

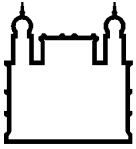
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

“Avaliação da influência do tratamento diretamente observado (DOT) com e sem profilaxia na transmissão da tuberculose em centros médicos de saúde do município do Rio de Janeiro, utilizando técnicas de tipagem molecular em cepas de *M. tuberculosis*”.

Ida Maria Foschiani Dias
Baptista

Rio de Janeiro – RJ

2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Ida Maria Foschiani Dias

Baptista

“Avaliação da influência do tratamento diretamente observado (DOT) com e sem profilaxia na transmissão da tuberculose em centros médicos de saúde do município do Rio de Janeiro, utilizando técnicas de tipagem molecular em cepas de *M. tuberculosis*”.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Philip Noel Suffys

Rio de Janeiro – RJ

2006

B222Baptista, Ida Maria Foschiani Dias

Avaliação da influência do tratamento diretamente observado (DOT) com e sem profilaxia na transmissão da tuberculose em centros médicos de saúde do município do Rio de Janeiro, utilizando técnicas de tipagem molecular em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* / Ida Maria Foschiani Dias Baptista. – Rio de Janeiro : FIOCRUZ, 2006.

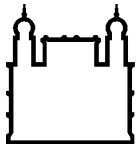
VI, 132p. : il.

Dissertação (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2006.

Bibliografia: p. 134-156.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Tuberculose. 3. Estratégia DOTS. 4. RFLP-IS6110. 5. MIRU-VNTR. 6. Spoligotyping I. Título.

CDD 616.995



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Ida Maria Foschiani Dias Baptista

“Avaliação da influência do tratamento diretamente observado (DOT) com e sem profilaxia na transmissão da tuberculose em centros médicos de saúde do município do Rio de Janeiro, utilizando técnicas de tipagem molecular em cepas de *M. tuberculosis*”.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Philip Noel Suffys

Aprovada em: ____/____/____

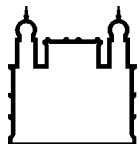
EXAMINADORES:

Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani (Presidente)

Prof. Dr. Afrânio Lineu Kritski

Prof. Dr. Moisés Palaci

Rio de Janeiro, 06 de Junho de 2006.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

“Avaliação da influência do tratamento diretamente observado (DOT) com e sem profilaxia na transmissão da tuberculose em centros médicos de saúde do município do Rio de Janeiro, utilizando técnicas de tipagem molecular em cepas de *M. tuberculosis*”.

RESUMO/ABSTRACT

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Ida Maria Foschiani Dias Baptista

SUMÁRIO

RESUMO	ii
SUMMARY	v
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Aspectos Gerais	2
2. Terapêutica e resistência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a drogas	4
3. Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT)	8
3.1. Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração (DOTS)	9
3.2. Implantação da estratégia DOTS no município do Rio de Janeiro	22
4. Epidemiologia molecular da tuberculose e métodos de tipagem	27
4.1. Técnicas moleculares utilizadas para genotipagem dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
2. OBJETIVOS	41
3. CASUÍSTICA e MÉTODOS	43
3.1. Histórico do estudo	43
3.2. Informações gerais sobre o município do Rio de Janeiro	44
3.3. Desenho do estudo e casuística	45

3.4. Análise microbiológica dos isolados de <i>M. tuberculosis</i>	50
3.5. Extração do DNA genômico dos isolados de <i>M. tuberculosis</i>	50
3.6. Técnicas de tipagem molecular	51
3.6.1. Análise do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) baseado na seqüência de inserção IS6110	51
3.6.2. Análise da região “Direct Repeat”(DR) – (“spoligotyping”- Spacer Oligonucleotide Typing)	54
3.6.3. Análise do número de repetições variáveis em tandem (MIRU – mycobcaterial interspersed-repetitive-unit)	55
3.7. Análise estatística	59
4. RESULTADOS	61
4.1. População estudada	61
4.2. Tipagem molecular	61
4.2.1. Fluxo do recebimento das amostras para tipagem molecular	61
4.2.2. Representatividade das amostras genotipadas em relação aos pacientes diagnosticados	62
4.2.2.1. MIRU-VNTR	62
4.2.2.2. RFLP-IS6110-3’	70
4.2.2.3. “spoligotyping”	70

4.2.3. Resultados da tipagem molecular	71
4.2.3.1. Análise preliminar por RFLP-IS6110-3'	71
4.2.3.2. Análise preliminar por RFLP-IS6110-5'	74
4.2.3.3. Análise por MIRU-VNTR	77
4.2.3.4. Análise por “spoligotyping”	87
4.2.3.5. Análise combinada por MIRU-VNTR e “spoligotyping”	90
4.2.3.6. Comparação da formação de agrupamentos obtidos por RFLP-IS6110-3', MIRU-VNTR e “spoligotyping”	95
4.2.4. Análises adicionais para verificar associação de agrupamento de genótipos com grupos de tratamento DOT	100
4.2.4.1. Taxa de “cluster” entre os diferentes métodos de tipagem	100
4.2.4.2. Tendências à formação de “cluster” definido por MIRU-VNTR durante o período de estudo	101
4.2.4.3. Resistência	102
5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÕES	130
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

Anexo 1: formulário de inscrição no estudo

Ficha para anotação e envio de dados

Anexo 2: Formulário de resultados da bacteriologia

Ficha para anotação e envio de dados

Anexo 3: Report for form ICIDR- inscrição

Ficha para banco de dados

Anexo 4: Report for form ICIDR – bacteriologia

Ficha para banco de dados

Anexo 5: Tabela de amostras genotipadas por MIRU-VNTR e “spoligotyping”

Anexo 6: Tabela de amostras total genotipadas por MIRU-VNTR

Anexo 7: Comparação “clusters” projeto DOT/ICIDR e RDrio

Anexo 8: Dendrograma UPGMA “spoligotyping”

Anexo 9: Dendrograma N-J MIRU-VNTR

Anexo 10: Dendrograma N-J MIRU-VNTR + “spoligotyping”

Anexo 11: Manuscrito para o Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

RESUMO



RESUMO

A Tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública mundial, particularmente nos países em desenvolvimento. Na cidade de Rio de Janeiro, 7.000 casos novos de TB são relatados anualmente, para uma incidência de 105 por 100.000 habitantes. Em três centros de saúde comunitários (CHCs) da área de planejamento 1 (AP-1.0) do município do Rio de Janeiro (área da cidade com taxa a mais elevada de TB), uma avaliação da influência do tratamento diretamente observado (DOT) sem ou com profilaxia (DOT-A) para contatos de risco foi realizada; os contatos do último grupo foram avaliados também ativamente para TB ativa ou infecção. Para esta finalidade, quatro comunidades receberam o tratamento DOT enquanto outras quatro comunidades receberam DOT-A. Um estudo nessas comunidades foi realizado durante o período 2001-2004 e recebemos os isolados de 353 pacientes, distribuídos igualmente entre as vizinhanças com os dois grupos de tratamento (DOT e DOT-A). Os dados bacteriológicos, clínicos e epidemiológicos foram coletados e os genótipos de *Mycobacterium tuberculosis* definidos com MIRU-VNTR, “spoligotyping” e RFLP-IS6110. Também, o uso da sonda do lado direito e esquerdo do sítio de restrição da PvuII na IS6110 foi avaliado. Todas as amostras foram genotipadas por ambos os métodos de PCR, enquanto uma grande fração das amostras de 2001 foi submetida a RFLP-IS6110. Os resultados dos agrupamentos entre os três métodos foram comparados e as taxas de “cluster” foram, respectivamente, 20%, 29% e 72% para RFLP-IS6110, MIRU-VNTR e “spoligotyping”. A combinação de MIRU-VNTR e “spoligotyping” para a definição dos genótipos reduziu o número de “clusters” para 7.8% e os dados iniciais obtidos que sugerem que os “clusters” formados por RFLP-IS6110 foram respeitados por MIRU-VNTR. Entretanto, a tipagem por RFLP-IS6110 deve ser realizada em todos os isolados para se ter uma comparação mais sólida desta técnica com MIRU-VNTR e “spoligotyping”. O maior “cluster” obtido por MIRU-VNTR foi observado somente nas amostras de 2001 e podemos sugerir uma epidemia local temporária. A determinação dos fatores de risco para TB foi avaliada pela associação da formação de “clusters”

dos isolados com transmissão recente da TB entre os pacientes. Isto foi realizado para os três métodos de genotipagem e para MIRU-VNTR e “spoligotyping” combinado. O único fator de risco que foi relacionado consistentemente com transmissão recente foi estar infectado com um isolado resistente ou multidroga resistente. Nenhuma diferença nas taxas de agrupamento foi observada entre os dois grupos de tratamento DOT que sugerem a ausência de associação entre genótipos em “cluster” e a transmissão recente de TB ou a falta da influência dos procedimentos adicionais inerentes a DOT-A com relação ao DOT na transmissão de TB na população investigada. Abordagens adicionais da análise de dados devem, entretanto ser realizadas e estão em andamento.

SUMMARY



SUMMARY

The Tuberculosis (TB) is a serious problem of world-wide public health, particularly in the developing countries. In the city of Rio de Janeiro, 7,000 new TB cases are reported annually, for an incidence de 105 per 100,000 inhabitants. In three Community Health Centers (CHCs) of Planning Area 1 (AP-1.0) of Rio de Janeiro, the section of the city with the highest case rate of TB, an evaluation of the influence of directly observed treatment (DOT) without or with (DOT-A) prophylaxis of risk contacts was performed; contacts of the latter group were also actively evaluated for active or latent TB. For this purpose, four communities received the DOT regimen while other four communities received DOT-A. A prospective community-based study was performed during the period 2001 to 2004 and we received strains of 353 patients, equally distributed among the neighborhoods with the two DOT schemes. Bacteriological, clinical and epidemiological data were collected and *Mycobacterium tuberculosis* genotypes defined through MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units - variable number tandem repeats) typing, spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism (IS6110-RFLP). Also, the use of the left-hand side probe and a right-hand side probe of the *PvuII* site in the IS6110 was evaluated. All samples were typed by both PCR typing methods while a large fraction of the 2001 samples was submitted to IS6110-RFLP. Clustering results between the three methods were compared and cluster rates were, respectively, 20%, 29% and 72 % for IS6110-RFLP, MIRU-VNTR typing and spoligotyping. The combination of MIRU-VNTR and spoligotyping techniques for the definition of genotypes reduced the number of clusters to 7.8% and initial data were obtained suggesting that clusters formed by IS6110-RFLP are respected by MIRU-VNTR. However, IS6110-RFLP typing should be performed of all isolates to have a more solid comparison of this technique with MIRU-VNTR and spoligotyping. The biggest cluster obtained with MIRU-VNTR was only observed in 2001 and could suggest a local temporary outbreak. Risk factor determination for TB was evaluated through association of cluster formation of isolates with recent

transmission of TB between patients. This was performed for the three typing methods and for the combined MIRU-VNTR and spoligotyping procedure. The only risk factor that was consistently related with recent transmission was being infected with a resistant or multi-drug resistant strain. No difference in clustering rates was observed between the two DOT procedures suggesting either the absence of association between clustering of genotypes and recent transmission of TB or the lack of influence of the additional procedures inherent to DOT-A in relation to DOT on TB transmission in the investigated population. Additional approaches of data analysis should however be performed and are underway.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais:

A tuberculose representa hoje um grande desafio em várias regiões do mundo. A taxa de incidência global da doença esta aumentando em cerca de 0,4% ao ano (Brito et al. 2004). Estima-se que anualmente ocorram 1,9 milhões de mortes causadas pela tuberculose, com 98 % delas em países em desenvolvimento; cerca de 350.000 são casos de associação com a Aids. Caso a gravidade desse quadro não seja revertida, prevê-se que, até 2020, 200 milhões adoeçam e 35 milhões possam morrer (Teixeira, 2002).

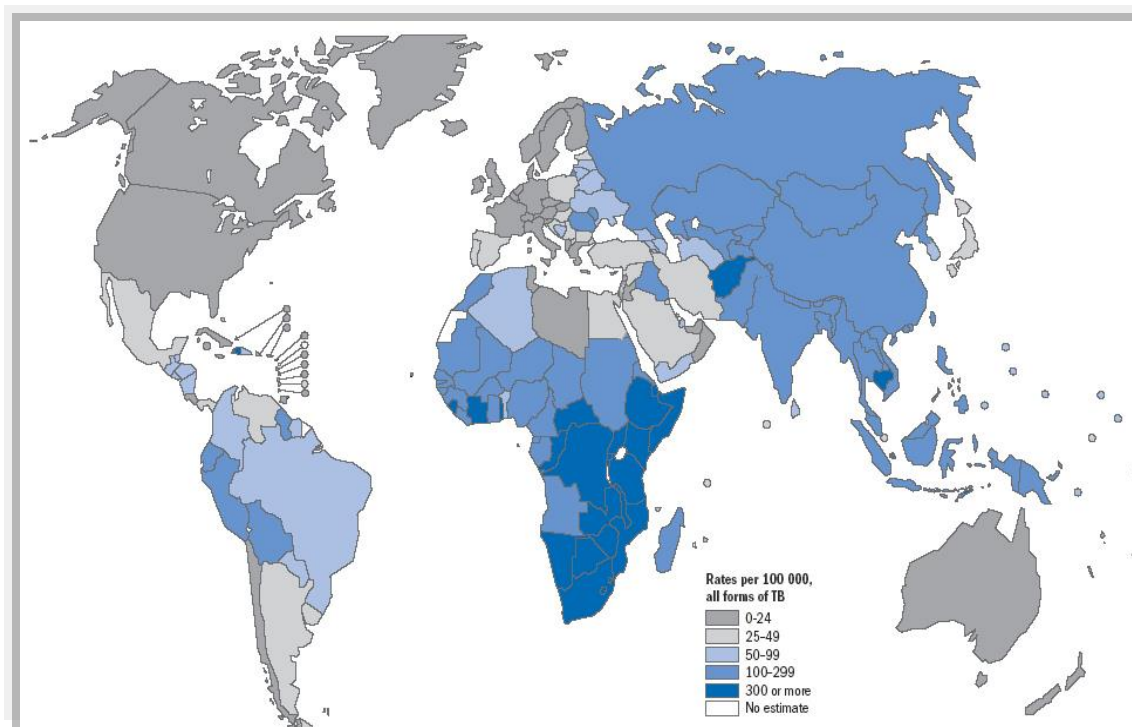


Figura 1: Estimativa das taxas de incidência de Tuberculose/ 2003 (Fonte: Global Tuberculosis Control. WHO Report 2005).

Cerca de um terço da população mundial, aproximadamente 1,8 bilhões de pessoas, encontram-se infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*): Desse total, a grande maioria vive nos países em desenvolvimento e geralmente são indivíduos entre 15 e 59 anos,

Introdução

representando um alto índice da população economicamente ativa de seus países. Desses, 8 milhões desenvolverão a doença (Brasil 2002 (a); Brasil 2004; WHO 2004).

Tem-se chamado a atenção sobre as doenças emergentes (e.g., Aids) ou reemergentes (dengue, por exemplo). Alguns chegam a alegar ser a tuberculose um problema reemergente em nosso meio. Essa afirmativa poderá ser válida para alguns países europeus e mesmo para os Estados Unidos da América; contudo, não é válida para o Brasil. Para nós, a tuberculose não é problema de saúde pública emergente e nem reemergente; ela é um problema presente e ficante há longo tempo (Rufino-Neto, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil é o décimo sexto colocado no ranking dos países com maior carga de tuberculose no mundo. Em 2004, estimou-se a ocorrência de 110.000 casos da doença, com uma taxa de incidência de 60/100.000 habitantes. O controle da doença ainda é precário em várias regiões do país, e a implantação da estratégia de tratamento supervisionado precisa continuar avançando (WHO 2006).

O percentual de cura no país em 1999, era de 75,4%, com 13,8% de abandono. Nos últimos anos, o maior impacto negativo no controle tuberculose foi observado nas grandes cidades, em virtude da piora das condições sócio-econômicas e do desmantelamento do sistema de saúde. Na região sudeste, área de maior taxa de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), os dados são mais alarmantes (Brasil 2002).

O município do Rio de Janeiro, a maior região metropolitana do estado, possui cerca de seis milhões de habitantes. Segundo o Boletim Informativo do Programa da Tuberculose do Município do Rio de Janeiro (2005), em 2003, foram notificados 6.274 casos novos de tuberculose, com uma taxa de incidência de 105,5/ 100.000 habitantes e um coeficiente de mortalidade de 6,3%.

Não só no Rio de Janeiro, mas no Brasil como um todo, infelizmente parte das mortes causadas pela tuberculose é inevitável, devido à associação com outras doenças (ex: Aids), à emergência de bacilos resistentes, a

fragilidade orgânica de parcela dos afetados e também pelas deficiências do sistema de assistência e controle da doença (Brasil 1998).

2. Terapêutica e resistência do *M. tuberculosis* a drogas:

A tuberculose passou por várias fases históricas em relação ao seu tratamento. Inicialmente, o reconhecimento da transmissão dos doentes para os sadios e a observação de que alguns pacientes conseguiam sobreviver, levaram à idéia de que o isolamento, o repouso e a boa alimentação derrotariam a doença e impediriam sua disseminação (Melo et al. 1993).

O tratamento quimioterápico específico da tuberculose iniciou-se em 1944 com a descoberta da estreptomicina, que se mostrou eficaz no tratamento da tuberculose humana. Logo foi constatado que seu uso isolado nas formas escavadas da doença, com grande população bacilar, determinava o surgimento de resistência ao fármaco alguns meses após o início do tratamento (Picon et al. 1993). Em seguida, novas drogas foram incorporadas ao arsenal terapêutico: em 1946, o ácido paraminossalicílico; em 1952, a isoniazida e em 1957, a rifampicina (Brasil 1994). A introdução da rifampicina no esquema terapêutico possibilitou a redução do tempo de tratamento da tuberculose de 18 para 6 meses (Castelo Filho 1993). Na década de 60 até o início da de 70, o tratamento para a tuberculose no Brasil era realizado com esquema padronizado, composto por estreptomicina, isoniazida e ácido paraminossalicílico por um período de 3 meses e em seguida isoniazida e pirazinamida por 9 meses. Na década de 70, enquanto em todo o país o esquema usado era estreptomicina, isoniazida e tiacetazona (3 meses) seguido de isoniazida e tiacetazona (9 meses), no Estado de São Paulo, o recomendado era estreptomicina, isoniazida e etambutol (2 meses), seguido de isoniazida e etambutol (4 meses) e isoniazida (6 meses) (Melo et al. 1996). A partir de 1980, novos esquemas de tratamento foram recomendados pelo Ministério da Saúde.

Introdução

Quadro 1: Principais esquemas utilizados no tratamento da tuberculose.

Esquemas	Fases	Drogas
Esquema I – casos novos de tuberculose pulmonar e extra-pulmonar (exceto Meningite tuberculosa)	1ª fase (2 meses)	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida
	2ª fase (4 meses)	Rifampicina Isoniazida
Esquema IR – casos de recidiva ou abandono do Esquema I	1ª fase (2 meses)	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Etambutol
	2ª fase (4 meses)	Rifampicina Isoniazida Etambutol
Esquema III – casos de falência aos esquemas anteriores (I, IR)	1ª fase (2 meses)	Estreptomicina Etionamida Etambutol Pirazinamida
	2ª fase (4 meses)	Etionamida Etambutol

Introdução

O tratamento da tuberculose, utilizando rifampicina, isoniazida e pirazinamida têm uma alta eficácia, curando 97,8% dos pacientes com tuberculose pulmonar que completam seu uso regular (Melo et al. 1993). O objetivo dessa associação é reduzir rapidamente a população em franca multiplicação. A rifampicina e a isoniazida são drogas de intenso poder bactericida e, associadas, são capazes de evitar a seleção de mutantes resistentes. A pirazinamida tem a função de destruir a população bacteriana localizada no interior dos macrófagos (Brasil 1994).

Desde a década de 60, o tratamento da tuberculose pulmonar é feito em nível ambulatorial, e a hospitalização restringe-se aos casos especiais, como indicações cirúrgicas, complicações graves, intolerância medicamentosa incontrolável, em casos sociais, nos quais o pacientes não tem residência fixa, e em grupos especiais que facilmente abandonam o esquema de tratamento (Brasil 1995).

A emergência da resistência de cepas bacterianas a vários antibióticos tornou-se um assunto de grande importância nos últimos anos e as epidemias de tuberculose resistente a drogas tem recebido considerável atenção. Cepas resistentes se desenvolvem em função de terapias inadequadas, do uso indiscriminado de antibióticos pela população em geral e da irregularidade do tratamento (Snider et al. 1994). A resistência a drogas na tuberculose é o resultado da inter-relação do fenômeno de mutação espontânea e da seleção da população predominantemente resistente, como consequência de tratamento irregular e/ ou inadequado (Kantor 1994).

Os estudos epidemiológicos de resistência aos medicamentos anti-tuberculose fornecem indicadores, como a prevalência da resistência primária e adquirida, os quais são úteis na avaliação da qualidade do tratamento e do programa de controle da tuberculose (Ribeiro et al. 2004).

Em países desenvolvidos, o aumento da resistência inicial e adquirida vem trazendo preocupações, principalmente em grandes centros urbanos, sendo a maior parte dos casos de resistência inicial relacionada à contaminação em ambiente fechado (hospitais, prisões, albergues) e co-infecção pelo HIV (Fujiwara et al. 1994; Small et al. 2001). Já nos países em

Introdução

desenvolvimento, os dados são precários: não existe uniformidade nos programas de controle da tuberculose com relação à realização de baciloscopia em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde e a inexistência de normas sobre a necessidade de realização de culturas para micobactérias e testes de sensibilidade em amostras clínicas de pacientes atendidos em hospitais gerais (Dolin et al. 1994; Snider et al. 1994).

No Brasil, os dados referentes à resistência aos medicamentos anti-tuberculose são escassos. Entre 1995 e 1996, o Ministério da Saúde realizou um estudo multicêntrico, onde pode ser demonstrada uma taxa de resistência inicial de 8,5% e adquirida de 21% (Natal 2002). Nesse mesmo estudo a taxa de tuberculose multidroga-resistente em pacientes sem tratamento foi de 1,1% e em pacientes com tratamento de 7, 9% (Natal 2002). Entre 2000 e 2003, foram notificados no Brasil 1.214 casos de tuberculose multidroga-resistente, sendo que 45,4% ocorreram no Estado do Rio de Janeiro. Dentre estes pacientes, 95% apresentou resistência adquirida, como consequência de tratamento inadequado. Com relação à co-infecção pelo HIV, de 988 pacientes com tuberculose multidroga-resistente e exame anti-HIV solicitados, 8% eram positivos (Brasil 2003).

Brito et al. (2004) realizaram estudo num hospital referência para o tratamento de Aids no Rio de Janeiro com o objetivo de estimar a resistência inicial e adquirida e também identificar fatores associados a esta ocorrência. Os autores demonstraram uma taxa de resistência inicial de 18,4% e de resistência adquirida de 12,5% entre os pacientes incluídos neste estudo. Com relação a fatores de risco, variáveis sócio-demográficas, clínicas, laboratoriais, infecção pelo HIV, tratamento prévio e ser profissional de saúde foram utilizadas na análise e foi observado que profissionais de saúde mantêm uma forte associação com resistência a uma ou mais drogas. Ainda neste estudo, foi observada uma taxa de tuberculose multidroga-resistente de 3,6%.

A epidemia de Aids e a multirresistência às drogas concorre para o agravamento do quadro da tuberculose em todo o mundo.

3. Programa Nacional de Controle da tuberculose (PNCT):

No ano de 1964, o Comitê de Peritos da Organização Mundial de Saúde (OMS) formulou o conceito de Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) a ser implantado nos países membros, levando em conta os seguintes aspectos: ter um alcance nacional e planejado ao longo prazo, estar adaptado às necessidades da população, estar integrado aos serviços gerais de saúde e ser planejado dentro dos recursos disponíveis aos serviços gerais da saúde (Gazeta 2004).

Nesse contexto, a tendência epidemiológica da tuberculose se articula com o desenvolvimento das sociedades. As condições de vida das diferentes classes sociais, nas diferentes partes do mundo, apresentam estreita relação com o número de doentes e com a disseminação da doença. Baseados nesses índices, os programas de controle da tuberculose atualmente se esforçam em quebrar a cadeia de transmissão, sendo que a forma de prevenção se baseia no tratamento precoce com o objetivo de impedir a proliferação da doença (Informes Técnicos Institucionais 2004).

Em 1993, a OMS declarou a tuberculose como sendo um problema de saúde em todo o mundo e as principais razões destacadas para o aumento da doença foi a pobreza, a desigualdade social, a associação com a Aids, o envelhecimento da população e os grandes movimentos migratórios (Raviglione 1995; WHO 1998; Rufino-Netto 2004).

Atualmente as iniciativas mundiais para o controle da tuberculose apresentam três diferentes dimensões, porém superpostas (OMS 2002(a)):

- *Humanitária*: requer um enfoque centrado no paciente para o controle da doença (aliviar a enfermidade, o sofrimento e a morte dos indivíduos);
- *Saúde Pública*: inclui o diagnóstico e tratamento adequado dos pacientes, visando a redução da transmissão da tuberculose nas comunidades;
- *Econômica*: o controle da doença se relaciona com a redução de custos, diminuição da pobreza e promoção do desenvolvimento.

3.1. Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração (DOTS):

É impressionante, registrar fatos históricos que permitiram a implantação da estratégia DOTS (atualmente em 183 países), antes de iniciar uma análise da influência dessa estratégia, pelos dados apresentados na literatura internacional.

Em 1950, com a introdução da quimioterapia, a cura da tuberculose reduzindo para 5% ou menos os quadros de morbidade e extinguindo dessa forma as longas permanências em hospitais (WHO 1999; Arcêncio 2006).

No período de 1955-58 um estudo foi realizado em seis regiões da Índia, incluindo áreas rurais e urbanas, para a obtenção de informações mais precisas sobre a magnitude do problema da tuberculose. Através deste trabalho, foi confirmada a alta prevalência da morbidade da tuberculose nas áreas rurais, onde precocemente tinha sido sugerido testar tuberculina em grande escala. Estimou-se que 8 milhões de pessoas sofriam com a tuberculose, sendo que naquela época, 80% eram das áreas rurais. A partir desses dados, se percebeu a necessidade do desenvolvimento de um programa nacional de controle aplicável para “atacar” o problema (Tuberculosis Control in Índia 2005).

Em 1956, o “Tuberculosis Chemotherapy Centre” (TCC) conduziu uma série de estudos que forneceriam informações na aplicação da quimioterapia domiciliar maciça para o tratamento da tuberculose. Demonstraram que a “eficácia consagrada pelos tempos” dos tratamentos em sanatórios como tratamento por repouso, dieta balanceada e outras medidas não apresentavam uma influência perceptível, desde que o fornecimento de quimioterapia adequada fosse prescrito e completamente tomada (Tuberculosis Control in Índia 2005).

A descoberta de drogas específicas, potentes e prontamente disponíveis para o tratamento da tuberculose e a eficácia do tratamento domiciliar como mostrado pelo Centro de Tuberculose de Nova Deli e pelo TCC de Madras, mudou completamente a perspectiva para o paciente com tuberculose. A

Introdução

probabilidade de formular um programa detalhado de tuberculose para combater a doença baseada em grandes comunidades pareceu agora possível.

No final da década de 50, surgiram novas possibilidades para o paciente, entre elas a terapia intermitente, facilitadora do processo de aplicação do tratamento supervisionado em diferentes cenários. Ela estabelecia a frequência da supervisão do tratamento de acordo com as características e necessidades de cada paciente, com duração do tratamento de 18 meses e obtendo bons resultados (Arcêncio, 2006).

Com a introdução da rifampicina em 1970, um esquema de duração menor (“Short Course”) foi incorporado ao tratamento que passava para seis a oito meses, reduzindo a carga bacilar nos primeiros dois meses de tratamento (Arcêncio, 2006). Nesse mesmo ano, o Dr. Karel Styblo propõe um modelo de controle baseado em unidades básicas de gerenciamento (distritos), que teriam equipes e recursos necessários para diagnosticar, iniciar, registrar e informar o progresso do tratamento e gerenciar o suprimento de drogas em uma área populacional de 100.000 a 150.000 habitantes (Arcêncio, 2006).

Infelizmente, somente em 1993, frente a um triste cenário mundial que vinha sendo desenhado há décadas, a WHO declara a emergência mundial da tuberculose, preconizando a estratégia de Styblo como instrumento técnico e gerencial de controle dessa doença – estratégia conhecida hoje como DOTS.

A estratégia DOTS, foi baseada em princípios e em tecnologias de tempos passado, mas engendrada por energia nova e por vontade política, tendo como meta conseguir a detecção de 70% dos casos novos e a taxa da cura de 85% até 2005. Embora estes objetivos não tenham tido êxito em uma escala global e a execução do programa seja irregular e esporádica em muitos lugares, em outros, a implantação foi rápida e eficaz (Sharma et al. 2006).

O DOTS é fruto de pesquisas operacionais cuidadosamente planejadas e executadas e não apenas a simples observação da tomada dos medicamentos. Na realidade, o DOTS é um conjunto de atividades essenciais mínimas necessárias para um controle eficaz da tuberculose (Small 1999).

Esta estratégia inclui cinco elementos básicos, a saber:

1. Comprometimento político e financeiro com o programa;
2. Detecção de casos pela baciloscopia do escarro;
3. Tratamento de curta duração e diretamente observado (DOT);
4. Regularidade na manutenção de medicamentos;
5. Sistema de informações que permita o registro e monitoramento dos casos.

A OMS recomendou a padronização da terapia de curso curto em conformidade com o completo gerenciamento das condições objetivando aderência, a conclusão do tratamento, a cura e a prevenção da resistência a drogas. Estas condições incluem a colocação do paciente no centro das atividades para o controle da tuberculose, a garantia da confiabilidade e a consideração das necessidades do paciente. Também inclui a organização dos serviços de tuberculose de maneira que o paciente tenha tratamento em sua casa na medida do possível, considerando incentivos, identificando potenciais problemas, mantendo seguro os prontuários e buscando meios para negociar com faltosos (Garner et al. 2003).

O impacto da estratégia DOTS varia entre países e depende do financiamento, da infra-estrutura do programa, da taxa de co-infecção com HIV (Khan et al. 2002) e da taxa de tuberculose-MDR (Pablos-Méndez et al. 2002). Nos últimos anos, muitos estudos foram realizados objetivando a avaliação dos programas de tuberculose e a adoção da estratégia DOTS em diversos países do mundo.

Em 2004, segundo a Organização Mundial de Saúde, o DOTS havia sido implantado em 183 países, cobrindo em média 83% da população mundial (a porcentagem da população coberta pelo DOTS variou de 45 a 100% de acordo com cada país). As taxas de detecção de casos novos com baciloscopia positiva em países com DOTS aumentaram de 11% em 1995 para 53% em 2004 (WHO 2006). Atualmente, muitos países que incorporaram a estratégia DOTS têm demonstrado que podem conseguir atingir as metas propostas pela OMS.

Introdução

Analisando casos como a Índia e China, entendemos que a implantação não foi fácil, mas que cautela, planejamento, infraestrutura, treinamento contínuo, análise contínua, supervisão e avaliação são essenciais para se obter êxito (Dye 2006). Na China o programa foi adotado em 1991, implantado em 12 províncias e com cobertura de 80% da população nos primeiros quatro anos. Numa análise dos 10 primeiros anos do DOTS, a China alcançou 85% de taxa de cura para casos com baciloscopia positiva, mas a taxa de detecção de casos ficou em 70%, não alcançando a meta global devido a uma série de limitações como, por exemplo; falha no gerenciamento dos programas, recursos humanos inadequados, falta de motivação no “staff” e falha no envolvimento com a comunidade, entre outros (Chen et al. 2002).

Os resultados alcançados pela Índia são devido à reformulação do Programa Nacional de Controle da Tuberculose e o progresso recente na expansão do DOT. Estas realizações significativas foram obtidas através do esforço de dedicados funcionários em nível de Estado e Distritos. A Índia, país de grandes dimensões geográficas e populacionais, também deve esses resultados a sua comunidade, que por diferentes razões participaram como agentes comunitários. Mathew et al. (2005) demonstram o exposto acima no estudo onde compararam que as taxas de conclusão de tratamento e cura foram de 89,2% nos pacientes com supervisão e 64% nos pacientes sem supervisão. Conclui que esta é uma indicação de que o sucesso do DOTS, incluindo o DOT, pode ser concluído com êxito, quando se trabalha com profissionais motivados e dedicados mesmo em condições de pobreza.

Outro estudo, realizado para estimar o risco da infecção tuberculosa entre crianças menores de 10 anos em área rural do sul da Índia e avaliar o impacto do programa DOTS, demonstrou que de 1991 a 1996 ocorreu um declínio de 6% na prevalência da infecção e que essa redução estava associada a implementação do programa DOTS para o controle da tuberculose (Gopi et al. 2006).

Outros estudos conduzidos na Índia falam a favor da estratégia DOTS, incluindo o DOT, quando da necessidade de se controlar o tratamento, o resultado do mesmo e também avaliar a prevalência de isolados resistentes a

Introdução

drogas, principalmente as MDR (Balasubramanian et al. 2000; Chadha et al. 2000; Anuradha et al. 2006).

Em continuidade a análise da influência da estratégia DOTS, altas taxas de incidência da tuberculose tem sido observada em países do Leste Europeu desde 1990 e na África subsariana desde meados dos anos 80. O declínio na notificação de casos no Leste Europeu está claro nos dados da Rússia e nos Estados Balcãs da Estônia, Letônia e Lituânia. O reaparecimento da tuberculose nestes países pode ser explicado pelo declínio da economia, insatisfatório controle da tuberculose e subpadronização dos serviços de saúde desde 1991 (Dye 2006).

Históricamente, a busca de casos, tratamento e atividades profissionais na Rússia tem diferido daqueles defendidos pela OMS e a Comunidade Internacional. Em 2003, aproximadamente 26% da população na Rússia tinham cobertura DOTS.

Estudo publicado por Atun et al. (2005) mostraram que as razões para esta taxa de cobertura baixa estavam relacionadas com atitudes negativas para mudanças e devido ao inadequado entendimento da estratégia DOTS. Doutores, administradores e pacientes afirmavam que períodos prolongados de hospitalização eram vantajosos para a rotina de tratamento ser assegurada; médicos experientes avaliarem os pacientes de perto e atenderem a outras necessidades tais como providenciar abrigo e alimento. Não acreditavam na aderência do paciente atendido na comunidade.

Outro estudo afirma que mais que 10% dos novos casos de tuberculose na Estônia, Letônia e algumas partes da Rússia são multidroga-resistentes e essa resistência é subproduto de eventos que levaram o reaparecimento da tuberculose nesses países, embora não seja a causa primária (WHO/ IUATLD 2004).

A TB-MDR é uma séria ameaça ao programa de controle da tuberculose, pois a estratégia DOTS não proporciona taxas de cura com boa aceitação em locais onde se concentram os mais altos índices. Por exemplo, no Kenya, mesmo com a estratégia DOTS implementada desde 1993, vários fatores favorecem o fortalecimento da TB-MDR, entre eles, instalações inadequadas

Introdução

para o atendimento, laboratórios inadequados para o diagnóstico, inadequados regimes de tratamento e a migração natural da população para as favelas.

