

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

THAYNAN SAMA ALVES DE OLIVEIRA

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADOS DA
POPULAÇÃO PRIVADA DE LIBERDADE DO MUNICÍPIO DE RECIFE,
PERNAMBUCO

RECIFE

2019

THAYNAN SAMA ALVES DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADOS DA
POPULAÇÃO PRIVADA DE LIBERDADE DO MUNICÍPIO DE RECIFE,
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Haiana Charifker Schindler

Coorientadora: Dra. Michelle Christiane da Silva Rabello

RECIFE

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- O48e Oliveira, Thaynan Sama Alves de.
Diversidade genética de Mycobacterium tuberculosis isolados da população privada de liberdade do Município de Recife, Pernambuco / Thaynan Sama Alves de Oliveira. - Recife: [s.n.], 2019.
95 p.: ilus., tab.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.
Orientador: Haiana Charifker Schindler;
coorientador: Michelle Christiane da Silva Rabello.
1. Epidemiologia molecular. 2. Prisões. 3. Mycobacterium tuberculosis – isolamento & purificação. 4. MIRU-VNTR - métodos. I. Schindler, Haiana Charifker. II. Rabello, Michelle Christiane da Silva. III. Título.

CDU 616-002.5

THAYNAN SAMA ALVES DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADOS DA
POPULAÇÃO PRIVADA DE LIBERDADE DO MUNICÍPIO DE RECIFE,
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 27/06/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr. Danilo Elias Xavier
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Heidi Lacerda Alves da Cruz
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Haiana Charifker Schindler
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dedico este trabalho a Deus, minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as provas e conquistas que tornaram possível a finalização de mais essa etapa da minha vida.

A minha avó Josefa (*in memoriam*), agradeço por tudo o que me ensinou em sua jornada terrena e tenho certeza que sempre a tenho ao meu lado.

Aos meus pais, agradeço por toda a luta, abnegação e mais profundo amor que dedicam a mim e a minha irmã. Sem vocês nada disso seria possível e espero que saibam que os amo do fundo do meu coração e lhes serei eternamente grata.

A Mima agradeço por ter você na minha vida minha irmã e espero que saiba o quanto lhe amo.

A minha orientadora, Dra. Haiana Schindler pela confiança depositada durante esta jornada.

A Dra. Michelle Rabello, pela oportunidade, assistência, tempo e apoio que dedicou na realização deste trabalho e em minha formação, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos alunos, pesquisadores e colaboradores do Departamento de Imunologia, em especial aos do laboratório do Imunoparasitologia que me acolheram durante a realização de grande parte dos experimentos, muito obrigada.

Aos amigos que fiz durante a minha passagem pelo Instituto Aggeu Magalhães, obrigada por todos conselhos, atenção, companheirismo e amizade, em especial a Athos Lucena, João Ferreira, Andreza Souza, Ana Carla, Kamilla Sales, Kamilla Kássia, Rafaela Lira e Diego Torres.

Aos meus amigos da vida, em especial a Dayane Silva, Moana Santiago, Osana Diniz, Janderson Lopes, Millena Nascimento, Rebeqa Macedo, Maria Odete, Larissa Rocha, Victor Teodósio e Thais Neves, por sempre me apoiarem e me socorrerem, muito obrigada.

Aos órgãos de fomento, CAPES e FACEPE, pela bolsa de pós-graduação e financiamento do projeto.

A todos do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães que sempre foram solícitos e dispostos a ajudar.

Em suma, a todos que ajudaram na realização de conclusão deste trabalho, meus agradecimentos.

OLIVEIRA, Thaynan Sama Alves de. **Diversidade genética de *Mycobacterium tuberculosis* isolados da população privada de liberdade do município de Recife, Pernambuco.** 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

A tuberculose (TB) continua sendo um grande problema de saúde pública no Brasil, inclusive nos presídios. O objetivo deste estudo foi realizar uma investigação da epidemiologia molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) da população encarcerada do Complexo Prisional Aníbal Bruno entre os anos de 2015 e 2016. Um total de 70 isolados clínicos de Mtb foram genotipados com sucesso através da técnica MIRU-VNTR. Dentre os casos avaliados todos os indivíduos eram do sexo masculino, predominantemente da raça/cor da pele parda e jovens adultos com baixa escolaridade. A forma clínica da tuberculose mais frequente era pulmonar e de casos novos, não tendo sido observados óbitos até o encerramento dos casos. A aplicação web MIRU-VNTR^{plus} foi utilizada na construção de árvores filogenéticas e identificação das linhagens/sublinhagens associadas. A frequência de cada sublinhagem encontrada foi a seguinte: Haarlem (45,71%), LAM (12,86%), X (11,43%), Beijing (10%), *mutiple matches* (4,29%) e perfis desconhecidos (15,71%). Os padrões de 15 e 24 MIRU-VNTR *loci* foram avaliados: considerando-se 15 *loci* foram obtidos 47 padrões, destes 42 eram de perfis únicos e cinco correspondiam a *clusters* compostos por 27 isolados. A análise dos 24 *loci* resultou em 54 padrões, destes 51 eram de perfis únicos e três correspondiam a *clusters* compostos por 18 isolados. Notamos ainda a presença de sete infecções mistas entre os casos e estes isolados apresentaram um perfil alélico duplo entre dois a seis *loci*. Estes achados nos permitiram concluir que há uma diversidade de genótipos e sublinhagens entre as estirpes de Mtb que causam a doença na população privada de liberdade das unidades avaliadas, além de fornecer subsídios ao planejamento de medidas preventivas para a diminuição da carga de tuberculose no complexo estudado. Todavia, futuros estudos temporais da epidemiologia molecular em Recife são necessários para avaliar a dinâmica da transmissão do Mtb entre as unidades prisionais e a comunidade, além de relacionar os fatores de risco associados ao surgimento da TB.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular. Prisões. *Mycobacterium tuberculosis*. MIRU-VNTR.

