.; GIBSON, A.; YOUNG, D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infectious Disease*, v. 3, n.3, p. 141-147, 2003.

DUARTE, R. Teste tuberculínico. Como otimizar? *Revista Portuguesa de Pneumologia*, v.15, n. 2, p. 295-304, 2009.

EISENACH, K. D.; SIFFORD, M. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *American Review of Respiratory Disease*, v. 144, p. 1160-1163, 1991.

EL-SADR, W. M.; TSIOURIS, S. J. HIV-associated tuberculosis: diagnostic and treatment challenges. *Seminars in Respiratory Critical and Care Medicine*, v. 29, n. 5, p. 525-531, 2008.

EUZEBY, J. P. *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>. Acesso em 20 de setembro de 2011.

EVANS, J. T.; HAWKEY, P. M.; SMITH, E. G.; BOESE, K. A.; WARREN, R. E.; HONG, G. Automated High-Throughput Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing of Mycobacterium tuberculosis Strains by a Combination of PCR and Nondenaturing High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 9, p. 4175–4180, 2004.

FARHAT, M.; GREENAWAY, C.; PAI, M.; MENZIES, D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 10, p. 1192-1204, 2006.

FERNANDES, T.M.D.; ALMEIDA, A.B.S.; NASCIMENTO, D.R. A historia da tuberculose no Brasil. Fundo Global Tuberculose Brasil. 2011 Disponível em <<http://www.fundoglobaltb.org.br>>. Acesso em 19 de setembro de 2011.

FISK, T. L.; HON, H. M.; LENNOX, J. L.; REYN, C. F.; HORSBURGH JR, C. R. Detection of latent tuberculosis among HIV-infected patients after initiation of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, v. 17, p. 1102-1104, 2003.

FLORES, L. L.; PAI, M.; COLFORD, J. M.; RILEY, L. W. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiology*, v. 3, 2005.

FOMUKONG, N. G.; TANG, T. H.; AL-MAAMARY, S.; IBRAHIM, W. A.; RAMAYAH, S.; YATES, M.; ZAINUDDIN, Z. F.; DALE, J. W. Insertion sequence typing of *M. tuberculosis*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. *Tubercle and Lung Disease*, v. 75, n.6, p. 399-468, 1994.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. *American Journal of Epidemiology*, v. 153, n. 12, p. 1135-1141, 2001.

FREITAS, F. T. M.; YOKOTA, R. T. C.; CASTRO, A. P. B.; ANDRADE, S. S. C. A.; NASCIMENTO, G. L.; Moura, N. F. O. *et al.* Prevalência de sintomáticos respiratórios em regiões do Distrito Federal, Brasil. *Revista Panamericana de Salud Publica*, v. 29, n. 6, p. 451-460, 2011.

FRIEDMAN, H.; NEWTON, C.; KLEIN, T. W. Microbial infections, immunomodulation, and drugs of abuse. *Clinical Microbiology Review*, v. 16, n. 2, p. 209-219, 2003.

GAGNEUX, S.; DeRIEMER, K.; VAN, T.; KATO-MAEDA, M.; JONG, B. C.; NARAYANAN, S.; NICOL, M.; NIEMANN, S.; KREMER, K.; GUTIERREZ, M. C.; HILTY, M.; HOPEWELL, P. C.; SMALL, P. M. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 8, p. 2869 – 2873, 2006.

GANDHI, N. R.; SHAH, N. S.; ANDREWS, J. R.; VELLA, V.; MOLL, A. P.; SCOTT, M.; WEISSMAN, D.; MARRA, C.; LALLOO, U. G.; FRIEDLAND, G. H. HIV coinfection in multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis results in high early mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 181, p. 80–86, 2010.

GANGULY, N. K. What is new in diagnosis of tuberculosis? Part I: techniques for diagnosis of tuberculosis. *Indian Council of Medical Research Bulletin*, v.32, n.8, 2002.

GARG, S. K.; TIWARI, R. P.; TIWARI, D.; SINGH, R.; MALHOTRA, D.; RAMNANI, V. K.; PRASAD, G.B.K.S. ; CHANDRA, R.; FRAZIANO, M.; COLIZZI, F.; BIEN, P. S. Diagnosis of Tuberculosis: Available Technologies, Limitations, and Possibilities. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 17, p. 155–163, 2003.

GAZETTA, C. E.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; COSTA JÚNIOR, M. L.; VILLA, T. C. S.; VENDRAMINI, S. H. F. Aspectos epidemiológicos da tuberculose em São José do Rio Preto - SP, a partir das notificações da doença em um Hospital - Escola (1993-1998). *Pulmão*, v. 12, n. 3, 2003.

GETAHUN, H.; GUNNEBERG, C.; GRANICH, R.; NUNN, P. HIV infection associated tuberculosis: the epidemiology and the response. *Clinical Infectious Diseases*, v 50, p. 201–207, 2010.

GOMES, H. M.; ELIAS, A. R.; OELEMANN, M. A.; PEREIRA, M. A.; MONTES, F. F.; MARSICO, A. G.; KRITSKI, A. L.; FILHO, L. D.; CALDAS, P. C.; POSSUELO, L. G.; CAFRUNE, P.; ROSSETTI, M. L.; LUCENA, N.; SAAD, M. H.; CAVALCANTI, H. R.; LEITE, C. Q.; BRITO, R. C.; LOPES, M. L.; LIMA, K.; SOUZA, M.; TRINDADE, R. D.; ZOZIO, T.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; SUFFYS, P. N. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Disease*, 2011 (In press).

GOULDING, J. N.; STANLEY, J.; SAUDERS, N.; ARNOLD, C. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n.3, p. 1121-1126, 2000.

GUTIERREZ, R. S.; SANTOS, B. R.; ESPINA, C. A. A.; AZAMBUJA, H. C. P.; SILVA, L. C. C. Tuberculose. In: SILVA, L. C. C. *Condutas em pneumologia*. Rio de Janeiro (RJ): Revinter, v.1, 2001.

GUTIERREZ, M. C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R.; FABRE, M.; OMAIS, B.; MARMIESSE, M.; SUPPLY, P.; VINCENT, V. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos One*, v.1, n. 1, 2005.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. *Microbiologia Ilustrada*. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2007.

HAYMAN, J. *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurassic time? *Lancet*, v. 2, 1984.

HECK, M. A.; COSTA, J. S. D.; NUNES, M. F. Prevalência de abandono do tratamento da tuberculose e fatores associados no município de Sapucaia do Sul (RS), Brasil, 2000-2008. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 14, n.3, p. 478-485, 2011.

HERMANS, P. W. M. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n.9, p. 2051-2058, 1990.

HIJJAR, M. A.; GERHARDT, G.; TEIXEIRA, G. M.; PROCÓPIO, M. J. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 41, p. 50-58, 2007.

HINO, P.; CUNHA, T. N.; VILLA, T. C. S.; SANTOS, C. B. Perfil dos casos novos de tuberculose notificados em Ribeirão Preto (SP) no período de 2000 a 2006. *Ciência e saúde coletiva*, v. 16, n.1, p.1295-1301, 2011

HOUBEN, R. M. G. J.; CRAMPIN, A. C.; NDHLOVU, R.; SONNENBERG, P.; GODFREY-FAUSSETT, P.; HAAS, W. H.; ENGELMANN, G.; LOMBARD, C. J.; WILKINSON, D.; BRUCHFELD, J.; LOCKMAN, S.; TAPPERO, J.; GLYNN, J. R. Human immunodeficiency virus associated tuberculosis more often due to recent infection than reactivation of latent infection. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 15, n.1, p. 24-31, 2011.

HOWARD, A.A.; KLEIN, R. S.; SCHOENBAUM, E. E.; GOUREVITCH, M. N. Crack cocaine use and other risk factors for tuberculin positivity in drug users. *Clinical Infectious Disease*, v. 35, n. 10, p.1183-1190, 2002.

HWANGA, L.; GRIMESA, C. Z.; BEASLEYA, R. P.; GRAVISSA, E. A. Latent tuberculosis infections in hard-to-reach drug using population – detection, prevention and control. *Tuberculosis*, v. 89, p. S41-S45, 2009.

JONAS, V.; LONGIARU, M. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular methods. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 17, p: 119-128, 1997.

JONES, B. E.; YOUNG, S. M.; ANTONISKIS, D.; DAVIDSON, P. T.; KRAMER, F.; BARNES, P. F. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *The American Review of Respiratory Disease*, v. 148, n. 5, p. 1292–1297, 1993.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; van AGTERVELD, M.; van SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; van EMBDEN, J. D. A. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n.4, p. 907-914, 1997.

- KANDUMA, E.; MCHUGH, T. D.; GILLESPIE, S. H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 781–791, 2003.
- KÄSER, M.; RUF, M. T.; HAUSER, J.; MARSOLLIER, L.; PLUSCHKE, G. Optimized Method for Preparation of DNA from Pathogenic and Environmental Mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, n.2, p. 414-418, 2009.
- KWAN, C. K.; ERNST, J. D. HIV and Tuberculosis: a Deadly Human Syndemic. *Clinical Microbiology Review*, v. 24, n. 2, p. 351-376, 2011.
- KREMER, K.; van SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HASS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTÍN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M. and van EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 8, p. 2607-2618, 1999.
- KUBICA, G. P.; DYE, W. E.; COHN, M. L. Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetil-L-cysteine, as a sputum digest for the isolation of mycobacteria. *American Review of Respiratory Disease*, v. 87, p. 775-779, 1963.
- LAFAIETE, R. S.; MOTTA, M. C. S.; VILLA, T. C. S. Satisfação dos usuários no programa de controle da tuberculose de um município do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 19, n. 3, 2011.
- LAROUZÉA, B.; SÁNCHEZ, A.; DIUANA, V. Tuberculosis behind bars in developing countries: a hidden shame to public health. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, p. 841-842, 2008.
- LASUNSKAIA, E.; RIBEIRO, S. C. M.; MANICHEVA, O.; GOMES, L. L.; SUFFYS, P. N.; MOKROUSOV, I.; FERRAZOLI, L.; ANDRADE, M. R. M.; KRITSKI, A.; OTTEN, T.; KIPNIS, T. L.; SILVA, W. D.; VISHNEVSKY, B.; OLIVEIRA, M. M.; GOMES, H. M.; BAPTISTA, I.

F.; NARVSKAYA, O. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes and Infection*, v. 12, n. 6, p. 467-475, 2010.

LAZZARINI, L. C. O.; HUARD, R. C.; BOECHAT, N. L.; GOMES, H. M.; OELEMANN, M. C.; KUREPINA, N.; SHASHKINA, E.; MELLO, F. C. Q.; GIBSON, A. L.; VIRGINIO, M. J.; MARSICO, A. G.; BUTLER, W. R.; KREISWIRTH, B. N.; SUFFYS, P. N.; SILVA, J. R. L.; HO, J. L. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage that is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 12, p. 3891-3902, 2007.

LEÃO, S. C.; MARTIN, A.; MEJIA, G. I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. S.; PORTAELS, F. *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*. 1. ed. European Commission, International Cooperation for Developing Countries, 2004.

LEÃO, S. C. E PORTAELS, F. History. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITTACO, V. *Tuberculosis - From basic science to patient care*. 1 ed., 2007.

LEHMANN, J. Twenty years afterward historical notes on the discovery of the antituberculosis effect of paraminosalicylic acid (PAS) and the first clinical trials. *American Review of Respiratory Disease*, v. 90, p. 953-956, 1964.

LIPPKE, J. A.; STRZEMPKO, M. N.; RAIA, F. F.; SIMON, S. L. Isolation of Intact High-Molecular-Weight DNA by Using Guanidine Isothiocyanate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 2588-2589, 1987.