Um estudo realizado no México mostrou que a implementação de DOTS contribuiu para a redução da transmissão e incidência, tanto de isolados sensíveis quanto resistentes às drogas. Ainda assim, a prevalência moderada de TB-MDR naquele país demonstra a importância de um gerenciamento eficaz do tratamento, pela realização de testes de sensibilidade às drogas e padronização ou individualização dos regimes de tratamento, necessários à redução das taxas de mortalidade (DeRiemer et al. 2005).

Em populações africanas com taxas elevadas da infecção HIV, uma proporção relativamente alta dos pacientes com tuberculose são mulheres de 15-24 anos. A ascensão no número de casos de tuberculose está mais tardia na África, porque provavelmente as taxas de infecção do HIV estão começando a se estabilizar ou diminuir (Asamoah et al. 2004). O HIV tem provavelmente um efeito menor na prevalência da tuberculose do que na incidência, porque o vírus reduz significativamente a expectativa de vida dos pacientes com tuberculose. Onde as taxas de infecção do HIV são elevadas na população geral, são também elevadas entre pacientes com tuberculose. As estimativas para 2004 excederam em 50% em países do sul da África, como, Botswana, África sul, Zâmbia, Zimbábue e outros países (Onyebujoh et al. 2006).

Claramente, a maior falha da estratégia DOTS está na África, onde as taxas de tuberculose continuam a avançar. Em 2002, países da África mostraram menos que 75% nas taxas de cura e 8% mais alto nas taxas de morte em pacientes co-infectados com *M. tuberculosis* e HIV (Sharma et al. 2006).

Visando identificar os obstáculos do DOT em Burkina Faso, Quédraogo et al. (2006) demonstraram claramente que as principais dificuldades estavam relacionadas com a falta de assiduidade entre o conjunto de funcionários, as viagens diárias, as longas distâncias, o alto custo do transporte e o alto número de comprimidos. Burkina Faso é um país onde a infraestrutura de saúde é modesta, então a supervisão da tomada dos comprimidos foi o principal obstáculo à aplicação integral do DOT. Entretanto, os autores afirmam ser um

Introdução

obstáculo possível de controlar utilizando de modo racional os recursos disponíveis e envolvendo de forma sensata pessoas da comunidade.

Um caso de sucesso na implantação da estratégia DOTS na América do Sul é o Peru, que tem 100 % da população amparada pelo DOTS, e uma taxa de detecção superior a 95% enquanto a taxa de cura é de 92% (Hopewell 2002). Mas a emergência das isolados resistentes, principalmente as MDR, atualmente tem se tornado uma grave ameaça aos mais de 10 anos de implantação da estratégia DOTS nesse país (Baldeviano et al. 2003). Descrevemos no quadro 2, os resultados alcançados com a implantação da estratégia DOTS em várias regiões do mundo.

Quadro 2: Estudos publicados nos últimos 5 anos, avaliando a estratégia DOTS em todo o mundo.

Estudo	Objetivo	Conclusões	Referências
Índia (Kerala)	Determinar a frequência com que o DOT ocorreu no período estudado e a associação de DOT com o resultado do tratamento	Pacientes sem observação direta tinham maiores risco de resultados adversos (não receberam DOT, falência no tratamento ou recidiva)	Balasubramanian et al. 2000
Peru	Comparar a taxa de declínio na incidência da tuberculose antes e depois da introdução do DOTS (período de 1991 a 2000)	Organização do PNCT; Redução na transmissão da tuberculose; Taxa de morte em 2000 foram 73% menor.	Suárez et al. 2001.
Haiti	Avaliar o PNCT em área rural do Haiti e comparar duas	Não DOT (29% abandono, 12% morte e 58% tratamento completo).	Ollé-Goig et al. 2001.

Introdução

	estratégias para administrar o tratamento em domicílio (DOT e não DOT)	DOT (7 % abandono, 4 % morte, 87% tratamento completo).	
Índia Distrito Tiruvallur	Determinar a prevalência basal da tuberculose com cultura ou baciloscopia positiva e o risco anual da infecção tuberculosa, junto à implementação do DOTS (1999 – 2001)	Prevalência da tuberculose de 605/100.000 com cultura positiva e 323/100.000 para tuberculose com baciloscopia positiva.	Gopi et al. 2003
Singapura	Avaliação dos primeiros cinco anos do programa de eliminação da tuberculose de Singapura (início em 1997)	Incidência da tuberculose em 1998 era de 57/100.000 habitantes e em 2001 diminuiu para 44/100.000.	Chee et al. 2003
Nepal	Implantar e avaliar uma aliança público-privada para aplicação da estratégia DOTS	A combinação de médicos privados, organizações não governamentais e setor público garantiram taxas altas de cura e maiores taxas de notificação de casos.	Newell et al. 2004
Tanzania	Avaliar a eficácia do DOT na comunidade, utilizando tutores e ex-	DOT na comunidade é tão eficaz como DOT em estabelecimentos de saúde,	Wandwalo et al. 2004

Introdução

	pacientes de tuberculose, comparado com DOT em hospitais da Tanzânia.	obtendo bons resultados em países com PNT em bom funcionamento.	
EUA New York	Identificar pacientes e fatores que influenciam na recusa do DOT	A recusa estava associada com pacientes que pensavam em auto-administrar-se. Outro aspecto da recusa estava centrado com o horário de trabalho que interferia com o programa DOT.	Gupta et al. 2004
Tailândia	Avaliar os resultados de tratamento de pacientes com tuberculose com a implementação da DOTS em prisões	A implementação da estratégia DOTS não alcançou a meta nacional de 85% de cura dos casos novos com baciloscopia positiva. Referem problemas com transferências de presos, falha no treinamento dos enfermeiros (alta rotatividade), alta taxa de mortalidade, co-infecção HIV (teste para o HIV e teste de sensibilidade a drogas não eram feitos).	Nateniyom et al. 2004
Hong Kong	Determinar a tendência de modificações na sensibilidade de cepas	De 1921 culturas positivas de pacientes com tratamento anterior, 176	Kam et al. 2004

Introdução

	de <i>M. tuberculosis</i> , incluindo os medicamentos de segunda linha, em pacientes com antecedentes de tratamento prévio (DOTS-plus, estudo retrospectivo – período de 8 anos).	(9,2%) eram tuberculose-MDR. No grupo de cepas TB-MDR, 101 (57,4%) mostraram uma sensibilidade a todos os medicamentos de segunda linha, somente 30 (17%) eram resistentes a três ou mais medicamentos de segunda linha. Portanto, o uso prudente de medicamentos de segunda linha em uma população com programa DOTS-plus que funciona corretamente não gera cepas resistentes.	
Rússia	Examinar as atitudes dos coordenadores envolvidos no controle da tuberculose com respeito à introdução da estratégia DOTS	Os autores mostram que para a estratégia DOTS ter sucesso, modelos inovadores de cuidados que respondam à necessidade humana e social devem ser desenvolvidos.	Atun et al. 2005

Os estudos apresentados no quadro 2 demonstram que o problema da tuberculose no mundo esta intimamente relacionada com o nível de desenvolvimento social, econômico, político e até mesmo cultural de cada país e que o tratamento supervisionado (DOT) apresenta bons resultados desde que o conjunto de estratégias proposta pelo DOTS seja respeitado.

Introdução

A implantação da estratégia DOTS exige um planejamento prévio, cuidadoso e deve ser feito em etapas (Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro - Assessoria em Pneumologia Sanitária):

“Na **etapa inicial** devem ser selecionadas poucas unidades de saúde do município onde já exista uma infra-estrutura de recursos humanos e materiais, facilitando a organização do serviço com normas, procedimentos e fluxos bem definidos de modo a obter em curto prazo, altas taxas de cura.

Na **etapa de expansão**, as unidades de saúde que participaram da etapa inicial, servirão como locais de demonstração do sucesso da estratégia de TS e de capacitação de pessoal das demais unidades onde seguirá a implantação. Nesta etapa, o papel da coordenação do Programa de Controle de Tuberculose (PCT) nos municípios é fundamental, uma vez que exigirá capacitação continuada de pessoal, uma oferta de exames de baciloscopia de escarro com resultados para o mesmo dia ou no máximo em 48 horas, um sistema de informações ágil e confiável que permita detectar rapidamente os nós críticos e propor soluções e, a supervisão contínua das ações desenvolvidas nas unidades de saúde e laboratórios.

A **etapa de manutenção** consiste em manter a eficácia da estratégia de TS (altas taxas de cura) através da formação de novos profissionais, reciclagem e atualização em novos conhecimentos. Nesta fase, os gestores de saúde e as instâncias de decisão devem estar convencidos dos benefícios humanos, econômicos e políticos dessa estratégia, que justificam o investimento de mais recursos para o controle da tuberculose”.

Conforme descrito acima, a implantação desta estratégia requer o compromisso governamental de continuidade das ações de controle da tuberculose, que se traduz em investimentos para contratação de pessoal, transporte de pessoas e materiais, insumos de laboratório, incentivos para os pacientes e outras necessidades identificadas.

O Brasil adotou oficialmente a estratégia DOTS em 1998. Em 2004, a cobertura da estratégia DOTS em nível nacional aumentou de 34% para 52% e a taxa de detecção de novos casos de 18% para 47% (WHO 2006). A taxa de sucesso do tratamento com a implantação do DOTS em 2003 foi 83%, sendo

que em 2002 era de 75% (WHO 2006). Segundo a OMS (2006), o orçamento para TB no Brasil (16º em maior carga de tuberculose no mundo) dobrou entre 2002 e 2006 e essa despesa adicional tem sido causada pelo aumento no número de casos novos sob a estratégia DOTS.

Quadro 3: Ações para o controle da tuberculose: como implantá-las na estratégia de tratamento supervisionado.

AÇÕES	ESTRATÉGIA TRATAMENTO SUPERVISIONADO
Deteção e diagnóstico dos casos de tuberculose	<ul style="list-style-type: none">• Duas baciloscopias de escarro para todos os pacientes sintomáticos respiratórios;• Uso de exame radiológico em casos específicos;• Pontualidade do resultado dos exames de baciloscopia no máximo em 48 horas;• Práticas laboratoriais padronizadas garantindo a confiabilidade dos resultados;• Controle de qualidade das baciloscopias pelos LACEN;• Registro sistemático dos dados pelo laboratório no Livro Branco.
Classificação de pacientes para o tratamento	<ul style="list-style-type: none">• Tipo de tuberculose (pulmonar ou extrapulmonar) ;• Baciloscopia (+) ou baciloscopia (-);• Categoria terapêutica (primeiro tratamento, recidiva pós cura, reingresso pós abandono, falência do tratamento, resistência às drogas).

Introdução

<p>Tratamento</p> <p>Monitoramento do tratamento</p>	<ul style="list-style-type: none">• Utilização dos esquemas padronizados pelo MS de eficácia comprovada para cada tipo de caso ;• Utilização do regime diário de tomadas das doses;• Observação direta do tratamento no mínimo três vezes por semana;• Educação e aconselhamento dos pacientes;• Exame dos contatos e quimioprofilaxia quando indicada;• Suprimento regular das drogas nas unidades de saúde (US). <ul style="list-style-type: none">• Baseado na baciloscopia de escarro mensal, no mínimo no 2º, 4º e 6º mês;• O indicador principal é a evolução do paciente até a cura após o tratamento completo;• Registro de dados individuais do tratamento no Livro de Registro de Casos e na ficha de TS do paciente;• Rápida identificação de faltosos e busca imediata dos pacientes.
<p>Resultados</p>	<ul style="list-style-type: none">• Alta taxa de conversão da baciloscopia de escarro ao final da fase inicial do tratamento;• Altas taxas de cura;• Diminuição da prevalência de casos crônicos;• Diminuição da transmissão da infecção pelo BK;• Prevenção da resistência às drogas.• Maior comprometimento político garantindo os recursos e a sustentabilidade das ações dos PCT;• Alta mobilização comunitária garantindo o controle social preconizado no SUS.

Fonte: <http://www.saude.rj.gov.br/tuberculose/recomendacoes.html>

3.2. Implantação da Estratégia DOTS no município do Rio de Janeiro:

Em 2003, no município do Rio de Janeiro (pioneiro na implantação da estratégia DOTS no Estado), o número de casos novos de TB era de 6.572 e a taxa de incidência de 105/ 100.000 habitantes. O maior número de casos estava na faixa de 20-49 anos, com o predomínio da incidência entre os homens. O percentual da forma pulmonar entre os casos novos foi de 79%. O resultado do teste anti-HIV, quando da notificação da tuberculose foi de 17%. O número de casos novos e a taxa de incidência de tuberculose na AP 1.0 (área de planejamento) foi de 619 e 241,3 respectivamente no ano de 2003.

Quadro 4: Informações sobre a notificação de casos novos e a taxa de incidência da tuberculose no Estado do Rio de Janeiro no período de 1999 a 2003.

Municípios de Residência	1999	2000	2001	2002	2003
	CN/ TI	CN/ TI	CN/ TI	CN/ TI	CN/ TI
Angra dos Reis	74/ 76,4	92/ 77,2	109/ 88,4	89/ 70,4	99/ 76,4
Armação de Búzios	10/ 59,1	12/ 65,9	18/ 94,1	13/ 65,6	19/ 92,4
Arraial do Cabo	0/ 0,0	1/ 4,2	4/ 16,4	23/ 93,0	16/ 63,7
Belford Roxo	565/ 132,9	594/ 136,7	437/ 98,9	452/ 100,4	424/ 92,7
Bom Jesus de Itabapoana	18/ 53,4	15/ 44,6	11/ 32,3	30/ 87,1	24/ 68,9
Cabo Frio	82/ 68,6	66/ 52,0	90/ 67,5	90/ 65,3	104/ 72,7
Carmo	8/ 51,4	0/ 0,0	6/ 39,0	5/ 32,3	12/ 77,3
Conceição de Macabu	8/ 42,0	10/ 53,2	17/ 89,8	15/ 78,3	13/ 68,1
Duas Barras	2/ 20,0	1/ 9,7	2/ 19,3	4/ 38,3	7/ 66,8
Duque de Caxias	1018/ 136,3	1054/ 135,9	1063/ 135,7	894/ 112,0	888/ 109,8
Guapimirim	28/ 75,3	28/ 73,8	18/ 46,0	46/ 114,9	34/ 82,9
Itaboraí	118/ 67,8	140/ 74,7	164/ 85,1	154/ 78,2	151/ 75,0

Introdução

Itaguaí	62/ 83,1	75/ 91,5	87/ 103,3	64/ 74,5	72/ 82,1
Japeri	101/ 124,8	110/ 132,1	148/ 173,5	139/ 159,8	110/ 124,1
Lage do Muriaé	0/ 0,0	1/ 12,6	0/ 0,0	4/ 50,0	6/ 74,6
Macuco	2/ 34,0	0/ 0,0	3/ 62,5	1/ 21,1	3/ 64,0
Magé	225/ 114,7	199/ 96,7	243/ 115,2	231/ 107,6	178/ 81,3
Mangaratiba	18/ 81,5	20/ 80,3	31/ 120,6	21/ 79,6	18/ 66,5
Maricá	53/ 79,5	44/ 57,3	54/ 67,3	74/ 89,1	81/ 94,1
Mendes	16/ 90,8	21/ 121,5	17/ 97,7	21/ 120,5	14/ 80,0
Mesquita	4	5	25/ 14,9	138/ 80,5	135/ 77,6
Nilópolis	180/ 117,4	176/ 114,5	230/ 150,3	208/ 136,1	195/ 128,0
Niterói	76/ 16,5	72/ 15,7	205/ 44,4	421/ 90,7	389/ 83,4
Nova Iguaçu	976/ 113,2	1123/ 122,0	1214/ 158,7	947/ 121,4	892/ 112,6
Paracambi	19/ 46,0	36/ 88,9	45/ 110,0	32/ 77,4	41/ 98,3
Pinheiral	18/ 92,9	14/ 71,9	8/ 39,9	7/ 34,2	21/ 100,2
Porciúncula	8/ 49,7	9/ 56,4	9/ 55,9	13/ 80,0	14/ 85,5
Queimados	107/ 93,0	35/ 28,7	44/ 35,3	147/ 115,9	151/ 116,9
Quissamã	10/ 72,7	8/ 58,5	3/ 21,3	8/ 55,8	10/ 68,2
Rio das Ostras	26/ 81,2	24/ 65,9	29/ 74,3	26/ 64,6	42/ 99,9
Rio de Janeiro	6607/ 116,8	6793/ 114,8	6759/ 111,9	6632/ 108,3	6434/ 105,0
Santa Maria Madalena	1/ 9,4	3/ 28,6	2/ 19,5	0/ 0,0	7/ 67,6
São Gonçalo	471/ 54,2	699/ 78,4	559/ 61,9	679/ 74,2	653/ 70,6
São João do Meriti	523/ 118,8	486/ 108,1	465/ 102,9	458/ 100,8	410/ 89,8
São José de Ubá	0/ 0,0	2/ 31,2	3/ 46,3	2/ 30,7	4/ 61,1
Vassouras	36/ 122,5	33/ 104,9	30/ 94,5	21/ 65,5	20/ 61,9
Volta Redonda	2/ 0,8	5/ 2,1	15/ 6,1	147/ 59,6	155/ 62,3

Fonte: Ministério da Saúde

O processo de implantação da estratégia DOTS, conforme as diretrizes do Ministério da Saúde (MS) do Brasil e da OMS, teve seu início no final de 1998, quando a Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (SMS-RJ)

Introdução

redefiniu o controle da tuberculose como uma prioridade e reviu as estratégias de controle da doença para o município. Assim, em 1999 a SMS-RJ iniciou o processo de implantação de DOTS em áreas piloto, tendo como meta uma expansão futura para toda a cidade.

A seguir, descreveremos a viabilização político-financeira e parcerias, áreas, etapas e procedimentos de implantação de DOTS no município do Rio de Janeiro, segundo Cavalcante et al. 2003. A expansão da estratégia e avaliação de diferentes modelos de tratamento diretamente observado (DOT) por meio de pesquisas operacionais foi viabilizada através de colaboração com a Universidade Johns Hopkins (Baltimore-EUA) e do financiamento da United States Agency for International Development (USAID) e do Nacional Institutes of Health (NIH-EUA). Os procedimentos diagnósticos (culturas e testes de sensibilidade) foram realizados com parcerias estabelecidas com o Instituto de Pesquisas Evandro Chagas (IPEC) da FIOCRUZ e o Complexo Hospitalar Instituto de Doenças do Tórax (IDT) /Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ.

Para fins operacionais, a cidade do Rio de Janeiro é dividida em 10 Áreas de Planejamento (AP), que incluem 32 Regiões Administrativas (RA) com seus respectivos bairros. A implantação da estratégia DOTS na cidade foi realizada de forma gradual, por áreas de planejamento, seguindo critérios epidemiológicos e operacionais.

Quadro 5: Área selecionada para experiência piloto em DOTS – Área de Planejamento 1 (AP1).

Ano de implantação	Área de Planejamento	Taxa de incidência	Casos/ ano Habitantes	Bairros
Julho a Dezembro de 1999	AP 1	240/ 100.000 habitantes	650 casos/ ano 264.968 habitantes (área de 36 Km ²)	Catumbi, São Cristóvão, Santa Teresa, Caju, Estácio, Cidade Nova, Centro, Zona Portuária e outros.

Introdução

Quadro 6: Expansão da Estratégia DOTS em outros bairros do Município do Rio de Janeiro.

Ano de implantação	Área de Planejamento	Taxa de incidência	Casos / ano Habitantes	Bairros
Dez/ 1999	AP 5.1	100/ 100.000 habitantes	700 casos/ ano 668.144 habitantes (área de 323 Km ²)	Bangu, Senador Câmara, Realengo, Padre Miguel e outros
Julho/ 2002	AP 2.1	140/ 100.000 habitantes	900 casos/ ano 634.966 habitantes (área de 43 Km ²)	Copacabana, Flamengo, Gávea, Rocinha e outros.

A seguir, foram realizadas atividades de sensibilização, capacitação e treinamento das equipes das unidades de saúde. Foi elaborado pela SMS-RJ, material educativo sobre DOTS para os clientes e equipes de saúde, e foram criados instrumentos para o registro das doses supervisionadas e para a distribuição de incentivos e facilitadores.

O Plano de Controle da Tuberculose no Brasil, introduz novas possibilidades de intervenção na sua proposta de trabalho, contando com as estratégias de Saúde da Família e Agentes Comunitários de Saúde. Tal parceria pode vir a contribuir para expansão das ações do Programa de Controle da Tuberculose (PCT), pois estas estratégias têm a família e o domicílio como instrumento de trabalho. Nesta perspectiva, o Plano dá ênfase na atuação das equipes do Programas Agentes Comunitários da Saúde (PACS) e Programa Saúde Família (PSF) como instrumento para melhorar a adesão terapêutica e evitar o abandono ao tratamento (Rufino 2005). Desta forma, a proposta da SMS-RJ, acompanhando as diretrizes do Ministério da Saúde, é de expandir a estratégia DOTS, por meio da integração com a estratégia PSF/PACS, para detectar e acompanhar os pacientes com tuberculose e seus contatos, na própria comunidade (Cavalcante et al. 2003).

Introdução

Os parágrafos abaixo (itálico) foram extraídos do site do Ministério da Saúde (Departamento de Atenção Básica: Diretriz Conceitual), com o intuito de enfatizar a ampla aplicação da estratégia DOTS junto ao Programa Saúde da Família (PSF) e Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS).

“A Saúde da Família é entendida como uma estratégia de reorientação do modelo assistencial, operacionalizada mediante a implantação de equipes multiprofissionais em unidades básicas de saúde. Estas equipes são responsáveis pelo acompanhamento de um número definido de famílias, localizadas em uma área geográfica delimitada. As equipes atuam com ações de promoção da saúde, prevenção, recuperação, reabilitação de doenças e agravos mais freqüentes, e na manutenção da saúde desta comunidade. O trabalho de equipes da Saúde da Família é o elemento-chave para a busca permanente de comunicação e troca de experiências e conhecimentos entre os integrantes da equipe e desses com o saber popular do Agente Comunitário de Saúde. As equipes são compostas, no mínimo, por um médico de família, um enfermeiro, um auxiliar de enfermagem e 6 agentes comunitários de saúde. Quando ampliada, conta ainda com: um dentista, um auxiliar de consultório dentário e um técnico em higiene dental.

O Programa de Agentes Comunitários de Saúde é hoje considerado parte da Saúde da Família. Nos municípios onde há somente o PACS, este pode ser considerado um programa de transição para a Saúde da Família. No PACS, as ações dos agentes comunitários de saúde são acompanhadas e orientadas por um enfermeiro/supervisor lotado em uma unidade básica de saúde. Os agentes comunitários de saúde (ACS) podem ser encontrados em duas situações distintas em relação à rede do SUS: a) ligados a uma unidade básica de saúde ainda não organizada na lógica da Saúde da Família; b) ligados a uma unidade básica de Saúde da Família como membro da equipe multiprofissional. Atualmente, encontra-se em atividade no país 204 mil ACS, estando presentes tanto em comunidades rurais e periferias urbanas quanto em municípios altamente urbanizados e industrializados.

A estratégia de Saúde da Família é um projeto dinamizador do SUS, condicionada pela evolução histórica e organização do sistema de saúde no

Brasil. A velocidade de expansão da Saúde da Família comprova a adesão de gestores estaduais e municipais aos seus princípios. Iniciado em 1994, apresentou um crescimento expressivo nos últimos anos. A consolidação dessa estratégia precisa, entretanto, ser sustentada por um processo que permita a real substituição da rede básica de serviços tradicionais no âmbito dos municípios e pela capacidade de produção de resultados positivos nos indicadores de saúde e de qualidade de vida da população assistida.”

O desenvolvimento da estratégia DOTS utilizando agentes comunitários apresentou bons resultados em vários países tanto em área urbana como em áreas rurais (Mushtaque et al. 1997; Hadley et al. 2000). Entretanto, no Rio de Janeiro, a violência interfere no desenvolvimento da estratégia DOTS e compromete a execução de atividades relacionadas ao controle da tuberculose, como as visitas domiciliares, o comparecimento regular às unidades de saúde para supervisão da tomada dos medicamentos e a avaliação dos contatos intradomiciliares (Cavalcante et al. 2003).

Neste momento, a taxa de cobertura de DOTS nas áreas implementadas é de 34% para os casos de TB atendidos.

Portanto, no Rio de Janeiro a implantação do Programa de Saúde da Família é uma alternativa promissora na tentativa de redução das interferências, assim como direciona as ações para o controle eficaz da tuberculose (RIO ESTUDOS 2003).

4. Epidemiologia molecular da tuberculose e métodos de genotipagem:

Ao contrário de muitas outras doenças que afetam o desenvolvimento das populações, a tuberculose pode ser tratada e controlada. Quanto melhor for o sistema de busca e tratamento, maior a redução do risco da transmissão (Rodrigues et al.1990). A identificação de isolados de *M. tuberculosis* pode ser uma ferramenta adicional em investigações epidemiológicas e isto acontece através do melhor entendimento dos fatores que influenciam a transmissão da doença, a chamada identificação de fatores de risco da transmissão na

Introdução

comunidade. Também ajuda na avaliação de programas de controle regionais permitindo um projeto racional de medidas de controle mais adequadas (Maguire et al. 2002). A identificação dos isolados pode ajudar a direcionar perguntas epidemiológicas importantes, tais como, a origem de uma infecção na casa ou na comunidade em que vive um paciente e a detecção precoce dos organismos com disseminada resistência antibiótica adquirida (Edlin et al. 1992).

A tipagem molecular se realiza em escalas diferentes, sejam em laboratórios, hospitais, albergues, asilos, comunidades, regiões, países ou global. A transmissão global da tuberculose pode ser estudada pelo uso de técnicas de tipagem molecular que podem ser usadas para a comparação das cepas entre laboratórios, regiões, países e continentes, compreendendo melhor a transmissão e as propriedades filogenéticas do *M. tuberculosis* (Moro et al. 1998; Chaves et al. 1999).

O conhecimento da dinâmica de transmissão da tuberculose tem sido melhorado pelo uso de técnicas de genotipagem que permitem a diferenciação de isolados de *M. tuberculosis*. A doença ativa se desenvolve tanto após uma infecção adquirida recentemente, quanto pela reativação de uma infecção adquirida em um passado remoto. Em estudos populacionais tem-se postulado que pacientes com tuberculose, portando isolados com um padrão único são considerados casos de reativação e pacientes com isolados que compartilham padrões idênticos são considerados como pertencentes a “cluster” e representam doença decorrente de uma infecção adquirida recentemente (Barnes et al. 2003).

A transmissão recente da tuberculose tem sido claramente demonstrada por tipagem molecular em vários estudos. Bishai et al. (1998) ilustraram os recentes avanços da tipagem molecular, quando relataram num estudo prospectivo (30 meses) realizado em Baltimore, que 46% dos pacientes com tuberculose estavam em “cluster” e 32% desses casos podiam ser considerados como transmitidos recentemente. Resultados similares foram observados em estudos publicados por Small et al. (1994) na cidade de São Francisco, Alland et al. (1994) na cidade de Nova York.

Introdução

Deutekom et al. (2003), em estudo prospectivo verificaram em Amsterdam que de 481 pacientes avaliados, 138 (29%) estavam dentro de 43 “clusters” e 20% desses envolvidos em transmissão recente.

A seguir um resumo dos dados disponíveis na literatura sobre aplicação de técnicas de genotipagem em diferentes situações:

Quadro 7: Principais estudos publicados, utilizando técnicas de genotipagem.

Aplicações das técnicas de genotipagem	Referências
Discriminar doença endógena de doença exógena (infecção recente de reativação)	van Rie et al. 1999; Chaves et al. 1999; Small et al. 1993
Investigar surtos em asilos, hospitais, pacientes HIV positivo, cepas de TB-MDR e morador de rua	Friedman et al. 1995; Frieden et al. 1996; Jereb et al. 1993; Genewein et al. 1993; Small et al. 1993
Investigar casos de contaminação laboratorial	Dunlap et al. 1995; Nivin et al. 1998; Breese et al. 2001;
Estudos de transmissão dentro de uma área geográfica definida.	Alland et al. 1994; Small et al. 1994; Yang et al. 1994; van Soolingen et al. 1999; Bifani et al. 1996
Distribuição global do complexo <i>M. tuberculosis</i> (evolução, filogenia)	Filliol et al. 2003; Filliol et al. 2006; Gutacker et al. 2005

4.1. Técnicas moleculares utilizadas para genotipagem de isolados de *M. tuberculosis*:

Existe uma variedade considerável de técnicas disponíveis para tipagem do *M. tuberculosis*. No ano de 1993, van Embden et al. publicaram um protocolo padrão, aceito internacionalmente, para tipagem de isolados de *M. tuberculosis*, avaliando a presença da seqüência de inserção IS6110 pela

Introdução

detecção do polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (“restriction fragment polymorphism” – RFLP). Posteriormente, o desenvolvimento de modalidades de genotipagem baseada em PCR, como o “spoligotyping” e o Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable-Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR), despontaram como as novas possibilidades para os estudos da epidemiologia molecular da tuberculose em tempo real.

A técnica de RFLP-IS6110, padronizada por van Embden et al. (1993) envolve extração rigorosa de DNA a partir de uma cultura do *M. tuberculosis*, digestão com PvuII, separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose, transferência dos fragmentos para uma membrana de nylon e hibridação com uma sonda marcada que permite a identificação dos fragmentos que contém parte da IS6110. O marcador é parte da seqüência de inserção IS6110, segmento de DNA de 1355 pares de bases que está presente em diferentes números de cópias integradas em vários sítios cromossômicos. A endonuclease de restrição PvuII (derivada de *Proteus vulgaris*), cliva na posição 461 da IS6110 nos sítios alvo para a enzima, presente em outras regiões da genoma. O tamanho (e posição no southern blot), dos fragmentos contendo parte (3') do IS6110 é determinado pela distância entre o sítio de restrição na IS6110 e o mais próximo do genoma (susceptível a mutações que criam ou eliminam sítios de restrições). Sendo a IS6110 uma seqüência de inserção com atividade, parte da variabilidade entre perfis de RFLP também é causada por mudança de posição da IS6110 e por inserções e deleções pela própria IS6110. Assim, um perfil de bandas é obtido, os quais refletem o número de cópias da IS6110 e a distribuição do tamanho dos fragmentos onde se localizam as mesmas.

Estudos avaliando a estabilidade, o polimorfismo e o número de cópias de IS6110 demonstraram a utilidade desta técnica em estudos epidemiológicos. Hermans et al. (1990) demonstraram que os perfis de IS6110 mantiveram-se estáveis e permaneceram sem alterações durante passagens *in vivo* de isolados de *M. tuberculosis* em cobaias durante 2 meses. Da mesma forma, os perfis dos isolados que foram submetidas à passagem seriada em meio de cultura e em cultura de macrófago permaneceram sem

Introdução

alterações. Várias isolados de um mesmo indivíduo, num período que variou de um há vários anos, mantiveram o mesmo perfil de DNA, mostrando que a IS6110 é um adequado marcador para estudar transmissão. Infelizmente, a maior desvantagem é que esse método requer cultura viável, grande quantidade de DNA, pureza do DNA e todo procedimento leva uma semana para estar completo.

Sendo a melhor técnica de tipagem disponível no início da década de 90, RFLP-IS6110 ajudou a revelar características da doença e da sua transmissão que eram obscuros antes da era da tipagem molecular. Os achados mais importantes foram à identificação de grupos de risco para tuberculose, as melhorias na investigação de contatos, a possibilidade da avaliação dos programas de controle da tuberculose e a visualização da transmissão da tuberculose.

A associação de métodos de moleculares, principalmente aqueles baseados em reações da PCR tem proporcionado grande impulso nos estudos da epidemiologia molecular do *M. tuberculosis*.

Na década de 90, Supply et al. (2000), identificaram no genoma do *M. tuberculosis*, elementos repetitivos denominados “Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - MIRU” que são similares às seqüências de minissatélites descritas no genoma humano. Minissatélites estão dispersos em milhares de cópias no genoma dos eucariotos superiores, com tamanhos que variam entre 10 e 100 pb, e muitos desses loci são hipervariáveis em humanos e em outros animais, recebendo a denominação de “Variable Number Tandem Repeats” (VNTR). Esses VNTR são marcadores importantes para estudos de evolução e de relações filogenéticas. Neste contexto, os MIRU estão dispersos em regiões intergênicas do genoma de *M. tuberculosis* e possuem de 40 a 100 pb. Muitos destes loci demonstram uma variabilidade no seu número de repetições (VNTR), tendo sido descritos como úteis na genotipagem de isolados de *M. tuberculosis*.

Os MIRU são classificados em três classes (I, II e III) com base no seu comprimento, seqüência nucleotídica e organização. As seqüências do tipo I contêm 77 pb enquanto as seqüências dos tipos II e III são caracterizadas por

Introdução

um intervalo (“gap”) de 24 e 15 pb nas extremidades 3’ e 5’ das seqüências do tipo I, respectivamente. Seqüências mistas dos tipos III/II, contendo “gaps” de ambos os tipos, também foram observadas nos loci 8 e 20 (Supply et al. 2000). Estão localizados em 41 posições ao longo do genoma do *M. tuberculosis* e doze loci demonstram variabilidade no número de cópias entre isolados de *M. tuberculosis* não-relacionados. A maioria destes loci demonstra variabilidade nucleotídica entre as unidades repetitivas, enquanto que outros (loci 4 e 20) contêm um número variável de cópias idênticas. O polimorfismo observado no número de repetições nos 12-MIRU loci tem sido utilizado para a genotipagem de isolados de *M. tuberculosis* (Supply et al. 2000).

A figura 2 mostra o posicionamento desses 41 loci no mapa cromossômico do *M. tuberculosis*.

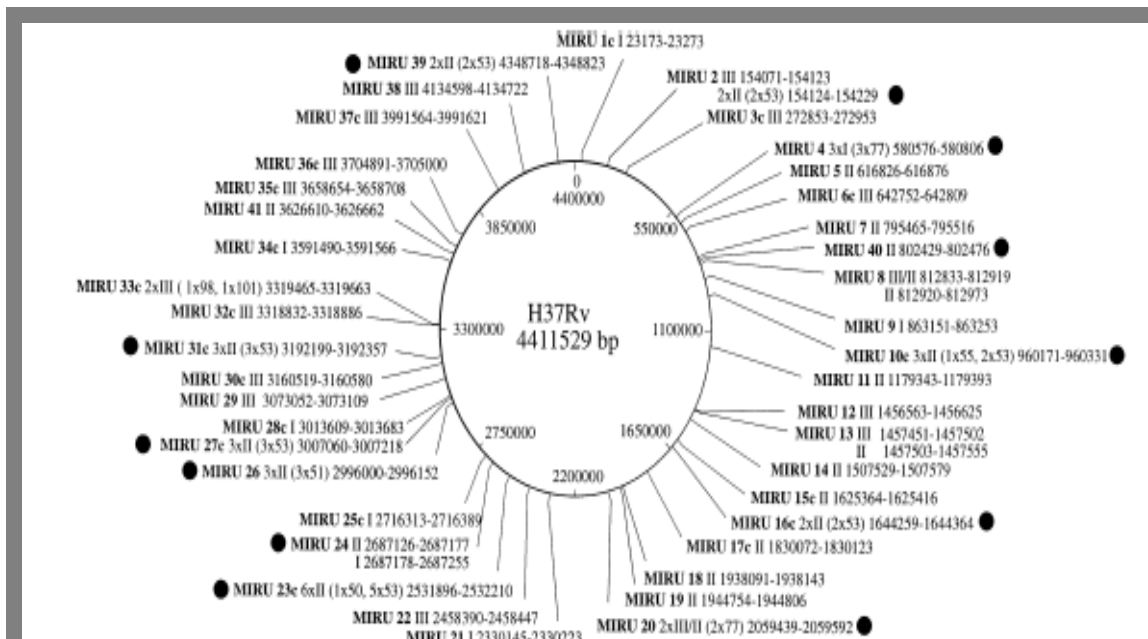


Figura 2: Posição dos 41 MIRU no cromossomo do *M. tuberculosis* H37Rv. P primeiro número indica a posição de cada locus ocupado por um MIRU. A letra c indica a orientação contrária a estabelecida por Cole et al. (1998). Algarismos romanos indicam o tipo de MIRU (I, II ou III). Os números seguintes indicam a localização de cada loci. A esfera em preto indica os 12 loci com número variável de MIRU.