OLIVEIRA, Thaynan Sama Alves de. **Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from prisoners from Recife, Pernambuco**. 2019. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2019.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains a major public health problem in Brazil, including in prisons. The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) strains from the incarcerated population of the Aníbal Bruno Prison Complex between the years of 2015 and 2016. A total of 70 clinical isolates of Mtb were successfully genotyped using the MIRU-VNTR technique. Among the cases evaluated, all the individuals were male, predominantly brown skin color/race and young adults, with low educational level. The most frequent clinical form of tuberculosis were pulmonary and new cases, and no deaths were observed until the closure of the cases. The MIRU-VNTR_{plus} web application was used for the construction of phylogenetic trees to identify the associated lineages/sublineages. The frequency of each sublineage was found as follows: Haarlem (45.71%), LAM (12.86%), X (11.43%), Beijing (10%), multiple matches (4.29%) and unknown profiles (15.71). The patterns of 15 and 24 MIRU-VNTR *loci* were evaluated: considering 15 *loci* 47 patterns were obtained, of these 42 were unique profiles and five corresponded to clusters composed of 27 isolates. Analysis of the 24 *loci* resulted in 54 patterns, of which 51 were single profile and three corresponded to clusters composed of 18 isolates. We also observed the presence of seven mixed infections among the cases and these isolates presented a double allelic profile between two and six *loci*. These findings allowed us to conclude that there is a diversity of genotypes and sublineages between the Mtb strains that cause the disease in the prisoners of the evaluated units, besides providing subsidies to the planning of preventive measures to reduce the burden of tuberculosis in the studied complex. However, future temporal studies of molecular epidemiology in Recife are necessary to evaluate the dynamics of Mtb transmission between the prison units and the community, as well as to relate the risk factors associated with the onset of TB.

Keywords: Molecular epidemiology. Prisons. *Mycobacterium tuberculosis*. MIRU-VNTR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxas estimadas de Incidência de Tuberculose no mundo em 2017.....	19
Figura 2 – Linhagens de Mtb adaptadas aos humanos (Linhagem 1 à 7) e sua distribuição pelo globo.....	26
Figura 3 - Mapa Circular do Cromossomo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Cepa de Referência H37Rv.....	27
Figura 4 - Esquema representativo de um dendograma.....	30
Figura 5 – Representação Esquemática dos sítios de restrição da enzima PuvII no genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
Figura 6 – Representação da Técnica RFLP-IS6110.....	33
Figura 7 - Ilustração esquemática da técnica <i>Spoligotyping</i> e MIRU-VNTR.....	35
Figura 8 – Esquema representativo do princípio da genotipagem por MIRU-VNTR loci.....	37
Figura 9 – Número de pessoas privadas de liberdade entre 1990 e 2016.....	42
Figura 10 - Dendograma de similaridade UPMGA 15 loci MIRU-VNTR.....	64
Figura 11 – Dendograma de similaridade UPMGA 24 loci MIRU-VNTR.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os métodos de tipagem molecular mais utilizados em estudos epidemiológicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40
Tabela 2 - Número de Isolados de Mtb genotipados correlacionados a unidade prisional de origem do paciente/presidiário.	53
Tabela 3 - Dados epidemiológicos e dos exames laboratoriais de rotina dos casos de TB dos pacientes privados de liberdade (N=67).	54
Tabela 4 – Dados clínico-epidemiológicos e demográficos dos casos de TB notificados e genotipados dos pacientes privados de liberdade genotipadas.	56
Tabela 5 – O poder discriminatório da técnica MIRU-VNTR e taxa de clustering.	58
Tabela 6 – Análise similaridade entre os isolados clínicos de Mtb e as linhagens/sublinhagens globais usando diferentes distancias máximas	59
Tabela 7 – Proporção das linhagens/sublinhagens identificada para os isolados de Mtb através da plataforma MIRU-VNTR _{plus}	59
Tabela 8 – A diversidade alélica (h) entre os 24 loci MIRU-VNTR avaliados.	60
Tabela 9 – Isolados de Mtb que apresentaram perfil alélico misto.	61
Tabela 10 – Linhagens e Sublinhagens dos <i>clusters</i> obtidos pelas análises de MIRU-VNTR 15 e 24 loci	63
Tabela 11 – Proporção das linhagens/sublinhagens identificadas para os isolados de Mtb de cada unidade prisional através da plataforma MIRU-VNTR _{plus}	66
Tabela 12 – Associação entre casos de coinfeção TB-HIV e a sublinhagem observada nos isolados relacionados.	67
Tabela 13 – Associação entre os casos de recidiva e a sublinhagem observada nos isolados relacionados	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
BCG	Bacillus Calmette Guerin
DR	Direct Repeats
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
HIV	Human Immunodeficiency Viroses
ILTB	Tuberculose Latente
IS	Insertion Sequence
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
MS	Ministério da Saúde
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex
NGS	Next-Generation Sequencing
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frames
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPL	População Privada de Liberdade
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SINAN	Sistema de Informação de Agravos Notificação
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism
TB	Tuberculose
TB-DR	Tuberculose Droga-Resistente
TB-MDR	Tuberculose Multidroga-Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Resistente
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
WGS	Whole Genome Sequence

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 Aspectos Históricos.....	16
2.2 Epidemiologia da Tuberculose	17
2.3 Transmissão e Patogênese da Tuberculose	21
2.4 Diagnóstico e Tratamento da Tuberculose.....	23
2.5 O Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
2.5.1 O Genoma do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	27
2.6 Epidemiologia Molecular	29
2.6.1 Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação - IS6110	31
2.6.2 Spoligotyping	34
2.6.3 Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeat.....	36
2.6.4 Sequenciamento do Genoma Completo (WGS).....	38
2.7 Tuberculose na População privada de Liberdade.....	41
3 JUSTIFICATIVA	45
4 PERGUNTA CONDUTORA	46
5 HIPÓTESE.....	47
6 OBJETIVO GERAL	48
6.1 Objetivos Específicos.....	48
7 METODOLOGIA.....	49
7.1 Desenho de Estudo.....	49
7.2 Critérios de Inclusão e de exclusão	49
7.3 Coleta e análise dos dados epidemiológicos.....	49
7.4 Extração de DNA genômico dos isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
7.5 Genotipagem dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> por MIRU- VNTR.....	50
7.6 Análises estatísticas MIRU-VNTR.....	51
7.6.1 Busca por similaridade	51
7.6.2 Cálculo da diversidade alélica	51
7.6.3 Dendograma	52
7.6.4 Análise de <i>cluster</i>	52
7.6.5 Poder discriminatório	52