LOPES, A. J.; CAPONE, D.; MOGAMI, R.; TESSAROLLO, B.; CUNHA, D. L.; CAPONE, R. B.; SIQUEIRA, H. R.; JANSEN, J. M. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão*, v. 15, p. 253-261, 2006.

LOPES, T.; GOMES, C.; DIOGO, N. Tuberculosis unit: study of 10 years of activity (1999-2009). *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 2011 (*In press*).

MARKS, D. J. B.; DHEDA, K.; DAWSON, R.; AINSLIE, G.; MILLER, R. F. Adverse events to antituberculosis therapy: influence of HIV and antiretroviral drugs. *International Journal of STD & AIDS*, v. 20, n. 5, p. 339-345, 2009.

MATHEMA, B.; KUREPINA, N. E.; BIFANI, P. J.; KREISWIRTH, B. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 4, p. 658–685, 2006.

MATTEELLI, A.; MIGLIORI, G. B.; CIRILLO, D.; CENTIS, R.; GIRARD, E.; RAVIGLION, M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 5, n.5, 2007.

MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A.-L.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYRENC, 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 of the United States of America*, v. 98, n. 4, p. 1901–1906, 2001.

MENDES, A. M.; FENSTERSEIFER, L. M. Tuberculose: porque os pacientes abandonam o tratamento? *Boletim de Pneumologia Sanitária*, v. 12, n. 1, p. 25-36, 2004.

MENDES, J. M.; MACHADO, S. M. A.; LOURENÇO, M. C.; FERREIRA, R. M. C.; FONSECA, L. S.; SAAD, M. H. F. Diversidade molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* em uma região de favela da cidade do Rio de Janeiro. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 34, n. 12, p. 1063-1068, 2008.

MIRANDA, S. S.; CARVALHO, W. S. C.; SUFFYS, P. N.; KRITSKI, A. L.; OLIVEIRA, M.; ZARATE, N.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N.; GICQUEL, B. Spoligotyping os clinical *M. tuberculosis* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 3, p. 267-273, 2011.

MOATTER, T.; MIRZA, S.; SIDDIQUI, M. S.; SOOMRO, I. N. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin embedded intestinal tissue

specimens by polymerase chain reaction: characterization of IS6110 element negative strains. *The Journal of Pakistan Medical Association*, v. 48, n. 6, p. 174-178, 1998.

MOKROUSOV, I. Towards a quantitative perception of human-microbial co-evolution. *Frontiers in Bioscience: a Journal of virtual library*, v. 1, n. 12, p. 4818-4825, 2007.

MONOT, M.; HONORÉ N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPÉE, J. Y.; LACROIX, C.; SOW, S.; SPENCER, J. S.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L.; GELBER, R.; VIRMOND, M.; FLAGEUL, B.; CHO, S. N.; JI, B.; PANIZ-MONDOLFI, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P. E.; RASOLOFO, V.; BRENNAN, P. J.; COLE, S. T. On the Origin of Leprosy. *Science*, v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, 2005.

MONTEIRO, M. C. M.; NEVES, D. D.; SIGNORINI, D. J. H. P.; SILVA, I. B. D.; DIAS, M. C. Características sócio-demográficas dos pacientes com tuberculose atendidos em um hospital universitário. *Pulmão*, v. 15, n. 4, p. 228-232, 2006.

MOSTRÖM, P.; GORDON, M.; SOLA, C.; RIDELL, M. AND RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection Diseases*, v. 8, n.11, 2002.

MURRAY, M.; ALLAND, D. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. *American Journal of Epidemiology*, v. 155, n.6, p. 565-571, 2002.

NAVA-AGUILERA, E.; ANDERSSON, N.; HARRIS, E.; MITCHELL, S.; HAMEL, C.; SHEA, B.; LÓPEZ-VIDAL, Y.; VILLEGAS-ARRIZÓN, A.; MORALES-PÉREZ, A. Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*, v. 13, n. 1, p. 17-26, 2009.

NEONAKIS, I. K.; GITTI, Z.; KRAMBOVITS, E.; SPANDIDOS, D. A. Molecular diagnostics tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods*, v. 75, p. 1-11, 2008.

NERLICH, A. G.; HAAS, C. J.; ZINK, A. SZEIMIES, U.; HAGEDORN, H. G. Molecular evidence for tuberculosis in ancient Egyptian mummy.

Lancet, v. 350, p. 1404, 1997.

NEYROLLES, O.; QUINTANA-MURCI, L. Sexual Inequality in Tuberculosis. *Plos One Medicine*, v. 6, n.12, 2009.

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, 2000.

NOGUEIRA, P. A.; ABRAHÃO, R. M. C. A infecção tuberculosa e o tempo de prisão da população carcerária dos Distritos Policiais da zona oeste da cidade de São Paulo. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.12, n.1, P. 30-39, 2009.

NOGUTI, E. N.; LEITE, C. Q. F.; MALASPINA, A. C.; SANTOS, A. C. B.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; MAMIZUKA, E. M.; CARDOSO, R. F. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 6, 2010.

NOORDHOEK, G. T.; KOLK, A. H. J.; BJUNE, G.; CATTY, D.; DALE, J. W.; FINE, P. E.; GODFREY-FAUSSETT, P.; CHO, S. N.; SHINNICK, T.; SVENSON, S. B.; WILSON, S.; VAN EMBDEN, J. D. A. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 277-284, 1994.

NOORDHOEK, G. T.; EMBDEN, J. D. A.; KOLK, A. H. J. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 10, p. 2522-2525, 1996.

NOORDHOEK, G. T.; MULDER, S.; WALLACE, P.; VAN LOON, A. M. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by acid nucleic amplification methods. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, n.4, p. 295-301, 2004.

NUTTAL, J. J.; DAVIES, M. A.; HUSSEY, G. D.; ELEY, B. S. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine-induced complications in children treated with highly active antiretroviral therapy. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n. 6, p. 99-105, 2008.

OELEMANN, M. C.; GOMES, H.M.; WILLERY, E.; POSSUELO, L.; LIMA, K. V. B.; ALLIX-BÉGUEC, C.; LOCHT, C.; SALMONIÈRE, YVES-OLIVIER L. G.; 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*, v. 6, n. 3, 2011.

OELTMANN, J. E.; KAMMERER, J. S.; PEVZNER, E. S.; MOONAN, K. Tuberculosis and Substance Abuse in the United States, 1997-2006. *Archives of Internal Medicine*, v. 169, n. 26, p. 189-197, 2009.

PAI, M.; ZWERLING, A.; MENZIES, D. Systematic Review: T-Cell-based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Annals of Internal Medicine*, v. 149, p. 177-184, 2008.

PAIXÃO, L. M. M.; GONTIJO, E. D. Perfil de casos de tuberculose notificados e fatores associados ao abandono, Belo Horizonte, MG. *Revista de Saúde Pública*, v. 41, n.2, p. 205-213, 2007.

PANDOLFI, J. R.; MALASPINA, A. C.; SANTOS, A. C. B.; SUFFYS, P. N.; OELLEMAN, M. A. C.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C. Q. F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, p. 251-257, 2007.

PARSONS, L. M.; SOMOSKÖVI, A. ; GUTIERREZ, C.; LEE, E.; PARAMASIVAN, C. N.; ABIMIKU, A.; SPECTOR, S.; ROSCIGNO, G.; NKENGASONG, J. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 2, p. 314-350, 2011.

RASTOGI, N.; SOLI, C. Molecular Evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITTACO, V. Tuberculosis - From basic science to patient care. 1 ed., 2007.

- RAMACHADRAN, R.; PARAMASIVAN, C. N. What is new in the diagnosis of tuberculosis? *Indian Journal of Tuberculosis*, v. 50, p. 133-141, 2003.
- RAMAZANZADEH, R.; FARNIA, P.; AMIRMOZAFARI, N. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from iranian and afghani patients by spoligotyping method. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, n. 2, p. 314-320, 2009.
- RAMOS, R. R. C. M.; GORELIK, V. L. B.; KRISTENSE, C. H. Avaliação Quanto ao Uso de Substâncias Psicoativas e Comorbidades Psiquiátricas de Uma População Internada para Tratamento de Tuberculose. *Revista da Graduação – PUC-RS*, v. 3, n.1, 2010.
- REHM, J.; SAMOKHVALOV, A. V.; NEUMAN, M. G; ROOM, R.; PARRY, C.; LÖNNROTH, K.; PATRA, J.; POZNYAK, V.; POPOVA, S. The association between alcohol use, alcohol use disorders and tuberculosis (TB). A systematic review. *BMC Public Health*, v. 9, n. 450, 2009.
- ROGALL, T.; FLOHR, T.; BOTTGER, E. C. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *Journal of General Microbiology*, v. 136, p.1915-1920, 1990.
- RODRIGUEZ, C. A. R.; ZUMÁRRAGA M. J.; OLIVEIRA, E. M. D.; CATALDI, A. A.; ROMANO, M .I.; OTTO, H. H.; BONAFÉ, V. L.; NETO, J. S. F. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo, Brasil, utilizando a técnica de spoligotyping. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, v.71, n.3, p.277-282, 2004.
- ROSSETTI, M. L. R.; JARDIM, S. B.; RODRIGUES, V. F. S; MOURA, A. R.; OLIVEIRA, H.; ZAHA, A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *Journal of Microbiology Methods*, v. 28, n 2, p. 139-146, 1997.
- ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A. B. Tuberculose. In: TARANTINO, A. B. *Doenças pulmonares*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 294-380, 2002.

ROY, M.; ELLIS, S. Radiological diagnosis and follow-up of pulmonary tuberculosis. *Postgraduate Medical Journal*, v. 86, p. 663-674, 2010.

RUFFINO-NETTO, A. Impacto da reforma do setor saúde sobre os serviços de tuberculose no Brasil. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, v.7, p. 7-18, 1999.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: A calamidade negligenciada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n. 1, p. 51-58, 2002.

SAFWAT, T. M.; ELMASRY, A. A.; MOHAMED, A. K. M. Prevalence of Multi-Drug Resistant Tuberculosis in Abbassia Chest Hospital from July 2006 to December 2009. *Egyptian Journal of Bronchology*, v, 5, n. 2, p. 124-130, 2011.

SALO, W.; AUFDERHEIDE, A. C.; BUIKSTRA, J.; HOLCOMB, T. A. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, v. 91, p. 2091-2094, 1994.

SÁNCHEZ, A. R.; MASSARI, V.; GERHARDT, G.; BARRETO, A. W.; CESCONI, V.; PIRES, J.; ESPÍNOLA, A. B.; BIONDI, E.; LAROUZÉ, B.; CAMACHO, L. A. B. A tuberculose nas prisões do Rio de Janeiro, Brasil: uma urgência de saúde pública. *Caderno de Saúde Pública*, v. 23, n. 3, p. 545-552, 2007.

SANTO, L. A. L. A.; SANTOS, P. C. H.; MOREIRA, M. E. Perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes com tuberculose em hospital universitário da região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 6, n. 68, p. 14-21, 2009.

SANTOS, J. S.; BECK, S. T. A co-infecção tuberculose e HIV: um importante desafio - Artigo de revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 41, n. 3, p. 209-215, 2009.

SANTOS, L. C.; KIPNIS, A. P. J.; KIPNIS, A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de Patologia Tropical*, v. 36, n.1, p. 1-15, 2007.

SC – SANTA CATARINA. Governo do Estado de Santa Catarina.

Disponível em: <<http://www.sc.gov.br>>. Acesso em 11 de janeiro de 2012.

SCHATZ, A.; BUGIE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 55, p. 66-69, 1944.