Introdução

A tipagem por MIRU-VNTR detecta, através da verificação do tamanho dos produtos amplificados, o número das repetições de 12 MIRU-loci. As condições de amplificação, de cada loci são específicas e descritas por Mazars et al. (2001) e envolvem o anelamento dos iniciadores à região flanqueadora dos MIRUs. Os produtos amplificados são separados por eletroforese em géis de agarose e o tamanho dos fragmentos amplificados é verificado, visualmente, e comparado à uma tabela de número de alelos, disponível em: <http://www.ibl.fr/mirus/mirus.html>.

Teoricamente, é possível a ocorrência de 2 a 10 alelos, em cada um dos doze loci, permitindo 20 milhões de combinações alélicas possíveis (Barnes et al. 2003). Esta resolução resulta em poder discriminatório da tipagem por MIRU similar àquele oferecido pelo RFLP-IS6110. A vantagem do MIRU por ser um método baseado numa reação de PCR, está na sua simplicidade de execução em relação ao RFLP, além de ser reprodutível, sensível e ter aplicação diretamente à culturas do *M. tuberculosis* (em início de crescimento) sem a necessidade de obtenção de DNA purificado (Barnes et al. 2003). Tem sido aplicado à estudos globais sobre a diversidade genética em *M. tuberculosis* e estudos de vigilância epidemiológica da tuberculose (Kanduma et al. 2003).

MIRU-VNTR tem o potencial de substituir futuramente o RFLP, sobretudo com aumento do seu poder discriminatório através da inclusão de novos loci.

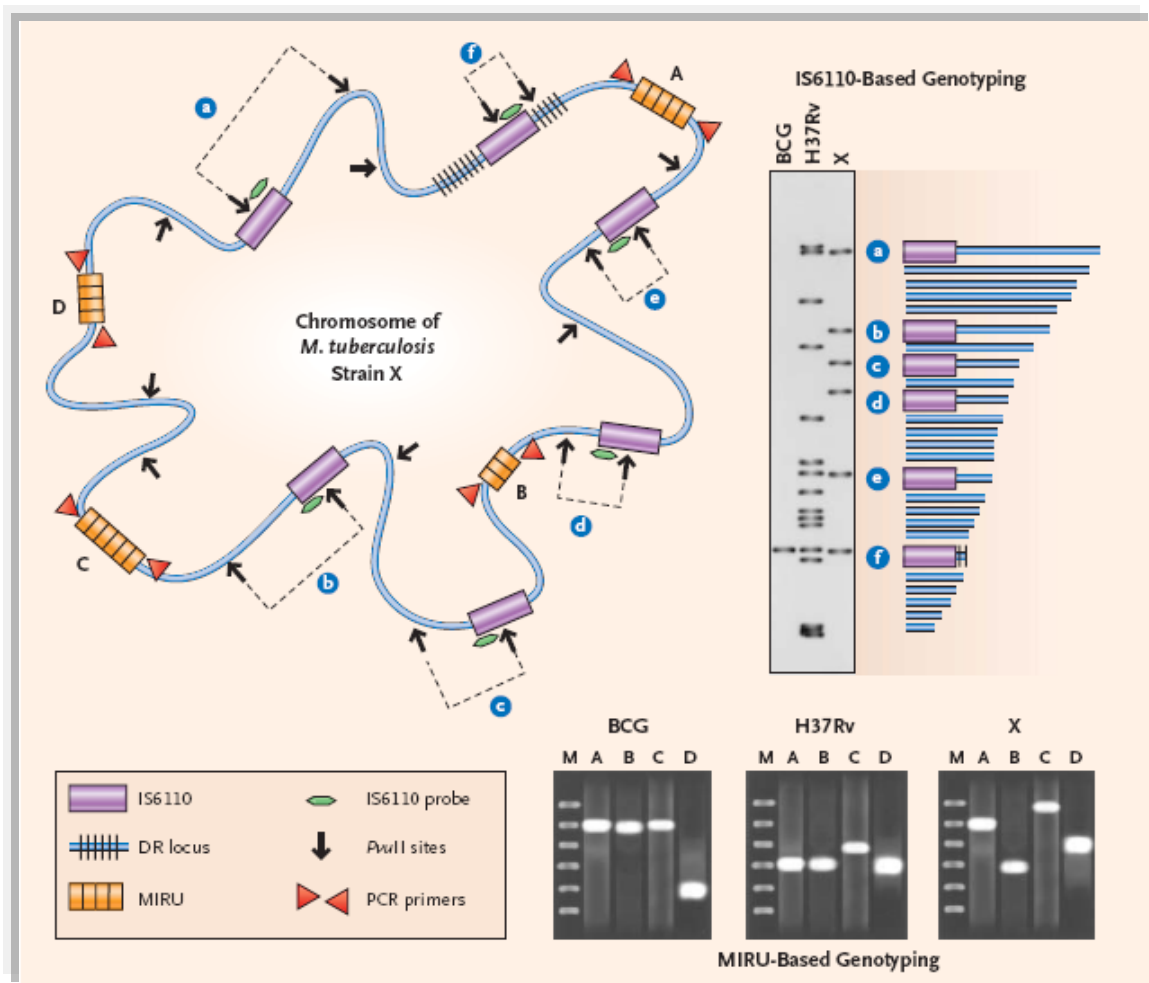


Figura 3: Cromossomo hipotético de um isolado X de *M. tuberculosis* e genotipagem de *M. bovis*-BCG, *M. tuberculosis* H37Rv e isolados X, utilizando as técnicas de RFLP-IS6110 e MIRU-VNTR (Fonte: Barnes PF et al., Molecular Epidemiology of Tuberculosis. N Engl. J Med. 2003; 349: 1149-56.).

A tipagem por “spoligotyping” baseia-se no polimorfismo do DNA presente no locus denominado “Direct Repeat” (DR), presente exclusivamente

Introdução

no genoma de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. O número de DRs varia entre as diferentes espécies de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* e está presente em um número de 49 cópias em *M. bovis*-BCG e 39 em *M. tuberculosis* H37Rv. Entre as seqüências DRs estão localizadas as seqüências espaçadoras (“spacer”) não repetitivas que podem conter de 34 a 41 pb (Hermans et al. 1991). O “spoligotyping” convencional (Kamerbeek et al. 1997) é capaz de detectar a presença ou ausência de 43 “spacers” de seqüências conhecidas, por PCR e hibridação dos mesmos com seus respectivos DNAs complementares imobilizados em membrana.

Os isolados de *M. tuberculosis* de amostras clínicas, variam de acordo com o número de DRs e com a presença ou ausência das seqüências espaçadoras. As bases moleculares deste polimorfismo estão provavelmente relacionadas à recombinação homóloga entre as DRs próximas ou distantes e também em função do rearranjo ocorrido devido a presença do transposon *IS6110* na região DR da maioria dos isolados de *M. tuberculosis* (Kamerbeek et al. 1997). A técnica de “spoligotyping” testa simultaneamente até 43 amostras, dispensando o cultivo do *M. tuberculosis*, com base na reação de PCR. Devido a esta versatilidade é uma técnica adequada para genotipagem, pois oferece resposta rápida para surtos e em situações que o cultivo do bacilo não seja possível.

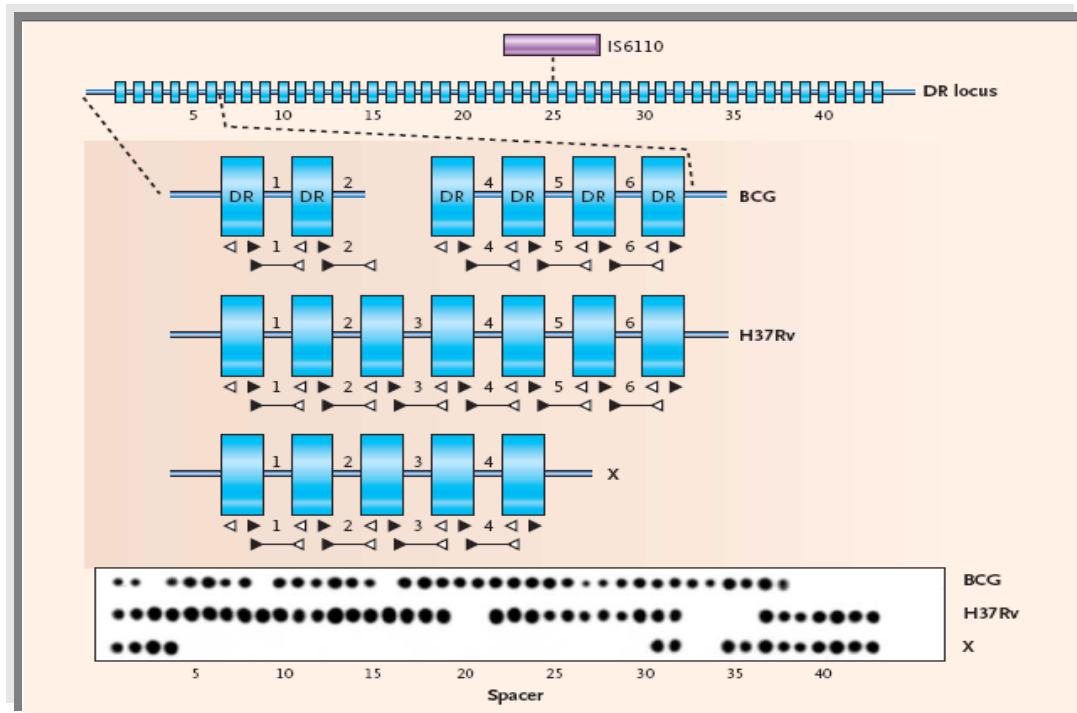


Figura 4: Spoligotyping: (Barnes PF et al., *Molecular Epidemiology of Tuberculosis*. N Engl. J Med. 2003; 349: 1149-56.

Atualmente, as diferentes técnicas de tipagem, como o MIRU, “spoligotyping” e RFLP-IS6110 estão sendo intensamente avaliadas com relação ao seu poder de resolução, pois são marcadores que até o momento melhor definem os isolados do complexo *M. tuberculosis*. Embora a tipagem de **RFLP-IS6110**, fosse considerado padrão ouro entre os métodos de tipagem (Small et al. 1994; van Embden et al. 1993), um número de limitações foi demonstrado, em nível teórico e prático (McHugh et al. 1998). Primeiro, seu poder discriminatório para isolados com menos de seis cópias IS6110 é baixo e, conseqüentemente tipagem secundária usando um outro marcador genético independente é requerido frequentemente (Chaves et al. 1996). Segundo, a existência de um locus preferencial da IS6110 ou “ipl” (Fang et al. 1997; Warren et al. 2000) levanta uma importante questão; a identidade entre dois isolados por tipagem de IS6110, em elevado número de cópias, nem sempre indica a transmissão recente do *M. tuberculosis* (Gillespie et al. 2000). Em terceiro lugar, **RFLP-IS6110** é uma metodologia demorada e trabalhosa, e a comparação intra ou inter-laboratorial adequada entre perfis é uma tarefa difícil

Introdução

que requer a entrada e a perícia intensiva dos investigadores. Assim, a fim de melhorar a comparação de perfis de RFLP, os softwares especializados são necessários (Salamon et al. 1998). Por estas razões, a execução global da técnica de **RFLP-IS6110** permanece difícil e metodologias alternativas de genotipagem rápidas, simples, e com custo mais baixo são requeridas.

O “**spoligotyping**” e o **RFLP-IS6110** apresentam diferenças com relação à capacidade de distinguir isolados, pois embora o RFLP-IS6110 seja o **padrão ouro** para estudo de epidemiologia molecular, isolados com uma ou poucas cópias de IS6110 são melhores discriminadas pelo “spoligotyping” (Kamerbeek et al. 1997; Gouget de la Salmonière et al. 1997). As metodologias de tipagem molecular têm estabelecido relações epidemiológicas entre os isolados de *M. tuberculosis* responsáveis por surtos e/ou ligações entre isolados circulantes em determinada área. O “spoligotyping” foi reconhecido como capaz de distinguir especificidades geográficas entre seus “**spoligotypes**”, de modo que alguns isolados agrupados em famílias estejam relacionados a uma determinada população, região geográfica e até a própria história da dispersão da tuberculose no mundo (Sola et al. 1999).

Muitos loci adicionais de VNTR foram identificados em poucos anos e estes loci podem variar consideravelmente em sua habilidade de diferenciar entre os isolados. O poder discriminatório da tipagem VNTR conseqüentemente, dependerá dos loci usados e parte das diferenças obtidas entre estudos diferentes, além da diferença entre a dinâmica da transmissão da doença, pode ser devido à utilização de diferentes marcadores. Com a padronização internacional dos mais apropriados loci VNTR, os quais podem diferir entre a espécie ou genótipos, a tipagem VNTR será aplicada mais extensamente e realçará nossa compreensão da dinâmica da transmissão e estrutura da tuberculose na população.

Aplicar métodos de genotipagem baseados em PCR em isolados de *M. tuberculosis* tipados previamente pelo **RFLP-IS6110** e comparar o poder discriminatório de cada método em relação ao padrão ouro foi o objetivo da investigação de Sola et al (2001) em isolados da Sicília. Os autores puderam verificar que a combinação de VNTR e “spoligotyping” é uma boa estratégia de

Introdução

triagem para detectar ligações epidemiológicas em estudos de epidemiologia da tuberculose em nível molecular.

Outro estudo avaliou 103 isolados de *M. tuberculosis* de diferentes origens geográficas utilizando **VNTR** (loci ETR-A a ETR-E), “**spoligotyping**” e MIRU-VNTR. O MIRU demonstrou ser a técnica mais discriminatória que os outros dois métodos e a inclusão de VNTR e MIRU em associação com “spoligotyping” tornou-se a melhor alternativa para tipagem de uma grande quantidade de isolados desconhecidos em substituição ao RFLP-IS6110 (Sola et al. 2003).

Kwara et al. (2003) avaliaram a utilidade epidemiológica do emprego de métodos de tipagem secundária para diferenciação de isolados de *M. tuberculosis* previamente agrupadas em “cluster” pelo RFLP-IS6110, submetendo-as ao “spoligotyping” e MIRU-VNTR. Os autores demonstraram que MIRU-VNTR é útil como tipagem secundária para isolados em “cluster”, com número de cópias de IS6110 alto e baixo. O MIRU-VNTR reduziu o número de isolados em falsos “clusters”, permitindo que a investigação de contatos fosse efetivamente mais focalizada. Assim, a habilidade de MIRU-VNTR diferenciar alguns “clusters” definidos por IS6110 e “Spoligotypes” sugeriu que a genotipagem combinada de RFLP-IS6110 e “spoligotyping” têm um resultado superestimado da doença transmitida recentemente.

Comparando a utilidade do RFLP-IS6110 com o VNTR e MIRU em um caso de “cluster” entre 53 pacientes, Hawkey et al. (2003) observaram que a concordância entre as três metodologias foi completa, mas os autores destacam a velocidade com que combinação da tipagem MIRU e VNTR facilita o acesso em tempo real dos resultados para algumas das investigações, influenciando as escolhas em traçar contatos. Assinalam ainda sobre a facilidade da comparação de resultados (números multidígitos) e no gerenciamento da investigação.

Em contraposição, Scott et al. (2005), afirmaram que a baixa sensibilidade e especificidade apresentadas pelas técnicas de tipagem MIRU-VNTR e “spoligotyping” resultaram em estimativas de transmissão continuada e com pouca capacidade de detectar grupos de alto risco. Da mesma forma,

Introdução

com relação ao potencial para investigar epidemias, confirmar contaminação cruzada no laboratório, e como modalidade secundária de tipagem para isolados com baixo número de cópias, os dados sugerem que MIRU-VNTR e “spoligotyping” têm parâmetros operacionais inaceitáveis para estudos epidemiológicos em nível populacional.

Estudo recente que avaliou o poder discriminatório e a reprodutibilidade de novos métodos de tipagem para isolados do Complexo *M. tuberculosis*, concluiu que quatro técnicas de tipagem, o RFLP-IS6110, LM-PCR (ligation-mediated PCR), FLiP (Fast ligation-mediation PCR) e VNTR são altamente confiáveis, discriminatórias e apropriadas para tipagem epidemiológica. Verificaram também que a tipagem por VNTR (utilizando os loci MIRUs e os QUB - Queens University of Belfast), é uma técnica adotada mais facilmente pelos laboratórios, que detecta polimorfismos em loci múltiplos e é superior para tipagem de isolados que contêm poucas cópias de IS6110.(Kremer et al. 2005)

Nesse estudo em particular, o objetivo principal foi avaliar, por epidemiologia molecular, um número de amostras encaminhadas dos postos de saúde para verificar a influência do DOT-A (com profilaxia de contatos) em comparação ao DOT sozinho na incidência da tuberculose em 8 bairros do município do Rio de Janeiro. A hipótese principal era que a possível diminuição da incidência no grupo DOT-A seria causada pela redução da transmissão recente da tuberculose o que resultaria na redução do número de agrupamentos de isolados com perfis genéticos idênticos ou semelhantes.

Portanto, nessa revisão verificamos que estudos de grande relevância mostraram o quanto à epidemiologia molecular tem contribuído para o entendimento da dinâmica da tuberculose nos mais diversos cenários. Dessa forma, pretendemos avaliar também a utilidade dessas ferramentas moleculares na detecção da transmissão recente da tuberculose no município do Rio de Janeiro depois da implementação do programa DOTS.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- ▶ Avaliar a influência da terapia diretamente observada (DOT) na transmissão recente da tuberculose em oito bairros do município Rio de Janeiro atendido por três centros médicos de saúde na Área de Planejamento 1 (AP 1.0).
- ▶ Realizar a tipagem molecular nos isolados de *M. tuberculosis* pela análise de RFLP-IS6110, “spoligotyping” e MIRU-VNTR para definição da taxa de cluster e, em paralelo, nível de transmissão recente.
- ▶ Identificar os fatores de risco para a transmissão da tuberculose nos oito bairros pela associação de dados clínico-epidemiológicos com tipagem molecular.
- ▶ Verificar a acurácia do spoligotyping, MIRU-VNTR e RFLP- IS6110-5’ como metodologias de tipagem auxiliar ao IS6110-RFLP-3’.

CASUÍSTICA e MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Histórico do Estudo:

Esta tese de doutorado foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias do Departamento de Micobacterioses do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. O estudo faz parte de um projeto de colaboração entre a “School of Medicine” do “Johns Hopkins University” (Baltimore, EU), o Programa de Pneumologia Sanitária da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, o Núcleo de Pesquisa em Tuberculose da Universidade Federal do Rio de Janeiro e a Fundação Oswaldo Cruz, RJ.

O projeto foi financiado pela denominada “International Collaboration in Infectious Disease Research” (ICIDR) do “National Institute of Health” (NIH) e teve como proposta o desenvolvimento de um projeto multidisciplinar enfocando abordagens inovadoras para o controle da tuberculose. Dessa forma, foi estabelecido como programa, a condução de três projetos (P1, P2 e P3) de pesquisa inter-relacionados, avaliando o impacto de estratégias inovadoras para o controle da Tuberculose, apoiado por um núcleo administrativo e por diagnóstico molecular.

Os projetos têm como objetivo principal:

P1: Conduzir um ensaio aleatório baseado em comunidades para intensiva avaliação de DOT versus DOT-A (profilaxia de contatos familiares) em duas comunidades urbanas no Rio de Janeiro com altas taxas de Tuberculose. O impacto dessas estratégias na incidência da Tuberculose e na transmissão recente poderá ser verificado pela taxa de cepas com genótipos idênticos.

P2: Conduzir ensaio de terapia preventiva para contatos domiciliares de alto risco de pacientes com Tuberculose ativa nas comunidades do projeto 1 (1x semana, RIF + INH/ 12 meses; 2X semana RIF + PZA/ 8 meses), com a finalidade de assegurar eficácia, segurança e adesão ao tratamento.

P3: Desenvolver, avaliar e validar testes diagnósticos rápidos para Tuberculose ativa usando novas e apropriadas técnicas moleculares com objetivo da avaliação das mesmas em países em desenvolvimento com altas taxas de Tuberculose.

Esta tese descreve parte da execução do projeto 1.

3.2. Informações gerais sobre o município do Rio de Janeiro:

Com mais de 5,8 milhões de habitantes, o município do Rio de Janeiro é uma das grandes metrópoles mundiais, núcleo de vasta região metropolitana de mais de 10 milhões de habitantes. Localiza-se na costa brasileira, junto à entrada da baía de Guanabara.

A origem da cidade como porto na baía de Guanabara marca sua configuração, num formato comum a tantas metrópoles marítimas. No caso do Rio de Janeiro, o crescimento se ajustou a uma topografia peculiar. A região é formada de macios montanhosos, entalhados por vales profundos, e de linhas de morros que segmentam planícies mais amplas, ou mais estreitas (Instituto Pereira Passos). A cidade se constitui num amplo mosaico de mais de 1.200 Km², composto de paisagens muito diferenciadas em termos de conteúdos físicos e sociais.

O município está dividido em 32 Regiões Administrativas (RA), com 159 bairros, integradas a 10 Áreas de Planejamento (AP's).

A realidade de saúde da população carioca expressa pelo menos dois aspectos marcantes e que caracterizam o Rio de Janeiro: uma população em que de cada 100 pessoas, 13 tem acima de 60 anos de idade e uma cidade onde a cada três horas morre uma pessoa vítima de agressões/ homicídios (Indicadores de Saúde 2005). A composição etária da cidade se expressa no impressionante peso que as doenças crônico-degenerativas têm no conjunto dos óbitos. Este grupo de doenças se caracteriza pela evolução longa, por tratamentos de alto custo social e econômico, que não se limitam aos gastos

com internações hospitalares, mas também com a necessidade de estruturas de reabilitação e de suporte social (Indicadores de Saúde 2005).

A violência marca outra situação, que cruelmente vêm caracterizando esta cidade. Os homicídios e os acidentes de trânsito são os principais agravos que atingem violentamente os jovens homens cariocas. Para cada 100 mortes que ocorrem de 15 aos 24 anos – 88 devem-se à causas violentas (Indicadores de Saúde 2005).

Entre as AP's, observamos que a distribuição destas mortes não ocorre de modo igualitário. Assim como temos áreas da cidade em que o acesso aos serviços de saúde e outros bens e serviços favorecem melhores condições de saúde das pessoas que ali vivem, em outras áreas onde esses equipamentos sociais e oportunidades de uma vida melhor são escassas, prevalecem toda ordem de desalentos, em particular a violência.

Outro problema para o Rio: 5000 mortes ao ano - das chamadas Causas Mal Definidas de morte, representando um grave problema para o conhecimento das necessidades de ações de saúde, pois este grupo de mortes pode estar compreendendo casos que requeiram intervenções imediatas – como é o caso das doenças transmissíveis, em particular as de notificação compulsória, como meningite, tuberculose, etc. As Causas Mal Definidas de morte expressam em parte um problema na prática dos profissionais de saúde, em particular médicos, quanto ao registro dos dados do atendimento médico-hospitalar nos boletins de atendimento da emergência e prontuários. Por outro lado, as Causas Mal Definidas de morte, representam, sem dúvida, um importante marcador da exclusão de uma parcela importante da população do acesso a qualquer forma de atenção à saúde (Indicadores de Saúde 2005).

3.3. Desenho do Estudo e Casuística:

Trata-se de um estudo prospectivo, desenvolvido em três Regiões Administrativas (RA) da cidade do Rio de Janeiro: Portuária (1), Rio Comprido (3) e São Cristóvão (7) (conforme discriminado na figura 5), que se integram à Área de Planejamento 1.0.

Oito bairros foram divididos em 2 grupos de Tratamento Diretamente Supervisionado:

- DOT
- DOT-A que é a supervisão observada do tratamento mais a profilaxia de contatos domiciliares.

Quadro 8: Bairros do município do Rio de Janeiro dividido por grupos de tratamento.

DOT-A	DOT
1. São Cristóvão	5. Estácio
2. Cidade Nova	6. Rio Comprido
3. Catumbi	7. Santo Cristo
4. Mangueira	8. Benfica

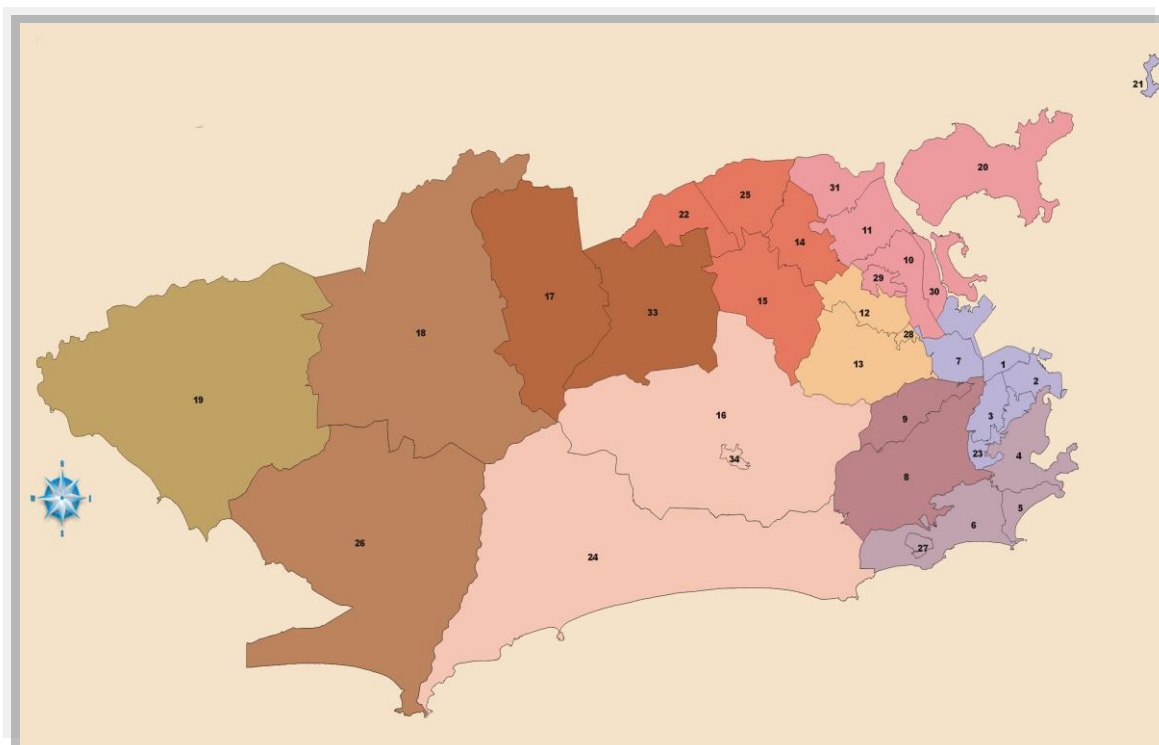


Figura 5: Mapa das Áreas de Planejamento de Saúde (AP's) e Regiões Administrativas – 2004 (AP 1.0 incluídas no presente estudo – 1. Portuária (Santo Cristo); 3. Rio Comprido (Catumbi, Cidade Nova e Estácio); 7. São Cristóvão (Benfica e Mangueira)).

Os pacientes foram atendidos em 3 Centros Municipais de Saúde: O CMS Marcolino Candau localizado no Rio Comprido atendeu pacientes do próprio bairro mais Catumbi e Cidade Nova; o CMS Ernesto Zeferino Tibau Jr atendeu São Cristóvão, Mangueira e Benfica e o CMS José Messias do Carmo atendeu Santo Cristo.

O período de implantação da estratégia DOTS nos CMS incluídos neste estudo estão discriminados no quadro 9.

Quadro 9: Período de implantação da estratégia DOTS e localização dos CMS incluídos neste estudo.

UNIDADE DE SAÚDE	Localização	AP's	Implantação do DOTS
CMS Marcolino Candau	Rio Comprido	1.0	Julho/ 1999
CMS Ernesto Zeferino Tibau Jr	São Cristóvão	1.0	Agosto/ 1999
CMS José Messias do Carmo	Santo Cristo	1.0	Novembro/ 1999

De modo sistemático foram incluídos nos esquemas DOT e DOT-A, os casos de tuberculose identificados para tratamento nos três centros de saúde que prestam serviços nos 8 bairros e com as seguintes características:

DOT:

- Homem ou mulher com diagnóstico confirmado de Tuberculose (casos novos e recorrentes);
- De qualquer idade;
- Soropositivos e soronegativos para o HIV;
- Ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido;
- Consentir em aderir aos protocolos e medicações.

DOT-A (contatos):

- Homens e mulheres vivendo em contato domiciliar com um caso de tuberculose pulmonar, em alto risco para desenvolvimento de tuberculose (mas sem evidência de tuberculose ativa).

Alto risco definido como:

- HIV soropositivo, sem levar em conta os resultados iniciais de PPD;
- PPD positivo definido como ≥ 5 mm de induração;
- PPD negativo na primeira avaliação de contato e positiva na segunda avaliação após 4 a 12 meses.

Exclusão de terapia preventiva:

- Tuberculose ativa
- História de sensibilidade/ intolerância para qualquer medicação utilizada no estudo
- Evidência de hepatite aguda
- História ou evidência laboratorial de cirrose
- gravidez

Esquema de tratamento:

- 2 meses: 800 mg INH/ 600 mg RMP/ 3000 mg PZA
- 4 meses: 800 mg INH/ 600 mg RMP

Terapia preventiva:

- 6 meses (2x por semana) 600 mg ou 800 mg INH

A coleta nas oito comunidades foi realizada durante 4 anos consecutivos (2001, 2002, 2003 e 2004). No ano de 2000 foi iniciado um projeto piloto com objetivo de avaliar o treinamento dos profissionais de saúde nos postos, verificar o fluxo do material clínico, o processamento das amostras para realização das culturas, provas bioquímicas e teste de suscetibilidade a drogas. Recebemos as primeiras culturas de *M. tuberculosis*, a partir de maio de 2002.

3.4. Análise microbiológica dos isolados de *M. tuberculosis*:

Os espécimes clínicos de origem pulmonar foram enviados para o Laboratório de Micobacteriologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ) onde foi realizada identificação das culturas por teste bioquímico e posteriormente o teste de sensibilidade às drogas.

3.5. Extração do DNA genômico dos isolados de *M. tuberculosis*:

A extração do DNA foi feita seguindo o protocolo descrito por van Embden et al. (1993). Aproximadamente 50 mg de massa bacteriana foi transferida para um tubo de microcentrífuga e misturado com 400 µl de tampão TE 1X (Tris-HCL 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, pH 8.0). A suspensão foi incubada a 80°C por 20 minutos para matar os bacilos e em seguida, adicionado 50 µl de lisozima na concentração de 10 mg/ml (Sigma); a mistura foi agitada e incubada a 37°C durante a noite.

Foram adicionado 75 µl de uma solução contendo SDS 10% (sodium dodecyl sulphate - Sigma) e 5 µl de proteinase K na concentração de 10 mg/ml (Sigma). Após agitação e incubação por 10 minutos a 65°C, foi adicionado 100 µl de NaCl 5M e em seguida 100 µl de solução CTAB/NaCl (N-cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide - Sigma); a mistura foi agitada até que o líquido se tornasse branco e incubados novamente por 10 minutos a 65°C.

Foram adicionados volumes iguais de clorofórmio (350 µl) e álcool isoamílico (350 µl) e a suspensão agitada por 10 segundos e em seguida centrifugada por 5 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e o DNA precipitado com 450 µl de isopropanol, colocando a mistura durante 30 minutos a - 20°C, seguida por centrifugação por 15 minutos a 12.000 g.

A maior parte do sobrenadante foi removida, em seguida foi adicionado 1 ml de etanol 70 % frio, centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante foi

descartado. O precipitado contendo o DNA foi ressuspensionado em 100 µl de tampão TE e estocado a - 20°C até o uso.

Foram aplicados 2 µl de DNA de cada amostra em gel de agarose 0,8 %, com a finalidade de verificar a concentração (quantidade) e a qualidade (integridade).

3.6. Técnicas de tipagem molecular:

3.6.1. Análise do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) baseado na seqüência de inserção IS6110:

Esta metodologia foi descrita por van Embden et al. (1993) e segue as seguintes etapas:

A. Digestão do DNA com a enzima *PvuII*:

Foram digeridos em torno de 4,5 µg de cada amostra a ser analisada e da cepa referência Mt14323 com *PvuII* para um volume final de 30 µl em um tubo de microcentrífuga.

A mistura da reação foi preparada adicionando-se um volume de DNA contendo a quantidade desejada, 1 µl da enzima *PvuII* (10 U/ µl), 10% do volume do tampão de enzima (10 X) e quantidade de água destilada estéril para completar 30µl. A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 37°C durante a noite.

B. “Southern Blotting”:

A separação dos fragmentos das amostras de DNA obtidos após digestão com a enzima *PvuII* foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE 1X por 18 horas a 25 volts. Em seguida o gel recebeu o

tratamento com 500 ml de HCl 0,25 M por 10 minutos e a seguir foi tratado duas vezes com 500 ml de NaOH 0,4 M por 20 minutos.

O gel foi colocado em um sistema “vacuum blotter apparatus” (GE Healthcare Life Sciences) para a transferência dos fragmentos de DNA para membrana Hybond N-plus (GE Healthcare Life Sciences). Após a transferência a membrana contendo os fragmentos de DNA foi lavada com 500 ml de solução SSC 2X (SSC 20 X - NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M; pH 7).

C. Preparação da sonda (DNA probe) pela PCR:

Foram utilizados 20 ng de DNA da cepa referencia Mt14323 (*M. tuberculosis*) e os oligonucleotídeos iniciadores INS 1 – 5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC; INS 2 - 5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA .

O programa de amplificação consistia de: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto.

O produto da PCR foi submetido a uma precipitação com 0,1 volume de acetato de sódio 3M, seguida da adição de 2 volumes de etanol 100 % gelado. A mistura foi homogeneizada e incubada a -20°C durante a noite. E posteriormente, foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento lavado com etanol 70 % gelado.

Após a evaporação do etanol residual, o sedimento foi ressuspenso em 500 ul de TE 1X e armazenado a - 20°C até o uso.