7.7 Aspectos éticos	52
8 RESULTADOS	53
8.1 População de estudo	53
8.1.1 Características clínico-epidemiológicas e demográficas	53
8.2 Perfil genético dos Isolados de Mtb: MIRU-VNTR 15 loci e 24 loci.....	58
8.2.1 Análise do dendograma de similaridade entre os isolados de Mtb.....	61
8.3 Diversidade de genótipos de Mtb circulantes em cada unidade do Complexo Prisional Aníbal Bruno.....	66
8.4 Correlação entre os casos de coinfeção TB-HIV e de recidiva por tuberculose com as sublinhagens de Mtb.....	67
9 DISCUSSÃO	69
10 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO A - FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE TUBERCULOSE - SISTEMA DE NOTIFICAÇÃO DE AGRAVOS (SINAN).....	94
ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	95

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença antiga e um grave problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morbimortalidade global. Embora um tratamento efetivo esteja disponível, a TB ainda é prevalente em várias regiões no mundo. Isto pode ser atribuído a sua ampla dispersão geográfica, a co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a emergência dos casos multirresistentes as drogas (GLAZIOU et al., 2013; OMS, 2017).

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é o principal agente etiológico da tuberculose humana, sendo considerado como um dos patógenos humanos mais bem-sucedidos, sobretudo devido ao grande número de mortes a ele atribuídas (PAULSON et al., 2013). A evolução clínica da doença é altamente variável, desde uma infecção assintomática até a rápida progressão pulmonar ou a forma disseminada da tuberculose. Esta variabilidade tem sido atribuída à susceptibilidade do hospedeiro, assim como a diversidade genética do patógeno (ALMEIDA; PALOMINO, 2011; GLAZIOU et al., 2013; LÓPES et al., 2003).

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que a tuberculose é a doença infecciosa que mais causa mortes no mundo, superando o HIV/AIDS no *ranking* da mortalidade por infecções. Acredita-se que ao menos um terço da população mundial esteja infectada e que, em média, um doente possa infectar de dez a quinze pessoas durante o período de um ano (WHO, 2017). O bacilo expelido pelo paciente com tuberculose pulmonar ativa (bacilífero) através da tosse, fala ou espirro é transmitido de pessoa a pessoa, sendo a via respiratória a principal fonte de disseminação da doença. O risco de infecção é dependente de fatores como a intensidade da carga bacilar e a proximidade do contato com o paciente, além da integridade do sistema imune do hospedeiro (MENDOZA et al., 2010).

A tuberculose atinge indiscriminadamente a população, a maioria dos casos da doença é relatada em países subdesenvolvidos e está diretamente relacionada às precárias condições de vida dos indivíduos infectados (OELEMANN et al., 2007; PARSONS et al., 2011). Estes fatores contribuem consideravelmente para a proporção da doença no mundo e diferem de acordo com a região geográfica (GLAZIOU et al., 2013).

No Brasil, apesar da incidência da tuberculose ter decrescido desde a década de 1950, o número de casos novos notificados pelo Ministério da Saúde ainda é bastante elevado. A situação da tuberculose nos presídios do Brasil é crítica e apresenta um elevado coeficiente de incidência, cerca de 985,3 por 100 mil habitantes, taxa quase 30 vezes maior que a da população brasileira em geral. A superlotação, a pobre iluminação, a pouca ventilação e a permanência

prolongada no sistema carcerário estão entre os fatores que favorecem a alta transmissibilidade do patógeno nestes locais (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2015).

Atualmente, a identificação molecular de linhagens do Mtb é uma importante ferramenta molecular utilizada nos estudos epidemiológicos de tuberculose. A partir da associação de técnicas moleculares aos dados epidemiológicos tradicionais é possível responder questões quanto à fonte de infecção, estabelecer casos atribuídos à transmissão recente do *M. tuberculosis*, diferenciar infecção exógena de reinfecção e rastrear a distribuição geográfica do patógeno (JAGIELSKI et. al., 2016; ORDUZ; RIBÓN, 2015).

No Brasil, um estudo de epidemiologia molecular da tuberculose realizado em Dourados, no Mato Grosso do Sul, constatou que 54% das cepas de *M. tuberculosis* isoladas da população privada de liberdade estão relacionadas com as cepas transmitidas pela população urbana. Este trabalho demonstrou que o controle efetivo da tuberculose nas prisões é necessário para redução da prevalência da doença (SACCHI et al., 2015).

Portanto, é importante que outros estudos de epidemiologia molecular da tuberculose também sejam conduzidos em outras regiões do Brasil para avaliar a dinâmica de transmissão da doença nos sistemas prisionais em diferentes cenários. A maioria das pesquisas epidemiológicas sobre diversidade genética entre isolados clínicos de *M. tuberculosis* no Brasil foi realizada em pacientes residentes das regiões Sul e Sudeste (BAPTISTA et al., 2002; GOMES et al., 2011; KUHLEIS et al., 2012; MALAGHINI et al., 2009; MIRANDA et al., 2011; MARTINS et al., 2013; OELEMANN et. al., 2007). No entanto, poucos estudos foram conduzidos na população encarcerada (HUBER et al., 2014; KUHLEIS et al., 2012, MEDEIROS et al., 2018; SACCHI et al, 2015).

2 MARCO TEÓRICO

As próximas sessões deste trabalho apresentam os aspectos teóricos de maior relevância para a compreensão da temática. Abordando tópicos relacionados a tuberculose, entre eles, o histórico, transmissão, patogênese, diagnóstico, tratamento, o agente causador e a epidemiologia clássica e molecular da doença.

2.1 Aspectos Históricos

A tuberculose afeta a população humana desde a antiguidade. Sugere-se que o gênero *Mycobacterium* tem sua origem estimada há mais de 150 milhões de anos atrás (BRITES; GAGNEUX, 2017; DANIEL, 2006). Além do patógeno ter sido detectado em restos humanos, lesões post-mortem características da infecção e descrições clínicas em relatos médicos têm sido documentadas ao longo dos séculos (CAMBAU; DRANCOURT, 2014). A forma pulmonar da doença é a mais comum, entretanto, formas extrapulmonares também foram descritas ao longo da história (CHAISSON; BISHAI, 2017).