SILVEIRA, M. T. P.; ADORNO, R. F. R.; FONTANA, T. Perfil dos pacientes com tuberculose e avaliação do programa nacional de controle da tuberculose em Bagé (RS). *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 33. N. 2; p. 199-205, 2007.

SEVERO, N. P. F.; LEITE, C. Q. F.; CAPELA, M. V.; SIMÕES, M. J. S. Características clínico-demográficas de pacientes hospitalizados com tuberculose no Brasil, no período de 1994 a 2004. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 33, n. 5, p. 565-571, 2007.

SILVA, A. B. S. ; GROLLA, A. V. ; FÉLIXA, C.; CONCEIÇÃO, F. R.; SPIES, F. S.; SCAINIA, C. J.; ROSSETTI, M. L; BORSUKD, S.; DELLAGOSTIN, O . A.; SILVA, P. E. A. Clonal diversity of *M. tuberculosis* isolated in a sea port city in Brazil. *Tuberculosis*, v. 89, n. 6, p. 443-447, 2009.

SLOSÁREK, M.; DONDOV, C.; DABROWSKA, L.; FIEDLER, E.; JANKOVA, E.; KALFIN, E.; KAUSTOVÁ, J.; MEZENSKÝ, L.; MYSÁK, J.; SAPKADZIJEVA, P.; WOJCIECHOWSKA, E.; HYNČICA, V. Comparison of microscopic positivity in smears from sputa stained according to Ziehl-Neelsen in different modifications. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, v. 21, n. 1, p. 7-15, 1977.

STEINGART, K. R.; RAMSAY, A.; PAI, M. Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 5, n. 3, p. 327–331, 2007.

STORLA, D. G.; YIMER, S.; BJUNE, G. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of Tuberculosis. *BMC Public Health*, v. 8, n. 15, 2008.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LSEJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minissatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

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*, v. 39, n. 10, p. 3563-71, 2001.

SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RÜSCH-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 repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4498-510, 2006.

TELLES, M. A.; FERRAZOLI, L.; WALDMAN, E. A.; GIAMPAGLIA, C. M.; MARTINS, M. C.; UEKI, S. Y.; CHIMARA, E.; SILVA, C. A.; CRUZ, V.; WALDMAN, C. C.; HEYN, I.; HIRONO, I. U.; RILEY, L. W. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 9, n. 9, p. 970-976, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiology*. São Francisco (CA): Pearson. 9 ed., 2009.

van EMBDEN, J. D. A.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICK, T. M.; Small, P. M. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.

van EMBDEN, J. D. A.; van GORKOM, T.; KREMER, K.; JANSEN, R.; van der ZEIJST, B. A. M.; SCHOULS, L. M. Genetic variation and

evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n.9, p. 2393–2401, 2000.

van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W.; de HAAS, P. E.; SOLL, D. R.; van EMBDEN, J. D. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 1987-95, 1991.

van SOOLINGEN, D.; DE HASS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; van EMBDEN, J. D. A. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods in Enzymology*, v. 235, p. 196-204, 1994.

van SOOLINGEN, D.; KREMER, K.; HERMANS, P. W. M. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. Molecular Epidemiology: Breakthrough Achievements and Future Prospects. In PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITTACO, V. *Tuberculosis - From basic science to patient care*. 1 ed., 2007.

VARMA-BASIL, 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*, v. 106, n. 5, p. 524-535, 2011.

WAITT, C. J.; SQUIRE, S. B. A systematic review of risk factors for death in adults during and after tuberculosis treatment. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 15, n.7, p. 871-885, 2011.

WALÉRIA-ALEIXO, A.; KROON, E. G.; CAMPOS, M. A. S.; MARGUTI-PINTO, M. E.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. Heteroduplex mobility assay for rapid, sensitive and specific detection of mycobacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 36, n. 4, p. 225-235, 2000.

WANG, L.; TURNER, M. O.; ELWOOD, R. K.; SCHULZER, M.; FITZGERALD, J. M. A meta-analysis of the effect of bacille Calmette –

Guérin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax*, v. 57, p. 804-809, 2002.

WATTERSON, S. A.; DROBNIIEWSKI, F. A. Modern laboratory of mycobacterial infections. *Journal of Clinical Patology*, v. 53, n. 10, p. 727-732, 2000.

WEIR, R. E.; BLACK, G. F.; NAZARETH, B.; FLOYD, S.; STENSON, S.; STANLEY, C.; BRANSON, K.; SICHALI, L.; CHAGULUKA, S. D.; DONOVAN, L.; CRAMPIN, A. C.; FINE, P. E.; DOCKRELL, H. M. The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacilli Calmette—Guerin vaccination in southern England and northern Malawi. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 146, p. 390-399, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) – 2010 Global Report on Surveillance and Response. *WHO Report 2011*. Geneva: World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control 2011. *WHO Report 2011*. Geneva: World Health Organization, 2011a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Stop TB Partnership. Disponível em: <<http://www.stoptb.org/about/>>. Acesso em 05 de setembro de 2011b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis Fact sheet N°104. November 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>>. Acesso em 09 de set. de 2011c.

YANG, Z.; CHAVES, F.; BARNES, P. F.; BURMAN, W. J.; KOEHLER, J.; EISENACH, K. D.; BATES, J. H.; CAVE, M. D. Evaluation of Method for Secondary DNA Typing of Mycobacterium tuberculosis with pTBN12 in Epidemiologic Study of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 12, p. 3044–3048, 1996.

YEE, D.; VALIQUETTE, C.; PELLETIER, M.; PARISIEN, I.; ROCHER, I.; MENZIES, D. Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *American Journal in Respiratory Critical and Care Medicine*, v. 3, n. 167, p. 1472-1477, 2003.

ZAGER, E. M.; MCNERNEY, R. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*, v. 8, n. 10, 2008.

ZOCHE, T. L.; SILVA, R. M. Tuberculose no município de Tubarão nos anos de 2000 a 2006: estudo epidemiológico. *Pulmão*, v. 18, n. 2, p. 70-76, 2009.

10. Anexos

ANEXO1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: “Tuberculose e doença pulmonar causadas por micobactérias em indivíduos soropositivos ao HIV: epidemiologia molecular e avaliação de técnicas diagnósticas”

Eu, _____ confirmo que compreendi que:

1. O estudo acima intitulado refere-se a um projeto de pesquisa que visa melhorar o diagnóstico laboratorial da tuberculose com a utilização de um método molecular rápido e moderno chamado de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi-me explicado, também, que é muito importante fazer a identificação da espécie de bactéria que está me causando a tuberculose.
2. Estou ciente que coletarei uma amostra de escarro para ser utilizada no referido estudo e que esta amostra receberá uma numeração de forma que quando os resultados forem analisados e divulgados minha identidade não será revelada.
3. A amostra coletada é o escarro produzido espontaneamente e o procedimento de coleta não traz nenhum desconforto.
4. Confirmo ainda que entendi que esta amostra coletada não será utilizada para os exames de rotina solicitados pelo médico que está me atendendo, e que apenas é uma amostra que estou doando para pesquisa.
5. Mesmo que eu não me beneficie diretamente dos resultados da pesquisa estou ciente que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes.
6. Eu posso escolher participar ou não deste estudo. Minha decisão em participar desta pesquisa não implicará em quaisquer benefícios pessoais bem como não resultará em prejuízos pessoais.
7. Eu também sou livre para não participar desta pesquisa. Isto não implicará em quaisquer prejuízos pessoais. Coletando a amostra, eu estarei concordando em participar da pesquisa.
8. Todos os resultados dos testes laboratoriais feitos com a minha amostra serão sigilosos e somente serão utilizados para esta pesquisa.

9. A participação na pesquisa não gerará despesas pessoais, nem danos porque minha participação será apenas com a doação da amostra de escarro. Não será feita nenhuma intervenção no meu corpo.
10. Se eu tiver alguma dúvida a respeito, eu posso contatar a Professora Maria Luiza Bazzo pelos telefones 3721-8148 (Laboratório do Hospital Universitário).
11. Eu concordo em participar deste estudo.

Participante: _____

Data _____

Entrevistador: _____

Data _____

ANEXO 2. Regiões e municípios do Estado de Santa Catarina com isolamento de *M. tuberculosis* na população estudada.

Mesorregião do Estado de Santa Catarina	Município	Porcentagem de casos de TB no estudo
Vale do Itajaí	Ibirama	0,2% (1/406)
	Ilhota	0,2% (1/406)
	Ituporanga	0,2% (1/406)
	Mirim Doce	0,2% (1/406)
	Presidente Nereu	0,2% (1/406)
	Rodeio	0,2% (1/406)
	Tijucas	0,2% (1/406)
	Timbó	0,2% (1/406)
	Balneário de Piçarras	0,5% (2/406)
	Gaspar	0,5% (2/406)
	Penha	0,5% (2/406)
	Pomerode	0,5% (2/406)
	Barra Velha	1,0% (4/406)
	Itapema	1,0% (4/406)
	Brusque	1,5% (6/406)
	Balneário Camboriú	2,2% (9/406)
	Camboriú	2,5% (10/406)
	Navegantes	2,5% (10/406)
Blumenau	5,9% (24/406)	
Itajaí	14,0% (57/406)	
	34,5% (140/406)	
Grande Florianópolis	Paulo Lopes	0,2% (1/406)
	Canelinha	0,5% (2/406)
	Governador Celso Ramos	0,7% (3/406)
	Biguaçu	1,0% (4/406)
	São João Batista	2,0% (8/406)
	São Pedro de Alcântara	2,2% (9/406)
	Palhoça	3,0% (12/406)
	São José	4,2% (17/406)
	Florianópolis	19,2% (78/406)
	33,0% (134/406)	

continuação

Nordeste Catarinense		
	Itaiópolis	0,2% (1/406)
	Massaranduba	0,2% (1/406)
	Monte Castelo	0,2% (1/406)
	Papanduva	0,2% (1/406)
	Araquari	0,5% (2/406)
	Garuva	0,7% (3/406)
	São Francisco do Sul	1,7% (7/406)
	Joinville	15,3% (62/406)
		19,2% (78/406)
Sul Catarinense		
	Araranguá	0,2% (1/406)
	Capivari de Baixo	0,2% (1/406)
	Criciúma	6,4% (26/406)
	Garopaba	0,2% (1/406)
	Imbituba	0,2% (1/406)
	Laguna	1,0% (4/406)
	Lauro Muller	0,5% (2/406)
	Tubarão	0,7% (3/406)
	Urussanga	0,2% (1/406)
		9,9% (40/406)
Oeste Catarinense		
	Água Doce	0,2% (1/406)
	Anchieta	0,2% (1/406)
	Capinzal	0,2% (1/406)
	Fraiburgo	0,2% (1/406)
	Herval D'Oeste	0,2% (1/406)
	Joaçaba	0,2% (1/406)
	São Miguel do Oeste	0,2% (1/406)
	Chapecó	1,0% (4/406)
		2,7% (11/406)
Serra Catarinense		
	Lages	0,7% (3/406)
		0,7% (3/406)
Total:100% (406)		

ANEXO 3. Spoligotypes da Família LAM descritos no SpolDB4 e identificados em Santa Catarina