D. Marcação da sonda IS6110:

A sonda IS6110 foi diluída com água do Kit ECL (GE Healthcare Life Sciences) para uma concentração de 10 ng/µl, desnaturada a 100° C em banho-maria por 5 minutos e resfriada imediatamente em gelo por 1 a 3 minutos.

A seguir a sonda diluída passou pelas seguintes etapas de marcação: foi adicionado volume igual de “DNA labelling reagent” (Kit ECL) e misturado cuidadosamente com a pipeta. Em seguida o mesmo volume de glutaraldeído (Kit ECL) e cuidadosamente misturado com a pipeta. A sonda marcada foi agitada cuidadosamente por 2 segundos, centrifugada poucos segundos a 12.000 g e em seguida incubados a 37°C por 10 minutos. Quando não utilizada imediatamente para hibridação, a sonda foi congelada a - 20°C após a adição de 2 volumes de glicerol.

E. Hibridação e detecção da IS6110:

A membrana foi enrolada, colocada dentro de uma garrafa de hibridação, adicionado tampão de hibridação do Kit ECL já aquecido a 42° C e colocada no forno de hibridação a 42° C por 45 minutos. Em seguida a sonda foi adicionada à membrana e a hibridação foi realizada durante a noite.

Após o tempo de hibridação, a membrana foi submetida a duas lavagens com 20 ml de tampão primário de lavagem (360 g uréia, 4 g SDS e 25 ml SSC 20X) por 20 minutos a 42° C. Em seguida a membrana foi lavada em 500 ml de tampão SSC 2X e por último em água destilada.

A membrana foi tratada com a mistura de volumes iguais (7 ml de cada) de reagente de detecção 1 (peroxidase) e reagente de detecção 2 (luminol) (Kit ECL) e em seguida, sobreposta por um Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences) por um período que variou de 40 minutos a 2 horas para a detecção dos perfis de IS6110.

As auto-radiografias foram escaneadas para um computador e analisadas pelo software BioNumerics, version 4.5- 2005 (Applied Maths – Bélgica).

As amostras que apresentaram perfis eletroforéticos idênticos foram classificadas como “cluster”.

3.6.2. Análise da região “Direct Repeat” (DR) – (“spoligotyping”- Spacer Oligonucleotide Typing):

A. Amplificação do locus DR:

Foram utilizados nos experimentos 20 ng de DNA das cepas *M. tuberculosis* em estudo e das cepas controle *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG.

A PCR foi realizada utilizando 20 pmol dos iniciadores DRa 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3'- biotilado e DRb 5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3', 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, perfazendo um volume total de 60 ul.

O programa de amplificação consistia de desnaturação inicial do DNA a 96°C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 1 minuto, anelamento a 56° C por 1 minutos e extensão a 72°C por 30 segundos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

B. Hibridização com a membrana e revelação:

Trinta microlitros do produto da PCR foram diluídos em 150 µL de 2x SSPE/ 0, 1% SDS e desnaturados a 99°C durante 10 minutos, e em seguida colocados em banho de gelo.

Esta suspensão foi aplicada ao “miniblotter” (MN45, Isogen, Holanda), onde previamente foi montada uma membrana (Isogen, Holanda) contendo as 43 seqüências correspondentes aos espaçadores conhecidos na região DR do *M. tuberculosis*.

A hibridação da membrana foi então realizada a temperatura de 60°C por um período de 60 minutos e em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com 2x SSPE/ 0,1% SDS e então incubada com um conjugado estreptavidina-peroxidase a 42° C por um período de 45 a 60 minutos.

A membrana foi então lavada duas vezes com 2x SSPE/ 0,5% SDS a 42° C por 10 minutos e mais duas lavagens com 2x SSPE a temperatura

ambiente. Em seguida foi tratada com a mistura de volumes iguais de reagente de detecção 1 (peroxidase) e reagente de detecção 2 (luminol) (Kit ECL) e em seguida, sobreposta por um Hyperfilm ECL por um período de duas horas.

C. Interpretação e tabulação dos resultados:

Após revelação, os sinais obtidos com os 43 espaçadores para cada isolado foram transformados em formato binário (0 = falta de sinal e 1 é presença de sinal). Estes perfis binários dos 43 espaçadores foram em seguida introduzidos em uma planilha Excel, e junto com os perfis, criados colunas contendo o código da cepa, código DOT e bairro.

Esta planilha foi introduzida no BioNumerics utilizando um “Open Database Connection Protocol” (ODBC) e para a visualização dos “clusters” e estrutura populacional, foram construídos dendrogramas utilizando coeficiente binário e algoritmos como UPGMA e Neighbor Joining (N-J) (software BioNumerics, version 4.5- 2005 Applied Maths – Bélgica).

3.6.3. Análise do número variável de repetições em tandem (MIRU – mycobcaterial interspersed-repetitive-unit):

A. Amplificação dos 12 loci MIRU-VNTR:

Foram utilizados 12 sistemas de PCR, sendo que os iniciadores e as condições de PCR foram os mesmos descritos por Supply et al. 2000. Para cada um dos 12 sistemas (Quadro 2), foram desenvolvidos pares de iniciadores para amplificação de fragmentos cujo tamanho variam de 51 a 77 pb.

Quadro 10: 12 loci MIRU-VNTR: iniciadores desenvolvidos para amplificação por PCR.

locus MIRU	MIRU- VNTR (pb)	Iniciadores (5'- 3')	Polimorfismo
2	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT	Baixo
4	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGTCAGC	Alto
10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	Alto
16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAATA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	Alto
20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	Baixo
23	53	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC	Baixo
24	54	CGACCAAGATGTGCAGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	Baixo
26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG	Alto
27	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA	Baixo
31	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	Alto
39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT	Baixo
40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	Alto

Foram utilizados 30 ng dos DNAs alvo e da cepa padrão de *M. tuberculosis* (H37Rv). Para cada cepa foram preparadas 25 µl da mistura de reação com seus respectivos iniciadores conforme quadro abaixo:

Quadro 11: Condições da “Mix-PCR”

MIRU	Reações para 25 µl
MIRU 4	Taq polimerase Recombinante (Invitrogen) (1U), Tampão da Taq 10 X, DNTP (0,2 mM), Primer (0,4 mM), Glicerol P.A (10%), MgCl ₂ (3.0 mM)
MIRU 26 e 40	Taq polimerase Recombinante (Invitrogen) (1U), Tampão da Taq 10 X, DNTP (0,2 mM), Primer (0,4 mM), DMSO P.A (5%), MgCl ₂ (3.0 mM)
MIRU 2, 23 e 39	Taq polimerase Recombinante (Invitrogen) (1U), Tampão da Taq 10 X, DNTP (0,2 mM), Primer (0,4 mM), DMSO P.A (5%), MgCl ₂ (2.5 mM)
MIRU 20, 24 e 27	Taq polimerase Recombinante (Invitrogen) (1U), Tampão da Taq 10 X, DNTP (0,2 mM), Primer (0,4 mM), DMSO P.A (5%), MgCl ₂ (1.5 mM)

Para cada grupo de amostra testada, foram incluídos controles positivos (DNA do *M. tuberculosis* H37Rv) e controles negativos (“mix-PCR” sem DNA)

A reação de amplificação foi realizada utilizando o seguinte programa: um ciclo de desnaturação inicial do DNA a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C / 1 minuto, anelamento a 59°C/ 1 minuto e extensão a 72°C/ 1.5 minutos. Extensão final a 72°C por 10 minutos.

B. Visualização e análise:

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 2% preparado em tampão TBE 0,5X (Tris-HCl 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM; pH 8,0). A corrida eletroforética foi efetuada a 90 V por um período de 4 horas. Ao final, o DNA foi corado com solução de brometo de etídeo (10 mg/ ml), visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador e fotografado para análise.

Os perfis eletroforéticos foram analisados por comparação com marcador de peso molecular (50 bp ou 100 bp ladder; Invitrogen) e o número de cópias para cada MIRU determinado através da utilização do quadro a baixo:

Quadro 12: Correspondência entre os tamanhos de produtos previstos de PCR e dos alelos de MIRU-VNTR para os 12 loci polimórficos de MIRU-VNTR.

Allele	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23 ¹	MIRU 23 ²	MIRU 24	MIRU 26 ¹	MIRU 26 ²	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40
0	402	175	482	565	437	558	150	395	461	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	608	200	447	512	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	661	253	501	563	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	714	306	555	614	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	767	359	609	665	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	820	412	663	716	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	873	465	717	767	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	926	518	771	818	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	979	571	825	869	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	1032	624	879	920	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	1085	677	933	971	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	1138	730	987	1022	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	1191	783	1041	1073	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	1244	836	1095	1124	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	1297	889	1149	1175	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1360	1592	1350	942	1203	1226	1050	1293	1287	1335	1164

Fonte: Supply et al., 2000, *Mol. Microbiol.*, 36, 762-771; Mazars et al 2001, *PNAS*, 98, 1901-1906 ; Supply et al. 2001, *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3563-3571

C. Interpretação e tabulação dos resultados:

Da mesma forma que foi feito com os dados de “spoligotyping”, os resultados do MIRU-VNTR foram introduzidos em planilha Excel, utilizando os mesmos códigos e informações associadas com os isolados para permitir comparação com “spoligotyping”. A tabela foi introduzida no Bionumerics utilizando um “Open Database Connection Protocol” (ODBC) e foram

construídos dendrogramas utilizando um coeficiente categórico e algoritmos UPGMA e N-J software (BioNumerics, version 4.5- 2005(Applied Maths – Bélgica).

3.7. Análise estatística:

A análise estatística para associação de fatores de risco para o desenvolvimento da tuberculose entre os grupos DOT e DOT-A e bairros foi determinada por variáveis contínuas, utilizando o teste do qui-quadrado ou teste Fischer, incluindo correção de Yates para pequenas amostras. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1. População estudada:

Durante o período de 2001-2004, um total de 741 pacientes foi diagnosticado com tuberculose e incluídos para tratamento DOT nos três centros médicos de saúde (CMS Marcolino Candau, CMS Ernesto Zeferino Tibau Jr e CMS José Messias do Carmo) do município do Rio de Janeiro que prestam atendimento aos oito bairros incluídos neste estudo.

Os pacientes como referido anteriormente, foram distribuídos em dois grupos de tratamento supervisionado: DOT e DOT-A (profilaxia de contatos). Dos 385 (51.9%) pacientes do grupo DOT, 127 (17.1%) eram do Estácio, 132 (17.8%) Rio Comprido, 68 (9.1%) Santo Cristo e 58 (7.8%) Benfica. No grupo DOT-A, um total de 356 (48.1%) pacientes foram incluídos, sendo que 112 (15.1%) eram de São Cristóvão, 53 (7.1%) Cidade Nova, 117 (15.7%) Catumbi e 74 (9.9%) Mangueira.

No banco de dados do projeto, foi ainda registrado um total de 635 contatos DOT-A que não desenvolveram tuberculose. Devido à ausência de busca ativa de contatos no grupo DOT, não há inclusão no banco de contatos de pacientes deste grupo. Um total de 32 contatos desenvolveu tuberculose, sendo 16 pacientes no grupo DOT e 16 no grupo DOT-A.

4.2. Tipagem molecular:

4.2.1. Fluxo do recebimento das amostras para tipagem molecular:

Recebemos para o estudo em questão um total de 455 isolados de *M. tuberculosis*, sendo que 23 (5,1%) não pertenciam ao grupo de pacientes estudados, 15 (3,3%) não tinham crescimento bacteriano e 64 isolados (14%) eram do mesmo paciente. No total, 417 isolados de *M. tuberculosis* de 353 diferentes pacientes foram submetidas à tipagem molecular, o que representa

48% do número total de pacientes diagnosticados com tuberculose durante o período do estudo.

Com objetivo de entender o porquê do recebimento de um número muito menor de cepas do que previsto durante o desenvolvimento do projeto, fizemos um levantamento no livro de registro do Laboratório de Micobactérias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ), onde as amostras e as culturas foram processadas e identificadas. Verificamos o recebimento de um total de 562 amostras clínicas. Desse total de 562 amostras, 81 (14,4%) amostras de 49 pacientes foram negativas para o *M. tuberculosis* e 26 (4,7%) amostras de 20 pacientes contaminaram.

Para avaliar se a amostragem recebida (genotipada) não apresentou desvio para um ou outro grupo de estudo (DOT e DOT-A), submetemos a amostragem ao teste do qui-quadrado.

4.2.2. Representatividade das amostras genotipadas em relação aos pacientes diagnosticados:

4.2.2.1. MIRU-VNTR:

As 417 culturas de 353 pacientes foram submetidas à tipagem por MIRU-VNTR. Dos 353 pacientes analisados, 166 pacientes pertenciam ao Grupo DOT-A e 187 ao grupo DOT somente.

A tabela 1 mostra a distribuição dos pacientes DOT e DOT-A atendidos nos centros médicos de saúde envolvidos no estudo.

Tabela 1: Distribuição dos 353 pacientes diagnosticados e genotipados, incluídos no esquema DOT e DOT-A em relação ao atendimento nos centros médicos de saúde.

Centro Médico de Saúde	Grupo DOT-A	Grupo DOT
	Bairros/ Nº de pacientes (%)	Bairros/ Nº de pacientes (%)
CMS Marcolino Candau	Catumbi: 57/(34.4)	Rio Comprido: 65/ (34.8)
	Cidade Nova: 19/ (11.5)	Estácio: 61/ (32.6)
CMS Ernesto Zef. Tibau Jr	São Cristóvão: 55/ (33.1)	Benfica: 26/ (13.9)
	Mangueira: 35/ (21.0)	
CMS José Messias do Carmo		Santo Cristo: 35/ (18.7)
TOTAL	166 (100)	187 (100)

Uma análise da representatividade dos 353 pacientes com pelo menos uma amostra genotipada em relação ao total dos 741 pacientes diagnosticados com tuberculose foi realizada através do teste de χ^2 quadrado (tabela 2). Foram avaliadas as características clínicas e sócio-demográficas dos genotipados e do total de pacientes diagnosticados.

Tabela 2: Características clínicas e sócio-demográficas dos pacientes DOT (total e genotipados).

Características	Pacientes DOT	Pacientes DOT	Pacientes DOT	P value
	Total	Genotipados	Não genotipados	
	(n = 741) n (%)	(n = 353) n (%)	(n = 388) n (%)	
Média de idade	–	37.2	34.3	p= 0.0025
Sexo				
Masculino	491 (66.3)	237 (67.2)	254 (65.4)	NS
Feminino	250 (33.7)	116 (32.8)	134 (34.5)	NS
Cor da pele				
Branca	285 (38.5)	145 (41.1)	140 (36.0)	NS
Negra	194 (26.2)	87 (24.7)	107 (27.5)	
Amarela	1 (0.1)	0	1 (0.25)	
Parda	261 (35.2)	121 (34.2)	140 (36.0)	
Estado Civil				
Solteiro	401 (54.1)	180 (50.9)	221 (57.1)	NS
Casado	145 (19.5)	80 (22.6)	65 (16.7)	
Separado	38 (5.1)	24 (6.7)	14 (3.6)	
U. consensual	122 (16.4)	52 (14.7)	70 (18.0)	
Divorciado	15 (2.0)	6 (1.7)	9 (3.2)	
Viúvo	19 (2.5)	11 (3.1)	8 (2.0)	
Situação de domicílio				
Alugado	212 (28.6)	111 (31.4)	101 (26.0)	NS
Próprio (pago)	465 (62.8)	210 (59.4)	255 (65.8)	
Próprio (pagando)	4 (0.5)	1 (0.2)	3 (0.77)	
Cedido	53 (7.1)	30 (8.4)	23 (5.9)	
Abrigo	5 (0.6)	1 (0.2)	4 (1.0)	
Sem teto	1 (0.1)	0	1 (0.25)	

Cômodos da casa

1	147 (20.0)	66 (18.8)	81 (21.0)	
2	237 (32.2)	117 (33.4)	120 (31.1)	
3	228 (31.0)	110 (31.4)	118 (30.6)	NS
≥ 4	117 (15.9)	55 (15.7)	62 (16.1)	
Outros	6 (0.8)	2 (0.5)	4 (1.0)	

Pessoas morando na mesma casa

1-3	380 (57.1)	170 (53.7)	210 (60.1)	
4-6	218 (32.7)	109 (34.4)	109 (31.2)	
7-9	42 (6.3)	23 (7.2)	19 (5.4)	NS
10-12	5 (0.7)	2 (0.6)	3 (0.86)	
> 12	3 (0.4)	2 (0.6)	1 (0.28)	
Outro	17 (2.5)	10 (3.1)	7 (2.0)	

Estar empregado no momento

Não	388 (52.3)	176 (49.8)	212 (54.6)	
Sim	353 (47.6)	177 (50.1)	176 (45.3)	NS

Grau de Instrução

Sem instrução formal	56 (7.5)	27 (7.6)	29 (7.5)	
1º Grau incompleto	411 (55.7)	199 (56.5)	212 (55.0)	
1º Grau completo	92 (12.4)	43 (12.2)	49 (12.7)	
2º Grau incompleto	71 (9.6)	33 (10.7)	38 (9.8)	
2º Grau completo	82 (11.1)	38 (10.7)	44 (11.4)	NS
Superior incompleto	16 (2.1)	10 (2.8)	6 (1.55)	
Superior completo	9 (1.2)	2 (0.5)	7 (1.81)	

Renda Familiar

Menos 1 sal. Mínimo	118 (17.3)	52 (16.1)	66 (18.4)	
De 1 a menos de 2	27 (33.4)	107 (33.2)	120 (33.6)	
De 2 a menos de 4	209 (30.7)	102 (31.6)	107 (29.9)	
De 4 a menos de 6	60 (8.8)	30 (9.3)	30 (8.40)	NS
De 6 a menos de 8	25 (3.6)	12 (3.7)	13 (3.64)	
De 8 a menos de 10	21 (3.0)	11 (3.4)	10 (2.80)	
Mais de 10 sal. mínimos	19 (2.7)	8 (2.4)	11 (3.08)	

Contato com doente com tuberculose

Não	315 (48.6)	148 (47.8)	167 (49.2)	NS
Sim	333 (51.3)	161 (52.1)	172 (50.7)	

Esteve preso em presídio

Não	681 (91.9)	323 (91.5)	358 (92.2)	NS
Sim	60 (8.0)	30 (8.4)	30 (7.73)	

Esteve preso em delegacia

Não	628 (84.7)	302 (85.5)	326 (84.0)	NS
Sim	113 (15.2)	51 (14.4)	62 (15.9)	

Esteve internado em hospital geral

Não	422 (56.9)	213 (60.3)	209 (53.8)	NS
Sim	319 (43.0)	140 (39.6)	179 (46.1)	

Utilizou alguma droga intravenosa

Não	697 (94.0)	336 (95.1)	361 (93.0)	NS
Sim	44 (5.9)	17 (4.8)	27 (6.95)	

Teve contato homossexual ou bissexual

Não	696 (93.2)	332 (94.0)	364 (93.8)	NS
Sim	45 (6.0)	21 (5.9)	24 (6.18)	

Teve contato heterossexual com parceiro com infecção por HIV

Não	706 (97.7)	338 (98.2)	368 (95.1)	NS
Sim	16 (2.2)	6 (1.7)	10 (2.64)	

Teve contato sexual com prostitutas, múltiplos parceiros ou usuários de drogas injetáveis

Não	615 (83.3)	282 (80.3)	333 (86.0)	p = 0.03782
Sim	123 (16.6)	69 (19.6)	54 (13.9)	

Já fumou ou fuma

Não	355 (47.9)	151 (42.7)	204 (52.5)	p = 0.00764
Sim	386 (52.0)	202 (57.2)	184 (47.4)	

Quantos cigarros por dia

< 10	155 (40.1)	80 (39.6)	75 (40.7)	
11-20	136 (35.2)	67 (33.1)	69 (37.5)	
21-30	25 (6.4)	14 (6.9)	11 (5.9)	
31-40	46 (11.9)	26 (12.8)	20 (10.8)	NS
> 40	24 (6.2)	15 (7.4)	9 (4.89)	

Vacinado com BCG

Não	239 (33.3)	126 (36.8)	113 (30.2)	NS
Sim	477 (66.6)	216 (63.1)	261 (69.7)	

Teve diagnóstico anterior de tuberculose

Não	564 (76.4)	270 (76.4)	294 (76.3)	NS
Sim	174 (23.5)	83 (23.5)	91 (23.6)	

Recebeu tratamento para tuberculose

Sim	174	83		
-----	-----	----	--	--

Fez o tratamento para tuberculose completo

Não	58 (33.5)	27 (32.5)	31 (34.4)	NS
Sim	115 (66.4)	56 (67.4)	59 (65.5)	

Fez PPD anteriormente

Não	604 (83.1)	298 (85.3)	306 (81.1)	NS
Sim	122 (16.8)	51 (14.6)	71 (18.8)	

Resultado do PPD

0-4 mm	33 (47.1)	13 (44.8)	20 (48.7)	
5-9 mm	10 (14.2)	4 (13.7)	6 (14.6)	NS
≥ 10 mm	27 (38.5)	12 (41.3)	15 (36.5)	

Fez teste anti-HIV anteriormente

Não	488 (66.7)	236 (67.6)	252 (65.9)	NS
Sim	243 (33.2)	113 (32.3)	130 (34.0)	

Resultado do teste anti-HIV anterior

Positivo	198 (88.3)	97 (93.2)	101 (84.1)	p = 0.03390
Negativo	26 (11.6)	7 (6.7)	19 (15.8)	

Resultado atual para o teste anti-HIV

Positivo	404 (54.5)	200 (56.6)	204 (52.5)	NS
Negativo	52 (7.0)	19 (5.3)	33 (8.5)	
Desconhecido	285 (38.4)	134 (37.9)	151 (38.9)	

PPD atual

0-4 mm	123 (17.1)	54 (15.8)	69 (18.2)	NS
≥ 5 mm	469 (65.2)	237 (69.5)	232 (61.3)	
Não realizado	127 (17.6)	50 (14.6)	77 (20.3)	

RX de tórax

Normal	5 (0.6)	0	5 (1.28)	p = 0.00061
Não sug. de tuberculose	3 (0.4)	0	3 (0.77)	
Sug. Tuberculose ativa	4 (0.5)	1 (0.2)	3 (0.77)	
Susp. Tuberculose ativa	677 (91.4)	338 (96.0)	339 (87.3)	
Não realizado	51 (6.8)	13 (3.6)	38 (9.7)	

Resultado da 1ª baciloscopia

Negativo	133 (17.9)	35 (9.9)	98 (25.2)	NS
Positivo 1-19 colônias	8 (1.0)	2 (0.5)	6 (1.54)	
Positivo +	161 (21.7)	90 (25.4)	71 (18.2)	
Positivo ++	179 (24.1)	121 (34.2)	58 (14.9)	
Positivo +++	111 (14.9)	70 (19.8)	41 (10.5)	
Não realizado	149 (20.1)	35 (9.9)	114 (29.3)	

Resultado da 2ª baciloscopia

Negativo	150 (20.2)	58 (16.4)	92 (23.7)	NS
Positivo 1-19 colônias	1 (0.1)	1 (0.2)	0	
Positivo +	176 (23.7)	140 (39.6)	36 (9.2)	
Positivo ++	89 (12.0)	70 (19.8)	19 (4.8)	
Positivo +++	111 (14.9)	82 (23.2)	29 (7.4)	
Não realizado	214 (28.8)	2 (0.5)	212 (54.6)	

Resultado da 3ª baciloscopia

Negativo	131 (17.6)	51 (14.4)	80 (20.6)	
Positivo 1-19 colônias	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.25)	
Positivo +	162 (21.8)	132 (37.3)	30 (7.7)	NS
Positivo ++	79 (10.6)	62 (17.5)	17 (4.3)	
Positivo +++	106 (14.3)	82 (23.2)	24 (6.1)	
Não realizado	261 (35.2)	25 (7.0)	236 (52.3)	

Tipo de tuberculose

Pulmonar	657 (88.6)	343 (97.1)	314 (80.9)	
Extrapulmonar	64 (8.6)	4 (1.1)	60 (15.4)	NS
Miliar	1 (0.2)	0	1 (0.25)	
Pul. Extrapulmonar	19 (2.5)	6 (1.7)	13 (52.3)	

Grupos DOT

DOT	385 (51.9)	187 (52.9)	198 (51.0)	
DOT-A	356 (48.0)	166 (47.0)	190 (48.9)	NS

Bairros

São Cristovão	53 (7.1)	19 (5.3)	34 (8.7)	
Cidade Nova	53 (7.1)	19 (5.3)	34 (8.7)	
Catumbi	117 (15.7)	57 (16.1)	60 (15.4)	NS
Mangueira	74 (9.9)	35 (9.9)	39 (10.0)	
Estácio	127 (17.1)	61 (17.2)	66 (17.0)	
Rio Comprido	132 (17.8)	65 (18.4)	67 (17.2)	
Santo Cristo	68 (9.1)	35 (9.9)	33 (8.5)	
Benfica	58 (7.8)	26 (7.3)	32 (8.2)	

P value ≤ 0.05; NS: nenhuma significância

A grande maioria dos parâmetros avaliados não teve nenhuma diferença significativa entre o grupo genotipado e o total, com exceção de contato sexual com prostitutas, múltiplos parceiros ou usuários de drogas injetáveis ($p = 0.03782$), ser ou ter sido fumante ($p = 0.00764$), resultado anterior do teste anti-HIV ($p = 0.03390$) e RX de tórax ($p = 0.00061$).

A comparação dos genotipados e o total de pacientes por esquema DOT (DOT e DOT-A) e por bairro também foi equilibrada não apresentando

diferença entre os grupos, ou seja, não apresentou nenhuma significância estatística.

4.2.2.2. RFLP-IS6110-3':

Fizemos à análise da representatividade de 76 pacientes diagnosticados no período de 2001 em relação ao total dos 741 pacientes diagnosticados com tuberculose, utilizando o teste de χ^2 quadrado. Foram avaliadas as características clínicas e sócio-demográficas dos genotipados e do total de pacientes diagnosticados.

Foram analisados todos os parâmetros da análise anterior (para amostras genotipadas por MIRU-VNTR) e significância estatística foi observada nas variáveis: estado civil ($p = 0.0012$), renda familiar ($p = 0.0256$), tosse com catarro ($p = 0.013$), perda de peso ($p = 0.009$), estar preso em delegacia ($p = 0.030$), vacinado com BCG ($p = 0.043$), PPD atual ($p = 0.034$), lesão cavitária ($p = 0.003$) e resultado de 1º baciloscopia ($p = 0.0006$). Devido ao baixo número de submetidos ao RFLP-IS6110, existe mais desvio do que o observado para MIRU-VNTR, assim a interpretação de fatores de risco para transmissão recente deverá ser feita com muito cuidado.

O mais importante, é que a comparação dos genotipados e o total de pacientes para os esquemas DOT (DOT e DOT-A) e por bairro não apresentaram nenhuma significância estatística.

4.2.2.3. “spoligotyping”:

Um total 347 isolados de *M. tuberculosis* foram submetidos ao “spoligotyping” e a análise da representatividade das amostras genotipadas por não foi realizada por se tratar basicamente da mesma amostragem.

4.2.3. Resultados da tipagem molecular:

4.2.3.1. Análise (preliminar) por RFLP-IS6110-3':

Estrutura populacional dos isolados de *M. tuberculosis*

Foi feita uma análise de 76 isolados de *M. tuberculosis* utilizando a técnica de RFLP-IS6110 e hibridação com a sonda correspondente ao lado direito 3' do sítio *PvuII*.

Entre os 76 isolados, um total de 66 perfis diferentes foi encontrado. Em relação à taxa de cluster, 61 isolados (80,3%) apresentaram perfis únicos, enquanto 15 (19,7%) pertenciam a 5 "clusters". Nessa análise, encontramos um isolado (2341) com perfil "típico de 8 bandas" (Suffys et al. 2000).

Nos isolados analisados, encontramos perfis que variaram de 3 a 17 cópias de IS6110.

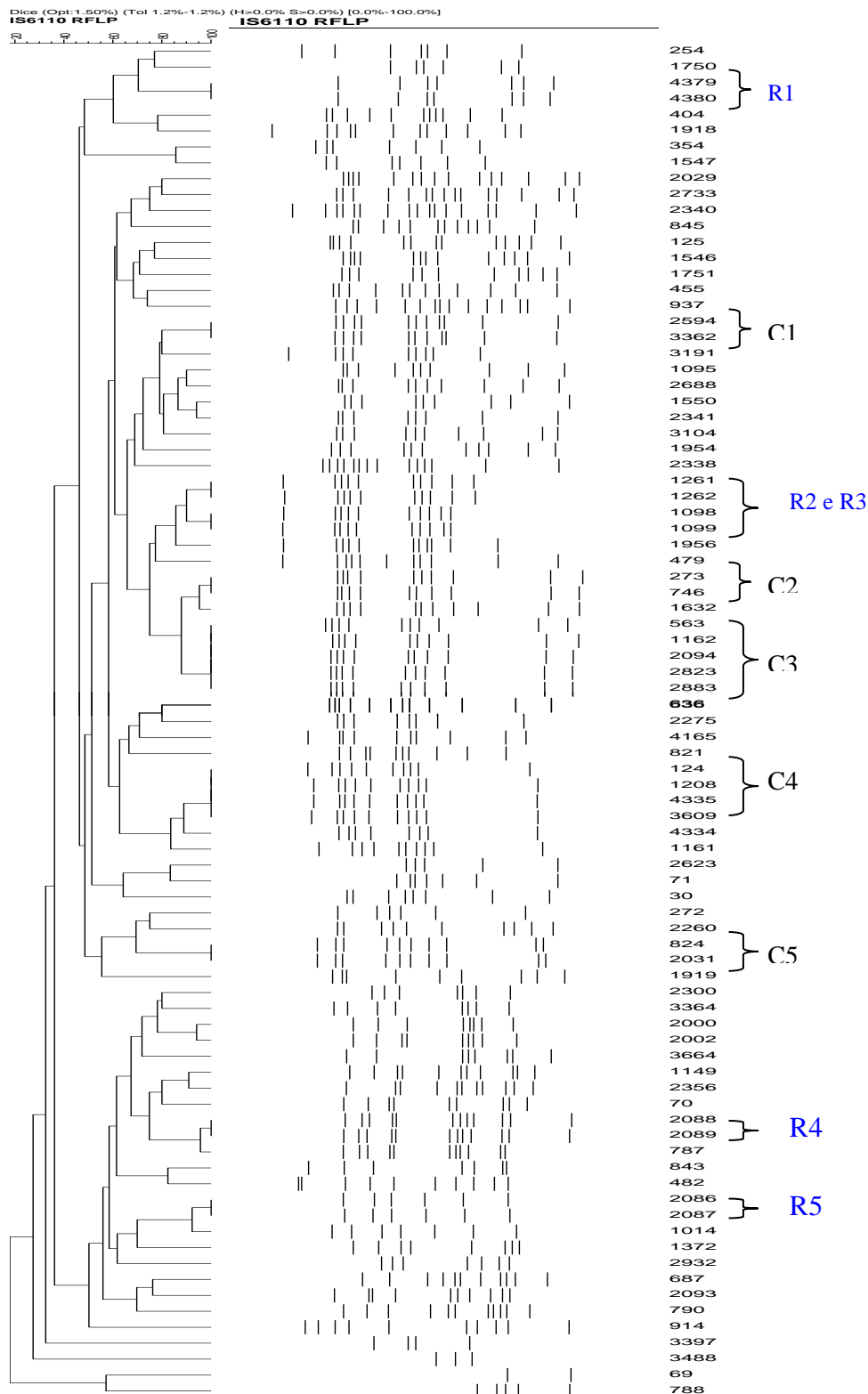
De 5 pacientes, 2 isolados foram submetidos ao RFLP e destes, os perfis eram idênticos. As amostras de mesmo paciente repetido no dendrograma, aparecem com a seguinte numeração: R1: 4379 e 4380; R2: 1261 e 1262; R3: 2086 e 2087; R4: 2088 e 2089; R5: 1098 e 1099.

Tabela 3: Distribuição do número de isolados de *M. tuberculosis* em "cluster" classificadas pelo RFLP-IS6110.

"Cluster" RFLP-IS6110	Nº de isolados "cluster"	Nº de cópias IS6110
C1	2	11
C2	2	10
C3	5	10
C4	4	10
C5	2	10

A seguir na figura 1, os “clusters” estão representados pelos seguintes isolados: C1: 2504 e 3362; C2: 273 e 746; C3: 563,1162, 2094, 2823 e 2883; C4: 124, 1208, 4335 e 3609; C5: 824 e 2031.

Figura 6: Dendrograma do padrão de RFLP-IS6110-3' obtido de 76 pacientes diferentes.



Análise de fatores de risco para agrupamento:

Embora exista diferença considerável entre algumas das características clínicas e demográficas da população submetida ou não ao RFLP, analisamos se há uma relação entre as características da população e o perfil RFLP das cepas pertencerem a agrupamento ou não. Gostaríamos de esclarecer que esta análise foi realizada como um exercício antecipado a realização do mesmo em uma amostragem mais completa.

A análise para fatores de risco para o desenvolvimento da tuberculose pela verificação do número de isolados que pertencem a “cluster” para a maioria das variáveis clínicas e demográficas não apresentou significância estatística. Variáveis bacteriológicas, como resultados de cultura, resistência a isoniazida (INH), resistência a rifampicina (RMP) e ambas (INH e RMP) foram testadas, mas nenhuma associação foi observada.

Tabela 4: Análise de fatores de risco para tuberculose dos pacientes com isolados em “cluster” dos 8 bairros dos Grupos DOT e DOT-A genotipados pela técnica de RFLP-IS6110.

Fatores de Risco	Nº pacientes	Nº pacientes	Nº pacientes	P value
	(n = 76)	“cluster” (n = 15)	não “cluster” (n = 61)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Teve diagnóstico anterior de tuberculose				
Não	52 (68.4)	7 (46.6)	45 (73.7)	NS
Sim	24 (31.5)	8 (53.3)	16 (26.2)	
Resultado atual para o teste anti-HIV				
Negativo	45 (59.2)	6 (40.0)	39 (63.9)	NS
Positivo	6 (7.89)	0	6 (9.83)	
Não realizado	25 (32.8)	9 (60.0)	16 (26.2)	

RX de tórax

Suspeita de TB ativa	75 (98.6)	14 (93.3)	61 (100.0)	NS
Não realizado	1 (1.31)	1 (6.66)	0	

Grupos DOT

DOT	40	7 (46.6)	33 (52.6)	NS
DOT-A	36	8 (53.3)	28 (45.9)	

Bairros

São Cristovão	6 (7.8)	1 (6.6)	5 (8.1)	
Cidade Nova	4 (6.5)	0	4 (5.2)	
Catumbi	14 (18.4)	3 (20.0)	11 (18.0)	
Mangueira	12 (15.7)	4 (26.6)	8 (13.1)	NS
Estácio	15 (19.7)	2 (13.3)	13 (21.3)	
Rio Comprido	17 (22.3)	4 (26.6)	6 (9.8)	
Santo Cristo	7 (9.2)	1 (6.6)	1 (1.6)	
Benfica	1 (1.3)	0	1 (1.63)	

P value ≤ 0.05; NS: nenhuma significância

4.2.3.2. Análise preliminar por RFLP-IS6110-5':

Com a finalidade de avaliar o poder discriminatório da técnica RFLP-IS6110 utilizando a sonda correspondente ao lado “esquerdo” (5') do sítio *PvuII* da IS6110 com o obtido utilizando a sonda correspondente ao lado “direito”(3') e analisar a utilidade de RFLP-IS6110-5' como método de tipagem secundária (visando comparar ou não agrupamentos obtidos com a sonda 3'), fizemos uma análise também preliminar utilizando esta versão do RFLP-IS6110. Um total de 86 isolados de *M. tuberculosis* de 76 pacientes foi analisado, mas devido a problemas na hibridação de uma membrana, somente 62 isolados apresentaram perfil satisfatório e foram submetidos à análise.