O começo do século XIX foi marcado por um intenso debate científico quanto às diversas teorias da origem etiopatogênica da tuberculose, se esta era uma doença infecciosa, hereditária ou uma forma de câncer (BARBERIS et al., 2017). O isolamento do bacilo Mtb por Robert Koch (1882) foi o começo do triunfo científico sobre a doença (CHAISSON; BISHAI, 2017). Koch identificou, isolou e cultivou os bacilos, assim como reproduziu a doença em animais de laboratório (BARBERIS et al., 2017). Além disso, Koch isolou um composto, denominado tuberculina, que foi utilizado primariamente como tratamento contra a tuberculose, mas que se mostrou sem valor terapêutico. O pesquisador Charles Mantoux observou uma forte reação intradérmica após a injeção da tuberculina em pacientes infectados pelo bacilo. Diante disto, a tuberculina passou a ser usada como ferramenta para o diagnóstico da TB (PAI et al., 2004).

A era da vacinação teve início após Albert Calmette e Camille Guérin sub-cultivarem uma cepa de *Mycobacterium bovis* (1908 a 1921). A vacina BCG (Bacillus Calmette Guerin) reduziu drasticamente o número de casos de meningite por tuberculose em crianças e a incidência da forma miliar, inclusive em adultos (CAMBAU; DRANCOURT, 2014). Entretanto, a mesma causou pouco impacto na epidemia, já que aparentemente não protege contra a forma pulmonar da doença (CHAISSON; BISHAI, 2017).

Na busca por antibióticos eficazes para o tratamento da tuberculose, a descoberta da estreptomicina e do ácido para-aminossalicílico foi de extrema importância. Pacientes tratados

com as referidas drogas progrediram com moderada melhora clínica, porém à custa de efeitos adversos significantes. Além disso, quando utilizadas individualmente, ou seja, como monoterapia, induziam o desenvolvimento da forma resistente da doença (CAMBAU; DRANCOURT, 2014; MURRAY et al., 2015).

A era moderna da quimioprofilaxia anti-TB teve início com a descoberta da isoniazida (1952), que logo demonstrou ser uma droga mais potente, bem tolerada e segura até aquele momento. Todavia, a monoterapia também levava ao desenvolvimento de resistência à droga, demonstrando a necessidade da terapia multidroga para a cura da doença. Durante 15 anos a “terapia tripla”, de isoniazida e para-aminossalicílico por 18 a 24 meses, mais estreptomicina intramuscular nos 6 primeiros meses, foi o tratamento preconizado (MURRAY et al., 2015).

Ao longo do tempo, o surgimento de cepas resistentes ao tratamento demonstrou a necessidade de desenvolver novos fármacos. Um desses fármacos foi o etambutol, que se mostrou efetivo em bacilos resistentes a isoniazida e estreptomicina. A partir de 1966, a rifampicina também foi incluída no regime quimioterápico anti-TB, reduzindo o tratamento para 9 meses e melhorando as taxas de cura (MURRAY et al., 2015).

Após décadas de estudos, acreditou-se que a luta contra a tuberculose estava praticamente vencida, pois havia um diagnóstico acurado, tratamento eficaz e uma terapia preventiva (vacina). Portanto, os esforços científicos poderiam ser realocados a outras doenças e problemas da sociedade. No fim da década de 80, a ineficácia do controle da tuberculose, a falta de infraestrutura do sistema de saúde nos países em desenvolvimento, o surgimento do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a emergência de bacilos resistentes a drogas da tuberculose alteraram drasticamente o panorama da doença no mundo (MURRAY et al., 2015; CHAISSON; BISHAI, 2017).