Subclasses da Família LAM	SIT	Distribuição geográfica mundial	Nº de isolados (SpolDB4)	Região	Município	Nº isolados (%)
LAM1	20	ARG, AUS, AUT, BEL, BRA , CMR, CUB, DEU, ECU, ESA, EST, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, IDN, LBY, MEX, MOZ, MWI, NAM, NLD, PER, PHL, PRT, RUS, SWE, USA, VEN, VNM, ZAF, ZWE	582	Grande FLN Vale do Itajaí	Florianópolis Blumenau	1 (0,2%) 1 (0,2%)
	729	BRA , HTI, GLP, ZAF	6	Grande FLN Sul Vale do Itajaí	Florianópolis Criciúma Blumenau	1 (0,2%) 2 (0,5%) 1 (0,2%) 6 (1,5%)
LAM2	17	ARG, BRA , CMR, CUB, CZE, ESA, FXX, GLP, GUF, HTI, MEX, MTQ, MYS, NAM, NLD, PHL, PRT, USA, VEN	468	Grande FLN Nordeste Oeste	Florianópolis Governador Celso Ramos São João Batista São José Joinville São Miguel do Oeste	2 (0,5%) 1 (0,2%) 1 (0,2%) 1 (0,2%) 5 (1,2%) 1 (0,2%)

continuação

LAM2	17	ARG, BRA , CMR, CUB, CZE, ESA, FXX, GLP, GUF, HTI, MEX, MTQ, MYS, NAM, NLD, PHL, PRT, USA, VEN	468	Sul	Barra Velha	1 (0,2%)
				Vale do Itajaí	Criciúma	2 (0,5%)
					Blumenau	1 (0,2%)
					Itajaí	2 (0,5%)
					Tubarão	1 (0,2%)
					Grande FLN	Florianópolis
179	BRA , GUF, PRT, USA	13	Vale do Itajaí	Ituporanga	1 (0,2%)	
166 1	BRA , VEN	4	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)	
169 1	MEX, PRT, VEN, ZAF	18	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)	
						23 (5,7%)
LAM3	33	ARC, ARG, BEL, BGD, BRA , CUB, ESA, ESA, FIN, FRB, FXX, GMB, GUF, ITA, LB Y, MDG, MEX, MOZ, NLA, PER, PRT, SWE, USA, VEA, VEN, ZAA, ZAF	609	Grande FLN	Florianópolis	2 (0,5%)
				Nordeste	Araquari	1 (0,2%)
				Vale do Itajaí	Blumenau	1 (0,2%)
					Ilhota	1 (0,2%)
					Itajaí	2 (0,5%)
130	AUT, BEL, BRA , CUB, ESA, ITA, MDG, NLA, USA, ZAF	69	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)	
211	ARG, BRA , ESA, FXX, MDG, MEX, PRT, USA, ZAF	62	Nordeste	Joinville	2 (0,5%)	
						10 (2,5%)

continuação

LAM5	93	ARG, AUS, BEL, BRA , DEU, ESA, ESA, FXX, GLP, GUF, HTL, ITA, TWN, USA, VEA, VEM, ZAF	254	Grande FLN Nordeste Serra Vale do Itajaí	Florianópolis	3 (0,7%)
					São João Batista	1 (0,2%)
					São José	1 (0,2%)
					São Pedro de Alcântara	2 (0,5%)
					Joinville	2 (0,5%)
					Lages	1 (0,2%)
					Balneário Camboriú	1 (0,2%)
					Barra Velha	1 (0,2%)
					Blumenau	1 (0,2%)
					Navegantes	1 (0,2%)
Itajaí	1 (0,2%)					
					15 (3,7%)	
LAM6	64	ARC, ARG, AUS, AUT, BEL, BRA , COM, CZE, DZA, FRB, GBB, GMB, GUF, IND, ITA, MDG, MEX, MTQ, MWI, MYS, NLA, PRT, SEN, USA, VEN	232	Grande FLN Grande FLN Nordeste Oeste	Governador Celso Ramos	1 (0,2%)
					Florianópolis	8 (2,0%)
					Palhoça	3 (0,7%)
					São João Batista	1 (0,2%)
					São José	1 (0,2%)
					Joinville	2 (0,5%)
Joaçaba	1 (0,2%)					

continuação

LAM6	64	ARC, ARG, AUS, AUT, BEL, BRA , COM, CZE, DZA, FRB, GBB, GMB, GUF, IND, ITA, MDG, MEX, MTQ, MWI, MYS, NLA, PRT, SEN, USA, VEN	232	Sul	Criciúma	1 (0,2%)
				Vale do Itajaí	Blumenau	1 (0,2%)
					Camboriú	1 (0,2%)
					Itajaí	3 (0,7%)
					Navegantes	1 (0,2%)
24 (5,9%)						
LAM9	42	ARC, ARG, ARM, AUS, AUT, AZE, BEL, BGD, BRA , CAF, CMR, CUB, CZE, DEU, DZA, EGY, ESA, EST, ETH, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, IDN, IND, IRN, ITA, KAZ, KEN, LBY, LVA, MAR, MDG, MEX, MOZ, MTQ, MWI, MYS, NLD, NZL, PER, PHL, POL, PRT, PYF, RUS, SAL, SEM, SWE, THA, TUN, TUR, USA, VEM, VNM, ZAF, ZWE	1507	Grande FLN	Florianópolis	4 (1,0%)
					Palhoça	2 (0,5%)
					São João Batista	1 (0,2%)
					São José	2 (0,5%)
				Nordeste	Joinville	6 (1,5%)
				Oeste	Chapecó	1 (0,2%)
				Sul	Capivari de Baixo	1 (0,2%)
					Criciúma	9 (2,2%)
					Lauro Müller	2 (0,5%)
				Vale do Itajaí	Barra Velha	1 (0,2%)
					Blumenau	1 (0,2%)
					Camboriú	1 (0,2%)
					Gaspar	2 (0,5%)
					Itajaí	3 (0,7%)
					Navegantes	1 (0,2%)
	Pomerode	2 (0,5%)				

continuação

LAM9	150	ARG, BEL, BRA , DZA, EGY, FIN, FXX, GUF, ITA, MAR, MEX, PRT, RUS, VEM, ZAF	72	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
	162	ARG, FIN, FXX, GMB, ITA, USA, VEA, VEN	16	Grande FLN	São José	1 (0,2%)
	177	ARG, BRA , EGY, ESA, FXX, GUF, ITA, MYS, TWN, USA, VEN, ZAF	44	Grande FLN Sul	Biguaçu Urussanga	1 (0,2%) 1 (0,2%)
				Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
					São José	1 (0,2%)
				Nordeste	Garuva	1 (0,2%)
					Joinville	2 (0,5%)
				Oeste	Anchieta	1 (0,2%)
	216	ARG, BRA , ITA, USA, VEN	13	Vale do Itajaí	Chapecó	2 (0,5%)
					Blumenau	2 (0,5%)
					Brusque	1 (0,2%)
					Camboriú	1 (0,2%)
					Itajaí	7 (1,7%)
					Navegantes	1 (0,2%)
	388	BRA , DZA, JPN, RUS, USA, VEN	21	Grande FLN	Canelinha	1 (0,2%)
	822	BGD, BGR, BRA , GLP, USA	12	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
				Grande FLN	Florianópolis	2 (0,5%)
LAM9	866	BRA , FXX, GNB, ITA, USA, VEN	32	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
				Oeste	Capinzal	1 (0,2%)
				Vale do Itajaí	Itajaí	1 (0,2%)

continuação

				Nordeste	Itaiópolis	1 (0,2%)
	1076	BRA , IND, MOZ, RUS, USA	7	Vale do Itajaí	Monte Castelo	1 (0,2%)
LAM9					Camboriú	4 (1,0%)
					Itajaí	1 (0,2%)
	1844	ARG, ZAF	5	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
	1933	ITA, USA	2	Vale do Itajaí	Blumenau	1 (0,2%)
					Penha	2 (0,5%)
						81 (20,0%)
LAM1- LAM4	1321	ARG, BRA , GUF, IND, NLA, PRT, USA	11	Nordeste	São Francisco do Sul	1 (0,2%)
						1 (0,2%)
LAM11_ ZWE	59	AUT, BEL, BRA , COM, DNK, FXX, GLP, GRC, ITA, KEN, MDG, MUS, MWI, NZL, PRT, REU, RUS, SWE, TZA, USA, ZAF, ZMB, ZWE	356	Grande FLN	Paulo Lopes	1 (0,2%)
						Total: 1
LAM3 e S/ Convergent	4	ARG, AUT, BEL, BGD, BGR, BRA , CAN, DEU, FIN, FXX, BGD, GLP, GRC, GUF, HTI, ITA, KEN, LBY, MAR, MTQ, MWI, NLA, NOR, POL, PRT, RUS, SAU, SDE, TUR, TZA, USA, VEM, ZAF, ZMB	204	Grande FLN Sul	Florianópolis	1 (0,2%)
					Criciúma	1 (0,2%)
						2 (0,5%)
						Total: 163 (40,1%)

ANEXO 4. *Spoligotypes* da Família T descritos no SpolDB4 e identificados em Santa Catarina

Subclasses da Família T	SIT	Distribuição geográfica mundial	Nº de isolados no SpolDB4	Região	Município	Nº isolados (%)
T1	51	ARG, AUS, AUT, BEL, BRA , CHN, FXX, GBR, GLP, GUF, HTI, ITA, JPN, MDG, MEX, MYS, NLD, PRT, SWE, TUR, USA, VEN, VNM	186	Grande FLN Nordeste	Florianópolis	1 (0,2%)
					Massaranduba	1 (0,2%)
					Joinville	1 (0,2%)
	53	ITA, JPN, KAZ, KEN, LBY, LVA, MAR, MDG, MEX, MNG, MOZ, MTQ, MWI, MYS, NAM, NLD, NOR, NZL, PAK, PER, POL, PRT, REU, ROM, RUS, SAL, SDN, SEM, SUR, SWE, THA, TUR, USA, VEM, VNM, ZAF, ZMB, ZWE	2450	Grande FLN Nordeste Sul Vale do Itajaí	Florianópolis	2 (0,5%)
					Biguaçu	1 (0,2%)
					Garuva	1 (0,2%)
					Joinville	4 (1,0%)
					São Francisco do Sul	1 (0,2%)
					Criciúma	4 (1,0%)
					Laguna	1 (0,2%)
					Tubarão	1 (0,2%)
					Balneário Camboriú	1 (0,2%)
					Balneário de Piçarras	1 (0,2%)
Blumenau	1 (0,2%)					
Navegantes	1 (0,2%)					
Presidente Nereu	1 (0,2%)					

continuação

T1	244	ARG, BEL, BGD, BRA , FXX, GNB, HTI, IND, MDG, NLA, PRT, USA, ZAF, ZIM	76	Nordeste Vale do Itajaí	Joinville Itajaí	1 (0,2%) 1 (0,2%)
	370	AUT, BRA , EST, SWE, USA	16	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
	373	AUT, BEL, BRA , CZE, FIN, FXX, GRC, ITA, NLA, USA, ZAF	32	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
	453	BRA , ESA, GUF, PRT, SWE, USA	10	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
	823	BRA , DEU, FIN, ITA, USA	12	Grande FLN Vale do Itajaí	Florianópolis Itajaí	1 (0,2%) 2 (0,5%)
	1202	BRA , LBY, MDG	4	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
	1223	ESA, MDG, USA	4	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
						33 (8,1%)
T1 (T4-CE1 ancestor?)	65	AUT, BEL, BRA , CMR, CZE, DEU, DZA, ESA, FXX, GLP, GUF, HTI, KAZ, MTQ, SWE, USA, ZAF	86	Grande FLN Vale do Itajaí	Florianópolis	4 (1,0%)
					São José	2 (0,5%)
					Blumenau	1 (0,2%)
					Camboriú	1 (0,2%)
					Itajaí	1 (0,2%)
					Navegantes	1 (0,2%)
		10 (2,5%)				
T2	52	ARM, AUS, AUT, BEA, BEL, BRA , CAF, CAN, CHN, CIV, CMR, COA, CUB, CZA, CZE, DEU, DNK, DZA, ESA, ESA, ETH, FIN, FXX, GBR, GLP, HUN, IND, ITA, JPN, KEN, MDG, MEX, MTQ, MYS, NLA, NOR, NZL, PAK,L, ROM, RUS, SAL, SWE, THA, TUR	496	Vale do Itajaí	Itajaí	1 (0,2%)