Nos isolados analisados, encontramos perfis que variaram de 4 a 15 cópias de IS6110.

Dos 62 isolados, 50 (80,6%) apresentaram perfis únicos e 12 (19,4%) pertenciam a 5 “clusters”, totalizando 55 perfis.

Dos 5 “clusters” RFLP-IS6110-3’ idênticos incluindo 15 pacientes, um dos isolados de um “cluster” de duas amostras não apresentou perfil IS6110-5’ interpretável, enquanto 14 isolados mantiveram perfil IS6110-5’ idêntico.

Dos 5 pacientes com isolados repetidos no RFLP-IS6110-3’, uma amostra (2086) do grupo não hibridou por IS6110-5’. Dos outros quatro agrupamentos, três foram confirmados pela IS6110-5’ (figura 2; R1: 1261 e 1262; R2: 1098 e 1099; R3: 4370 e 4380) e um agrupamento de isolados repetidos não confirmaram (R: 2088 e 2089), provavelmente devido a erros na interpretação (bandas duvidosas) e deverão ser submetidas a nova análise e possivelmente outro experimento.

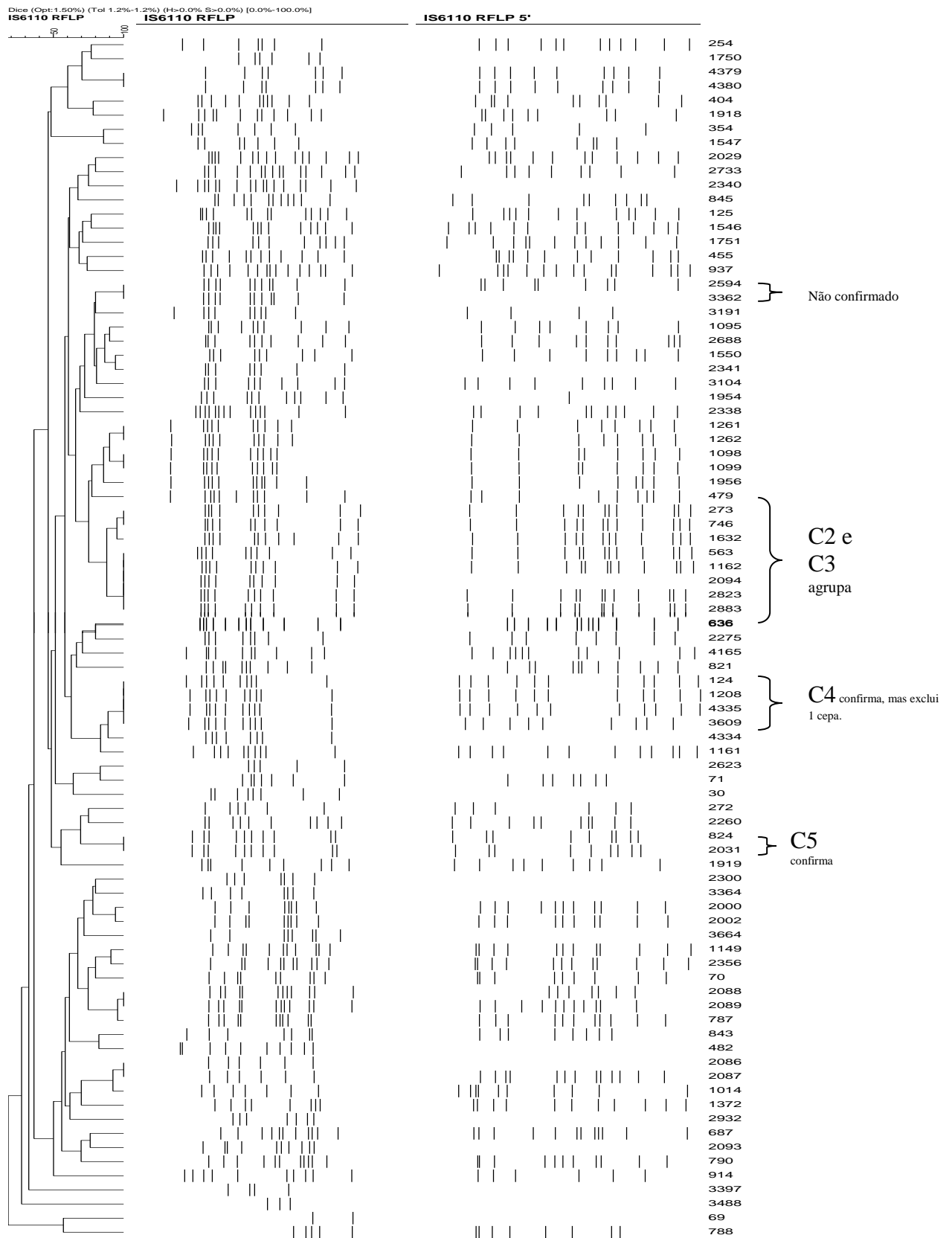
A tabela 5 resume o comportamento do “cluster”, quando as análises por IS6110-3’ versus IS6110-5’ são comparadas.

Tabela 5: Comportamento dos “clusters” classificados por IS6110-3’ quando submetidos a uma segunda técnica de tipagem: IS6110-5’.

Cluster IS6110-3’	Nº de isolados em “cluster”	Confirmação por IS6110-5’
C1	2	não avaliados
C2	2	agrupa com C3
C3	5	agrupa C2 e C3 exclui 3 cepas (2 formam outro “cluster”) e inclui outra.
C4	4	confirma, mas exclui 1 cepa
C5	2	confirma

OBS: Uma análise mais profunda com relação às diferenças na utilização das sondas dos lados “direito” e “esquerdo” do sítio de inserção da IS6110 esta descrito no manuscrito em anexo, submetido para revisão.

Figura 7: Dendrograma do padrão de RFLP-IS6110 3'- 5'.

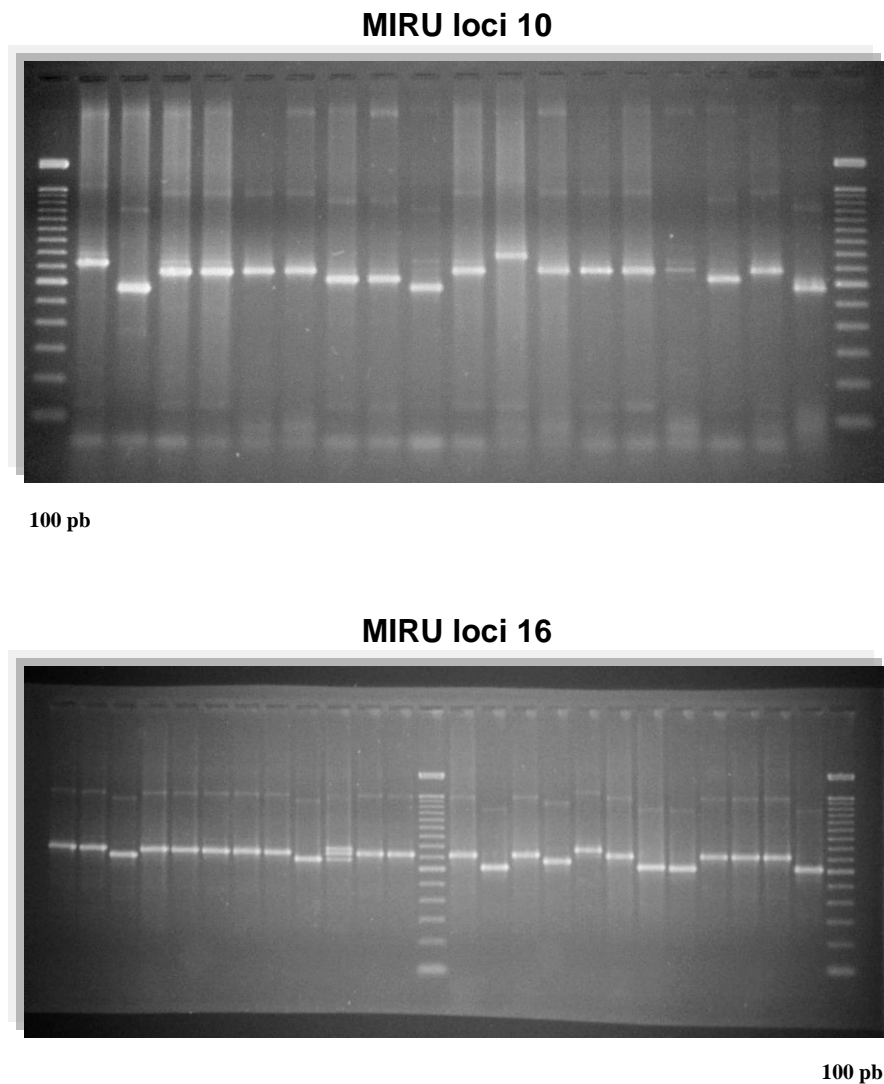


4.2.3.3. Análise por MIRU-VNTR:

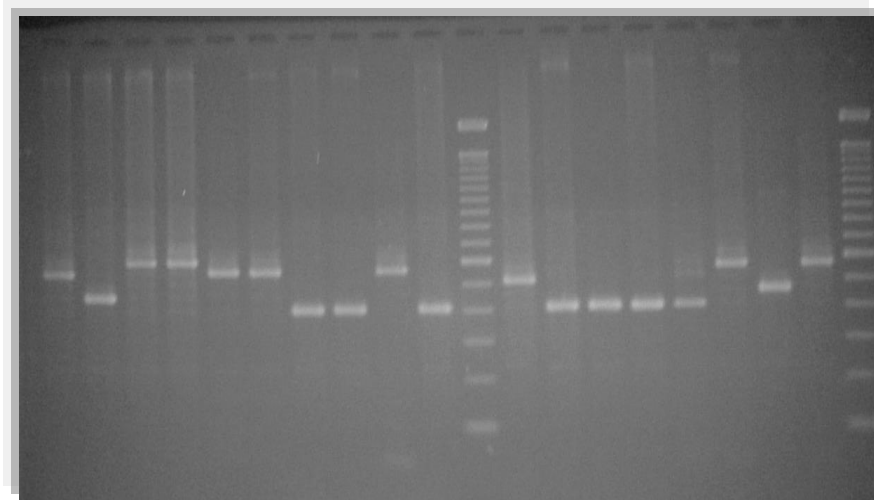
Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e a corrida eletroforética realizada para obter resolução máxima para os diferentes VNTR, variando o tamanho de 250 a 1200 pb. A quantidade de repetições para cada VNTR foi determinada pela comparação com marcador de peso molecular de 100 pb.

A figura 3 mostra produtos amplificados de alguns loci MIRU-VNTR.

Figura 8: Loci 10, 16 e 40 MIRU-VNTR em gel de agarose (loci 10 e 40 em nosso estudo verificado com alto polimorfismo).



MIRU loci 40



100 pb

Estrutura populacional das cepas de *M. tuberculosis*

Dos 353 isolados de *M. tuberculosis* analisadas pela técnica de MIRU-VNTR, 252 (71,4%) tinham perfis únicos e 101 (28,6%) pertenciam a 38 “clusters”, totalizando 290 perfis. Encontramos um “cluster” com 10 isolados, um com 7 isolados, dois com 5 isolados, um com 4 isolados, três com 3 isolados e 30 “cluster” com 2 isolados.

Quadro13: Classificação pela técnica de MIRU-VNTR dos 38 “clusters” distribuídos entre os grupos de tratamento DOT e DOT-A.

DOTS	M2	M4	M10	M16	M20	M23	M24	M26	M27	M31	M39	M40	Cluster
7022	1	2	3	2	2	6	1	5	3	2	2	1	C1
3044	1	2	3	2	2	6	1	5	3	2	2	1	C1
7021	1	2	4	3	2	6	1	5	2	2	2	2	C2
1050	1	2	4	3	2	6	1	5	2	2	2	2	C2
2042	1	3	4	1	2	5	1	6	1	2	3	5	C3
6112	1	3	4	1	2	5	1	6	1	2	3	5	C3
4006	2	1	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	C4
1092	2	1	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	C4
4001	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C5

Resultados

4020	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C5
6114	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	3	1	C6
2049	2	2	3	2	2	6	1	5	3	3	3	1	C6
7026	2	2	3	2	2	6	1	6	3	3	2	1	C7
2034	2	2	3	2	2	6	1	6	3	3	2	1	C7
2006	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2	3	C8
5047	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2	3	C8
7030	2	2	3	3	2	5	1	5	2	3	2	4	C9
6067	2	2	3	3	2	5	1	5	2	3	2	4	C9
3006	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4	C10
5018	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4	C10
7024	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4	C10
7043	2	2	3	3	2	6	1	3	3	3	2	3	C11
5087	2	2	3	3	2	6	1	3	3	3	2	3	C11
8015	2	2	3	3	2	6	1	5	2	3	2	3	C12
6086	2	2	3	3	2	6	1	5	2	3	2	3	C12
5041	2	2	3	3	2	6	1	6	4	3	2	1	C13
3043	2	2	3	3	2	6	1	6	4	3	2	1	C13
4054	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	3	1	C14
5114	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	3	1	C14
6052	2	2	4	2	2	6	1	5	2	3	2	1	C15
1040	2	2	4	2	2	6	1	5	2	3	2	1	C15
4002	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
3012	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
5012	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
7005	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
6019	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
6020	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
5021	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
3030	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
3031	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
7016	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	C16
1004	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	3	C17
5048	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	3	C17
5106	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	3	1	C18
5110	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	3	1	C18
6116	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	3	1	C18
3100	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	3	1	C18

Resultados

5103	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	3	3	C19
1088	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	3	3	C19
3090	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	3	3	C19
3029	2	2	4	2	2	7	1	5	3	3	2	1	C20
4057	2	2	4	2	2	7	1	5	3	3	2	1	C20
5072	2	2	4	3	1	4	1	5	2	3	2	3	C21
2026	2	2	4	3	1	4	1	5	2	3	2	3	C21
6085	2	2	4	3	2	4	1	5	3	3	3	3	C22
5120	2	2	4	3	2	4	1	5	3	3	3	3	C22
5054	2	2	4	3	2	5	1	4	2	3	2	3	C23
5061	2	2	4	3	2	5	1	4	2	3	2	3	C23
3053	2	2	4	3	2	6	1	5	2	3	2	3	C24
2018	2	2	4	3	2	6	1	5	2	3	2	3	C24
1060	2	2	4	3	2	6	1	5	2	3	2	3	C24
6071	2	2	4	3	2	6	1	5	2	3	2	4	C25
8043	2	2	4	3	2	6	1	5	2	3	2	4	C25
6025	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	1	C26
6029	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	1	C26
5037	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	1	C26
1025	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	1	C26
8044	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	1	C26
1074	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	1	C26
6073	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	1	C26
4015	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3	C27
3024	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	3	C27
6050	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	4	C28
5093	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	4	C28
6000	2	2	4	3	2	6	1	6	4	3	2	1	C29
5048	2	2	4	3	2	6	1	6	4	3	2	1	C29
7029	2	2	5	3	1	3	1	5	2	3	2	3	C30
3049	2	2	5	3	1	3	1	5	2	3	2	3	C30
1036	2	2	5	3	1	3	1	5	2	3	2	3	C30
5063	2	2	5	3	1	3	1	5	2	3	2	3	C30
1049	2	2	5	3	1	3	1	5	2	3	2	3	C30
3091	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	3	3	C31
5119	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	3	3	C31
2002	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3	C32
3082	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	C32

4030	2	2	5	3	2	5	1	5	2	3	2	3	C33
1053	2	2	5	3	2	5	1	5	2	3	2	3	C33
3056	2	2	5	3	2	5	1	5	2	3	2	4	C34
8037	2	2	5	3	2	5	1	5	2	3	2	4	C34
4014	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	C35
6036	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	C35
5099	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	C35
4027	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	3	4	C36
3095	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	3	4	C36
3114	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	3	4	C36
6128	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	3	4	C36
3115	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	3	4	C36
7034	2	2	5	3	2	6	1	5	2	3	2	3	C37
3057	2	2	5	3	2	6	1	5	2	3	2	3	C37
7004	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	2	C38
3040	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	2	C38

Diversidade genética dos isolados de *M. tuberculosis* coletados nos oito bairros do município do Rio de Janeiro

Na análise de diversidade alélica obtida para os 12 loci MIRU-VNTR (tabela 6), observamos que apenas o MIRU locus 24 não exibiu variação em seu número de cópias. Os MIRU loci 2, 4 e 20 exibiram uma maior frequência no alelo com duas repetições e por esta razão apresentam um poder discriminatório baixo.

Nos MIRU loci 10, 23 e 40 observamos um alto polimorfismo, contendo alelos com números de cópias que variaram de 1 a 9. Nesses loci polimórficos alguns alelos foram mais freqüentes que outros.

Utilizando “Gaston Hunter Discriminatory Index” ($h = 1 - \sum \chi_i^2$), verificamos que os loci 10, 23 e 40 tiveram um alto poder discriminatório (≥ 0.6), loci 16, 26, 27, 31 e 39 foram moderadamente discriminatórios (≥ 0.3) e loci 2, 4, 20 e 24 com baixo poder discriminatório (< 0.3).

Observamos que oito loci apresentaram um alta diversidade (10, 16, 23, 26, 27, 31, 39 e 40) e foram responsáveis por 67 % do poder discriminatório em relação aos 12 loci.

Tabela 6: Diversidade alélica dos 12 loci MIRU-VNTR avaliados nos isolados de *M. tuberculosis* coletados nos oito bairros do Município do Rio de Janeiro.

Alelo	12 loci MIRU-VNTR											
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
1	52	7	6	25	49	1	353	0	6	3	7	123
2	294	322	33	76	303	2	0	6	132	67	275	29
3	4	20	78	231	1	29	0	26	204	274	71	99
4	2	0	158	21	0	22	0	44	10	9	0	74
5	1	0	69	0	0	97	0	222	1	0	0	17
6	0	0	8	0	0	190	0	47	0	0	0	4
7	0	0	1	0	0	11	0	7	0	0	0	6
8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
3'	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
h	0,284	0,164	0,704	0,517	0,244	0,623	0,000	0,565	0,525	0,361	0,352	0,747

Diversidade alélica (h) definida como: $h = 1 - \sum \chi_i^2$, onde a χ_i é a frequência do alelo no locus.

“Cluster” MIRU-VNTR: área geográfica

Quando analisamos a formação de agrupamentos em regiões geográficas (no presente estudo, diferentes áreas geográficas também representam diferentes esquemas DOT) é importante verificar se a formação de “cluster” se estabelece dentro de uma região (um determinado esquema de DOT) ou entre regiões. Assim, verificamos a distribuição dos 38 “clusters” com relação aos dois grupos de tratamento (DOT e DOT-A) e os bairros a eles relacionados. Encontramos uma proporção de “clusters” assim representada: 7 “clusters” exclusivamente em DOT-A (18,5%), 8 “clusters” exclusivamente em DOT (21%) e 23 “clusters” com isolados obtidos de áreas com DOT e DOT-A (60,5%). Esta abordagem, em conjunto com a apresentada na tabela 7, mostra

Resultados

que a formação de agrupamentos, definida por MIRU-VNTR não apresenta diferenças significantes entre isolados de pacientes do grupo DOT e DOT-A.

Quadro 14: Distribuição por grupo de tratamento e origem geográfica dos 38 “clusters” classificados por MIRU-VNTR.

Nº DOTS	MIRU/ PERFIL	Bairros	Cluster	Grupo de tratamento
7022	123226153221	Sto C	C1	DOT
3044	123226153221	C	C1	DOT-A
7021	124326152222	Sto C	C2	DOT
1050	124326152222	SC	C2	DOT-A
2042	134125161235	CN	C3	DOT
6112	134125161235	RC	C3	DOT-A
4006	215325153323	M	C4	DOT-A
1092	215325153323	SC	C4	DOT-A
4001	223226153321	M	C5	DOT-A
4020	223226153321	M	C5	DOT-A
6114	223226153331	RC	C6	DOT
2049	223226153331	CN	C6	DOT-A
7026	223226163321	Sto C	C7	DOT
2034	223226163321	CN	C7	DOT-A
2006	223325143323	CN	C8	DOT-A
5047	223325143323	B	C8	DOT
7030	223325152324	Sto C	C9	DOT
6067	223325152324	RC	C9	DOT
3006	223325153324	C	C10	DOT-A
5018	223325153324	E	C10	DOT
7024	223325153324	Sto C	C10	DOT
7043	223326133323	Sto C	C11	DOT
5087	223326133323	E	C11	DOT
8015	223326152323	B	C12	DOT
6086	223326152323	RC	C12	DOT
5041	223326164321	E	C13	DOT
3043	223326164321	C	C13	DOT-A
4054	224126153331	M	C14	DOT-A
5114	224126153331	E	C14	DOT
6052	224226152321	RC	C15	DOT
1040	224226152321	SC	C15	DOT
4002	224226153321	M	C16	DOT-A
3012	224226153321	C	C16	DOT-A
5012	224226153321	E	C16	DOT
7005	224226153321	Sto C	C16	DOT
6019	224226153321	RC	C16	DOT
6020	224226153321	RC	C16	DOT
5021	224226153321	E	C16	DOT
3030	224226153321	C	C16	DOT-A
3031	224226153321	C	C16	DOT-A

Resultados

7016	224226153321	Sto C	C16	DOT
1004	224226153323	SC	C17	DOT
5048	224226153323	E	C17	DOT
5106	224226153331	E	C18	DOT
5110	224226153331	E	C18	DOT
6116	224226153331	RC	C18	DOT
3100	224226153331	C	C18	DOT-A
5103	224226153333	E	C19	DOT
1088	224226153333	SC	C19	DOT-A
3090	224226153333	C	C19	DOT-A
3029	224227153321	C	C20	DOT-A
4057	224227153321	M	C20	DOT-A
5072	224314152323	E	C21	DOT
2026	224314152323	CN	C21	DOT-A
6085	224324153333	RC	C22	DOT
5120	224324153333	E	C22	DOT
5054	224325142323	E	C23	DOT
5061	224325142323	E	C23	DOT
3053	224326152323	C	C24	DOT-A
2018	224326152323	CN	C24	DOT-A
1060	224326152323	SC	C24	DOT-A
6071	224326152324	RC	C25	DOT
8043	224326152324	B	C25	DOT
6025	224326153321	RC	C26	DOT
6029	224326153321	RC	C26	DOT
5037	224326153321	E	C26	DOT
1025	224326153321	SC	C26	DOT-A
8044	224326153321	B	C26	DOT
1074	224326153321	SC	C26	DOT-A
6073	224326153321	RC	C26	DOT
4015	224326153323	M	C27	DOT-A
3024	224326153323	C	C27	DOT-A
6050	224326153324	RC	C28	DOT
5093	224326153324	E	C28	DOT
6000	224326164321	RC	C29	DOT
5048	224326164321	E	C29	DOT
7029	225313152323	Sto C	C30	DOT
3049	225313152323	C	C30	DOT-A
1036	225313152323	SC	C30	DOT-A
5063	225313152323	E	C30	DOT
1049	225313152323	SC	C30	DOT-A
3091	225313153333	C	C31	DOT-A
5119	225313153333	E	C31	DOT
2002	225323153323	CN	C32	DOT-A
3082	225323153323	C	C32	DOT-A
4030	225325152323	M	C33	DOT-A
1053	225325152323	SC	C33	DOT-A
3056	225325152324	C	C34	DOT-A
8037	225325152324	B	C34	DOT
4014	225325153323	M	C35	DOT-A
6036	225325153323	RC	C35	DOT

5099	225325153323	E	C35	DOT
4027	225325153334	M	C36	DOT-A
3095	225325153334	C	C36	DOT-A
3114	225325153334	C	C36	DOT-A
6128	225325153334	RC	C36	DOT
3115	225325153334	C	C36	DOT-A
7034	225326152323	Sto C	C37	DOT
3057	225326152323	C	C37	DOT-A
7004	124326153222	Sto C	C38	DOT
3040	124326153222	C	C38	DOT-A

DOT-A: SC (São Cristóvão), CN (Cidade Nova), C (Catumbi), M (Mangueira); DOT: E (Estácio), RC (Rio Comprido), Sto C (Santo Cristo) e B (Benfica).

Análise de fatores de risco para agrupamento

A análise de fatores de risco para pertencer a agrupamento foi realizada para estes pacientes e não existiram diferenças significantes entre a maioria das variáveis. Apresentamos na tabela 7 as variáveis clínicas e demográficas que o teste apontou significância estatística. Variáveis bacteriológicas foram testadas e verificamos associação estatística com resistência a isoniazida (INH) ($p = 0.0393$). Para resistência a rifampicina (RMP) e ambas (INH e RMP), nenhuma associação foi observada.

Um aspecto importante é que nesse grupo também não foi encontrada nenhuma significância estatística para DOTS (DOT e DOT-A) e bairros.

Tabela 7: Análise de fatores de risco para tuberculose dos pacientes com isolados em “cluster” dos 8 bairros dos Grupos DOT e DOT-A genotipados pela técnica de MIRU-VNTR.

Fatores de Risco	Nº pacientes	Nº pacientes	Nº pacientes	P value
	(n = 353)	“cluster” (n = 101)	não “cluster” (n = 252)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Esteve preso em presídio				
Não	323 (91.5)	87 (86.1)	236 (93.6)	

Resultados

Sim	30 (8.4)	14 (13.8)	16 (6.3)	p = 0.02216
-----	----------	-----------	----------	--------------------

Esteve internado em hospital geral

Não	213 (60.3)	71 (70.2)	142 (56.3)	
Sim	140 (39.6)	30 (29.7)	110 (43.6)	p = 0.01547

Sim	56 (67.4)	18 (62.0)	38 (70.3)	NS
-----	-----------	-----------	-----------	----

Resultado atual para o teste anti-HIV

Negativo	200 (56.6)	67 (66.3)	133 (52.7)	
Positivo	19 (5.38)	3 (2.97)	16 (6.34)	
Não realizado	134 (37.9)	31 (30.6)	103 (71.3)	NS

Resistência

INH

Não	302 (86.0)	80 (80.0)	222 (88.4)	
Sim	49 (13.9)	20 (20.0)	29 (11.5)	p= 0.0393

RMP

Não	327 (93.1)	89 (89.0)	238 (94.8)	
Sim	24 (6.8)	11 (11.0)	13 (5.17)	NS

Ambos

Não	327 (93.1)	89 (89.0)	238 (94.8)	
Sim	24 (6.8)	11 (11.0)	13 (5.17)	

Grupos DOT

DOT	166 (47.0)	49 (48.5)	177 (46.4)	
DOT-A	187 (52.9)	52 (51.4)	135 (53.5)	NS

Bairros

São Cristovão	55 (15.5)	11 (10.8)	44 (17.4)	
Cidade Nova	19 (5.3)	7 (6.9)	12 (4.7)	

Catumbi	57 (16.1)	21 (20.7)	36 (14.2)	
Mangueira	35 (9.9)	10 (9.9)	25 (9.9)	NS
Estácio	61 (17.2)	20 (19.8)	41 (16.2)	
Rio Comprido	65 (18.4)	17 (16.8)	48 (19.0)	
Santo Cristo	35 (9.9)	11 (10.8)	24 (9.5)	
Benfica	26 (7.3)	4 (3.9)	22 (8.7)	

Pvalue \leq 0.05; NS: nenhuma significância.

4.2.3.4. Análise por “spoligotyping”:

Estrutura populacional de isolados de *M. tuberculosis*

Na análise realizada com 347 isolados de *M. tuberculosis* utilizando a técnica de “spoligotyping”, foi verificado um total de 247 (71.5%) isolados em “cluster” distribuídas em 39 “clusters”. O menor “cluster tinha 2 isolados e o maior 40” como mostra a tabela 8.

A distribuição dos 39 “clusters” em relação aos grupos de tratamento foi a seguinte: 5 (12.8%) “cluster” só em DOT-A, 6 (15.3%) “cluster” encontrados em DOT e 28 (71.7%) em DOT e DOT-A. Isso significa que das 247 isolados em “cluster um total de 113 (45.7%) eram provenientes do grupo DOT-A e 134 (54.3%) do grupo DOT, mostrando novamente a ausência de diferenças na taxa de agrupamento entre estes dois grupos.

Tabela 8: Distribuição do número de isolados em 39 “cluster” classificadas por “spoligotyping” segundo grupo de tratamento DOT e DOT-A.

“Cluster”	Família	Nº de isolados por grupo de tratamento	
C1	Beijing	DOT (3)	DOT-A (2)
C2	Haarlem 2	DOT-A (2)	
C3	LAM I 3	DOT (1)	DOT-A (2)
C4	LAM 2	DOT (12)	DOT-A (12)
C5	LAM 1	DOT (6)	DOT-A (5)

Resultados

C6	LAM 3	DOT (14)	DOT-A (8)
C7	S	DOT (2)	DOT-A (1)
C8	42-LAM 9	DOT (12)	DOT-A (13)
C9	Haarlem 1	DOT (5)	DOT-A (2)
C10	Haarlem 3	DOT (21)	DOT-A (19)
C11	53-T1	DOT (11)	DOT-A (13)
C12	Manu 2	DOT (1)	DOT-A (1)
C13	LAM 4	DOT (1)	DOT-A (1)
C14	LAM 6	DOT (7)	DOT-A (2)
C15	73-T2-T3	DOT (1)	DOT-A (3)
C16	86-T1		DOT-A (2)
C17	X3	DOT (1)	DOT-A (3)
C18	93-LAM 5	DOT (3)	
C19	106 U	DOT (2)	DOT-A (1)
C20	176-LAM 5	DOT (1)	DOT-A (1)
C21	177- LAM 9	DOT (1)	DOT-A (2)
C22	237- U	DOT (1)	DOT-A (1)
C23	1166-T1		DOT-A (2)
C24	T5- Madrid 2	DOT (3)	DOT-A (1)
C25	1284-T1	DOT (1)	
C26	1758 LAM U	DOT (1)	DOT-A (4)
C27	2007	DOT (1)	
C28	2070	DOT (1)	DOT-A (1)
C29	2573-LAM	DOT (3)	DOT-A (1)
C30	Desconhecida T	DOT (1)	DOT-A (1)
C31	Desconhecida 06	DOT (3)	DOT-A (1)
C32	Desconhecida 09 LAM		DOT-A (2)
C33	LAM		DOT-A (2)
C34	LAM	DOT (2)	DOT-A (2)
C35	Desconhecida 32 LAM	DOT (2)	
C36	Desconhecida 39	DOT (2)	
C37	Desconhecida 51 LAM	DOT (1)	DOT-A (1)
C38	Desconhecida 60 LAM	DOT (1)	DOT-A (1)
C39	157-T3	DOT (2)	

Encontramos 174 (50.1%) isolados da família LAM, 44 (12.7%) isolados da família T, 61 (17.5%) isolados da família Haarlem, 5 (1.4%) isolados da

família Beijing, 1 único isolado EAI (0.3%), 2 (0.6%) isolados da família Manu2 e 6 isolados (1.72%) da família X.

As principais famílias tinham a seguinte frequência com relação a classes:

FAMÍLIAS	CLASSES (nº cepas/ %)
LAM	LAM1 (11/ 6.3); LAM2 (24/ 13.7); LAM 3 (22/ 12.6); LAM 4 (2/ 1.14); LAM 6 (9/ 5.17); LAM 9 (24/ 13.7)
Haarlem	H1 (9/ 14.8); H2 (2/ 3.3); H3 (40/ 65.0)
T	T1 (24/ 12.7); T5 (4/ 9.0)
Beijing	5 (1.4)
Manu 2	2 (0.6)
X	X3 (4/ 66.6)
EAI	1

Análise de fatores de risco para agrupamento

A análise de fatores de risco também foi realizada para pacientes genotipados por “spoligotyping” e não existiram diferenças estatísticas entre a maioria das variáveis.

Apresentamos na tabela 9 as variáveis clínicas e demográficas que o teste apontou significância estatística.

Um aspecto importante é que nesse grupo também não foi encontrada nenhuma significância estatística para DOTS (DOT e DOT-A) e bairros.

Tabela 9: Análise de fatores de risco para tuberculose dos pacientes com isolados em “cluster” genotipados pela técnica de “spoligotyping”.

Fatores de Risco	Nº pacientes (n = 341) n (%)	Nº pacientes “cluster” (n = 248) n (%)	Nº pacientes não “cluster” (n = 93) n (%)	P value
Média de Idade		38.1	34.5	p = 0.01918
Cor da Pele				
Branca	140 (43.0)	100 (40.3)	40 (41.0)	
Negra	84 (24.6)	70 (28.2)	14 (15)	
Parda	117 (34.3)	78 (31.4)	39 (41.9)	p = 0.0294
Escarro com sangue				
Não	239 (70.0)	166 (66.9)	73 (78.4)	
Sim	102 (29.9)	82 (33.0)	20 (21.5)	p = 0.0378
Contatos com doentes com tuberculose				
Não	46 (48.6)	94 (43.7)	52 (61.1)	
Sim	154 (51.3)	121 (56.2)	33 (38.8)	p = 0.0064

P value ≤ 0.05

4.2.3.5. Análise combinada MIRU-VNTR e “spoligotyping”:

Estrutura populacional de isolados de *M. tuberculosis*

Na análise combinada de MIRU+”spoligotyping”, verificamos um total de 27 isolados distribuídos em 11 “clusters”, sendo um “cluster” com 5 isolados, dois com três isolados e outros sete com 2 isolados cada um.

O maior “cluster” de MIRU-VNTR com 10 isolados de *M. tuberculosis*(C16), incluiu somente amostras do ano de 2001 e 5 destas foram confirmadas por “spoligotyping” como pertencendo a família LAM2-17.

Resultados

A distribuição dos 11 “clusters” em relação aos grupos de tratamento foi a seguinte: 2 (18.2%) em DOT, 1 (9.1%) em DOT-A e 8 (72.7%) em DOT+DOT-A, compreendendo que das 27 isolados em “cluster” um total de 12 (44.5%) eram do grupo DOT e 15 (55.5%) eram do grupo DOT-A.

Quadro 15: Distribuição por grupo de tratamento e origem geográfica dos 38 “clusters” classificados por MIRU-VNTR, identificados por “spoligotyping” e combinação “MIRU + “spoligotyping””.