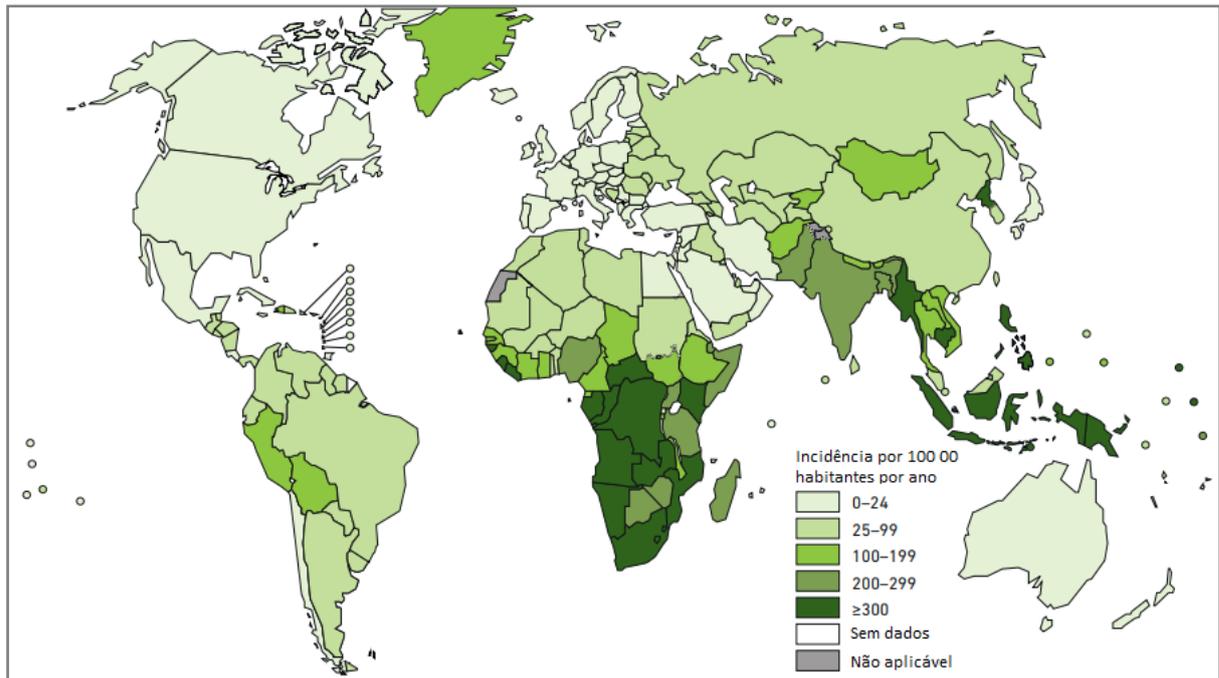
2.2 Epidemiologia da Tuberculose

A TB afeta de forma desproporcional a camada mais pobre e vulnerável da sociedade, sendo amplamente reconhecida como a doença da pobreza (PEDRAZZOLI et al., 2017). Os determinantes da doença se subdividem entre fatores inerentes ao hospedeiro, ao agente etiológico, e às condições sociais as quais os indivíduos estão inseridos (SALES et al., 2015). Portanto, a epidemiologia da tuberculose reflete os fatores de risco socioeconômicos e os aspectos comportamentais que influenciam nos diversos estágios da patogênese da doença (DUARTE et al., 2017). Dentre os grupos mais vulneráveis ao desenvolvimento da TB,

destacam-se os moradores de rua, presidiários, indígenas e portadores de HIV/AIDS (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2015; OMS, 2017).

Claramente, a enfermidade é mais incidente em países em desenvolvimento subdesenvolvidos e emergentes, e está diretamente relacionada a condições sanitárias precárias, a grande concentração populacional em áreas urbanas, serviços de saúde ineficientes, má-nutrição, consumo de álcool, drogas e ao tabagismo (PARSONS et al., 2011; SACCHI et al., 2015). Um estudo epidemiológico realizado na América Latina e Caribe por Munayco *et al.* (2016), demonstrou que altas taxas de crescimento da população urbana e da população privada de liberdade (PPL) são variáveis que apresentaram associação significativa com a prevalência da doença. Em contrapartida, os maiores investimentos na saúde *per capita*, o acesso a instalações sanitárias, a maior expectativa de vida ao nascimento e a detecção precoce da TB estão entre os fatores que possuem relação direta com a redução das taxas de incidência e de mortalidade por TB (MUNAYCO et al., 2016).

Em 2017, a OMS estimou a ocorrência de 10 milhões de novos casos de tuberculose no mundo, o que equivale a 133 casos a cada 100.000 habitantes. A TB é uma das dez principais causas de mortes no mundo, assumindo a primeira posição entre as doenças infecciosas, superando o HIV/AIDS. Mesmo com uma queda significativa de mortes por TB nos últimos 16 anos (37%), os números continuam alarmantes. Estima-se que 1,3 milhões de pessoas vieram a óbito por TB no ano de 2017, e destes, 300.000 eram pacientes HIV positivos. Atualmente, 30 países respondem por 87% da carga total de TB, entre eles, Índia, China, Indonésia, Filipinas, Paquistão, Nigéria, Bangladesh e África do Sul, em ordem decrescente (Figura 1) (OMS, 2018).

Figura 1 – Taxas estimadas de Incidência de Tuberculose no mundo em 2017.

Fonte: Relatório de Tuberculose. Organização Mundial da Saúde (2019, Tradução nossa).

Legenda: Mapa mundial demonstrando as diferentes taxas estimadas de incidência da tuberculose. Os tons de verde claros e escuros indicando menores e maiores taxas de incidência, respectivamente.

Por sua vez, o continente americano concentra aproximadamente 3% da carga mundial de tuberculose. Em 2017, estimou-se a ocorrência de 282 mil novos casos e destes 30 mil eram de coinfeção TB-HIV e 11 mil de TB multidroga-resistente (MDR). Além disso, no mesmo ano registrou-se 24.000 mortes por tuberculose nas Américas. As taxas mais altas de incidência neste continente são observadas no Caribe (61,2/100 mil habitantes), seguido da América do Sul (46,2/100 mil habitantes), América Central e México (25,9/100 mil habitantes) e América do Norte (3,3/100 mil habitantes) (PAHO, 2018).

Entre as ameaças ao controle da doença no mundo estão a coinfeção TB-HIV e a tuberculose drogarresistente (TB DR). A resistência à droga geralmente ocorre quando o tratamento é abandonado ou feito de forma inadequada. A TB DR pode ser monorresistente, polirresistente (TB-MDR) ou extensivamente resistente (TB-XDR). A TB-MDR é a forma de tuberculose causada por bactérias que não respondem ao tratamento com isoniazida e rifampicina, drogas anti-TB de primeira-linha. A TB-XDR é uma forma de tuberculose resistente mais severa. Além da resistência às drogas de primeira linha, as bactérias não respondem efetivamente às drogas de segunda-linha, deixando os pacientes sem opções de tratamento (OMS, 2017).

A Índia, a China e a Federação Russa concentram aproximadamente metade dos casos de TB DR do mundo. No ano de 2017, a OMS estimou a ocorrência de 558 mil novos casos de TB drogarristente, destes 82% eram de TB-MDR (OMS, 2018). No Brasil, 548 casos de tuberculose resistente foram notificados em 2018 no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

Em 2017, o Brasil ocupava a vigésima posição entre os 30 países que concentravam 87% dos novos casos de TB no mundo e a décima nona posição quanto à coinfeção TB-HIV (OMS, 2018). No ano de 2018 foram diagnosticados 72.788 casos novos da doença (coeficiente de incidência 34,8 por 100 mil habitantes) e no ano de 2017 foram notificadas cerca de 4.534 mil mortes por tuberculose (2,2 óbitos por 100 mil habitantes) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2018; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019). Além disso, a TB no Brasil foi considerada a terceira causa de mortes entre as doenças infectocontagiosas e a primeira entre os pacientes portadores da AIDS (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