continuação

T2	153	AUT, BRA , CUB, ETH, FIN, ITA, NLA, SWE, USA	45	Grande FLN	São João Batista	1 (0,2%)
	392	ARG, BRA	5	Sul	Araranguá	1 (0,2%)
1664		BRA	3	Grande FLN	Florianópolis	2 (0,5%)
					São Pedro de Alcântara	1 (0,2%)
				Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
						7 (1,7%)
T2-T3	73	AUS, AUT, BEL, BRA, EGY, FIN, FXX, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, IDN, ITA, MDG, MEX, MOZ, MTQ, NLD, PRT, SWE, USA, VEN, VNM, ZWE	162	Grande FLN	Florianópolis	5 (1,2%)
					Governador Celso Ramos	1 (0,2%)
					São João Batista	1 (0,2%)
					São José	3 (0,7%)
				Nordeste	Joinville	3 (0,7%)
				Sul	Imbituba	1 (0,2%)
				Vale do Itajaí	Balneário Camboriú	1 (0,2%)
					Blumenau	3 (0,7%)
					Brusque	1 (0,2%)
					Itajaí	14 (3,4%)
	Tijucas	1 (0,2%)				
						34 (8,4%)
T3	37	AUS, AUT, BEL, BRA , CAN, CHN, CIV, CUB, CZE, DEU, DNK, DZA, EST, ETH, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GUF, HTI, IDN, IRN, ITA, LBY, LVA, MDG, NLD, NZL,PAK, POL., SAU, SWE, THA, TUR, USA, VEN, ZWE	212	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
				Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
				Sul	Criciúma	1 (0,2%)
				Vale do Itajaí	Blumenau	1 (0,2%)
					Itajaí	2 (0,5%)

continuação

T3	157	BRA , DEU, ITA, PRT, SAL	21	Oeste	Água Doce	1 (0,2%) 7 (1,7%)
T4-CEU1	39	ARM, AUT, BEL, CZE, DEU, FXX, GBR, ITA, NLD, POL, USA, VNM, ZAF	112	Grande FLN	Florianópolis	2 (0,5%) 2 (0,5%)
T5	44	ARG, AUS, AUT, BEL, BRA , CMR, CZE, DEU, DNK, EGY, ESA, EST, FIN, FXX, GBR, GLP, GUF, IDN, IND, ITA, NLD, POL, PRT, USA, VEN, ZAF, ZWE	159	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%) 1 (0,2%)
T5_RUS1	254	AUT, AZE, BEL, BRA , DEU, DNK, ESA, FIN, FXX, GEO, ITA, KAZ, RUS, LVA, NLD, POL, RUS, TWN, TZA, USA, ZAF	116	Nordeste	Joinville	1 (0,2%) 1 (0,2%)
						Total: 95 (23,4%)

Grande FLN (Grande Florianópolis)

ANEXO 5. *Spoligotypes* da Família H descritos no SpolDB4 e identificados em Santa Catarina

Subclasses da Família H	SIT	Distribuição geográfica mundial	Nº de isolados no SpolDB4	Região	Município	Nº isolados (%)
H1	47	ARG, ARM, AUS, AUT, AZE, BEL, BGD, BRA , CAF, CAN, CMR, CUB, CZE, DEU, DNK, ESA, EST, FIN, FXX, GBR, GLP, GNB, GUF, HTI, HUN, IND, ITA, MAR, MDG, MEX, NLA, NLD, POL, PRT, ROM, RUS, SAL, SEN, SWE, TUR, USA, VEN, ZWE	743	Nordeste	São Francisco do Sul	1 (0,2%)
					Brusque	2 (0,5%)
				Vale do Itajaí	Itajaí	1 (0,2%)
						4 91,0%
H3	3	ARG, AUT, BRA , CUB, FXX, GLP, HTI, ITA, MEX, NLA, POL, SUR, USA, VEA, ZAF	83	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
				Grande FLN	Florianópolis	3 (0,7%)
	50	ARG, ARM, AUS, AUT, BEL, BOL, BRA , CAF, CHN, CIV, CMR, COM, CUB, CZE, DEU, DNK, DZA, EAFR, ESA, EST, FIN, FXX, GBR, GEO, GLP, GNB, GUF, HTI, HUN, IDN, IND, ITA, JPN, KEN, LBY, MAR, MDG, MEX, MTQ, MYS, NLD, NZL, PAK, PER, POL, PRT, REU, ROM, RUS, SDN, SEM, SWE, THA, TUR, USA, VEM, VNM, ZAF	1403	Nordeste	São João Batista	1 (0,2%)
					São José	3 (0,7%)
					Joinville	11 (2,7%)
					São Francisco do Sul	2 (0,5%)
Oeste	Herval D'Oeste	1 (0,2%)				
Sul	Criciúma	1 (0,2%)				

continuação							
H3-T3	36	ARG, AUS, AUT, BEL, BGR, BRA , CZE, DEU, FIN, FXX, GMB, GRC, GUF, ITA, LBY, MTQ, NLA, POL, TUR, USA, VEN, ZAF,	74	Oeste Vale do Itajaí	Chapecó	1 (0,2%)	
					Ibirama	1 (0,2%)	
					Blumenau	1 (0,2%)	
					3 (0,7%)		
H4	777	ARM, BGR, BRA , FIN, GEO, KAZ, NLA, RUS, SAU, SWE, TUR, USA	23	Vale do Itajaí	Mirim Doce	1 (0,2%)	
					1 (0,2%)		
						Total: 52 (12,8%)	
Grande FLN (Grande Florianópolis)							

ANEXO 6. *Spoligotypes* da Família U descritos no SpolDB4 e identificados em Santa Catarina

Subclasses da Família U	SIT	Distribuição geográfica mundial	Nº de isolados no SpolDB4	Região	Município	Nº isolados (%)
U	124	AUT, BEL, BRA , DEU, FIN, FXX, GLP, IND, NLA, RUS, TWN, USA	32	Vale do Itajaí	Itajaí	1 (0,2%)
	396	BRA , ITA, PRT	10	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
	450	BRA , CMR, CZE, DNK, FXX, ITA, MEX, NLA, USA	70	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
	534	BRA , ESA, GNB	9	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
	780	FXX, ZWE	6	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
	825	AUT, BRA , GBB, USA	5	Vale do Itajaí	Itajaí	1 (0,2%)
	956	BRA , USA	7	Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
	175 8	BRA , PRT	8	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
						8 (2,0%)
U (LAM3?)	106	ARG, AUS, BEL, BRA , DZA, ESA, FXX, REU, USA, VEN	60	Grande FLN	Florianópolis	1 (0,2%)
				Nordeste	Joinville	1 (0,2%)
				Sul	Criciúma	1 (0,2%)
				Vale do Itajaí	Barra Velha	1 (0,2%)
					Brusque	1 (0,2%)
						5 (1,2%)

continuação

U (likely H3)	237	AUT, BEL, BRG, BRA , CMR, DEU, FIN, FXX, GBR, GUF, IDN, ITA, MDG, POL, PRT, RUS, SWE, USA, ZAF	85	Vale do Itajaí	Balneário Camboriú	1 (0,2%)
						1 (0,2%)
U (likely LAM)	29	ESA, FXX, GLP, PRT, USA	32	Sul	Criciúma	1 (0,2%)
						1 (0,2%)
						Total: 15 (3,7%)

Grande FLN (Grande Florianópolis)

ANEXO 7. *Spoligotypes* da Família X descritos no SpolDB4 e identificados em Santa Catarina

Subclasses da Família X	SIT	Distribuição geográfica mundial	Nº de isolados no SpolDB4	Região	Município	Nº isolados (%)
X1	119	AUT, BEL, BGR, BRA , CAN, DNK, ESA, FIN, FXX, GBR, GRC, HTI, IND, ITA, LVA, MEX, MTQ, MWI, NLA, NLD, NOR, RUS, SWE, TUR, USA, ZAF, ZWE	918	Grande FLN Nordeste	São João Batista	1 (0,2%)
					Araquari	1 (0,2%)
				Sul	Garuva	1 (0,2%)
					Laguna	1 (0,2%)
				Vale do Itajaí	Itapema	1 (0,2%)
						5 (1,2%)
X2	137	AUS, BEL, BGD, BRA , BRB, CAN, CMR, DNK, ESA, ESC, ESA, FXX, GBR, GUF, HTI, ITA, LBY, MEX, MYS, NLA, NLD, SAU, SWE, USA, ZAF, ZMB	940	Grande FLN Vale do Itajaí	Palhoça	2 (0,5%)
					Navegantes	1 (0,2%)
	886	USA	1	Grande FLN	Palhoça	1 (0,2%)
						4 (1,0%)
X3	92	ARG, AUS, AUT, BGD, BRA , CUB, DNK, GBR, GNB, GUF, IND, ITA, MEX, MWI, NLA, NOR, NZL, NZL, TUR, TWN, USA, ZAF, ZMB, ZWE	325	Grande FLN	Florianópolis	2 (0,5%)
						2 (0,5%)
						Total: 11 (2,7%)

Grande FLN (Grande Florianópolis)

ANEXO 8. *Spoligotypes* da Família S descritos no SpolDB4 e identificados em Santa Catarina

Subclasses da Família S	SIT	Distribuição geográfica mundial	Nº de isolados no SpolDB4	Região	Município	Nº isolados (%)
S	34	ARG, AUS, AUT, BEL, BGR, BRA , CAN, CUB, DEU, DZA, EGY, FIN, FXX, GBB, GBR, GEO, GLP, GRC, GUF, HTI, IDN, IND, IRN, ITA, KEN, LBY, MAR, MDG, MEX, MOZ, MWI, NLA, NZL, PRT, REU, SAL, SWE, THA, TUR, USA, VEN, VNM, ZAA, ZAF, ZMB	584	Sul	Criciúma	3 (0,7%)
		Garopaba			1 (0,2%)	
					Laguna	2 (0,5%)
	71	ARG, BEL, CAN, CUB, FXX, IND, ITA, NLA, USA, VEN, ZAF	62	Oeste	Fraiburgo	1 (0,2%)
Total : 7 (1,7%)						

ANEXO 9. *Spoligotype* da Família BOVIS descrito no SpoIDB4 e identificados em Santa Catarina

Subclasses da Família BOVIS	SIT	Distribuição geográfica mundial	Nº de isolados no SpoIDB4	Região	Município	Nº isolados (%)
BOVIS1_BCG	482	ARG, AUT, BEA, BEL, BRA , CZE, DEU, DNK, ESC, ESA, FRB, FXX, GBA, GBR, GLP, GUF, IRB, ITA, MEX, NAM, NLA, NOR, NZL, PRT, RUS, SAU, SWE, TWN, USA, VEN, ZAA, ZAF, ZMB	653	Nordeste	Papanduva	1
Total:						1 (0,2%)

ANEXO 10. *Spoligotypes* não descritos no banco internacional SpolDB4 e identificados em Santa Catarina