N°	Bairros	Cluster	Grupo de tratamento	MIRU/ PERFIL	“spoligotyping”	MIRU + “spoligotyping”
7022	Sto C	C1	DOT	123226153221	T1-462	
3044	C	C1	DOT-A	123226153221	T DESC 01	
7021	Sto C	C2	DOT	124326152222	LAM desc 45	
1050	SC	C2	DOT-A	124326152222	T1-453	
2042	CN	C3	DOT	134125161235	LAM-desc 60	
6112	RC	C3	DOT-A	134125161235	T4-74	
4006	M	C4	DOT-A	215325153323	Haarlem3-50	C4 + H3
1092	SC	C4	DOT-A	215325153323	Haarlem3-50	C4 + H3
4001	M	C5	DOT-A	223226153321	T1	
4020	M	C5	DOT-A	223226153321	LAM1	
6114	RC	C6	DOT	223226153331	LAM	
2049	CN	C6	DOT-A	223226153331	Desc. 40	
7026	Sto C	C7	DOT	223226163321	LAM9	
2034	CN	C7	DOT-A	223226163321	LAM1	
2006	CN	C8	DOT-A	223325143323	Não genotipado	
5047	B	C8	DOT	223325143323	T3	
7030	Sto C	C9	DOT	223325152324	LAM	
6067	RC	C9	DOT	223325152324	Desc. 44	
3006	C	C10	DOT-A	223325153324	T1	
5018	E	C10	DOT	223325153324	Haarlem3	
7024	Sto C	C10	DOT	223325153324	X3	
7043	Sto C	C11	DOT	223326133323	Haarlem3	
5087	E	C11	DOT	223326133323	LAM	
8015	B	C12	DOT	223326152323	LAM	
6086	RC	C12	DOT	223326152323	LAM2	
5041	E	C13	DOT	223326164321	LAM-desc.31	C13 + LAM
3043	C	C13	DOT-A	223326164321	LAM-desc.31	C13 + LAM
4054	M	C14	DOT-A	224126153331	Não genotipado	
5114	E	C14	DOT	224126153331	2070	
6052	RC	C15	DOT	224226152321	T1-53	
1040	SC	C15	DOT	224226152321	T1-51	
4002	M	C16	DOT-A	224226153321	LAM2-17	C16 + LAM2
3012	C	C16	DOT-A	224226153321	LAM2-17	C16 + LAM2
5012	E	C16	DOT	224226153321	LAM2-17	C16 + LAM2

Resultados

7005	Sto C	C16	DOT	224226153321	LAM4-828	
6019	RC	C16	DOT	224226153321	LAM5-93	
6020	RC	C16	DOT	224226153321	LAM1-20	
5021	E	C16	DOT	224226153321	LAM-desc. 43	
3030	C	C16	DOT-A	224226153321	LAM2-17	C16 + LAM2
3031	C	C16	DOT-A	224226153321	LAM2-17	C16 + LAM2
7016	Sto C	C16	DOT	224226153321	LAM9-866	
1004	SC	C17	DOT	224226153323	LAM3-211	
5048	E	C17	DOT	224226153323	Não genotipado	
5106	E	C18	DOT	224226153331	LAM9-42	
5110	E	C18	DOT	224226153331	LAM2-17	C18 + LAM2
6116	RC	C18	DOT	224226153331	LAM2-17	C18 + LAM2
3100	C	C18	DOT-A	224226153331	LAM1-20	
5103	E	C19	DOT	224226153333	LAM3-33	C19 + LAM3
1088	SC	C19	DOT-A	224226153333	LAM-desc. 51	
3090	C	C19	DOT-A	224226153333	LAM3-33	C19 + LAM3
3029	C	C20	DOT-A	224227153321	LAM-desc. 57	
4057	M	C20	DOT-A	224227153321	LAM2-17	
5072	E	C21	DOT	224314152323	Haarlem 1-47	
2026	CN	C21	DOT-A	224314152323	LAM9- 42	
6085	RC	C22	DOT	224324153333	T1-53	
5120	E	C22	DOT	224324153333	LAM3-33	
5054	E	C23	DOT	224325142323	LAM2-17	
5061	E	C23	DOT	224325142323	Desc. 39	
3053	C	C24	DOT-A	224326152323	LAM9-150	
2018	CN	C24	DOT-A	224326152323	LAM3-33	
1060	SC	C24	DOT-A	224326152323	U-237	
6071	RC	C25	DOT	224326152324	LAM3-33	
8043	B	C25	DOT	224326152324	T1-244	
6025	RC	C26	DOT	224326153321	T5-Madrid	
6029	RC	C26	DOT	224326153321	Não genotipado	
5037	E	C26	DOT	224326153321	LAM2-17	
1025	SC	C26	DOT-A	224326153321	LAM9-42	
8044	B	C26	DOT	224326153321	T1-53	C26 + T1
1074	SC	C26	DOT-A	224326153321	T1-53	C26 + T1
6073	RC	C26	DOT	224326153321	LAM9-177	
4015	M	C27	DOT-A	224326153323	LAM3-33	
3024	C	C27	DOT-A	224326153323	LAM-desc. 27	
6050	RC	C28	DOT	224326153324	LAM3-33	
5093	E	C28	DOT	224326153324	T2-1491	
6000	RC	C29	DOT	224326164321	LAM desc.31	C29 + LAM
5048	E	C29	DOT	224326164321	LAM desc 31	C29 + LAM
7029	Sto C	C30	DOT	225313152323	T1-53	
3049	C	C30	DOT-A	225313152323	LAM5-176	
1036	SC	C30	DOT-A	225313152323	Haarlem3-50	C30 + H3
5063	E	C30	DOT	225313152323	Haarlem3-50	C30 + H3
1049	SC	C30	DOT-A	225313152323	Haarlem3-50	C30 + H3
3091	C	C31	DOT-A	225313153333	Desc 12	
5119	E	C31	DOT	225313153333	Haarlem desc 17	

2002	CN	C32	DOT-A	225323153323	Haarlem2-2	
3082	C	C32	DOT-A	225323153323	Haarlem3-50	
4030	M	C33	DOT-A	225325152323	T1-1053	
1053	SC	C33	DOT-A	225325152323	Não genotipado	
3056	C	C34	DOT-A	225325152324	Haarlem3-50	C34 + H3
8037	B	C34	DOT	225325152324	Haarlem3-50	C34 + H3
4014	M	C35	DOT-A	225325153323	Haarlem3-50	C35 + H3
6036	RC	C35	DOT	225325153323	Haarlem3-50	C35 + H3
5099	E	C35	DOT	225325153323	U- 237	
4027	M	C36	DOT-A	225325153334	X1-119	
3095	C	C36	DOT-A	225325153334	Desc. 46	
3114	C	C36	DOT-A	225325153334	Haarlem3-50	C36 + H3
6128	RC	C36	DOT	225325153334	Haarlem3-50	C36 + H3
3115	C	C36	DOT-A	225325153334	Haarlem3-50	C36 + H3
7034	Sto C	C37	DOT	225326152323	LAM-2573	
3057	C	C37	DOT-A	225326152323	T1-53	
7004	Sto C	C38	DOT	124326153222	LAM5	
3040	C	C38	DOT-A	124326153222	LAM	

Na tabela 10 indicamos a relação do poder discriminatório do MIRU-VNTR nos 353 isolados de *M. tuberculosis* analisadas e do “spoligotyping” nos 347 isolados.

Tabela 10: Poder discriminatório individualizado de MIRU-VNTR e “spoligotyping”.

Características	MIRU-VNTR 12 loci (353 isolados)	“spoligotyping” 43 espaçadores (347 isolados)	MIRU + “spoligotyping” (347 isolados)
Nº total perfis	290	139	331
Nº perfis únicos	252 (71.4)	100 (28.8)	320 (92.2)
Nº “cluster”	38	39	11
Nº cepas em “cluster”	101 (28.6)	247 (71.5)	27 (7.8)
Nº máx. cepas em “cluster”	10	40	5

Análise de fatores de risco para genotipagem combinada MIRU+“Spoligotyping”

Analizamos os fatores de risco para pertencer a “cluster” definido pelas técnicas combinadas MIRU-VNTR e “spoligotyping”. Na tabela 11, estão incluídas as variáveis clínicas, demográficas e bacteriológica que o teste apontou significância estatística, como, idade ($p = 0.0221$), situação de domicílio ($p = 0.000564$), resistência a INH ($p = 0.00187$), resistência a RMP ($p = 0.000243$) e INH + RMP ($p = 0.000243$).

Para as variáveis DOTS (DOT e DOT-A) e bairros, novamente não foi encontrada nenhuma significância estatística

Tabela 11: Análise de fatores de risco para tuberculose dos pacientes com cepas em “cluster” dos Grupos DOT e DOT-A (MIRU + “spoligotyping”).

Fatores de Risco	Nº pacientes	Nº pacientes	Nº pacientes	P value
	(n = 353)	“cluster” (n = 101)	não “cluster” (n = 252)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Média de Idade		32.2	37.6	p = 0.0221
Situação de Domicílio				
Alugado	107 (31.3)	3 (9.6)	104 (33.5)	
Próprio (pago)	203 (59.5)	26 (83.8)	177 (57.0)	
Próprio (pagando)	1 (0.29)	1 (3.2)	0	p = 0.000564
Cedido	29 (8.5)	1 (3.2)	28 (9.0)	
Abrigo	1 (0.29)	0	1 (0.32)	
Resistência				
INH				
Não	292 (86.1)	21 (67.7)	271 (87.9)	
Sim	47 (13.8)	10 (32.2)	37 (13.8)	p = 0.00187

RMP				
Não	316 (93.2)	24 (77.4)	292 (94.8)	
Sim	23 (6.7)	7 (22.5)	16 (6.7)	p = 0.000243
Ambos				
Não	316 (93.2)	24 (77.4)	292 (94.8)	
Sim	23 (6.7)	7 (22.5)	16 (5.1)	p = 0.000243

P value ≤ 0.05

4.2.3.6. Comparação da formação de agrupamentos obtidos por RFLP-IS6110-3', MIRU-VNTR e "spoligotyping":

Com o objetivo de avaliar se os agrupamentos definidos pelo RFLP-IS6110-3' (ainda considerado por muitos pesquisadores o método padrão de tipagem para *M. tuberculosis*) coincidem com os definidos por MIRU-VNTR e "spoligotyping", comparamos a estrutura populacional e formação de agrupamentos pelas referidas técnicas. Consideramos prudente fazer esta avaliação devido ao fato de termos submetidos 80% das amostras do ano de 2001 ao RFLP-IS6110-3'.

A comparação dos agrupamentos de genótipos definidos por MIRU-VNTR e RFLP-IS6110-3' foi realizada e os agrupamentos de cepas pertencendo a 4 "clusters" (C1, C2, C3 e C4) no RFLP-IS6110-3', foram confirmadas por MIRU-VNTR. Observamos que a grande maioria dos isolados pertencentes a agrupamentos no RFLP foi confirmada como pertencendo ao "cluster" 16 de MIRU-VNTR, com exceção de dois isolados não genotipadas dos "Clusters" C1 e C4 do RFLP, e um isolado do C3 (RFLP) que MIRU não agrupou (tabela 12).

Ainda com relação aos agrupamentos por MIRU-VNTR confirmados ou não por RFLP, observamos que 9 isolados estavam distribuídas em 5 "clusters" definidos por MIRU-VNTR (2 isolados no C10, 1 isolado/ C16, 2 isolados/ C26, 2 isolados/ C29 e 2 isolados/ C35) não agruparam por RFLP-IS6110-3'.

Com relação ao “spoligotyping”, verificamos que um isolado do “cluster” RFLP C1 não foi genotipado. Os “clusters” C2, C3 e C4 foram confirmados por “spoligotyping”, com exceção de um isolado no C3 e outra no C4 que não agruparam. O C5 não foi confirmado por MIRU-VNTR e nem por “spoligotyping”.

Na análise combinada MIRU + “spoligotyping” verificamos o agrupamento das amostras de C2 e de 3 amostras de C3. Entretanto verificamos algumas diferenças nessa análise.

Quando observamos o quadro 16 notamos claramente essas diferenças: no isolado 5025 do C3 (RFLP) ela é uma LAM2 e no MIRU tem uma cópia diferente em 1 alelo, esta diferença pode ter ocorrido em virtude de erro na interpretação na leitura do gel de MIRU ou até mesmo pelo fato da população bacteriana estar em evolução.

No isolado 7016 do C1 (RFLP) é LAM9 e pertence a C16 de MIRU e isto pode estar relacionado com a estrutura populacional, pois C1 é parecido com C3, apresentando 2 grupos de cópias aglomeradas e cópias de peso menor em separado. A técnica de RFLP precisa ser feita com mais cautela (uma corrida mais longa dos perfis em gel). LAM9 (ausência dos espaçadores 21 a 24 e 33 a 36) é muito parecida com LAM2, pois são diferentes somente na ausência dos espaçadores 3 e 13 (LAM2).

Com relação aos isolados 6041 e 6020, do C4 (RFLP) elas tem mesmo LAM1, mas MIRU com cópias diferentes nos alelo, que pode estar relacionado também com erro de interpretação. Já no isolado 4001 do mesmo “cluster” verificamos que é T1, mas o MIRU é muito parecido, com diferença no alelo 3.

Ainda verificamos que os isolados 3008 e 6000 estão em “cluster” por MIRU e “spoligotyping” (C29 + LAM), mas não são “cluster” por RFLP, talvez isso tenha ocorrido em virtude de falha na hibridação (esses isolados estavam em membranas diferentes).

Na tabela 12 e quadro 16, apresentamos o comportamento dessa análise com relação à inserção da técnica de RFLP-IS6110 para definição de “clusters” nas amostras de 2001.

Tabela 12: Análise combinada de RFLP-IS6110-3', MIRU-VNTR e "spoligotyping" para definição de "cluster" nas amostras do ano de 2001.

"RFLP-IS6110"	MIRU-VNTR	"spoligotyping"	MIRU + "spoligotyping"
C1			
2594	Não Genotipado	Não Agrupou	
3362	224226153321 – C16	LAM9	
C2			
273	224226153321 – C16	LAM2	C16 + LAM2
746	224226153321 – C16	LAM2	C16 + LAM2
C3			
563	224226153321 – C16	LAM2	C16 + LAM2
1162	224226153321 – C16	LAM5	
2094	224126153321	LAM2	
2823	224226153321 – C16	LAM2	C16 + LAM2
2883	224226153321 – C16	LAM2	C16 + LAM2
C4			
124	223226153321	T1 – 53	
1208	224226153321 – C16	LAM1 – 20	
4335	Não genotipado		
3609	223326153321 – não agrupou	LAM1 – 20	
C5			
824	433325163223 – não agrupou	Não genotipado	
2031	225325163223 – não agrupou	Não agrupou	

Além das informações já incluídas pela análise das amostras total do ano de 2001, no quadro 3 verificamos que MIRU + "spoligotyping" agruparam dois outros isolados (C35 + H3 e C29 + LAM) que o RFLP-IS6110-3' não reconheceu como idêntico.

Quadro 16: Análise combinada de RFLP-IS6110-3', MIRU-VNTR e "spoligotyping" para definição de "clusters" nas amostras do ano 2001.

Nº DOT	RFLP	"Spoligotyping" Família	Sub-classe	Perfil MIRU-VNTR	MIRU + "Spoligotyping"
3001		unknown63	Haarlem		225313153323
5014		1	Beijing-like		231325153324
2002		2	Haarlem	Haarlem 2	225323153323
6008		4	LAM	LAM 3 convergence S	233325133222
4002	C2	17	LAM	LAM 2	224226153321
3012	C3	17	LAM	LAM 2	224226153321
5012	C2	17	LAM	LAM 2	224226153321
6018		17	LAM	LAM 2	224125163321
4009		17	LAM	LAM 2	225115163321
5025	C3	17	LAM	LAM 2	224126153321
3030	C3	17	LAM	LAM 2	224226153321
3031	C3	17	LAM	LAM 2	224226153321
5037		17	LAM	LAM 2	224326153321
4022		17	LAM	LAM 2	223224163323
6041	C4	20	LAM	LAM 1	223326153321
4020		20	LAM	LAM 1	223226153321
6020	C4	20	LAM	LAM 1	224226153321
4015		33	LAM	LAM 3	224326153323
1014		33	LAM	LAM 3	223426153323
6034		33	LAM	LAM 3	224226153324
1022		33	LAM	LAM 3	224316153323
6050		33	LAM	LAM 3	224326153324
7019		33	LAM	LAM 3	224325153324
6030		34	S		533325153324
4004	C5	34	S		433325163223
6038		42	LAM	LAM 9	222126153321
8007		47	Haarlem	Haarlem 1	225313163323
4007		47	Haarlem	Haarlem 1	426313163321
7002		47	Haarlem	Haarlem 1	225313153311
4003		50	Haarlem	Haarlem 3	225323133322
5011		50	Haarlem	Haarlem 3	223316133323
5013		50	Haarlem	Haarlem 3	126323133323
4006		50	Haarlem	Haarlem 3	215325153323
5018		50	Haarlem	Haarlem 3	223325153324
3021		50	Haarlem	Haarlem 3	225325153324
6028		50	Haarlem	Haarlem 3	223313153323
4014		50	Haarlem	Haarlem 3	225325153323
7011		50	Haarlem	Haarlem 3	225313123322
1015		50	Haarlem	Haarlem 3	225313153324
6036		50	Haarlem	Haarlem 3	225325153323
5034		50	Haarlem	Haarlem 3	222324153324
1021		50	Haarlem	Haarlem 3	225313153322
5039		50	Haarlem	Haarlem 3	225112153322
3006		53	T	T1	223325153324
5007		53	T	T1	223425153322
4001	C4	53	T	T1	223226153321
5016		54		Manu 2	224325163221
3027		60	LAM	LAM 4	224226132321
5008		64	LAM	LAM 6	122326143224
3016		73		T2-T3	224315163221
4012		86	T	T1	224426153324
6019	C3	93	LAM	LAM 5	224226153321
7004		176	LAM	LAM 5	124326153222
4017		177	LAM	LAM 9	224226153421
3032		177	LAM	LAM 9	224226143321
1004		211	LAM	LAM 3	224226153323
7005		828	LAM	LAM 4	224226153321
7013		834		U	225225163324
7016	C1	866	LAM	LAM 9	224226153321
3005		1066	LAM	LAM 5	124226153225
6011		1227	T	T5_MADRID 2	223326153124
6021		1227	T	T5_MADRID 2	223326153324
6025		1227	T	T5_MADRID 2	224326153321
7017		1284	T	T1	234125153224
3007		1758	LAM	U	124326162227
7007		1895	LAM	LAM 4	124326143222
5027		2342	LAM		232126152221
1008		unknown04	LAM		224229153321
6053		unknown06			224324143324
6013		unknown06			224325143324
7020		unknown18			121316151224
3023		unknown20	Haarlem		224313153323
3024		unknown27	LAM		224326153323
2005		unknown28			223324173322
4019		unknown29	LAM		224326143321
3008		unknown31	LAM		224326164321
5041		unknown31	LAM		223326164321
6000		unknown31	LAM		224326164321
8011		unknown37			224125153321
6042		unknown41	LAM		222225163321
5021		unknown43	LAM		224226153321
7021		unknown45	LAM		124326152222
5026		unknown48	LAM		222224143321
3035		unknown50	LAM		224326153325
6037		unknown52			223226143324
6026		unknown54	LAM		215225133321
3029		unknown57	LAM		224227153321
7010		unknown58	LAM		234126142321
2004		unknown62	LAM		122326153225
4013	C5	unknown64	LAM		335325163223
1017		unknown65	LAM		224223153321

Resultados

Apresentamos na tabela 13, a relação entre os clusters formados por RFLP-IS6110-3', MIRU-VNTR, "spoligotyping" e a combinação "spoligotyping"+MIRU-VNTR.

Tabela 13: Relação entre os clusters por RFLP-IS6110, MIRU-VNTR e "spoligotyping" das amostras genotipadas no período de 2001.

Características	RFLP-IS6110 (76 isolados) Nº. (%)	MIRU-VNTR (95 isolados) Nº. (%)	"spoligotyping" (91 isolados) Nº. (%)	MIRU + "spoligotyping" Nº. (%)
Nº total perfis	66	79	51	91
Nº perfis únicos	61 (80.3)	72 (75.7)	40 (44.0)	82 (99.1)
Nº "cluster"	5	7	11	3
Nº cepas em "cluster"	15 (19.7)	23 (24.3)	51 (56.0)	9 (9.9)
Nº máx. cepas em "cluster"	5	10	14	5

4.2.4. Análises adicionais para verificar associação de agrupamento de genótipos com os grupos de tratamento DOT:

4.2.4.1. Taxas de “cluster” entre os diferentes métodos de tipagem:

Com o objetivo de resumir as possíveis diferenças em agrupamento (número de “cluster”, número de isolados pertencentes e divisão dos “clusters” e isolados entre os grupos DOT e DOT-A), construímos a tabela 14.

Tabela 14: Poder discriminatório de cada método de tipagem individual e combinado em relação aos grupos de tratamento DOT e DOT-A.

Características	RFLP-IS6110 Nº (%)	MIRU-VNTR Nº (%)	“spoligotyping” Nº (%)	MIRU + “spoligotyping” Nº (%)
Nº cepas “cluster”	15 (19,7)	101 (28,6)	247 (71,5)	27 (7,8)
Nº de “cluster”	5	38	39	10
Grupo/tratamento (“cluster”)				
DOT	1 (20)	8 (21)	6 (15,3)	2 (18,2)
DOT-A	0	7 (18,5)	5 (12,8)	1 (9,1)
DOT + DOT-A	4 (80)	23 (60,5)	28 (971,1)	8 (72,7)
Grupo/tratamento (cepas “cluster”)				
DOT	7 (46,6)	52 (51,5)	134 (54,3)	12 (44,5)
DOT-A	8 (53,4)	49 (48,5)	113 945,7)	15 (55,5)

DOT (Estácio, Rio Comprido, Santo Cristo e Benfica); DOT-A com profilaxia de contatos (São Cristóvão, Cidade Nova, Catumbi e Mangueira)

Não há diferenças estatisticamente significante entre as características do agrupamento de genótipos obtidos pelas diferentes técnicas entre os grupos DOT e DOT-A.

4.2.4.2. Tendências à formação de “cluster” definido por MIRU-VNTR durante o período do estudo:

As coletas das amostras começaram no ano de 2000 e a implantação da estratégia DOTS teve início em julho de 1999. É improvável que o efeito da profilaxia de contatos na incidência e transmissão recente da tuberculose se apresentasse imediatamente após essas medidas.

Para não diluir o possível efeito final da coleta no grupo DOT-A na transmissão recente e por hipótese, na taxa de agrupamentos, calculamos essas taxas definidas por MIRU-VNTR para os anos de 2001, 2002, 2003 e 2004 separadamente. Assim esperávamos observar se houve uma redução na taxa de agrupamento ao longo dos anos e não diluir esse efeito no calculo para o período inteiro.

Tabela 15: Características das amostras dos grupos de tratamento DOT e DOT-A por anos de coleta e pertencer a “cluster”.

Características	Ano/ 2001	Ano/ 2002	Ano/ 2003	Ano/ 2004
	(95 isolados) N° (%)	(108 isolados) N° (%)	(92 isolados) N° (%)	(58 isolados) N° (%)
N° perfis únicos	72 (75.7)	89 (82.5)	83 (90.2)	41 (70.7)
N° cepas em “cluster”	23 (24.3)	19 (17.5)	9 (9.8)	17 (29.3)
N° de “cluster”	7	8	4	6
Grupo/tratamento (“cluster”)				
DOT	1 (14.3)	2 (25.0)	1 (25.0)	-
DOT-A	2 (28.6)	2 (25.0)	-	-
DOT + DOT-A	4 (57.1)	4 (50.0)	3 (75.0)	6 (100.0)

Grupo/tratamento (cepas "cluster")				
DOT	12 (52.2)	9 (47.4)	6 (66.7)	8 (47.0)
DOT-A	11 (47.8)	10 (52.6)	3 (33.3)	9 (53.0)

Tabela 16: Tendência de agrupamento em "cluster" das amostras dos grupos de tratamento DOT e DOT-A por anos de coleta e total no período.

Características	Ano/ 2001	Ano/ 2002	Ano/ 2003	Ano/ 2004	Período 2001 – 2004
	Nº cepas (%)	Nº cepas (%)	Nº cepas (%)	Nº cepas (%)	Nº cepas (%)
Grupos de tratamento					
DOT	52 (54.7)	54 (50.0)	51 (55.4)	30 (51.7)	187 (953.0)
Nº perfis únicos	43 (82.7)	48 (88.8)	47 (92.2)	27 (90.0)	164 (87.8)
Nº cepas em "cluster"	9 (17.3)	6 (11.2)	4 (7.8)	3 (10.0)	23 (12.3)
Nº "cluster"	2	3	2	1	7
DOT-A	43 (45.3)	54 (50.0)	41 (44.6)	28 (48.3)	166 (47.0)
Nº perfis únicos	35 (81.4)	47 (87.0)	41 (44.6)-	23 (82.1)	146 (88.0)
Nº cepas em "cluster"	8 (18.6)	7 (13.0)	-	5 (17.9)	20 (12.0)
Nº "cluster"	3	3	-	2	8

4.2.4.3. Resistência:

Devido ao fato de resistência a INH ser uma fator de risco para agrupamento de perfis MIRU-VNTR e de INH, RMP e MDR para agrupamento de genótipos MIRU+"spoligotyping", realizamos análise adicional com os isolados resistentes.

Foi verificado que em 339 isolados, 11 não pertenciam a "cluster" e eram resistentes (05 a INH e 06 a INH+RMP). Nas análises de MIRU-VNTR e MIRU+"spoligotyping", 10 isolados pertenciam a "cluster", sendo 04 (1.48%) a

INH e 06 (1.77%) a INH+RMP. Quando analisadas somente por “spoligotyping”, 37 isolados pertencendo a “cluster” eram resistentes, sendo 20 (5.9%) a INH e 17 (5.0%) a INH+RMP.

Observamos uma grande distribuição nos bairros Catumbi, Mangueira e São Cristóvão que pertencem ao grupo de tratamento DOT-A. Ainda nesta análise com relação aos maiores grupos de cepas pertencendo a “cluster” pela técnica de MIRU-VNTR, verificamos que o C16 (10 isolados) apresentava 01 isolado resistente a INH (Rio Comprido) e 01 isolado INH+RMP (Santo Cristo). No C26 (7 amostras), 01 isolado resistente a INH (Rio Comprido) e 01 isolado INH+RMP (São Cristóvão).

Quando submetemos os dados de resistência ao teste do q-quadrado ($p \leq 0.05$), não encontramos nenhuma significância estatística, pois quando verificada a resistência total entre os grupos DOT e DOT-A o teste apontou um $p = 0.9976$, para somente resistência a INH entre os grupos verificamos um $p = 0.9716$ e para resistência MDR (INH + RMP) $p = 0.8393$.

Tabela 17: Resistência verificada nos grupos de tratamento e sua relação com os métodos de tipagem.

Grupo de tratamento	MIRU-VNTR “cluster” N°. (%)	MIRU-”spoligotyping” “cluster” N°. (%)	”spoligotyping” “cluster” N°. (%)
DOT			
INH	02 (0.59)	02 (0.59)	11 (3.24)
INH + RMP	01 (0.30)	01 (0.30)	03 (0.88)
DOT-A			
INH	02 (0.59)	02 (0.59)	09 (2.66)
INH + RMP	05 (1.48)	05 (1.48)	14 (4.13)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No ano 2000, teve início um estudo realizado em 8 bairros do município do Rio de Janeiro, dos quais os indivíduos com sintomas de tuberculose foram atendidos em três postos de saúde que pertencem a AP 1.0.

Parte deste estudo foi apresentada nesta tese cujo objetivo principal foi avaliar, por tipagem molecular, uma possível redução na incidência da tuberculose nas bairros incluídos no grupo DOT-A em comparação ao DOT, acompanhada por uma redução nas taxas de agrupamento de genótipos de isolados de *M. tuberculosis*. Também buscou-se identificar a influência da profilaxia com relação aos fatores de risco para adoecimento devido a transmissão recente da doença.

A metodologia de tipagem molecular escolhida no início do projeto foi a técnica de RFLP-IS6110-3', padronizada por van Embden et al. (1993), e considerada padrão ouro para estudos dessa natureza. Esta metodologia, desde a década de 90, tem sido empregada em diversos estudos de epidemiologia molecular desenvolvidos por todo o mundo. A análise de RFLP-IS6110 permitiu uma melhor compreensão da transmissão da tuberculose em surtos hospitalares, em asilos, prisões, entre pacientes com HIV, dentro e entre comunidades, ajuda rastrear a disseminação das isolados sensíveis e resistentes a drogas e possibilita a diferenciação de infecção recente e infecção por reativação.

Em virtude de problemas operacionais, o recebimento de grande parte das amostras só aconteceu muito tardiamente, afetando assim a realização dessa técnica nas amostras de 2002, 2003 e 2004.

A análise por RFLP foi realizada em 86 (de um total de 95 pacientes) isolados de *M. tuberculosis* de 76 pacientes das amostras coletadas no ano 2001. Inicialmente, verificamos que a maioria das isolados de *M. tuberculosis* tinha um alto número de cópias (> 5 cópias) e uma estrutura populacional complexa.

Na construção do dendrograma, foi possível verificar também que a população de *M. tuberculosis* se dividiu em 2 grandes grupos, sendo uma grande parte dos isolados tinha perfis únicos.

Sabe-se da literatura que a variabilidade genética encontrada em populações de *M. tuberculosis* depende da região geográfica onde foram isolados, da logística da coleta e da natureza da amostragem. Estudos demonstraram tanto uma alta variabilidade nos perfis de IS6110 quanto à existência de famílias de isolados de *M. tuberculosis* em regiões-específicas (Yeh et al. 1998; Alito et al. 1999). Van Soolingen et al. (1993) descreveram a predominância do perfil “Beijing” em determinados países da Ásia, mostrando que um nível pequeno de polimorfismo na população estudada complica o uso da IS6110 como marcador em estudos de transmissão. A predominância de certas famílias mais recentemente também foi descrito por Nicol et al (2005) em isolados de *M. tuberculosis* do sul da África e por Jou et al (2005) em isolados de Taiwan.

A estrutura populacional das 76 isolados de *M. tuberculosis* circulantes no município do Rio de Janeiro analisadas aqui é muito parecida com a obtida analisando um maior número de isolados, inclusive de outras regiões do Brasil. Um exemplo é a observação feita por Suffys et al. (2000) em isolados provenientes de três estados brasileiros e por Cafrune et al (2006) em isolados de várias regiões do Rio Grande do Sul.

Não fizemos uma comparação desses perfis com aqueles presentes no banco de perfis internacional, onde já foi verificado anteriormente que não existe diferença significativa entre a distribuição no número de cópias entre a população brasileira e os padrões de outros países (Suffys et al. 2000). Alguns autores sugerem que a similaridade entre perfis é devida tanto à transmissão internacional da tuberculose quanto a maior estabilidade de certos padrões de RFLP-IS6110, inclusive aqueles com alto número de cópias de IS6110.

Dos 76 isolados de *M. tuberculosis* analisados pela técnica de RFLP-IS6110, 61 apresentaram perfis distintos e encontramos uma taxa de “cluster” (utilizando como critério de definição de cluster genótipos 100% idênticos) de 19,7%. Esse valor ficou abaixo do encontrado em estudos feitos com isolados

de cidades de outros países, como o de Friedman et al. (1995b) que encontraram uma taxa de 41% de isolados em “cluster” na cidade de Nova York e de Small et al. (1994) que observaram uma taxa de 40 % em São Francisco.

No Brasil, Ferrazoli et al. (2000), em estudo realizado em São Paulo analisando amostras provenientes do Centro de Referência em Aids, encontraram uma taxa de 38% de isolados em “cluster” entre pacientes HIV positivos e 26% entre pacientes HIV negativos. Oelemann et al. (submetido), analisando por RFLP isolados de pacientes atendidos em 11 comunidades do município do Rio de Janeiro relatam uma taxa de 32,7% de isolados em “cluster”. Borges et al. (2004), analisando isolados de *M. tuberculosis* provenientes de um centro de saúde em Porto Alegre relatam uma taxa de “cluster” de 29.1%.

É importante observar que nem sempre a incidência da doença ou o nível de transmissão recente numa determinada população tem uma apresentação direta na taxa ou no tamanho dos “clusters” observados. Fatores como a heterogeneidade da população e a inclusão de isolados de pacientes hospitalizados, de ambientes fechados ou de ambulatórios influenciam também nessa proporção (Hermans et al. 1995; Strassle et al. 1997). Outros fatores importantes que influenciam esta taxa são: a distribuição da coleta no espaço geográfico, a representatividade da amostragem (fração do número total de pacientes) e o tempo da coleta (Glynn et al. 1999).

Mesmo partindo de uma análise parcial, decidimos avaliar se havia definição de possíveis fatores de risco para transmissão através da comparação dos isolados em “cluster” ou não. A justificativa para o mesmo foi (i) ter perfis RFLP-IS6110-3’ de boa qualidade de 76 dos 95 pacientes (80%) do ano 2001 dos quais recebemos cultura, o que representa em torno de 40% dos pacientes atendidos com tuberculose daquela época. (ii) Ter uma distribuição relativamente homogênea da amostragem por grupo de DOT e bairro. Entretanto, não observamos diferenças estatísticas no número de isolados em “cluster” e não “cluster” em nenhuma das variáveis.

Com relação ao poder discriminatório do RFLP-IS6110, existem publicações demonstrando ser menor ou insuficiente para isolados com baixo número de cópias (< 6) e que, portanto, existe a necessidade de confirmação dos agrupamentos por uma segunda técnica de tipagem. Em publicações anteriores (Suffys et al. 2000; Oelemann et al. Submetido), foi verificada a baixa freqüência desses isolados na população carioca com tuberculose e este dado foi confirmado no presente trabalho, pois só encontramos este tipo de perfil em 5,3% dos pacientes. Tal fato tornaria a confirmação do RFLP por outro teste menos importante.

Por outro lado, outros trabalhos mostram que mesmo isolados pertencendo a agrupamentos definidos por perfis RFLP com > 5 cópias não necessariamente pertencem a uma cadeia de transmissão recente e que há necessidade de confirmar agrupamentos de genótipos de RFLP-IS6110 por outra técnica (Cowan et al. 2002). Existem muitos fatores influenciando a confiabilidade da associação de “cluster” com transmissão recente, entre quais, variabilidade genética da população bacteriana, incidência da doença, tempo e tamanho do estudo, migração populacional etc. Na maioria dos desenhos experimentais, a tendência atual é confirmar “clusters” formados por uma técnica de tipagem, utilizando uma segunda técnica baseada na detecção por outro tipo de marcador genético.

O nosso objetivo inicial era também submeter agrupamentos formados por perfis RFLP-IS6110-3’ por hibridação com IS6110-5’. Essa escolha induzida pela ausência de informação sobre confiabilidade de MIRU-VNTR na época do início desse estudo. Também optamos por esta abordagem devido à possibilidade de reutilizar membranas para hibridação com outra sonda, quando da utilização do sistema ECL.

Devido à impossibilidade de realizar a tipagem por RFLP-IS6110-3’ de todos os isolados referentes a este projeto dentro do tempo disponível para entrega desta tese, optamos avaliar por MIRU-VNTR (12 loci) e “spoligotyping” todos os isolados obtidos durante a coleta de 2001 a 2004.

MIRU estão dispersos ao longo do genoma do complexo *M. tuberculosis* (Supply et al. 1997) e 12 dos 41 loci MIRU presentes no genoma da H37Rv

apresentam variabilidade em número de cópias entre isolados não relacionados de diferentes origens geográficas, apresentando grande potencial para rastrear eventos epidemiológicos, tais como transmissão ou recidiva (Supply et al. 2001). Esses 12 loci permitem a comparação direta e segura de resultados entre laboratórios, permitindo a construção e análise de banco de dados global via internet, para estudos epidemiológicos e populacionais em grande escala (Mazars et al. 2001).