A carga da doença no Brasil é variável nas diversas unidades da federação (UF). Em 2018, os estados do Amazonas (72,9 casos/100 mil habitantes) e Rio de Janeiro (66,3 casos/100 mil habitantes) foram os dois estados mais incidentes. Por sua vez, o estado de Pernambuco se destaca por apresentar a maior incidência da doença (47,1 casos/ 100 mil habitantes) na Região Nordeste. No mesmo ano, Pernambuco apresentou uma elevada taxa de mortalidade por tuberculose (4,5 óbitos por 100 mil habitantes) e 4.488 novos casos de TB foram notificados. A capital pernambucana, Recife, foi a quarta capital brasileira com maior incidência da doença (81,2 doentes por 100 mil habitantes), atrás da cidade de Manaus (102,6 doentes por 100mil habitantes), do Rio de Janeiro (89,9 doentes por 100 mil habitantes) e Porto Alegre (83,6 doentes por 100 mil habitantes). Desta forma, confirmando que a doença no Brasil apresenta um caráter urbano (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

Devido à emergência global da TB, desde 1993 a OMS tem estabelecido parcerias globais e recomendado novas estratégias visando o controle da doença. Dentre elas, a terapia diretamente observada, ou DOTS (do inglês, *Direct Observation Therapy Strategy*) tem sido uma ferramenta reconhecidamente eficiente e de excelente custo benefício (OMS, 2017; BRASIL, 2011).

Em 2006, criou-se o Plano Global *Stop-TB*, que teve como meta central o desenvolvimento de novas práticas quanto à tuberculose resistente e a coinfeção TB-HIV. Além disso, este plano, visando reduzir a carga mundial de TB em 50% e eliminá-la como um problema de saúde pública até 2015, incentivou o desenvolvimento de pesquisas sobre novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas para a doença (BRASIL, 2011; OMS, 1993; QUISSELL; WATT, 2016).

O plano foi bem-sucedido em todas as seis regiões estabelecidas pela OMS (Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental, África e Europa Oriental), e estima-se que 43 milhões de vidas foram salvas desde seu estabelecimento. Entretanto, o coeficiente de incidência caiu lentamente (1,5% por ano) (OMS, 2015). Por este motivo, novas estratégias foram adotadas pela OMS, como o *End TB Strategy* que é baseado no *Sustainable Development Goals*, visando o fim da epidemia da tuberculose. Para isso, novas metas foram estabelecidas para o período de 2016 a 2035. Até 2025, pretende-se reduzir 75% da mortalidade em relação às taxas de 2015 e 50% da taxa de incidência a nível mundial. Enquanto que a meta estabelecida para 2035 é a redução de 95% das taxas de mortalidade em relação ao ano de 2015 e 90% de redução na taxa de incidência (menos de 10/100 mil habitantes) (CLEMENTINO, 2016; OMS, 2017). A avaliação do sucesso dessas estratégias depende do monitoramento dos indicadores epidemiológicos que influenciam o curso da epidemia da tuberculose (OMS, 2017).

No âmbito nacional, o Ministério da Saúde (MS) formalizou a implementação da estratégia DOTS no ano de 1999. Além disso, a doença foi incluída na lista de Doenças de Notificação Compulsória. O MS preconiza que em todos os casos de TB, novo ou retratamento, a observação da ingestão do medicamento deve ocorrer pelo menos 3 vezes por semana. O objetivo dessa ação é aumentar a adesão ao tratamento e prevenir o aparecimento de cepas resistentes (BRASIL, 2011).

Em 1998, o governo brasileiro implementou o Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT). Atualmente, a meta do PNCT é alcançar a incidência de 10 casos por 100 mil habitantes até o ano de 2035 e a redução do coeficiente de mortalidade para menos de um óbito por 100 mil habitantes. As estratégias adotadas pelo programa estão centradas no diagnóstico precoce através da busca ativa de casos novos pela baciloscopia do escarro ou testes rápidos automatizados, como GeneXpert MTB/RIF, que permite detectar tanto o patógeno *Mtb* como a resistência à rifampicina. Este sistema foi introduzido em 2010 na rotina laboratorial de capitais que possuem uma alta incidência da doença e nos municípios que possuem presídios ou população indígena com casos notificados de TB (PINTO et al., 2017).

2.3 Transmissão e Patogênese da Tuberculose

A transmissão do *Mtb*, ao contrário de outros patógenos, está ligada diretamente à sua virulência, a qual é importante do ponto de vista de evolução e epidemiológico (GAGNEUX; BRITES, 2017). A tuberculose em humanos é transmitida de forma direta, ou seja, o paciente com TB pulmonar libera gotículas ao tossir. A infecção ocorre quando o indivíduo exposto

inala essas gotículas que contêm bacilos (FORBES et al., 2018). Depois de inalados, os bacilos atingem os bronquíolos e alvéolos, ultrapassam as barreiras físicas e estabelecem o primeiro contato com o sistema imune inato (NOGUEIRA et al., 2012). Os fagócitos são recrutados ao local da infecção por quimiocinas (Interleucina-8), proteína quimiotática de monócitos-1, e por citocinas pró-inflamatórias (Interleucina-1, Interleucina-6, e o Fator de Necrose Tumoral - α) (RAMAKRISHNAN, 2012).

O bacilo, entretanto, desenvolve diversos mecanismos de escape que impedem a sua morte nas células fagocíticas (O’GARRA et al., 2013). O principal deles é o bloqueio da acidificação do fagossomo, o que impede a fusão aos lisossomos permitindo seu estabelecimento no nicho intracelular (WARNER; KOCH; MIZRAHI, 2015). Através da liberação ativa do sistema secretor de ESX-1, a bactéria consegue romper a membrana do fagossomo, assim liberando os bacilos no citosol (PAI et al., 2016). Nos macrófagos, o patógeno passa por intensos ciclos de replicação, porém quando exposto as espécies reativas de oxigênio e intermediários de nitrogênio, há uma diminuição significativa do potencial replicativo (O’GARRA et al., 2013).