<i>Spoligotype</i>	% Similaridade/ Subfamília	Região	Município	TSA	Nº isolados (%)
Unk1	77% H3, 23% T1	Serra	Lages	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk2	51% H3, 33% LAM9, 15% T1	Grande FLN	Palhoça	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk3	99% T1	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk4	99% LAM9	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%)
			São Pedro de Alcântara	S	1 (0,2%)
		Nordeste Vale do Itajaí	São Francisco do Sul	S	1 (0,2%)
			Balneário Camboriú	S	2 (0,5%)
			Blumenau	S	1 (0,2%)
			Itajaí	S	1 (0,5%)
			Navegantes	S	2 (0,2%)
9 (2,2%)					
Unk5	99% LAM9	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk6	99% LAM9	Vale do Itajaí	Balneário Camboriú	S	1 (0,2%)
			Blumenau	S	1 (0,2%)
			Itajaí	S	2 (0,5%)
4 (1,0%)					
Unk7	99% LAM8	Grande FLN	São Pedro de Alcântara	S	3 (0,7%) 3 (0,7%)
Unk8	98% H37Rv	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)

continuação

Unk9	99% LAM9	Grande FLN	São Pedro de Alcântara	S	1 (0,2%)
		Vale do Itajaí	Blumenau	S	1 (0,2%)
					2 (0,5%)
Unk10	99% LAM8	Vale do Itajaí	Navegantes	S	1 (0,2%)
					1 (0,2%)
Unk11	99% T1	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%)
					1 (0,2%)
Unk12	99% T1	Nordeste	Joinville	S	1 (0,2%)
					1 (0,2%)
Unk13	99% H1	Vale do Itajaí	Itapema	S	1 (0,2%)
					1 (0,2%)
Unk14	---	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%)
					1 (0,2%)
Unk15	---	Grande FLN	São José	S	1 (0,2%)
					1 (0,2%)
Unk16	99% LAM9	Nordeste	Joinville	S	1 (0,2%)
					1 (0,2%)
Unk17	99% LAM9	Nordeste	Joinville	S	1 (0,2%)
					1 (0,2%)
Unk18	99% LAM7	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%)
		Nordeste	Joinville	S	2 (0,5%)
					3 (0,7%)
Unk19	98% LAM9	Grande FLN	São Pedro de Alcântara	S	1 (0,2%)
			São José	S	1 (0,2%)
					2 (0,5%)
Unk20	99% EAI1	Vale do Itajaí	Blumenau	S	1 (0,2%)
					1 (0,2%)

continuação					
Unk21	99% LAM9	Grande FLN	Palhoça	MD R	1 (0,2%)
		Nordeste	Joinville	MD R	2 (0,5%)
			São Francisco do Sul	MD R	1 (0,2%)
					4 (1,0%)
Unk22	99% LAM9	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk23	99% LAM9	Vale do Itajaí	Blumenau	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk24	99% LAM9	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk25	93% LAM10	Grande FLN	Palhoça	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk26	82% LAM2, 11% LAM1	Grande FLN Vale do Itajaí	Florianópolis Blumenau	S	1 (0,2%)
				S	2 (0,5%)
					3 (0,7%)
Unk27	---	Vale do Itajaí	Brusque	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk28	99% LAM9	Nordeste	Joinville	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
continuação					
Unk29	54% LAM1, 46% LAM9	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)
Unk30	99% EAI3	Grande FLN	Florianópolis	S	1 (0,2%) 1 (0,2%)

continuação

Unk31	54% LAM1,	Vale do	Balneário Piçarras	S	1 (0,2%)
	46% LAM9	Itajaí	Blumenau	S	1 (0,2%)
					2 (0,5%)
					Total: 54 (13,3%)

Grande FLN (Grande Florianópolis), S (sensível a rifampicina, isoniazida, etambutol e dihidroestreptomicina), MDR (resistente a rifampicina e isoniazida)

Anexo 11. Siglas e países

Sigla	País	Sigla	País
ABW	Aruba	CHL	Chile
AFG	Afeganistão	CHN	China
AGO	Angola	CIV	Costa do Marfim
AIA	Anguilla	CMR	Camarões
ALB	Albânia	COG	Congo
AND	Andorra	COK	Ilhas Cook
ANT	Antilhas Holandesas	COL	Colômbia
ARE	Emirados Árabes Unidos	COM	Ilhas Comores
ARG	Argentina	CPV	Cabo Verde
ARM	Armênia	CRI	Costa Rica
ASM	Samoa Ocidental	CUB	Cuba
ATA	Antártida Territórios do Sul da	CXR	Ilha Natal
ATF	França	CYM	Ilhas Cayman
ATG	Antígua e Barbuda	CYP	Chipre
AUS	Austrália	CZE	República Tcheca
AUT	Áustria	DEU	Alemanha
AZE	Azerbaijão	DJI	Djibuti
BDI	Burundi	DMA	Dominica
BEL	Bélgica	DNK	Dinamarca
BEN	Benin	DOM	República Dominicana
BFA	Burkina Fasso	DZA	Argélia
BGD	Bangladesh	ECU	Equador
BGR	Bulgária	EGY	Egito
BHR	Bahrein	ERI	Eritreia
BHS	Bahamas	ESA	Espanha
BIH	Bósnia-Herzegóvina	ESH	Saara Ocidental
BLR	Belarus	EST	Estônia
BLZ	Belize	ETH	Etiópia

BMU	Bermudas	FIN	Finlândia
BOL	Bolívia	FJI	Fiji
BRA	Brasil	FLK	Ilhas Falkland (Malvinas)
BRB	Barbados	FRA	França
BRN	Brunei	FRO	Ilhas Faeroes
BTN	Butão	FSM	Micronésia
BVT	Ilha Bouvet	FXX	França Metropolitana
BWA	Botsuana	GAB	Gabão
CAF	República Centro- Africana	GBR	Grã-Bretanha (Reino Unido, UK)
CAN	Canadá	GEO	Geórgia
CCK	Ilhas Cocos	GHA	Gana
CHE	Suíça	GIB	Gibraltar
GIN	Guiné	LCA	Santa Lúcia
GLP	Guadalupe	LIE	Liechtenstein
GMB	Gâmbia	LKA	Sri Lanka
GNB	Guiné-Bissau	LSO	Lesoto
GNQ	Guiné Equatorial	LTU	Lituânia
GRC	Grécia	LUX	Luxemburgo
GRD	Granada	LVA	Látvia
GRL	Groelândia	MAC	Macau
GTM	Guatemala	MAR	Marrocos
GUF	Guiana Francesa	MCO	Mônaco
GUM	Guam (Território dos Estados Unidos)	MDA	Moldova
GUY	Guiana	MDG	Madagascar
HKG	Hong Kong	MDV	Maldivas
HMD	Ilhas Heard e McDonald	MEX	México
HND	Honduras	MHL	Ilhas Marshall
HRV	Croácia (Hrvatska)	MKD	Macedônia
HTI	Haiti	MLI	Mali
HUN	Hungria	MLT	Malta

IDN	Indonésia	MMR	Myanma
IND	Índia	MNG	Mongólia
IOT	Território Britânico do Oceano Índico	MNP	Ihas Marianas do Norte
IRL	Irlanda	MOZ	Moçambique
IRN	Irã	MRT	Mauritânia
IRQ	Iraque	MSR	Montserrat
ISL	Islândia	MTQ	Martinica
ISR	Israel	MUS	Maurício
ITA	Itália	MWI	Malawi
JAM	Jamaica	MYS	Malásia
JOR	Jordânia	MYT	Mayotte
JPN	Japão	NAM	Namíbia
KAZ	Cazaquistão	NCL	Nova Caledônia
KEN	Kênia	NER	Níger
KGZ	Quirguistão	NFK	Ilhas Norfolk
KHM	Camboja	NGA	Nigéria
KIR	Kiribati	NIC	Nicarágua
KNA	São Cristóvão e Névis	NIU	Niue
KOR	Coreia do Sul	NLA	Equador
KWT	Kuait	NLD	Holanda
LAO	Laos	NOR	Noruega
LBN	Líbano	NPL	Nepal
LBR	Libéria	NRU	Nauru
LBY	Líbia	NZL	Nova Zelândia
OMN	Omã	TGO	Togo
PAK	Paquistão	THA	Tailândia
PAN	Panamá	TJK	Tadjiquistão
PCN	Ilha Pitcairn	TKL	Ilhas Tokelau
PER	Peru	TKM	Turcomenistão
PHL	Filipinas	TMP	Timor Leste

PLW	Palau	TON	Tonga
PNG	Papua-Nova Guiné	TTO	Trinidad and Tobago
POL	Polônia	TUN	Tunísia
PRI	Porto Rico	TUR	Turquia
PRK	Coréia do Norte	TUV	Tuvalu
PRT	Portugal	TWN	Taiwan
PRY	Paraguai	TZA	Tanzânia
PYF	Polinésia Francesa	UGA	Uganda
QAT	Qatar	UKR	Ucrânia
REU	Ilha Reunião	UMI	Ilhas Menores - Estados Unidos
ROM	Romênia	URY	Uruguai
RUS	Federação Russa	USA	Estados Unidos
RWA	Ruanda	UZB	Uzbequistão
SAU	Arábia Saudita	VAT	Vaticano
SDN	Sudão	VCT	Saint Vincent e Granadinas
SEN	Senegal	VEN	Venezuela
SGP	Cingapura	VGB	Ilhas Virgens (Inglaterra)
SGS	Ilhas Geórgia do Sul e Sandwich do Sul	VIR	Ilhas Virgens (Estados Unidos)
SHN	Santa Helena	VNM	Vietnã
	Ilhas Svalbard e Jan Mayen	VUT	Vanuatu
SJM	Mayen	WLF	Ilhas Wallis e Futuna
SLB	Ilhas Solomão	WSM	Samoa Ocidental
SLE	Serra Leoa	YEM	Iêmen
SLV	El Salvador	YUG	Iugoslávia
SMR	San Marino	ZAF	África do Sul
SOM	Somália	ZAR	Zaire
SPM	St. Pierre and Miquelon	ZMB	Zâmbia
STP	São Tomé e Príncipe	ZWE	Zimbábue
SUR	Suriname		
SVK	Eslováquia		

SVN	Eslovênia
SWE	Suécia
SWZ	Suazilândia
SYC	Ilhas Seychelles
SYR	Síria
TCA	Ilhas Turks e Caicos
TCD	Chade

Anexo 12. Artigo aceito para publicação



From: tms1@cdc.gov
To: nogueira.chris@gmail.com
CC: tms1@cdc.gov, ijtd@theunion.org
Subject: IJTLD - Dedsion on Manuscript ID IJTLD-09-11-0644.R2
Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Miss Christiane Nogueira

Thank you for sending us the revised version of your article entitled

"Alternative sputum treatment to improve the PCR assay for Mycobacterium tuberculosis detection" (Original Article)

and your reply to the reviewers' comments.

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in one of the forthcoming issues of the IJTLD, subject to the usual editorial revisions.

Your article will be checked before being prepared for publication, and you will be contacted by the Editorial Office if there are any elements missing.

If you have any queries, please contact the Editorial Office at ijtd@theunion.org. Remember to include the IJTLD number of your accepted manuscript in the subject line of your e-mail.

With kind regards,

Sincerely,

Dr. Thomas Shinnick
 Associate Editor
 IJTLD

Please note:

1. A signed copyright form must be supplied for all listed authors. If these have not already been uploaded during the submission process, please e-mail the signed, scanned forms directly to the Editorial Office. No article can be published until all signed forms have been provided.
2. Articles must comply in terms of length with journal requirements for their submission category, otherwise authors may be asked to make modifications before their article can be published. As of 1 July 2011, authors whose articles are over length (e.g., over 6 pp for original articles) will incur charges of 200€/page (in lieu of 100€/page previously).

The IJTLD Copyright form and Instructions to Authors can be viewed on the ScholarOne Manuscripts website <http://mc.manuscriptcentral.com/ijtd> or on the Union website (<http://www.theunion.org>).