A dificuldade técnica para avaliar os múltiplos pequenos fragmentos gerados pela PCR atualmente esta superada pela utilização de uma combinação de PCR multiplex marcado com fluoróforos analisados em seqüenciador (Mazars et al. 2001).

Verificando a estrutura populacional das isolados de *M. tuberculosis* analisados pela técnica de MIRU-VNTR, observamos que 28.6% dos isolados faziam parte de agrupamentos. Este valor é o encontrado pela técnica de RFLP-IS6110, e sugere que as duas metodologias tem um poder discriminatório parecido, mas é necessário lembrar que o RFLP foi feito somente em isolados de 2001. Quando comparamos a taxa de cluster encontrado com MIRU-VNTR nos isolados de 2001 com a observada na população inteira (2001-2004), verificamos que a diferença entre o número de isolados de 2001 (24,3%) não foi expressivamente menor do que encontrado na população inteira (28,6%). Possivelmente, isto foi devido à existência de um cluster grande (M16) formado por perfil MIRU no ano de 2001, que não encontramos em isolados de 2002, 2003 e 2004 e que a amostragem de 2001 talvez esteja envolvida em um surto que precisa ser melhor caracterizado.

A relação entre perfis em “cluster” e perfis únicos observado neste estudo é parecido com o de 77% encontrado por Mazars et al. (2001) numa coleção de 44 isolados do Instituto Pasteur, Paris. Por outro lado, Cowan et al. (2002), em coleção de 118 isolados do Estado de Michigan, verificaram somente 33 % de perfis únicos pela técnica de MIRU-VNTR. Isto demonstra que a variabilidade genética (e em paralelo, o poder discriminatório da metodologia baseada nestes marcadores) definida pelo número de repetições

dos diferentes MIRUs varia muito de uma população bacteriana para outra. No quadro 17 comparamos nossos achados com alguns outros estudos.

Quadro 17: Estudos realizados para avaliar a técnica de MIRU-VNTR

População	Tipo de estudo/objetivo	Perfis únicos	Perfis em “cluster”
Manitoba – (Blackwood et al. 2004 – J Clin Microbiol)			
126 isolados de <i>M. tuberculosis</i> coletadas de clínicas e postos de saúde	Avaliar MIRU-VNTR como método primário de tipagem	35 isolados (29%)	91 isolados (71%)
Singapura –(Sun et al. 2004 - J Clin. Microbiol)			
293 isolados de <i>M. tuberculosis</i> coletadas de postos de saúde	Avaliar MIRU-VNTR como método primário de tipagem	131 isolados (44.7%)	162 isolados (55.3%)
Rússia – (Mokrousov et al. 2004 – J Clin Microbiol)			
44 isolados de <i>M. tuberculosis</i> (família Beijing) coletadas de hospitais	Avaliar MIRU-VNTR	10 isolados (22.7%)	34 isolados (77.3%)
Hong Kong (Kremer et al. 2005 – J Clin Microbiol)			
69 isolados de <i>M. tuberculosis</i> (família Beijing) de coleção de laboratório	Avaliar MIRU-VNTR	21 isolados (30%)	48 isolados (70%)

Conforme os dados apresentados no quadro 17 existe uma grande variabilidade na taxa de isolados que fazem parte de agrupamentos, situação parecida com a encontrada em relatos utilizando RFLP-IS6110 como método de tipagem. Com passar dos anos, ficou claro que a diferença entre variabilidade genética entre populações de *M. tuberculosis* encontrados

utilizando IS6110 como marcador é consequência de muitas variáveis. Podemos inferir que as diferenças nas taxas de agrupamento (e poder discriminatório do método) encontradas por MIRU-VNTR são causadas pelos mesmos fatores e que tanto o tamanho da amostragem quanto as diferenças nas taxas de incidência e transmissão recente na população devem contribuir para que tal fato aconteça.

Quando analisamos a frequência alélica dos 12 loci MIRU-VNTR, verificamos uma alta diversidade em 8 loci, observamos uma heterogeneidade considerável da variabilidade entre os diferentes MIRUs e um alto poder discriminatório nos isolados avaliados. Sola et al. (2003) encontraram alto poder discriminatório nos loci 10, 23, 26, 31 e 40, diferindo do estudo em questão nos loci 26 e 31 que foram considerados como moderadamente discriminatórios.

Sun et al. (2004) demonstraram que os loci 10, 23, 31 e 39 tiveram alto poder discriminatório e o locus 27 um baixo poder discriminatório, divergindo do nosso estudo com relação aos loci 27, 31 e 39 que foram moderadamente discriminatórios.

Nosso estudo compartilha os resultados descritos por Mazars et al. (2001), quando se refere aos loci 10, 16, 23, 26, 31 e 40 como sendo de alta diversidade. Dados similares foram apresentados por Ferdinand et al. (2004), que avaliaram a estrutura clonal de *M. tuberculosis* para se definir famílias e encontraram alta diversidade entre os loci 40, 10, 26, 31 e 23 respectivamente.

Uma discordância entre nossos achados com os da literatura foi encontrada no estudo de Niobe-Eyangoh et al. (2004) que avaliando isolados da família Camarões, verificaram uma baixa diversidade alélica nos MIRUs 10, 23 e 31 enquanto MIRU 27 apresentava uma discreta diversidade.

Acreditamos que este tipo de divergência exista devido ao comportamento diferente entre loci em populações (famílias) de *M. tuberculosis* diferentes, a diferenças entre níveis de clonalidade da população bacteriana e talvez mais importante, devido à amostragem e características demográficas da população e transmissão da doença.

Retomando o objetivo principal deste trabalho, a avaliação da diferença entre DOT e DOT-A através da tipagem, observamos que dos 38 “clusters” encontrados por MIRU-VNTR, a concentração maior (60,5%) ficou mesclada entre pacientes DOT + DOT-A e o restante dos “clusters” se dividiram em DOT-A (18,5%) e em DOT (21%).

Isto provavelmente se deve ao fato (i) dos isolados que fazem parte de cadeias de transmissão estarem circulando em diferentes bairros/ áreas geográficas, fato sempre complicado em estudos de epidemiologia molecular feitos na sociedade (diferente de ambientes fechados), (ii) por razões filogenéticas, existindo um número limitado de genótipos e compartilhados entre regiões (bairros e aqui por desenho do estudo, esquema de tratamento) sem necessariamente significar que fazem parte de uma cadeia de transmissão. Este pensamento nos induziu a fazer uma análise, não somente de pertencer a cluster no DOT ou DOT-A, mas de analisar clusters dentro das regiões. Dos 101 isolados pertencentes a algum “cluster”, 51,5% eram provenientes do grupo DOT e 48,5% do grupo DOT-A. Quando avaliamos agrupamentos de genótipos separadamente no DOT e DOT-A ou verificamos a taxa de cluster existentes, também não havia diferenças entre os dois esquemas. Apesar dos dados referentes à implantação da estratégia DOTS no município do Rio de Janeiro serem favoráveis ao programa de controle da tuberculose, a partir dos dados obtidos por tipagem MIRU-VNTR (e também RFLP, “spoligotyping” e a combinação MIRU+spoligotyping), não observamos diferenças na taxa de agrupamento entre isolados de *M. tuberculosis* de pacientes dos dois grupos.

Importante é que foi observada uma diminuição na incidência da tuberculose no grupo DOT-A em relação ao grupo DOT durante o período do estudo (Afranio Kritski, comunicação pessoal). A ausência de diferenças em “clusters” sugere que (i) esta diminuição não é devido à diminuição da transmissão recente, (ii) a diminuição progressiva da transmissão recente ainda não se reflete na complexidade dos genótipos dos isolados circulantes ou (iii) que a relação entre transmissão recente e formação de agrupamento não é absoluta.

Por outro lado, podemos interpretar que a falta de diferenças nas taxas de agrupamento entre os grupos ocorreram devido às características do desenho do estudo, como por exemplo, o tamanho da população estudada, a escolha da área geográfica ou até mesmo o tempo de coleta das amostras. Entretanto, modelos matemáticos sugerem que tanto a representatividade da amostragem (48% dos pacientes) e tempo de estudo (4 anos) poderia ser suficiente (Tanaka et al. 2006) e são valores superiores do que apresentados em muitos outros trabalhos.

No sentido de considerar somente os nossos resultados (ausência de informação divulgada sobre resultados dos esquemas) e considerarmos a metodologia utilizada e o desenho do estudo adequado, os dados aqui apresentados sugerem que não há influência da profilaxia de contatos no grupo DOT-A na transmissão da tuberculose. Isto implica em dizer que este estudo ofereceu um aporte ao Programa de controle da tuberculose do município do Rio de Janeiro, sugerindo que os subsídios sejam melhores alocados à prevenção, controle e eventual eliminação da tuberculose.

É importante também observar que, no caso do MIRU-VNTR, 77 % dos “clusters” eram compostos por 2 isolados de *M. tuberculosis*. Isto sugere que dentro do tempo da coleta das amostras, as cadeias de transmissão são relativamente curtas, já que foram submetidos à tipagem isolados de uma fração equilibrada dos pacientes diagnosticados. Uma interpretação alternativa seria que os MIRUs, como relógio molecular, não são estáveis o suficiente para serem utilizados como elementos de tipagem molecular, o que contradiz estudos anteriores (Savine et al. 2002). Existem dados mostrando que o tamanho dos agrupamentos está relacionado com a “intensidade” da transmissão recente. O tamanho médio dos “clusters” entre os grupos DOT e DOT-A não apresentou diferença, sugerindo novamente a falta de influência da profilaxia na transmissão recente da TB. Por outro lado, é difícil, neste momento, definir a amostragem necessária (em torno de 48% dos pacientes foram submetidos à tipagem) para observar mudanças do comportamento da endemia nos genótipos bacterianos. Somente um estudo comparativo

avaliando diferentes frações da mesma população e tempos diferentes de coleta poderão resolver essas dúvidas.

No presente estudo, não foi possível verificar se existem ligações epidemiológicas entre pacientes com isolados com genótipos pertencentes a “clusters” estabelecidos por RFLP ou combinação de métodos. Cowan et al. (2005) sugeriram que comparar isolados de grandes áreas geográficas aumenta o número de “clusters” quando baseados em MIRU-VNTR e “spoligotyping” e isso diminuirá o significado dos “clusters” para os programas de controle da tuberculose. Os autores ainda sugerem o uso de RFLP-IS6110 como tipagem secundária para definição desses “clusters” quando uma discriminação adicional for necessária.

A reflexão sobre diferenças de comportamento de marcadores genéticos em populações e estudos diferentes enriquece o conhecimento sobre a relação entre resultados oferecidos por métodos baseados na visualização dos marcadores e a dinâmica da tuberculose. Mesmo assim, existem particularidades neste comportamento que somente a longo prazo terão uma consequência prática em relação ao entendimento da doença.

Questões mais básicas devem ser consideradas, como por exemplo, a observação que as discrepâncias dos genótipos MIRU-VNTR dos isolados são devido a evolução bidirecional dos MIRUs, ou seja os números de repetições aumentam ou diminuem com o tempo. Esta é uma característica que vale também para IS6110, mas não para os espaçadores que determinam o perfil obtido por “spoligotyping”. Foi observado também que certos loci (tanto no caso de IS6110 quanto MIRU) apresentam uma variabilidade maior do que outros. Segundo Gibson et al. (2005), diferenças na pressão da seleção atuando em diferentes loci e o fato que certos loci podem tolerar mais polimorfismos são umas das razões. A velocidade da modificação de certos perfis (famílias de perfis/isolados) e certos loci também é diferente em relação a outras.

Isto significa que existe variabilidade de comportamento das diferentes unidades que compõem o conjunto que se chama de marcador genético, dependendo do local de estudo. Levando-nos a pensar que este fenômeno é

ainda maior quando comparado ao comportamento de marcadores diferentes. Embora existam estudos sobre confiabilidade de métodos diferentes utilizando isolados de *M. tuberculosis* aparentemente bem caracterizadas (Kremer et al. 2005), o significado deste tipo de avaliação não pode ser transferido para outros ambientes.

Em relação às metodologias utilizadas neste estudo, vários trabalhos apresentam MIRU-VNTR (com ou sem spoligotyping) como técnica com poder discriminatório e definição de agrupamento parecido com RFLP-IS6110 (Balckwood et al. 2004). Outros contradizem o mesmo, possivelmente devido à relação entre transmissão recente e reativação diferente da maioria (Scott et al. 2005), ou devido a ausência de acurácia na definição de cluster (Viedma et al. 2006).

Outras variáveis como tipo de amostragem, tipo de paciente e variabilidade genética da população bacteriana deveriam influenciar a acurácia das metodologias de tipagem. Acreditamos que ainda não foi avaliada de forma suficiente a relação entre os métodos de tipagem e seu poder discriminatório, quanto à relação entre os agrupamentos dos genótipos de isolados de *M. tuberculosis* e o contato entre os hospedeiros. Tanto a falha da tipagem molecular em detectar os casos de transmissão definidos por epidemiologia convencional, quanto à capacidade dessa mesma metodologia em apresentar casos de transmissão recente não são percebidas sem sua utilização, porém a existência de “lacunas” na informação, favorece repostas pouco objetivas, fortalecendo em geral a metodologia mais “desejada”. Este fato não desfaz a contribuição dos mesmos e geralmente resulta em trabalhos que ensinam algo tanto sobre método quanto a doença, mais complica a interpretação rigorosa da relação entre metodologia e causa.

Dessa forma, foi verificado e confirmado o potencial de MIRU-VNTR para caracterizar isolados com baixo número de cópias pelo RFLP-IS6110 (Cowan et al. 2002), assim como seu poder discriminatório e reprodutibilidade também foram confirmados quando comparados com outros marcadores (Kremer et al. 2005).

MIRU-VNTR e RAPD foram utilizados por Tazi et al. (2004) para avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional dos isolados do *M. tuberculosis* em Casablanca (Maroccos). Foi verificado um notável polimorfismo genético e uma alta diversidade genética para 11 loci (0.91); apenas MIRU 24 foi totalmente monomorfo.

Outro estudo avaliou MIRU-VNTR correlacionando-o com RFLP-IS6110 (Balckwood et al. 2004). Os autores verificaram um poder discriminatório parecido entre MIRU e RFLP (0.821 e 0.997 respectivamente) e os isolados em “cluster” definidos por MIRU correlacionados com os “cluster” por RFLP, fornecem informações úteis para investigação ou confirmação da incidência de recente transmissão. Este conjunto de dados sugere que em certos estudos, MIRU-VNTR, como ferramenta de tipagem molecular, se comporta de forma parecida com o RFLP-IS6110.

Analizamos por RFLP-IS6110-3', 76 isolados de *M. tuberculosis*, representando 10,2% da amostragem no período total e 80% dos isolados do ano 2001. Por esta razão, não podemos esquecer que a análise vale somente para o ano 2001 e não pode ser extrapolada para o período inteiro do estudo. Assim, interpretamos os resultados da comparação entre RFLP e os outros métodos sem considerar tamanho amostral como possível fator causador de viés.

Conforme o que foi definido pelo programa Bionumerics 2, registramos o encontro de 2 “clusters” RFLP (rC2 e rC3) que foram confirmados por MIRU-VNTR, fazendo parte do maior cluster obtido por esta última (mC16). Naturalmente, os perfis “cluster” MIRU-VNTR que confirmam os obtidos por RFLP-IS6110 pertencem ao maior “cluster” MIRU-VNTR encontrado neste trabalho, o que dificulta a comparação da utilização dos dois tipos de marcadores neste estudo.

Outro cluster RFLP, C1, também apresentou este perfil MIRU C16 o que fará com que o MIRU “stricto senso” menos discriminatório do que RFLP. Entretanto, observamos uma grande similaridade entre os perfis C2-C3 e C1 e esses genótipos aparentemente são de isolados de *M. tuberculosis* pertencendo a uma grande família Brasileira (Suffys et al. 2000). Acreditamos que exista a

necessidade de uma reavaliação dos perfis RFLP utilizando estringências diferentes e de construção de clusters sem inclusão de certos genótipos. Em nossa experiência com construção de dendrogramas (atualmente temos armazenados perfis RFLP em torno de 1000 isolados brasileiros) é que devido à ordem constante nas tabelas de perfis introduzidos no programa Bionumerics, ou devido a estrutura matemática dos algoritmos para construção de dendrogramas (a partir da matriz de similaridade), agrupamentos são, embora não frequentemente, influenciados por fatores diferentes da composição genética. Porém, gostaríamos de inferir que os “clusters” C2 e C3 definidos por RFLP são um único “cluster”, separados apenas por um único isolado (com uma cópia a mais), que tem mais de 95% de similaridade.

Outro fator que dificulta esta comparação é que o “cluster” mC16 também agrupou dois isolados de *M. tuberculosis* com perfis RFLP diferentes (10 e 11 cópias de IS6110). Para complicar a análise, o “spoligotyping” reconhece esses dois isolados como “cluster”, incluindo-os junto com os outros que compõe o mC16.

Outra interpretação é que MIRUs são marcadores mais adequados do que IS6110 para revelar relações filogenéticas na população bacteriana. Embora a maioria dos isolados do maior cluster MIRU estejam em “cluster”, por RFLP, este fato diminui um pouco a chance de uma forte associação entre agrupamento em MIRU e os isolados serem de pacientes que pertençam a cadeia de transmissão recente. Savine et al. (2002) sugeriram que uma das razões para isso acontecer é devido à taxa de evolução combinada dos 12 loci MIRU-VNTR ser mais lenta do que a do RFLP-IS6110 em isolados com alto número de cópia de IS6110.

Fato a favor desta hipótese é a observação que em outra análise por MIRU-VNTR em isolados do *M. tuberculosis* do Rio de Janeiro, este perfil MIRU (mC16) também foi encontrado como maior agrupamento (Lazzarini et al. submetido). Além disto, os isolados com este MIRU no estudo de Lazzarini et al. (submetido) apresentaram uma deleção “RDrio”, que é uma modificação genética provavelmente originada em LAM9 ou precursor, indicando a circulação de isolados com este MIRU por muito tempo.

Porém concluímos que a relação entre diferentes tipos de marcadores genéticos e a relação do agrupamento de genótipos definidos pelos mesmos e a transmissão recente na população brasileira ainda precisa ser melhor caracterizada.

Scott et al. (2005) avaliaram isolados de *M. tuberculosis* de Montreal e afirmaram ter encontrado baixa sensibilidade (52% e 83% respectivamente) e especificidade (56% e 40% respectivamente) na tipagem por MIRU-VNTR, mesmo avaliando em conjunto com “spoligotyping” em relação a tipagem por RFLP-IS6110, que resultaram em estimativas de transmissão continuada e com pouca capacidade de detectar grupos de alto risco. Isto pode ter acontecido devido ao tipo de estudo populacional, ou seja, avaliar epidemiologia da tuberculose em país desenvolvido como o caso do Canadá (incidência de tuberculose baixa e doença sob controle). Esta situação implica em um nível menor de transmissão recente e maior taxa de reativação; conseqüentemente, a diferença da velocidade da evolução (relógio molecular) entre os marcadores moleculares fica mais rápida e não representa mais o mesmo valor para avaliar transmissão recente.

Por outro lado, devemos sempre considerar que os perfis devem ser analisados sempre com muito cuidado e calma, evitando assim resultados errôneos na interpretação dos produtos amplificados.

A estrutura populacional do *M. tuberculosis* parece ser estrita ou predominantemente clonal (Mokrousov et al. 2004). Várias famílias genéticas foram identificadas (Haarlem, Beijing e East-African-Indian) e geralmente, esta classificação se mantém utilizando diferentes marcadores moleculares. Estas famílias inicialmente são endêmicas dentro de uma específica área geográfica; algumas permanecem circunscritas em regiões particulares, enquanto outras têm se tornado ubiqüitárias, como é o caso da família Beijing.

Esta família genética, primeiro identificada em 1992 em Beijing, China, está correntemente espalhada e prevalente (40 a 60%) em certas regiões do mundo, por exemplo, na Ásia oriental e os países da antiga União Soviética (Mokrousov et al. 2004). Membros da família Beijing constituem um grupo de bactérias geneticamente homogêneas e em muitos países são encontradas

associadas com multidroga resistência e isto tem dificultado sua diferenciação pela maioria das técnicas de genotipagem.

A técnica de padrão ouro para identificação de isolados Beijing e algumas outras famílias (classes ou subtipo) é o “spoligotyping” (ausência de sinais do espaçador 1 ao 34) enquanto a divisão em subtipos se concretiza por RFLP-IS6110 ou MIRU-VNTR. Poucos estudos têm descrito o uso de MIRU-VNTR para genotipagem de isolados Beijing.

Surikova et al. (2005) demonstraram a eficiente diferenciação de isolados da família Beijing e outros não Beijing na Rússia usando loci VNTRs altamente polimórficos. Neste estudo destacam a eficiência dos loci 26 e 18 (HGDI = 0.8) em termos de diversidade alélica e poder discriminatório que outros loci. Eles sugerem que provavelmente o grau de polimorfismo dos VNTRs reflete as diferenças em funções associadas com a manutenção de um grupo de polimorfismo e sua ligação com o sistema de reparo ou a habilidade do microrganismo para se adaptar ao ambiente.

Kremer et al. (2005) avaliaram VNTRs (loci A a E ETR, 5 loci MIRU 10, 16, 26, 39 e 40) como técnica para discriminação e reconhecimento de isolados Beijing em Hong Kong. e verificaram uma diversidade alélica que variou de 0 a 0.618 e em conjunto, o poder discriminatório da análise por VNTR foi um pouco menor que por RFLP-IS6110. Afirmam que os VNTRs devido a suas muitas vantagens práticas podem ser utilizados para este tipo de estudo, mas que os “clusters” devem ser subtipados por RFLP-IS6110 para obter uma máxima resolução.

Kam et al (2005) para avaliar o uso de MIRU-VNTR na discriminação de genótipos Beijing resistentes a drogas, selecionaram 102 isolados MDR e um grupo de outros 253 isolados selecionados ao acaso não MDR em Hong Kong. Inicialmente o “spoligotyping” mostrou que 243 (68.5%) dos 355 isolados pertenciam à família Beijing. Observaram então, que a discriminação de MIRU (0.88) foi menor quando comparado com RFLP-IS6110 (0.99) nos isolados da família Beijing enquanto nas não Beijing a discriminação foi igual para MIRU e RFLP (0.9929 e 0.9979 respectivamente). Não existiram diferenças no poder

discriminatório na análise pelos dois métodos entre isolados Beijing MDR e não MDR e os não Beijing.

Diferente dos dados de Surikova et al (2005), isolados “Beijing” da Rússia avaliadas por Mokrousov et al.(2004), apresentaram pouca variabilidade nos genótipos MIRU-VNTR (monomorficos; HGDI para todos os 12 loci de 0.65). Os autores traçam um paralelo com os isolados Beijing da África que já apresentam uma longa história evolucionária e discute que a falha na discriminação pelo MIRU poderia estar relacionada à disseminação recente desses isolados na Rússia.

A homogeneidade dos perfis MIRU-VNTR dos 5 isolados Beijing encontrados no presente estudo e identificado pelo perfil de “spoligotyping” típico foi baixo, significando que não é fácil reconhecer isolados Beijing no Brasil por MIRU. Além disto, arvores construídas com algoritmos como UPGMA e N-J utilizando MIRU como informação não apresentaram uma separação clara dos isolados Beijing do resto dos isolados (anexos 8 e 9). Um dos isolados Beijing apresentou um ‘spoligotype’ ligeiramente diferente do característico apresentando somente presença dos espaçadores 37-43, mas esta diferença não se refletiu claramente no perfil MIRU.

Em estudo recente, Rao et al. (2006) apresentaram a hipótese que isolados da família Beijing são caracterizadas pela presença de 7 repetições do MIRU26. Esta hipótese foi questionada por Moukrosouv et al. (2006) na Rússia e Kremer et al. (2005), mostrando que nem todas os isolados de Beijing apresentam 7 cópias do MIRU26 e que isolados não pertencendo a esta família às vezes têm este alelo.

Em nossa análise, somente dois dos 5 isolados reconhecidos como Beijing pelo “spoligotyping” apresentaram MIRU26 com 7 repetições; os outros 3 tinham 5 repetições. Em contrapartida, 5 isolados não Beijing também apresentaram este alelo (7 repetições) do MIRU26. Isto sugere que a origem variada destes isolados MIRU (neste caso MIRU 26) pode sugerir a presença de Beijing, mas que não é um indicador absoluto do mesmo.

Além da avaliação das características genéticas da população de *M. tuberculosis*, utilizamos MIRU-VNTR também para avaliar a possível relação

entre as características microbiológicas dos isolados de *M. tuberculosis* e demográficas/ epidemiológicas dos pacientes e o fato dos genótipos bacterianos pertencerem ou não a “cluster”.

Quando consideramos somente perfis MIRU-VNTR, verificamos uma associação significativa entre os pacientes que estiveram presos e pertencer a agrupamento ($p = 0.022$), enquanto uma associação significativa foi observada entre pacientes que estiveram internados em hospital geral e ter isolado com genótipo que não pertence a “cluster” ($p = 0.015$).

No Brasil, um estudo realizado por Oelemann et al. (submetido) utilizando RFLP, não observou fatores de risco para transmissão da tuberculose em 11 comunidades avaliadas do Município do Rio de Janeiro; no caso deste trabalho, isto pode estar relacionado tanto com o período curto de realização da coleta dos isolados de *M. tuberculosis* (6 meses) quanto com a relativa baixa representatividade da amostragem (25% dos pacientes).

Cafrune et al. (2006) compararam genótipos RFLP-IS6110 de isolados de pacientes diagnosticados em três regiões (norte, sul e centro oeste) do Estado do Rio Grande do Sul, e verificaram que aposentados tem três vezes mais chances de estarem infectados recentemente. Esta observação parece paradoxal, considerando o conceito da associação de transmissão recente com pertencer a genótipos “cluster” e pode estar relacionado à reativação de doença antiga ou a comportamento social. Por outro lado, reativação de infecção antiga causada por isolados mais prevalentes em épocas passadas (em virtude de maior virulência ou filogenia) também poderia causar maior taxa de agrupamento atual. Esta análise relembra a cautela necessária na interpretação de resultados obtidos com ferramentas novas e da relatividade das observações feitas em determinados estudos.

Outro estudo de tipagem por RFLP-IS6110 feito em pacientes com tuberculose diagnosticados em um posto de saúde em Porto Alegre, apresentou um alto percentual (90,9%) de pacientes com tratamento prévio e uma taxa de 30,9% de isolados MDR (Borges et al., 2004). Com relação a fatores que possam estar associados com o desenvolvimento da tuberculose, os autores relatam que não foi identificada associação significativa entre

características clínico-demográficas com os isolados em cluster, mas que os dados encontrados em relação aos pacientes infectados com isolados resistentes sugerem a importância dos mesmos na cadeia de transmissão recente.

Isto tem valor pelo fato de tratamento anterior ser um fator predisponente para a seleção de bacilos resistentes (Natal et al. 2002). Bem-Dov et al (1987), verificaram que pacientes com cavernas pulmonares tinham quatro vezes mais chances de adquirir resistência, quando comparados com aqueles sem lesão cavitária (IC 95% = 2,1 - 7,6). Em doentes com história de tratamento anterior, a resistência foi 4,7 vezes maior, quando comparados com doentes sem história de tratamento (IC 95% = 2,6 – 8,8). A combinação de lesão cavitária com história de tratamento confere risco adicional, pois 71% destes doentes foram resistentes.

Além de ter submetido isolados de *M. tuberculosis* de 353 pacientes a MIRU-VNTR, 347 desses também foram genotipados por “spoligotyping”.

Verificamos que essa técnica agrupou os isolados em 39 “clusters” (71.5%) que variaram de tamanho de 2 a 40 isolados, número muito superior ao encontrado por MIRU-VNTR que agrupou os isolados em 38 “clusters” (28.6%).

Além de ajudar na definição de “cluster”, outra aplicação da técnica de “spoligotyping” é a visualização da distribuição dos genótipos de *M. tuberculosis* em nível regional, nacional, continental ou global. Esta abordagem deu origem a um banco de dados construído por Dr. Cristophe Sola do Instituto Pasteur de Guadeloupe que atualmente está na versão SpolDB4.0. Este banco reúne perfis de 39.295 isolados (35.925 de padrões “clusters” e 3370 padrões órfãos) provenientes de isolados de *M. tuberculosis* de pacientes de 122 países (Brudey et al. 2006).

Nesse presente estudo registramos o encontro das famílias LAM e Haarlem como as mais freqüentes, seguidas das famílias T, Beijing, EAI, Manu e X.

A distribuição Global de “spoligotypes” apresenta a família LAM distribuída na América do Sul com 22% (tipo 42 - 9%, 17 - 6%, 64 - 3%, 93 -

2%, 33 - 2%), África 13% (tipo 20 - 8%, 42 - 5%), América Central 8% (tipo 42 - 5%, 17 - 3%), Europa 3% (tipo 42), América do Norte 2% (tipo42), Oceania <2% (tipo42), Extremo Oriente 0% e Oriente Médio e Ásia Central 0% (Filliol & cols. 2003).

Duchene et al. (2004) estudando 4 regiões do caribe: Guadeloupe e Martinica (França), Cuba e Haiti observaram que de 321 isolados, 97 foram classificados como pertencentes a família LAM, e destes, 48 foram encontrados em Cuba e somente LAM tipo 17 foi encontrado em maior frequência em Guadeloupe e Martinica.

Os genótipos com maior frequência na Espanha são os pertencentes à família LAM, T1 e Haarlem 3. Neste país duas novas famílias estão relacionadas à população espanhola: Família Madrid 1, que por sua estreita relação com a família LAM foi classificada como LAM11 e Madrid 2 (Viedma et al. 2005).

Com relação ao número de isolados em “cluster” dentro dos grupos de tratamento verificamos as seguintes diferenças: “spoligotyping” no grupo DOT agrupa 54.3% e 45.7% no DOT-A, enquanto MIRU-VNTR 51.5 e 48.5% respectivamente. Como observamos por MIRU-VNTR, a análise de formação de agrupamentos de genótipos definidos por “spoligotyping” também sugere que a adição de profilaxia em contatos selecionados não interfere na formação de “cluster”/ transmissão recente em relação ao grupo DOT sem o mesmo.

Na análise de fatores de risco por “spoligotyping”, observamos que a variável idade ($p= 0.0191$) teve associação importante com pertencer a “cluster”, ou seja, aparentemente pacientes com maior idade tem mais chance de fazer parte de uma cadeia de transmissão recente de tuberculose. Esse achado foi parecido com o encontrado por Cafrune et al., 2006 (in press) fazendo tipagem RFLP-IS6110 em pacientes de várias regiões do Estado do Rio Grande do Sul, mas esta observação foi associada à ausência de importância de transmissão recente para desenvolvimento de TB na área pesquisada.

Quando verificamos esse tipo de análise frente à combinação dos métodos de tipagem MIRU + “spoligotyping”, ter mais idade foi apontada com

associação para não pertencer a “cluster”; já a análise de MIRU-VNTR sozinho não apontou associação nenhuma. Um número grande de trabalhos mostra uma relação entre idade menor e risco a pertencer a cluster e associa o mesmo a contatos sociais de indivíduos na fase mais produtiva da vida (van Deutekom et al. 1997; Bishai et al. 1998; Alland et al. 1994). Às vezes, observa-se que a associação entre idade e transmissão recente varia entre homem e mulher (Glynn et al. 2005); esta análise ainda não foi feita no presente trabalho. Acreditamos que a associação observada por “spoligotyping” ocorreu parcialmente, devido ao baixo poder discriminatório da técnica e isso torna a associação entre formação de agrupamentos e fatores de risco para transmissão recente menos confiável. Esta é uma característica da técnica que precisamos considerar em toda análise. Sugerimos que “spoligotyping” é mais confiável para complementação da tipagem feita por RFLP ou MIRU-VNTR ou ainda para estudos biogeográficos.

Com relação à associação de agrupamento com cor da pele nesta parte da nossa análise, achamos uma relação direta entre cor negra e invertida entre cor parda e risco de pertencer a cluster. Na literatura, tipo de etnia ou cor de pele muitas vezes são fatores de risco para tuberculose tanto devido a comportamento social quanto a associação à pobreza e aglomeração (Small et al. 1994).

Dois outros parâmetros, produção de escarro com sangue e contato anterior com paciente com tuberculose também foram indicados pelo “spoligotyping” como fatores de risco para tuberculose recentemente adquirida; acreditamos que estas associações mereçam um investimento maior.

Em trabalho recentemente submetido para publicação, Lazzarini et al. (submetido) observaram que tuberculose com hemoptise é fator de risco para adoecer de infecção com isolados de *M. tuberculosis* com deleção RDrio; a hipótese principal deste trabalho é que isolados de *M. tuberculosis* com este tipo de genótipo tem uma vantagem em relação aos que não tem e por esta razão poderiam ser mais transmissíveis.

Contato anterior com paciente com tuberculose foi indicado como fator de risco em muitos estudos moleculares (Bishai et al. 1998) e mais

especificamente no Brasil, contato com pacientes foi indicado como fator de risco para viragem de PPD ou adocimento, respectivamente em estudantes de medicina (Teixeira et al. 2005) e em contatos de casos de HIV-soronegativos (Carvalho et al. 2001).

Analisamos um total de 347 isolados de *M. tuberculosis* tanto por “spoligotyping” quanto MIRU-VNTR. A variabilidade dos genótipos definidos pela análise combinada desses métodos foi muito alta: foram encontrados 331 perfis diferentes dos quais 320 eram únicos; 11 perfis foram compartilhados por 27 isolados.

Este grande poder discriminatório e ao mesmo tempo desejável, dificulta o encontro de perfis idênticos entre isolados que não pertencem a uma cadeia de transmissão recente, mas também é preocupante, porque o número de isolados que apresentam genótipo em agrupamento é muito baixo (7.8%), o que implica na análise de um número grande de isolados para se ter poder estatístico suficiente.

Quando comparamos nossos achados com os da literatura, este valor foi muito menor de que o encontrado em isolados avaliados do Canadá (32% de 315 isolados de pacientes diagnosticados na rede em Montreal) e nos isolados avaliados no Estado de Michigan (57% de 180 isolados de pacientes diagnosticados pelo CDC no período de 1996 -1999) (Cowan et al. 2002);

Acreditamos que parte da baixa porcentagem de agrupamentos de perfis MIRU + “spoligotyping” encontrado, foi decorrente do pouco tempo para interpretação dos perfis MIRU-VNTR. Nossa experiência em projetos anteriores nos mostrou que existe um importante fator humano na interpretação desses perfis. Neste estudo a amplificação, a análise e a tabulação dos 12 loci MIRUs de 353 isolados foram realizados num período de poucos meses, tornando indispensável a reavaliação dos perfis de MIRU-VNTR. Mas por outro lado, verificamos a concordância de valor em nosso estudo, com a taxa de 7,9% de perfis em “cluster” obtido por Lazzarini et al. (submetido), também realizado em pacientes diagnosticados na rede da Cidade de Rio de Janeiro, mas com duas reavaliações dos perfis de MIRU-VNTR por observadores diferentes.