O aumento da carga bacteriana e a apresentação de antígenos de *Mtb* pelos macrófagos ativam a resposta de células T, o que leva ao recrutamento de mais macrófagos e formação de granulomas (O’GARRA et al., 2013). O granuloma é caracterizado pela aglomeração de fagócitos infectados e não infectados, e o centro da estrutura é preenchido por células fagocíticas mortas e bactérias, que compõem a substância necrótica (*caseum*) (BERG; RAMAKRISHNAN, 2012). Anteriormente, esta estrutura era dita “estável”, contudo, estudos no modelo animal *zebrafish* demonstraram se tratar de uma composição dinâmica (BERG; RAMAKRISHNAN, 2012). Portanto, o granuloma é um exemplo clássico da dualidade da infecção pelo *Mtb*. Para o hospedeiro o granuloma atua “contendo” a infecção localmente, porém, para o patógeno é um local protegido para a replicação e posterior disseminação (PAI et al., 2016; BERG; RAMAKRISHNAN, 2012). Estudos de polimorfismos genéticos mostraram que a chave para o controle bem-sucedido da infecção é uma resposta inflamatória bem regulada, ou seja, a balanceada relação entre fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (BERG; RAMAKRISHNAN, 2012).

As manifestações clínicas da doença dependem do órgão ou sistemas acometidos e podem variar de intensidade. Os sinais comuns a todas as formas são mal-estar, perda de peso, fadiga, dor torácica e dispneia. O principal órgão acometido são os pulmões, porém pode ocorrer em outras áreas como, laringe, ossos, ocular, pleura, linfonodos, rins, sistema nervoso,

e por último a doença pode se disseminar pela via sanguínea causando a forma miliar, também chamada de forma disseminada (FORBES et al., 2018).

A evolução clínica da infecção é extremamente variável e intrinsecamente ligada ao estado imune do indivíduo. Após ser fagocitado, uma cascata de eventos imunológicos resulta em dois possíveis desfechos: o primeiro é o controle da infecção e evolução para a forma de infecção latente (TB latente); e o segundo é a progressão para doença ativa (TB ativa) (OMS, 2017).

A tuberculose pulmonar pode ser primária ou secundária. A primeira aparece logo após a infecção e a segunda é resultado da reativação endógena da TB latente (PAI et al., 2016). A maioria dos indivíduos imunocompetentes consegue manter a replicação da bactéria dentro dos granulomas, entretanto, em 5 a 10% dos infectados, o patógeno se multiplica descontroladamente e ocasiona o desenvolvimento da TB ativa (O’GARRA et al., 2013).

Estudos de evolução molecular mostram que entre as regiões mais bem conservadas do genoma de Mtb estão as que codificam proteínas reconhecidas por células T (epítomos de célula T) (COMAS et al., 2010; COSCOLLA et al., 2015; PEPPERELL et al., 2013; YRUELA et al., 2016). Sugerindo assim, que uma pressão seletiva é necessária para o reconhecimento do Mtb por células T CD4+ para a promoção da resposta inflamatória, aumentando o dano pulmonar e a transmissão (GAGNEUX; BRITES, 2017; PAI et al., 2016). A coinfeção TB-HIV suporta esta hipótese, pois os indivíduos infectados pelo HIV possuem um alto risco de a forma latente da doença progredir para TB-ativa (TB secundária), contudo, portadores do HIV/AIDS apresentam menor associação com o desenvolvimento da doença após contágio (TB-primária) (PAI et al., 2016).

2.4 Diagnóstico e Tratamento da Tuberculose

O diagnóstico da tuberculose geralmente se utiliza de testes de rotina como, a baciloscopia, a cultura, o raio-x de tórax e os testes moleculares rápidos. Dependendo da forma clínica de TB e do tecido afetado outros testes podem ser agregados, entre eles o histopatológico e exames de imagem como a tomografia computadorizada (PAI, et al., 2016). A baciloscopia é um método diagnóstico de baixo custo, simples e rápido que identifica os Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAARs) nos pacientes sintomáticos respiratórios. Por sua vez, o cultivo permite a multiplicação e isolamento dos bacilos em meios específicos (Lowenstein-jensen e Ogawa-Kudoh) e é o padrão-ouro entre os testes diagnósticos (BRASIL, 2011). O exame de Raio-X de tórax observa a ocorrência de danos no tecido pulmonar e é o teste diagnóstico solicitado a

todos os pacientes com suspeita clínica da doença (BUSATTO, et al., 2016). O exame histopatológico é uma ferramenta usada no diagnóstico da TB extrapulmonar ou TB pulmonar difusa, onde é feita a biópsia dos tecidos que apresentam suspeita clínica de doença (SCHITO, et al., 2015). A doença é confirmada quando existe a identificação do bacilo, sendo a cultura considerada como padrão ouro (PAI, et al., 2016).

O rápido diagnóstico da TB é uma das principais estratégias para interrupção da cadeia de transmissão do patógeno. Neste contexto, os testes moleculares têm se tornado uma importante ferramenta no combate a doença. A maioria dos testes moleculares são baseados na amplificação e detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos do Mtb em amostras clínicas, fornecendo resultados entre 24 a 48 horas (BRASIL, 2011).

A partir de 2010, a OMS passou a recomendar a utilização do GeneXpert MTB/RIF® (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) com o objetivo de agilizar o diagnóstico e auxiliar na diminuição da carga da TB no mundo (WHO, 2017). Este teste também se trata de um ensaio de amplificação de ácidos nucleicos que, além de identificar a presença de Mtb, faz a detecção de isolados clínicos resistentes à rifampicina diretamente das amostras biológicas em menos de 2 horas (DUNN; STARKE; REVELL, 2016; RYU, 2015).

O diagnóstico da tuberculose latente (ILT) é um dos desafios para o controle da doença. Estima-se que a reativação da infecção latente é responsável por 80% dos casos incidentes de TB em países ricos (ALSDURF et al., 2016). Atualmente, não existe um padrão ouro para o diagnóstico da ILTB e os testes diagnósticos disponíveis são imunológicos, como o Teste de Mantoux e os Ensaio de Liberação de Interferon gama. Destes o mais utilizado é o teste de Mantoux, apesar do seu resultado ser influenciado por alguns fatores como a vacinação prévia com a BCG, pacientes imunossuprimidos e em indivíduos que residem em regiões com alta carga da doença (BUSATTO et al., 2016).

A tuberculose possui um tratamento efetivo disponível e eficaz desde que os princípios básicos da terapia medicamentosa sejam obedecidos. O paciente é capaz de transmitir o bacilo desde os primeiros sintomas respiratórios, porém a quantidade de bacilos no organismo cai rapidamente no início de tratamento específico (BRASIL, 2011). Interromper a cadeia de transmissão do Mtb é importante para o controle da doença, portanto, os fármacos utilizados devem ser capazes de reduzir rapidamente a população bacilar (interrompendo a transmissão), prevenir a seleção de cepas naturalmente resistentes (impedindo o surgimento de resistência durante a terapia) e esterilizar a lesão (prevenindo a recidiva de doença) (RABAHI et al., 2017).