Date Sent: 29-Nov-2011

**Alternative sputum treatment to improve the PCR assay for
Mycobacterium tuberculosis detection**

Running Read: **Sputum treatment to tuberculosis PCR assay**

Christiane Lourenço Nogueira¹, Letícia Muraro Wildner¹, Simone Gonçalves Senna¹, Darcita Rovaris³, Mônica Ferreira Gruner⁴, André Ricardo Jakimiu¹, Rosemeri Maurici da Silva^{1,2}, Maria Luiza Bazzo¹.

1. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

2. Universidade do Sul da Santa Catarina – UNISUL

3. Laboratório Central do Estado de Santa Catarina – LACEN/SC

4. Hospital Nereu Ramos – HNR

Summary

BACKGROUND: Tuberculosis, one of the major airborne infectious bacterial diseases, remains a major worldwide health problem. It is estimated that there are about 1,700 new cases per year in Santa Catarina State, Brazil. **OBJECTIVE:** In order to improve the PCR sensitivity for detection of *M. tuberculosis* in sputum samples, this study proposed the use of glass beads as a modification in a routine protocol for sputum treatment that was used in the Laboratory of Molecular Biology and Mycobacteria at the Federal University of Santa Catarina, Brazil. **METHODS:** The study comprised 120 sputum samples, 60 of which were treated with the routine protocol, and 60 were treated with the modified protocol using glass beads. **RESULTS:** The samples treated with the routine protocol showed 56.7% (95% CI: 44.1-69.2) of sensitivity in 16S rRNA PCR and 81.7% (95% CI: 71.9-91.5) in IS6110 PCR, when compared with the culture. The samples treated with the modified protocol showed 73.3% (95% CI: 62.1-84.5) of sensitivity in 16S rRNA PCR and 100% of sensitivity in IS6110 PCR. **CONCLUSION:** These results showed that the modified protocol using glass beads has greatly improved the mycobacteria detection in sputum samples when comparing with the routine protocol.

Key words: tuberculosis, molecular diagnosis, mycobacteria.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB), one of the major airborne infectious bacterial diseases, remains a major worldwide health problem¹. Brazil accounts for 31% of all TB cases in the World Health Organization's Latin American Region². It is estimated that there are 1,700 new cases/year in the Brazilian State of "Santa Catarina". The state is among those with the lowest rates of TB incidence (27/100,000). However, some cities have equal or higher rates than the Brazilian incidence (45/100,000), as "Itajaí" and "Joinville", with 84.7 and 46.2 cases/100,000, respectively^{1,2}. The Nereu Ramos Hospital (NRH) is a reference of inpatients with TB, and the Centre Laboratory of Public Health (CLPH) is the reference for conventional diagnosis of mycobacteria in Santa Catarina. Accurate and early diagnosis of TB followed by immediate treatment is essential for an effective control of the disease. This diagnosis, however, is not always easy due to limitations of traditional diagnostic tests: the acid-fast bacilli (AFB) smear microscopy has a quite low sensitivity, while Lowenstein-Jensen culture is laborious and time-consuming because culturing *Mycobacterium tuberculosis* can take four to eight weeks^{3,4,5}. Considering such limitations, other culture systems were developed, like the Bactec 460 and MGIT 960 TB systems (Becton-Dickinson, USA). Advantages of these systems include superior recovery rates, compared to Lowenstein-Jensen, and the decreased waiting time for positive results to about 15 days⁶. However these systems are more expensive than the traditional culture methodologies. Other tests such as the polymerase chain reaction (PCR) have emerged as promising alternatives to improve the TB diagnosis. With PCR, mycobacteria DNA can be detected directly in clinical samples, offering better accuracy and specificity than AFB smear and greater speed than culture methodologies^{5,7,8}. However, there is an inconsistency among studies using PCR assays, with variations in specificity and especially sensitivity for mycobacteria detection in clinical samples. This occurs because these studies used different methods for sample treatments, DNA extraction, amplification and detection of PCR products^{4,8,9,10,11}. Two mycobacterial DNA sequences are candidates for a TB diagnostic test: the insertion sequence of IS6110^{12, 13} and the 16S rRNA gene¹⁴. There are several commercial assays capable to detect mycobacteria in isolated and clinical specimens, like Cobas[®] Amplicor *M. tuberculosis*

(Roche, Germany), Amplified MTD assay (Gen-Probe Inc., USA) and GenoType[®] Mycobacteria Direct assay (Hain Lifescience, Germany). Some molecular assays provide information on drug resistance in addition to detecting *M. tuberculosis*, as GenoType[®] MTBDRplus (Hain Lifescience, Germany). However these methodologies are expensive so they have become part of the routine in many laboratories in low-prevalence, high-income countries⁶. The GeneXpert[®] System (Cepheid, USA) is a test developed for simultaneous TB diagnosis and rifampicin resistance directly from sputum. This methodology is under evaluation in Brazil and studies about its cost-benefit and effectiveness will be conducted in Amazonas and Rio de Janeiro States in 2012, lasting 18 months. The Laboratory of Molecular Biology and Mycobacteria (LMBM) at Federal University of Santa Catarina (FUSC), Brazil, has been assisting both NRH and CLPH in mycobacteria diagnosis of clinical samples using molecular methods. The main goal of this Lab is to expedite the diagnosis so the treatment can start as soon as possible, blocking disease transmission. However, the LMBM did not have a satisfactory molecular detection in sputum samples, especially in paucibacillary cases. In order to improve the PCR sensitivity, this study proposed the use of glass beads as a modification in the routine protocol for sputum treatment that was used in LMBM. The sensibility of the routine and modified protocols was analyzed and compared.

MATERIAL AND METHODS

Samples

The study comprised 120 sputum samples, 60 of which were tested with the routine protocol and 60 were tested with the modified protocol using glass beads. During one year (2010-2011), sputum samples were obtained from patients over 14 years old with a clinical diagnosis of pulmonary TB, and admitted at NRH. They agreed to participate and signed a free and informed consent approved by the institutional ethics committee of the FUSC (168/07). Patients treated with tuberculostatics longer than 15 days were excluded. All samples were collected in the morning, under fasting conditions, and were sent to LMBM. The bacilloscopy was performed in the TB section of the CLPH. Each clinical sample was cultured in Ogawa-Kudoh medium at 37°C during four weeks, according to the manufacturer's

manual (Laborclin[®]-Brazil). Clinical samples were simultaneously submitted to sputum treatment (routine or modified protocol) and DNA extraction followed by PCR.

Sputum Treatment

The routine protocol was performed using approximately 400 μL of sputum (3.0 mL steril plastic graduated Pasteur pipette, Plastlabor-Brazil) with 200 μL of N-acetyl-L-cysteine (100 mg/mL) (Sigma-Aldrich-USA) and vortexed vigorously during two minutes. After, 400 μL of 0.2N NaOH/1% SDS were added (Sigma-Aldrich-USA) and vortexed during three minutes. Further on 200 μL of 5M potassium acetate (pH 5.0) was added and vortexed during one minute and the mixture was centrifuged at 3000 x g for 15 minutes at 4°C¹⁵. Approximately 500 μL of the supernatant were discarded and the remaining volume was used to resuspend the pellet for DNA extraction. The modified protocol followed the same steps of routine protocol; however, it was performed using a glass tube containing glass beads, 1 and 2 mm, (Sigma-Aldrich-USA) in all vortex agitations. In both protocol the decontamination and digestion were realized in about 50 minutes, considering that between each vortex agitation the samples stood by 15 minutes in order to decrease the aerosol.

DNA Extraction

DNA extraction was performed using 1 mL of 5M Guanidine (guanidine isothiocyanate 5M, Tris 0.1M pH 6.4, EDTA 0.5M pH 8.0, Triton X 100) and 200 μL of the precipitate obtained after the treatment of sputum using the routine or modified protocol. The mixture was kept shaking overnight and 50 μL of silica solution was added, mixed by inversion during five minutes, and followed by centrifugation at 1300 x g for one minute. The supernatant was discarded, and the pellet washed out twice in 500 μL of washing solution (guanidine isothiocyanate 5M and Tris 0.1M pH 6.4), twice in 500 μL of 70% ethanol and once in 500 μL of acetone. After each wash out, centrifugation was performed at 1300 x g for one minute. Following wash out, the pellet was dried at 56°C, re-hydrated in 25 μL of TE buffer (pH 7.4) and centrifuged at 9000 x g for five minutes. The supernatant was transferred to another RNase-DNase-free microtube¹⁶.

PCR assay

PCR mixture (20µL) was performed using 2.0 µL of DNA extracted, 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen®-USA), 1U Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen®-USA), F-285/Myc264 primers^{14,17} to amplify the partial 16S rRNA gene and INS1/INS2¹⁸ to recognized sequences IS6110 (Table 1). Positive (2.0 µL of DNA extracted from *M. tuberculosis* H37Rv strain) and negative controls (without DNA) were also used for amplification in all reactions. The amplified products were resolved in agarose gel containing ethidium bromide. The specific fragments were visualized under ultraviolet light. The PCR results were compared with AFB smear microscopy (Ziehl-Neelsen) using sputum samples (without samples concentrated) and Ogawa-Kudoh culture.

Table 1. Oligonucleotide sequences and size amplified product.

Molecular Target	Primer's	Size (pb)
16S rRNA	F285 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') Myc264 (3'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-5')	1027
IS6110	INS1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3') INS2 (5'- GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3')	245

RESULTS

The sputum samples were paired carefully according to the amount of AFB found in the smear microscopy (negative, < 1 AFB/100, 1+, 2+ or 3+) in order to perform the comparison of the routine and modified protocols. All the 120 sputum samples were positive in the culture (100%), and 82% (49/60) of each group analyzed were positive in the bacilloscopy. From 60 samples tested by routine protocol, 36% (4/11) of negative bacilloscopy were detected in IS6110 PCR and 8% (4/49) of the positive bacilloscopy samples were not detected by PCR assay (table 2). These samples showed 56.7% (95% CI: 44.1-69.2) of sensitivity in 16S rRNA PCR and 81.7% (95% CI: 71.9-91.5) in IS6110 PCR, when compared with the culture method.

All samples (negative and positive bacilloscopy) tested with modified protocol using glass beads were detected by PCR assay (table 3). Comparing the culture and molecular tests, the 16S rRNA PCR showed 73.3% (95% CI: 62.1-84.5) of sensitivity, while IS6110 PCR presented 100% of sensitivity.

The evaluation of both protocols applied showed that the yield of modified protocol was statistically significant in respect to IS6110 PCR ($p = 0.001$) but not statistically significant in respect to 16SrRNA PCR ($p = 0.052$) as demonstrated in the Table 4.

Table 2. Comparison between AFB microscopy and 16S rRNA and IS6110 PCR in samples treated with routine protocol.

Number of sputum sample*	AFB microscopy	16S rRNA PCR	IS6110 PCR
34	+	+	+
11	+	-	+
4	+	-	-
4	-	-	+
7	-	-	-

* Ogawa-Kudoh culture positive, (-) negative result, (+) positive result.

Table 3. Comparison between AFB microscopy and 16S rRNA and IS6110 PCR in samples treated with modified protocol using glass beads

Number of sputum sample*	AFB microscopy	16S rRNA PCR	IS6110 PCR
43	+	+	+
6	+	-	+
1	-	+	+
10	-	-	+

* Ogawa-Kudoh culture positive, (-) negative result, (+) positive result.