De qualquer maneira, erro na interpretação dificilmente é causa dos agrupamentos, e torna o achado de um “cluster” com 5 isolados com perfil MIRU 224226153321 (C16) combinado com “spoligotype” LAM 2 de grande importância. Este cluster foi encontrado em 3 bairros diferentes, (1 isolado na Mangueira, 1 no Estácio e 3 no Catumbi) e devido às características de tamanho totalmente diferente dos demais “clusters” observados neste trabalho (tanto MIRU-VNTR quanto MIRU+ “spoligotyping” combinado) e isolados de três pacientes do mesmo bairro, existe a possibilidade de estarmos lidando com um surto de um isolado. Infelizmente, não temos acesso neste momento à informações epidemiológicas que poderiam confirmar tal fato.

Outra característica interessante deste grupo é que todos são LAM 2 e no estudo feito por Lazzarini et al. (submetido), observamos que isolados com este “spoligotype” sempre apresentam a presença da deleção RDrio. Como mencionamos anteriormente, existe a hipótese que a presença desta deleção pode estar associada com maior virulência dos isolados.

Pela análise combinada de RFLP, MIRU-VNTR e “spoligotyping”, acreditamos, nos permitindo ser relativistas em relação a nossa análise, que ainda existirão isolados de outros pacientes que agruparão neste grupo devido ao pouco tempo utilizado para a interpretação de alguns MIRUs. Pretendemos, então, reavaliar todos os isolados genotipados por MIRU e submeter a uma nova amplificação os casos com “spoligotype” LAM 2.

Em relação aos fatores de risco encontrados para formação de agrupamentos de genótipos MIRU-VNTR/ “spoligotypes”, achamos uma diferença significativa entre agrupamento ou não e tipo de moradia. A natureza exata desta associação não está clara no momento e precisa ser melhor investigada.

Importante foi à associação de idade menor com maior risco de pertencer a cluster e achamos o significado desta associação de importância e maior significado do que a associação inversa encontrada quando analisarmos “spoligotypes”.

Finalmente, tanto resistência a INH, resistência a RMP e multirresistência (INH+RMP) foram características microbiológicas associadas

com maior risco de pertencer a “cluster”. Devido ao número baixo de “clusters” encontrado analisando o genótipo combinado, consideramos este achado de grande importância, mas verificamos que os isolados resistentes e MDR não estavam localizados exclusivamente no maior “cluster” (somente em dois isolados desse grupo), mas espalhadas também em outros “clusters” e entre as amostras não “cluster”.

Resistência não foi fator de risco para agrupamento quando consideramos perfis RFLP e “spoligotyping” sozinho, menos para a análise agrupamento de MIRU-VNTR onde INH foi resistente. Pode ser que, no caso de RFLP, que isso se deve ao fato de termos analisado só isolados de 2001, enquanto que no caso de “spoligotyping”, esta técnica para estudos de fatores de risco quando utilizado sozinha não é muito confiável.

Resistência ou multirresistência a drogas é um dos fatores clássicos associados com maior risco de pertencer a “cluster”, mas esta é a primeira vez que isto está sendo observado no Brasil em pacientes atendidos em postos de saúde. Estudos anteriores realizados no país apontaram resistência e MDR em hospitais, ambulatórios, etc (Fandinho et al. 2000; Ferrazoli et al. 2000). Exemplos mais severos deste tipo de associação e surtos de isolados MDR com efeitos devastadores foram descritos na Rússia (Ruddy et al. 2005) e muitas vezes existe uma associação com um determinado genótipo (exemplo Beijing).

Ha informações contraditórias sobre virulência e transmissão de isolados resistentes e MDR: alguns trabalhos mostram que o desenvolvimento da resistência tem um “custo” e torna a cepa menos virulenta (Cohen et al. 2003). Por outro lado, isolados do tipo Beijing foram caracterizados como organismos com maior capacidade de gerar mutações, inclusive para desenvolvimento de resistência (Kremer et al. 2005; Park et al) e esta linhagem apresenta maior virulência em modelos animais (Dormans et al. 2004) e se espalha ao redor do mundo com eficiência (Sola et al. 2001).

Com certeza, outros fatores, como interação entre hospedeiro e parasita também estão envolvidos no complexo fenômeno da transmissão e prevalência em populações diferentes (Gagneux et al. 2006). De qualquer modo, a

associação entre desenvolvimento de resistência, virulência e patogenicidade dos isolados de *M. tuberculosis* não está resolvida. Exemplo interessante é o trabalho de van Soolingen et al. (2000), que mostraram que isolados de pacientes resistentes a INH não sofrem inibição da capacidade de serem transmitidas e causarem doença quando ha mutação no katG na posição 315, enquanto mutantes em outras posições do gene, também resistentes, perdem parte da capacidade de transmissão. Um estudo abordando o fenômeno sob outro aspecto é o de Kurepina et al. (2006), que mostraram que diferentes isolados MDR mantiveram a capacidade de se replicar em macrófagos quando compararam com a H37Rv.

CONCLUSÕES



6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados desse estudo permitiu as seguintes conclusões:

Conclusões:

1. Apesar dos números referentes à implantação da estratégia DOTS no município do Rio de Janeiro serem favoráveis ao Programa de Controle da Tuberculose, e assumindo que existem pacientes com isolados de *M. tuberculosis* com genótipos idênticos pertencentes a cadeia de transmissão, nossos dados sugerem que o tratamento supervisionado no grupo DOT-A (com profilaxia de contatos) a transmissão recente da tuberculose tem acontecido com uma frequência parecida com o grupo DOT.
2. Não foi possível definir fatores de risco fortemente associados com transmissão recente da tuberculose quando consideramos os genótipos obtidos pelos métodos de tipagem separadamente ou combinado (MIRU-VNTR + “spoligotyping”), a não ser resistência a drogas. Observamos uma taxa significativa de resistência a INH (MIRU-VNTR) e INH, RMP e MDR (MIRU-VNTR + “spoligotyping” com o risco de pertencer a “cluster”. Devido a baixa taxa de agrupamentos analisando os genótipos combinados, consideramos esta associação de maior significância.
3. A taxa de isolados em “cluster” foi de 28,6% pelo MIRU-VNTR, representando uma porcentagem de isolados idênticos parecida com os achados de outros estudos de âmbito nacional e internacional. Entretanto, a utilização combinada de MIRU-VNTR + “spoligotyping” apresentou uma porcentagem de agrupamentos de genótipos (7.8%) muito abaixo do encontrado em estudos realizados em outros países.

4. A taxa agrupamento observado para MIRU-VNTR foi similar ao RFLP-IS6110-3', mas existe a necessidade de melhor avaliar o poder discriminatório e analisar pequenas discrepâncias entre os métodos.

Limitações:

1. Este trabalho é o resultado de uma colaboração entre um grupo de especialistas em ensaios clínicos, clínica médica, epidemiologia, microbiologia, estatística, biologia molecular e epidemiologia molecular aliados a interação com a Secretaria Municipal de Saúde do município do Rio de Janeiro que gerencia o Programa de Controle da Tuberculose. A falta de comunicação (reuniões) durante a execução do projeto gerou falhas em seu andamento que não puderam ser corrigidas ou modificadas, assim como prejudicada ficou interação entre os grupos. Acreditamos que nesse projeto um número maior de amostras poderiam ser analisadas assim como um maior número de dados bacteriológicos, clínicos/ epidemiológicos também poderiam serem disponibilizados visando a obtenção de uma análise mais rigorosa dos dados de tipagem.
2. O precário fluxo de recebimento das amostras, impondo mudanças estratégicas para a exeqüível finalização dessa tese.
3. A falta de tempo para apresentar genótipos com maior segurança (principalmente MIRU-VNTR) e interpretação de dados pode ter (ligeiramente) contribuído para a baixa porcentagem de agrupamentos quando utilizamos a combinação MIRU-VNTR + "spoligotyping".

Perspectivas:

1. Verificar a possibilidade de recuperar isolados que não entraram nesse estudo e aumentar a representatividade da amostragem.

Conclusões

2. Utilizar a técnica de RFLP-IS6110-3' visando análise completa dos isolados recebidos nos 4 anos para tornar a comparação das metodologias mais robusta.
3. Reavaliar todos os perfis de MIRU e resubmeter a amplificação os perfis ainda duvidosos.
4. Comparar métodos de tipagem tais como RFLP-IS6110-3', MIRU-VNTR (de 12 ou 15 loci MIRUs) e "spoligotyping" em isolados de pacientes com ligação epidemiológica (pertencendo a cadeia de transmissão recente).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alito A, Morcillo N, Scipioni S, Dolmann A, Romano MI, Cataldi A, van Soolingen D. The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistance *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. J Clin Microbiol 1999; 37: 788-91.

Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth, W et al. Transmission of tuberculosis in New York city: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiological methods. N Engl J Med 1994; 330: 1710-6.

Anuradha B, Priya VHA, Lakshmi VV, Akbar Y, Aparna S, Latha GS, Murthy KJR. Prevalence of drug resistance under the DOTS strategy in Hyderabad, south India, 2001-2003. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10: 58-62.

Arcêncio RA. A organização do tratamento supervisionado nos municípios prioritários do Estado de São Paulo (2005). Ribeirão Preto; 2006. Mestrado (Dissertação em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo.

Asamoah-Odei E, Calleja JMG, Boerma JT. HIV prevalence and trends in sub-Saharan África: no decline and large subregional differences. Lancet 2004; 364: 35-40.

Atun RA, Baeza J, Drobniowski F, Levicheva V, Coker RJ. Implementing WHO DOTS strategy in the Russian Federation: stakeholder attitudes. Health Policy 2005; 74: 122-32.

Balasubramanian VN, Oommen K, Samuel R. DOT or not? Direct observation of anti-tuberculosis treatment and patient outcomes, Kerala State, India. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4(5): 409-413.

Referências Bibliográficas

Baldeviano C, Quispe N, Bonilla C, Gastiaburu D, Pro J, Lianos-Zavalaga LF. Perfíles genéticos (RFLP-IS6110) y resistencia a drogas em aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes internados em um hospital referencial Del Callao, Peru. Rev Peru Méd Exp Salud Publica 2003; 20: 72-77.

Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. N Engl J Med 2003; 349: 1149-56.

Beck-Sagué C, Dooley SW, Hutton MD, Otten J, Breeden A, Crawford JT, et al. Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. Factors in transmission to staff and HIV- infected patients. JAMA 1992; 268: 1280-6.

Bem-Dov I, Mason GR Drug-resistant tuberculosis in a Southern California hospital trends from 1969 to 1984. Am Rev Resp Dis 1987; 135: 1307-10.

Bifani PJ, Plikaytis BB, Kapur V, Stockbauer K, Pan X, Lutfey ML, et al. Origin and interstate spread of a New York city multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. JAMA 1996; 275: 452-7.

Blackwood KS, Wolfe JN, Kabani AM. Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? J Clin Microbiol 2004; 42: 5001-6.

Borges M, Cafrune PI, Possuelo LG, Valim ARM, Ribeiro MO, Rossetti ML. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from na outpatients clinic in Porto Alegre (RS). J Bras Pneumol 2004; 30: 358-64.

Brasil. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. Manual de normas para o controle da tuberculose. Brasília. 1995.p. 13.

Referências Bibliográficas

Brasil. Ministério da Saúde. Encerramento dos casos de tuberculose no Brasil 1999 [dados não publicados]. Área Técnica de Pneumologia Sanitária, Banco de Dados. Brasília;2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Brasília. 1994.p. 29.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. Centro de referência Prof. Hélio Fraga. Rio de Janeiro, 1998. p.2-3.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Banco de dados da TBMR. Rio de Janeiro; 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília, 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de saúde. Divisão de Pneumologia Sanitária. Campanha Nacional contra a Tuberculose. Controle da Tuberculose. Uma proposta de integração ensino-serviço. 5º ed. Brasília: CNCT/NUTES, 2002a.

Breese PE, Burman WJ, Hildred M, Stone B, Wilson ML, Yang Z, et al. The effect of changes in laboratory practices on the rate of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Pathol Lab Med 2001; 125: 1213-6.

Brito RC, Gounder C, Lima DB, Siqueira H, Cavalcanti HR, Pereira MM, Kritski AL. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated at an AIDS reference center general hospital in Rio de Janeiro. J Bras Pneumol 2004; 335-42.

Referências Bibliográficas

Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006; 6: 23.

Cafrune PI, Riley LW, Possuelo LG, Valim ARM, Borges M, Ribeiro MO, Rossetti MLR, Zaha A. Recent transmission of tuberculosis involving retired patients. J Infect 2006;(in press).

Castelo-Filho A. Tratamento intermitente para tuberculose pulmonar: oportunidade de uso no Brasil. J Pneumol 1993; 19: 50-51.

Cavalcante SC, Soares ECC, Rocha MS, Oliveira JR, Dias SMO, Pacheco AGF et al. A implantação da estratégia DOTS na cidade do Rio de Janeiro. Pulmão RJ 2003; 12(2): 71-79.

Chadha SL, Bhagi RP. Treatment outcome in tuberculosis patients placed under directly observed treatment short course (DOTS) – a cohort study. Ind J Tub 2000; 47: 155-58.

Chaves F, Dronda F, Alonso-Sanz M, Noriega AR. Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. AIDS 1999; 13: 615-20.

Chaves F, Yang Z, El Hajj H, Alonso M, Burman WJ, Eisenack F, et al. Usefulness of the secondary probe pTBN12 in DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin microbial 1996; 34: 1118-23.

Chee CBE, James L. the Singapore tuberculosis elimination programme: the first five years. Bull WHO 2003; 81(3): 217-221.

Referências Bibliográficas

Chen X, Zhao F, Duanmu H, Wan L, Wang L, Du X, Chin DP. The DOTS strategy in China: results and lessons after 10 years. Bull WHO 2002; 80: 430-36.

Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, Koubaji H, Gicquel B, dellagi K. Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 2446-50.

Cowan LS, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oeming TV, Crawford JT. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. J Clin Microbiol 2005; 43: 688-95.

Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. Variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. J Clin Microbiol 2002; 40: 1592-1602.

Dale JW, Nor RM, Ramayah S, Tang TH, Zainuddin ZF. Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. J Clin Microbiol 1999; 37: 1265-8.

DeRiemer K, Daley CL. Tuberculosis transmission based on molecular epidemiologic research. Seminars Resp Crit Care Med 2004; 25: 297-06.

Directly Observed Treatment Short-Course: Tuberculosis Cure for all. ICMR Bulletin 31(3); 2001.

DeRiemer K, García-García L, Bobadilla-del-Valle M, Palacios-Martínez M, Martínez-Gamboa A, Small PM, Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-León A Does DOTS work in populations with drug-resistant Tuberculosis. Lancet 2005; 365: 1239-1245.

Referências Bibliográficas

De Viedma DG, Rodríguez NA, Andrés S, Lirola MM, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E Evaluation of alternatives to RFLP for the analysis of clustered cases of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10(4):454–459.

Directorate General of Health Services. Ministry of Health and Family Welfare. Tuberculosis Control in India. New Delhi. 2005.

Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1900-2000. *Bull WHO* 1994; 72: 213-20.

Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P et al Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* 2004; 137: 460-68.

Dunlap NE, Harris RH, Benjamin WH Jr, Harden JW, Hafner D Laboratory contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1702-4

Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 2006; 367: 938-40.

Edlin BR, Tokars JI, Gioco MH, Crawford JT, Williams J, Sordilli EM, et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326: 1514-21.

Edlin BR, Tokars JI, Griego MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326: 1514-21.

Referências Bibliográficas

Fandinho FC, Kritski AL, Hofer C, Junior Conde H, Ferreira RM, Saad MH et al. RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 271-5.

Fang Z, Forbes KJ. A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (ipl) for insertion into the genome. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 479-81.

Ferdinand S, Sola C, Verdol B, Legrand E, Goh KS, Berchel M et al. Molecular characterization and drug resistance patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in an AIDS counseling center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 694-702.

Ferdinand S, Valétudie G, Sola C, Rastogi N. Data mining of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validates the clonal structure of spoligotyping-define families. *Res Microbiol* 2004; 155: 647-54.

Ferrazoli L, Palaci M, Marques LR, Jamal LF, Afiune JB, Chimara E, et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 18-25.

Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1963-70.

Filliol I, Motiwala AS, Cavtore M, Qi W, Hazbon MH, Bobadilla del Valle M, et al. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* 2006; 188: 759-72.

Referências Bibliográficas

Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, Crawford JT, Nivin B et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis. *Epidemiology and clinical outcomes*. JAMA 1996; 276: 1229-35.

Friedman CR, Stoeckle MY, Kreiswirth BN, Johnson WD Jr, Manoach SM,

Berger J, et al. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a large urban setting. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 (b); 52: 355-9.

Fujiwara PI, Huberman R. Relación entre vírus de la inmunodeficiencia humana, Sida y tuberculosis em la Ciudad de Nueva York. *Bol of Sanit Panam* 1994; 117: 438-52.

Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, Jong BC, Narayanan S et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 2006; 103: 2869-73.

Garner P, Volmink J. Directly observed treatment for tuberculosis. *BMJ* 2003; 327: 823-4.

Gazeta CE. Controle dos comunicantes de doentes de tuberculose: ações realizadas no programa de controle da tuberculose , no município de São José do Rio Preto – SP. Ribeirão Preto; 2004. Doutorado (Tese em Sociedade, saúde e Enfermagem) – Universidade de São Paulo.

Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, Mordasini C, Weiss S, Maurer AM, et al. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet* 1993; 342: 841-44.

Gibson A, Brown T, Baker L, Drobniowski F. Can 15-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis provide insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*? *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8207-13.

Referências Bibliográficas

Gillespie SH, Dickens A, McHugh TD. False molecular clusters due to nonrandom association of IS6110 with *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2081-86.

Glynn E, Vynnycky E, Fine PE. Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* derived from DNA fingerprinting techniques. Am J Epidemiol 1999; 149: 366-71.

Godfrey-Faussett P, Sonnenberg P, Shearer SC, Bruce MC, Mee C, Morris L, Murray J. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold-mining community. Lancet 2000; 356: 1066-71.

Gopi PG, Subramani R, Narayanan PR. Trend in the prevalence of TB infection and ARTI after implementation of a DOTS programme in south Índia. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10: 346-48.

Gopi PG, Subramani R, Radhakrishna S, Kolappan C, Sadacharam K, Devi TS, Frieden TR, Narayanan PR. A baseline survey of the prevalence of tuberculosis in a community in south Índia at the commencement of a DOTS programme. Int J Tuberc Lung Dis 2003; 7(12): 1154-1162.

Gouguet de la Salmoniere YO, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden JDA, Gicquel B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1997; 35: 2210-14.

Gupta S, Berg D, Lott F, Kellner P, Driver C. Directly observed therapy for tuberculosis in New York City: factors associated with refusal. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8(4): 480-85.

Referências Bibliográficas

Gutacker MM, Mathema B, Soini H, Shashkina E, Kreiswirth BN, Graviss EA, Musser JM. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. J Infect Dis 2006; 193: 121-8.

Hadley M, Maher D. Community involvement in tuberculosis control: lessons from other health care programmes. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4(5): 401-8.

Hawkey PM, Smith EG, Evans JT, Monk P, Bryan G, Huda H, et al. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. J Clin Microbiol 2003; 41: 3514-20.

Hermans PW, Messadi F, Guebresabher H, van Soolingen D, de Haas PE, Heersma H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. J Infect Dis 1995; 17: 1504-13.

Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, De Haas PE, Dale JW van Embden. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG isolated in a hot-spot integration region for insertion elements in *M. tuberculosis* complex strain. Infection and Immunity 1991; 59: 2695-2705.

Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, Schuitma AR, McAdam R, Catty D, van Embden JD. Insertion element IS986 from *M. tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1990 (b); 28: 2051-58.

Referências Bibliográficas

Hopewell PC. Tuberculosis control: how the world has changed since 1990. Bull WHO 2002; 80: 427 (Editorial).

Informes Técnicos Institucionais. Programa de Controle da Tuberculose no Município de Jacareí. Programa de Controle da Tuberculose e Implantação do Tratamento Supervisionado no Município de Jacareí , São Paulo, Brasil. Rev Saúde Publ 2004; 38 (6): 846-7.

Instituto Pereira Passos. Armazém de Dados. Bairros Cariocas. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://portalgeo.rio.rj.gov.br>

Instituto Pereira Passos. Coleção Estudos da Cidade. Tuberculose, ameaça que se mantém. 2002. Disponível em: <http://www.armazemdedados.rio.rj.gov.br/>

Jereb JA, Burwen DR, Dooley SW, Haas WH, Crawford JT, Geiter LJ, et al. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Infect Dis 1993; 168: 1219-24.

Jou R, Chiang CY, Huang WL. Distribution of the Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. J Clin Microbiol 2005; 43: 95-100.

Kam KM, Yip CW, Tse LW, Wong KL, Lam TK, Kremet K, et al. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the Beijing family. J Clin Microbiol 2005; 43: 306-13.

Kam KM, Yip CW. Surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to second-line drugs in Hong Kong, 1995-2002, after the implementation of DOTS-plus. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8(6): 760-66.

Referências Bibliográficas

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907-14.

Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. J Appl Microbiol 2003; 94: 781-91.

Kantor IN. Comisión Latino americana de Bacteriología de la Tuberculosis. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. Bol Inf Colabat 1994; 1: 4-19.

Kent RJ, Uttley AH, Stoker NG, Miller R, Pozniak AL. Transmission of tuberculosis in British centre for patients infected with HIV. BMJ 1994; 10: 639-40.

Khan MA, Walley JD, Witter SN, Shah SK, Javeed S. Tuberculosis patient adherence to direct observation: results of a social study in Pakistan. Health Policy Plan 2005; 20: 354-365.

Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutierrez MC, Haas WH, Panaiotov S, et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. J Clin Microbiol 2005; 43: 5628-38.

Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutierrez MC, Haas WH, Panaiotov S et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. J Clin Microbiol 2005; 43: 5628-38.

Referências Bibliográficas

Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, van Soolingen D. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. J Clin Microbiol 2005; 43: 314-20.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999; 37: 2607-18.

Kwara A, Schiro R, Cowan LS, Hyslop NE, Wiser MF, Roahen Harrison S, et al. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol 2003; 41: 2683-85.

Lazzarini LCO, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Mello FQ et al. Discovery of a new *Mycobacterium tuberculosis* genotype that is the most predominant cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. 2006 (submetido).

Magdalena J, Vachée A, Supply P, Locht C. Identification of a DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1998; 36: 937-43.

Maguire H, Dale JW, McHugh TD, Butcher PD, Gillespie SH, Costetsos A. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995-1997 demonstrating low rate of active transmission. Thorax 2002; 57: 617-22.

Mathew A, Binks C, Kuruvilla J, Davies PD. A comparison of two methods of undertaking directly observed therapy in a rural Indian setting. Int J Tuberc Lung Dis 2005; 9: 69-74.

Referências Bibliográficas

Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vicent V, Gicquel B. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. PNAS 2001; 98: 1901-06.

McHugh TD, Gillespie SH. Nonrandom association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis*: implications for molecular epidemiological studies. J Clin Microbiol 1998; 36: 1410-13.

Melo FA, Afiune JB, Ribeiro LHG. Resistência primária do *M. tuberculosis* num serviço ambulatorial de referência em São Paulo: evolução por três décadas e comparação com outros estudos nacionais. J Pneumol 1996; 22: 3-8.

Melo FA, Afiune JB. Transmissão e imunopatogênia da tuberculose. J Pneumol 1993; 19: 19-24.

Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasil. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/atencaobasica.php>

Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Vyazovaya A, Otten T, Vyshnevskiy B. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. J Clin Microbiol 2004; 42: 2438-44.

Moro ML, Gori A, Errante I, Infuso A, Franzetti F, Sodano L, Iemoli E. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy. Italian Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak Study Group. AIDS 1998; 12: 1095-1102.

Muniz JN, Palha PF, Monroe AA, Gonzáles RC, Rufino-Neto A, Villa TCS. A incorporação da busca ativa de sintomáticos respiratórios para o controle da tuberculose na prática do agente comunitário de saúde. Ciência & Saúde Coletiva 2005; 10(2): 315-21.

Referências Bibliográficas

Mushtaque A, Chowdhury R, Chowdhury S, Islam MN, Islam A, Vaughan JP. Control of tuberculosis by community health workers in Bangladesh. *Lancet* 1994; 343: 647-48.

Natal S. Emergência da resistência às drogas. *Bol Pneumol Sanit* 2002; 10: 57-70.

Nateniyom S, Jittimanee SX, Ngamtrairai N, Jittimanee S, Boonpendetch R, Moongkhetklang V et al. Implementation of the DOTS strategy in prisons at provincial level, Thailand. *Int J Tuberc. Lung Dis* 2004; 8(7): 848-54.

Newell JN, Pande SB, Baral SC, Bam DS, Malla P. Control of tuberculosis in an urban setting in Nepal: public-private partnership. *Bull WHO* 2004; 82(2): 92-98.

Nicol MP, Sola C, February B, Rastogi N, Steyn L, Wilkinson RJ Distribution of strain families of *Mycobacterium tuberculosis* causing pulmonary and extrapulmonary disease in hospitalized children in Cape Town, South Africa. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5779-81.

Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Thonnon J, Vicent V, Gutierrez MC. Molecular characteristics of strains of the Cameroon family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5029-35.

Nivin B, Fujiwara PI, Hannifin J, Kreiswirth BN. Cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*: an epidemiological and laboratory investigation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19: 500-3.

Oelemann MC, Fontes AB, Pereira MAS, Bravin Y, Barreira G, Degrave W, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in 11 Community Health Centers of Rio de Janeiro City, Southeast Brazil. 2006 (submetido)

Referências Bibliográficas

Ollé-Goig J E, Alvarez J. Treatment of tuberculosis in a rural área of Haiti: directly observed and non-observed regimens. The experience of Hôpital Albert Schweitzer. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(2): 137-141.

Onyebujoh P, Rodriguez W, Mwaba P. Priorities in tuberculosis research. *Lancet* 2006; 367: 940-42.

Pablos-Méndez A, Gowda DK, Frieden TR. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. *Bull WHO* 2002; 80(6): 489- 500.

Park YK, Shin S, Ryu S, Cho SN, Koh WJ, Kwon OJ et al Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Microbiol. Methods* 2005; 63: 165-72.

Picon PD, Rizzon CFC, Ott WP. Tratamento quimioterápico da tuberculose. In: Picon PD, Rizzon CFC, Ott WP. Tuberculose: epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Rio de Janeiro: Medsi; 1993. p. 491-499.

Quédraogo M, Kouanda S, Dembélé M, Quédraogo SM, Badoum G, Quédraogo G, et al. Obstacles to the implementation of directly observed treatment in Quagadougou, Burkina Faso. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 188-91.

Rao RK Ahmed N, Srinivas S, Sechi LA, Hasnain DE. Rapad identification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotypes on the basis of the Mycobacterial Interspersed Repetitive Units locus 26 signature. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 274-77.

Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 18: 220-6.

Referências Bibliográficas

Ribeiro MO, Gomes MS, Senna SG, Rossetti MLR, Fonseca LS. Evaluation of rapid microplate assays using cellular-viability indicators to determine patterns of susceptibility to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Bras Pneumol 2004; 30: 455-60.

Rodrigues LC, Smith PG. Tuberculosis in developing countries and methods for its control. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1990; 84: 739-44.

Ruddy M, Balabanova Y, Graham C, Fedorin I, Malamanova N, Elisarova E et al Rates of drugs resistance and risk factor analysis in civilian and prison patients with tuberculosis in Samara region, Russia. Thorax 2005; 60: 130-35.

Rufino-Neto. Carga da tuberculose: reflexões sobre o tema. J Bras Pneumol 2004; 30: 307-9 (Editorial)

Rufino-Netto A, Tuberculose: calamidade negligenciada. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35(1): 51-58.

Salamon H, Segal MR, Ponce de Leon A, Small P. Accommodating error analysis in comparison and clustering of molecular fingerprints. Emerg Infect Dis 1998; 4: 159-67.

Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Loch C, Supply P. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40: 4561-6.

Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN, Thibert L, Kozak R, Joseph L et al. Sensitivities and Specificities of Spoligotyping and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing Methods for Studying Molecular Epidemiology of Tuberculosis. J Clin Microbiol. 2005; 43: 89-94.

Referências Bibliográficas

Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN, Thibert L, Kozak R, Joseph L, et al. Sensitivities and specificities of spoligotyping and micobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 2005; 43: 89-94.

Secretaria de Saúde de Estado do Rio de Janeiro. Assesoria de Pneumologia Sanitária (online). Rio de Janeiro, Brasil. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/tuberculose/recomendacoes.shtml>

Secretaria Municipal de saúde. Ações em Saúde. Números da Saúde - Indicadores de Saúde. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.saúde.rio.rj.gov.br/cgi/public/cgilua.exe/web>

Secretaria Municipal de Saúde. Boletim Informativo do Programa de Controle da Tuberculose do Município do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: http://www.saude.rio.rj.gov.br/media/boletim_epidemiologicoTB_2004.pdf

Secretaria Municipal de Saúde. Boletim Informativo do Programa de Controle da Tuberculose do Município do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: http://www.saude.rio.rj.gov.br/media/boletim_epidemiologicoTB_2004.pdf

Sharma SK, Liu J. Progress of DOTS in global tuberculosis control. Lancet 2006; 367: 951-2.

Small P. Tuberculosis in the 21st century: DOTS and SPOTS. Plenary lecture given at the 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Bangkok, Thailand, 23-26 November 1998. Directly observed therapy. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3 (11): 949-55.

Small PM, Fujiwara PI. Management of tuberculosis in the United States. N Engl J Méd 2001; 345: 189-200.

Referências Bibliográficas

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

Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, Singh SP, Murphy MJ, Desmond E. Exogenous reinfection with multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993; 328: 1137-43.

Snider DE, La Montagne JR. The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 world congress on tuberculosis. *J Infect Dis* 1994; 169: 1189-96.

Sola C, Devallois A, Horgen L, Maisetti J, Filliol I, Legrand E, Rastogi N. Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 404-14.

Sola C, Ferdinand S, Mammina C, Nastasi A, Rastogi N. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1559-65.

Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Lochter C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution* 2003; 3: 125-33.

Strassle A, Putnik J, Weber R, Fehr-Merhof A, Wust J, Pfyffer GE. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in a human immunodeficiency virus cohort in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 374-8.

Referências Bibliográficas

Suárez PG, Watt CJ, Alarcón E, Portocarrero J, Zavala D, Canales R, Luelmo F, Espinal MA, Dye C. The dynamics of tuberculosis in response to 10 years of intensive control effort in Peru. *J Clin Infect Dis* 2001; 184: 473-8.

Suffys PN, Ivens de Araújo ME, Rossetti ML, Zahab A, Barroso EW, Barreto AM, et al. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol* 2000; 151: 343-51.

Sun YJ, Bellamy R, Lee ASG, Ng ST, Ravindran S, Wong SY, et al. Use of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number tandem repeat typing to examine genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1986-93.

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3563-71.

Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* 1997; 26: 991-1003.

Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vicent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36: 762-71.

Surikova OV, Voitech DS, Kusmicheva G, Talkov SI, Mokrousov IV, Narvskaya OV et al. Efficient differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci. *Eur J Epidemiol* 2005; 20: 963-74.

Referências Bibliográficas

Tazi L, El Baghdadi J, Lesjean S, Loch C, Supply P, Tibayrenc M, Banuls AL. Genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Casablanca, a Moroccan city with high incidence of tuberculosis. J Clin Microbiol 2004; 42: 461-6.

Teixeira GM. Da tuberculose e suas perspectivas no novo governo. Bol Pneumol Sanit 2002. 10 (2): Editorial. Bol Pneumol Sanit 2002; 10:57-70.

Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA, Giampaglia CM, Martins MC, Ueki SY et al. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. Int J Tuberc Lung Dis 2005; 9: 970-6.

Timm J, Kurepina N, Kreiswirth BN, Post FA, Walther GB, Wainwright HC et al. A multidrug-resistant, *arc1*-deficient clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis* is unimpaired for replication in macrophages. J Infect Dis 2006; 193: 1703-10.

Tudó G, Gonzales-Martin J, Obama R, Rodrigues JM, Franco JR, Espasa M et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Bata and Malabo districts of Equatorial Guinea. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8: 1458-63.

van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993; 31: 406-409.

Van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor RC, Gie RP, Enarson DA. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. N Engl J Med 1999; 1174-79.

van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PE, Sebek MMGG, Veen J, Dessens M, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. J Infect Dis 1999; 180: 726-36.

Referências Bibliográficas

van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1993; 31: 1987-95.

Wandwalo E, Kapalata N, Egwaga S, Morkve O. Effectiveness of community-based directly observed treatment for tuberculosis in an urban setting in Tanzania: a randomised controlled trial. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8(10): 1248-54.

Warren RM, Simpson SL, Richardson GD, van Der Spuy P, Lombard CJ, Victor TC, van Helden PD. Mapping of IS6110 flanking regions in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* demonstrates genome plasticity. Mol Microbiol 2000; 37: 1405-16.

World Health Organization. Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing. WHO Report. Communicable Diseases. Geneva, 2004.

World Health Organization. Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing. Who report. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/tb/surveillanceworkshop/>

World Health Organization. Ad-hoc Committee on the tuberculosis epidemic. WHO/TB/98.245. Geneva, 1998.

World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report. Geneva, 2006.

World Health Organization. IUATALD. Anti-tuberculosis drug-resistance in the world: third global report. Geneva. WHO, 2004.

Referências Bibliográficas

World Health Organization. What is DOTS ? : A guide to understanding the WHO-recommended TB control strategy know as DOTS. Geneva: WHO, 1999.

Yang ZH, de Haas PEW, van Soolingen D, van Enbdem JDA, Andersen AB. Restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992; evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. J Clin Microbiol 1994; 32: 3018-25.

Yang ZH, Mtoni I, Chonde M, Mwasekaga M, Fuursted K, Askgard DS, et al. DNA fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. J Clin Microbiol 1995; 33: 1064-9.

Yeh RW, Ponce de Leon A, Agasino CB, Hahn JA, Daley CL, Hopewell PC, Small PM. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. J Infect Dis 1998; 177: 1107-11.

Zaza S, Blumberg HM, Beck-Sagué C, Haas WH, Woodley CL, Pineda M, et al. Nosocomial transmission of *Mycobacterium tuberculosis*: role of health care workers in outbreak propagation. J Infect Dis 1995; 172: 1542-9.

ANEXOS



8. ANEXOS

Anexo 1: formulário de inscrição no estudo

Ficha para anotação e envio de dados

Anexo 2: Formulário de resultados da bacteriologia

Ficha para anotação e envio de dados

Anexo 3: Report for form ICIDR- inscrição

Ficha para banco de dados

Anexo 4: Report for form ICIDR – bacteriologia

Ficha para banco de dados

Anexo 5: Tabela de amostras genotipadas por MIRU-VNTR e “spoligotyping”

Anexo 6: Tabela de amostras total genotipadas por MIRU-VNTR

Anexo 7: Comparação “clusters” projeto DOT/ICIDR e RDrio

Anexo 8: Dendrograma UPGMA “spoligotyping”

Anexo 9: Dendrograma N-J MIRU-VNTR

Anexo 10: Dendrograma N-J MIRU-VNTR + “spoligotyping”

Anexo 11: Manuscrito para o Memórias do Instituto Oswaldo Cruz