Table 4. Yield comparison of 16S rRNA and IS6110 PCR assay in routine and modified protocol applied on sputum samples

PCR	Routine Protocol		Modified Protocol	
	Number of samples	Sensibility (%)	Number of samples	Sensibility (%)
16S rRNA positive	34	56,7	44	73,3
16S rRNA negative	26		16	
<i>p = 0,052</i>				
IS6110 positive	49	81,7	60	100
IS6110 negative	11		-	
<i>p = 0,001</i>				

DISCUSSION

The worldwide spread of TB has created an urgent need of rapid diagnosis and effective treatment of active TB. The low sensitivity of sputum smears has been claimed to be the main responsible for the delayed detection of a substantial number of TB cases¹⁹. Research showed that patients become more contagious as the delay progresses²⁰. Therefore, the PCR is the object of an increasing research interest in an attempt to include it as routine test. The sensibility of PCR to detect *M. tuberculosis* in clinical samples is largely dependent of DNA extraction efficiency. The commonly employed methods of DNA isolation provide either low quantity (due to incomplete lysis of bacterial cell wall) or poor quality of DNA, resulting in low sensitivity of the test²¹. Depending on the DNA extraction methods and molecular target, the use of PCR may allow the detection of a low number (1 to 20 bacilli) of organism genome in each clinical sample²². The mycobacterial cell wall is a complex structure composed of lipophilic molecules and polysaccharides. So its resistant to most lysis methods employed for other bacterias. Cell wall disruption can be achieved in different ways: mechanical disruption, enzymatic and chemical lysis or the combination of these techniques^{21,23}. After the cell wall disruption, a DNA

purification step becomes essential in order to remove PCR inhibitors, which can decrease the assay sensitivity²¹. Beyond the use of different methods of DNA extraction and purification, different methodologies for the liquefaction and decontamination of sputum and the lack its standardization may contribute to the interlaboratory variation in the PCR results⁹.

The LMBM used to apply a routine protocol for DNA extraction of mycobacteria which consisted of either sputum N-acetyl-L-cysteine and SDS treatment, followed by DNA purification. The N-acetyl-L-cysteine markedly reduces the viscosity of mucoprotein solutions in vitro. Kubica and co-workers (1963) described a technique with a solution of 0.5% N-acetyl-L-cysteine and 2% NaOH in a citrate buffer to digest sputum¹⁵. The use of a detergent as SDS for mycobacterial cell wall lysis was found to be essential by most of the researchers^{24,25}. The following steps in the routine protocol that used silica particles were used for DNA purification²⁶. This is the most important step to remove PCR inhibitors²¹. Despite the association of Kubica's technique to digest sputum, the use of detergent to promote the chemical lysis and the DNA purification step, the LMBM did not have a satisfactory molecular detection in sputum samples, especially in paucibacillary cases. In order to improve the PCR sensitivity to detect mycobacteria in sputum samples, this study proposed the addition of a physical sputum treatment with prolonged vortexing using glass beads in glass tubes as a modification in routine protocol. Studies have shown that the sputum homogenization by prolonged vortexing with glass beads, may have distributed bacilli more evenly and may have increased the yield of the AFB smear microscopy^{27,28}. This mechanical procedure disrupts sputum structure, separate clumps of mycobacteria, and concentrate bacilli, thereby increasing the probability of their detection²⁸. Our results showed that the modified protocol using glass beads increased the sensitivity of IS6110 and 16S rRNA. The increased sensitivity was statistically significant in respect to IS6110 PCR ($p = 0.001$). In all steps of the modified protocol, the sputum samples were subjected to a harsh shaking condition of homogenization by prolonged vortexing using glass beads in glass tubes. The vortex agitation, which promotes the friction between the beads and tube glass wall, and the use of N-acetyl-L-cysteine should help in the breakage of mycobacterial

clusters. The release of mycobacteria increases its surface area, which facilitates the SDS detergent and guanidine isothiocyanate action in cell wall disruption and, consequently, increases the yield of DNA extraction and the sensitivity of PCR assay. In this study, it was also verified that the IS6110 PCR was more sensitive than the 16S rRNA PCR, which was expected since IS6110 occurs with up to 20 copies in the *M. tuberculosis* genome and the 16S rRNA occurs in a single copy gene. However, in a laboratory routine for molecular diagnosis of mycobacteria, it is interesting to use a gene as 16S rRNA, present in *Mycobacterium* sp, to complement the IS6110 PCR result, because, although more sensitive, *M. tuberculosis* strains lacking the IS6110 element have been previously described^{29,30,31}. Moreover, patients can also be infected by nontuberculous mycobacteria, which are detected by 16S rRNA PCR. It is worthy to note that a potential limitation in the design of our study consists in the use of non-paired samples in the sputum treatment protocols. Ideally, both routine and modified protocol would be applied from the same sputum sample, but this may not be feasible due to the following reasons. The LMBM receives low volumes of sputum since inpatients frequently have difficulties to provide higher amounts of sputum. Moreover, the samples are received as part of the routine of the laboratory, so the volume of samples was not enough to divide them into aliquots, as were also used to perform culture and AFB smear microscopy. In addition, obtaining two sputum samples (one for the routine and other for the study) is often unfeasible because generally there is no patient willingness to provide two sputum collections. As the laboratory did not have a satisfactory molecular detection in sputum samples, we decided to add the glass beads in the routine process. Therefore we paired the samples carefully according to the AFB smear (negative, < 1 AFB/100, 1+, 2+ or 3+) in order to compare the routine and modified protocols, which did not invalidate our results. Despite the study limitation, the use of the modified protocol greatly improved the TB diagnosis in our setting, particularly paucibacilli cases with negative AFB smear, reducing the bacillus detection time directly from clinical samples. This is a great contribution to our routine, mainly because about 25% of TB patients, in Santa Catarina State, are co-infected with HIV, which tend to be negative in AFB smear microscopy. Moreover, the CLPH is acquiring the MGIT® 960

(Becton-Dickinson, USA) and the other nine public laboratories of the state still use the Ogawa-Kudoh[®] and bacilloscopy to TB diagnostic. Other strengths of our study include that this methodology is less costly than available commercial methodologies so it is operationally feasible for national TB programs in high burden regions, as Santa Catarina State, Brazil. This work can be considered a pilot study in our State, and further work, using larger sample sizes, is needed to confirm our results.

CONCLUSION

The use of glass beads in the modified protocol has greatly improved the mycobacteria detection in sputum samples when compared with the routine protocol. The modified protocol could be useful in the clinical samples that present low sensitivity in AFB microscopy, especially those samples that are negative sputum by bacilloscopy. Moreover this methodology is applicable in a routine diagnosis of TB in high burden and low income regions because its low cost when compared to commercial methodologies.

REFERENCES

- 1 World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control 2010. WHO Report 2010. Geneva: World Health Organization, 2010.
- 2 Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DIVE). Gerência de agravos. Tuberculose. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br>>. Access in 09.03.2011.
- 3 Jonas V, Alden M J, Curry J I, Kamisango K, Knott C A, Lankford R, Wolfe J M, Moore D F. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1993; 31: 2410-2416.
- 4 Noordhoek G T, Kolk A H, BJune G, Catty D, Dale J W, Fine P E, Godfrey-Fausset P, Cho S N, Shinnick T, Svenson S B. Sensitivity and Specificity of PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a Blind Comparison Study among Seven Laboratories. J Clin Microbiol 1994; 32: 277-284.
- 5 Negi S S, Khan S F O, Gupta S, Pasha S T, Khare S, Lal S. Comparison of the conventional diagnostic modalities, Bactec culture and Polymerase Chain Reaction test for diagnosis of tuberculosis. Indian J Med Microbiol 2005; 23: 29-33.
- 6 Parsons L M, Somoskövi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan C N, Abimiku A, Spector S, Roscigno G, Nkengasong J. Laboratory

- Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. *Clin. Microbiol. Rev* 2011; 24: 314-350.
- 7 Eisenach K D, Sifford M D, Cave M D, Bates J H, Crawford J T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1160-1163.
 - 8 Flores L L, Pai M, Colford J M, Riley L W. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol* 2005; 5: 55.
 - 9 Noordhoek G T, Embden J D A, Kolk A H J. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2522-2525.
 - 10 Drobniński F A, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 141-147.
 - 11 Noordhoek G T, Mulder S, Wallace P, van Loon A M. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by acid nucleic amplification methods. *J Clin Microbiol* 2004; 10: 295-301.
 - 12 Eisenach K D, Cave M D, Bates J H, Crawford, J T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161: 977-981.
 - 13 Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon J-L, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2668-2673.
 - 14 Böddinghaus B, Rogall T, Florhr T, Blocker H, Bottger E C. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1751-1759.
 - 15 Kubica G P, Dye W E, Cohn M L, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine, as a sputum digest for the isolation of mycobacteria. *Amer Rev Resp Dis* 1963; 87: 775-779.
 - 16 Lippke J A, Strzempko M N, Raia F F, Simon S L. Isolation of Intact High-Molecular-Weight DNA by Using Guanidine Isothiocyanate. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 2588-2589.
 - 17 Rogall T, Flohr T, Bottger E C. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J General Microbiol* 1990; 136: 1915-1920.
 - 18 van Embden J D A, Cave M D, Crawford J T, Dale, J W, Eisenach K D, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick T M, Small P

- M. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409.
- 19 Asch S, Leake B, Anderson R, Gelberg L. Why do symptomatic patients delay obtaining care for tuberculosis? *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1244-1248.
 - 20 Storla D G, Yimer S, Bjune G. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of Tuberculosis. *BMC Public Health* 2008; 8.
 - 21 Amita J, Vandana T, Guleria R S, Verma R. K. Qualitative Evaluation of Mycobacterial DNA Extraction Protocols for Polymerase Chain Reaction. *Mol Biol Today* 2002; 3: 43-50.
 - 22 Rossetti M L R, Jardim S, Rodrigues V F S, Moura A R, Oliveira H, Zaha A. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J Microbiol Methods* 1997; 28: 139-146.
 - 23 Käser M, Ruf M T, Hauser J, Marsollier L, Pluschke G. Optimized Method for Preparation of DNA from Pathogenic and Environmental Mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 414-418.
 - 24 Baess I. Isolation and purification of deoxyribonucleic acid from mycobacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect* 1974; 82: 780-784.
 - 25 Banavaliker J N, Bhalotra B, Sharma D C, Goel M K, Khandekar P S, Bose M. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction in clinical specimens. *Ind J Tub* 1998; 45: 15-18.
 - 26 Herzer S. DNA Purification. In: *Molecular Biology Problem Solver – A Laboratory Guide*, New York: Willey-Liss, 2001: pp 167-196.
 - 27 Slosárek M, Cend Dondov, Dabrowska L, Fiedler E, Jankova E, Kalfin E, Kaustová J, Mezenský L, Mysák J, Sapkadzijeve P, Wojciechowska E, Hyncica V. Comparison of microscopic positivity in smears from sputa stained according to Ziehl-Neelsen in different modifications. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1977; 21: 7-15.
 - 28 Daley P, Michael J S, Kalaiselvan S, Latha A, Mathai D, John K R, Pai M. A Pilot Study of Short-Duration Sputum Pretreatment Procedures for Optimizing Smear Microscopy for Tuberculosis. *Plos One* 2009; 5.
 - 29 Fomukong N G, Tang T H, Al-Maamary S, Ibrahim W A, Ramayah S, Yates M, Zainuddin Z F, Dale J W. Insertion sequence typing of *M. tuberculosis*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. *Tubercle Lung Dis* 1994; 75: 399-468.
 - 30 Agasino C B, Ponce de Leon A, Jasmer R M, Small P M. Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains in San Francisco that do not contain IS6110. *Int J Tuberc and Lung Dis* 1998; 2: 518-520.

- 31 Moatter T, Mirza S, Siddiqui M S, Soomro I N. Detection of Mycobacterium tuberculosis in paraffin embedded intestinal tissue specimens by polymerase chain reaction: characterization of IS6110 element negative strains. J Pak Med Assoc 1998; 48:174-178.