A distribuição dos medicamentos para o tratamento é gratuita no país e requer que o paciente apresente a ficha de notificação preenchida pelo profissional responsável. Um dos

fatores limitantes ao sucesso do tratamento é o período prolongado do mesmo, muitas vezes levando a desistência ou uso inadequado da medicação (BRASIL, 2011).

A fim de reduzir o índice de abandono ao tratamento, vários estudos têm sido conduzidos para estabelecer um regime de tratamento com menor duração, principalmente para pacientes HIV positivo (WHO, 2017). Além disso, novas combinações entre fármacos já utilizados e novos fármacos vêm sendo testadas com o objetivo de aumentar a efetividade da terapia tanto em casos de tuberculose sensível quanto de tuberculose resistente (RABAHI et al., 2017).

2.5 O Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

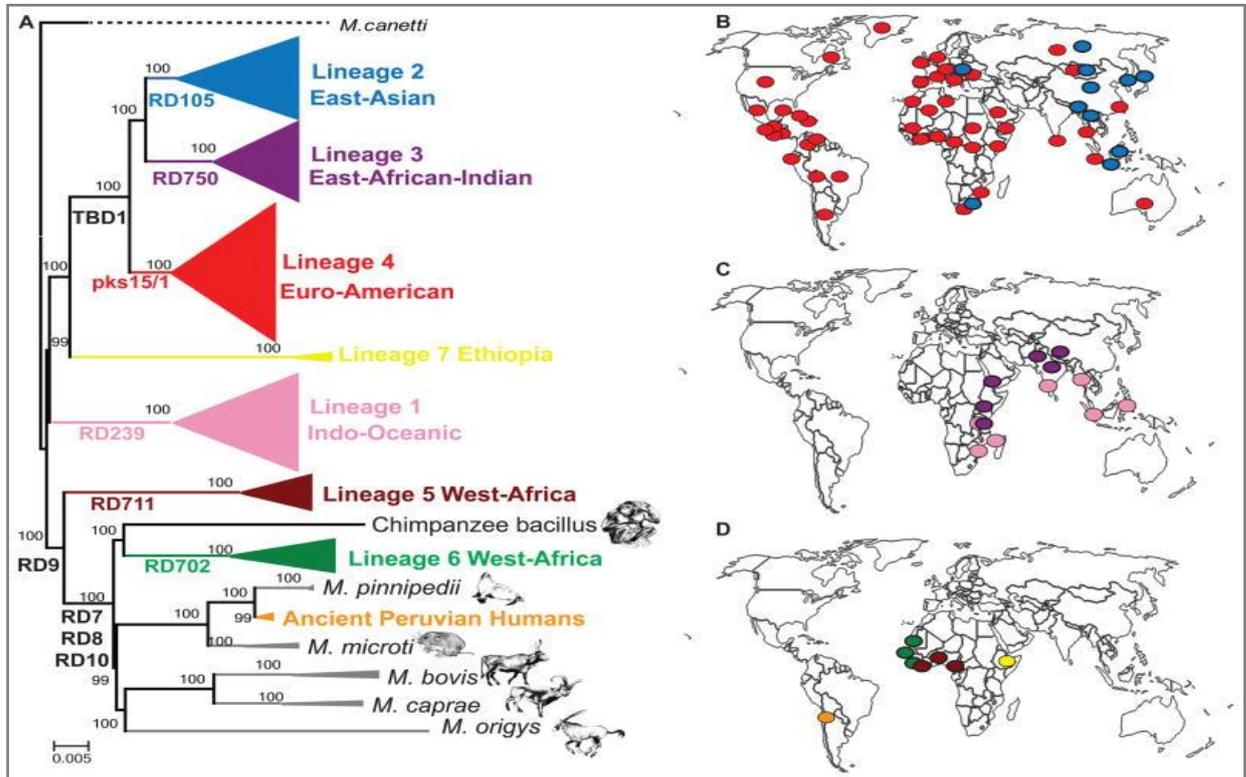
A tuberculose é causada por um grupo de bactérias que pertencem ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e fazem parte do Gênero *Mycobacterium* (GAGNEUX, BRITES, 2017). As micobactérias possuem alto conteúdo de ácidos micólicos na parede celular, o que as tornam resistentes à descoloração por álcool e ácido, portanto, são denominados bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Os bacilos são aeróbicos, não esporulados, gram-positivos e de crescimento lento (FORBES et al., 2018).

O principal patógeno causador da tuberculose no homem é o *Mycobacterium tuberculosis*, entretanto, outras espécies como o *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canettii* são capazes de infectar humanos mesmo sendo potencialmente menos patogênicos (JONG; ANTONIO; GAGNEUX, 2010; SUPPLY, 2013). As espécies que compõem o grupo MTBC apresentam uma alta similaridade genética entre si, 99,9% (GAGNEUX; BRITES, 2017). Além das espécies adaptadas aos humanos, o MTBC é composto pelas espécies adaptadas em animais como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium orygis* e *Mycobacterium mungi* (COMAS et al., 2013).

Sete linhagens filogenéticas têm sido descritas entre as espécies adaptadas aos humanos, sendo as linhagens 1, 2, 3, 4 e 7 pertencentes as espécies de *M. tuberculosis sensu strictu* e as Linhagens 5 e 6, a espécie de *M. africanum* (COMAS et al., 2013). Estas linhagens apresentam uma distribuição geográfica distinta entre si, enquanto que algumas se distribuem globalmente (Figura 2). A Linhagem 2 (Leste Asiática) e a Linhagem 4 (Euro Americana) são encontradas em todos os continentes. Enquanto que as outras linhagens, como a Linhagem 5 (*M. africanum* West Africa 1), a Linhagem 6 (*M. africanum* West Africa 2), a Linhagem 7, a Linhagem 1 (Indo-

Oceanic) e a Linhagem 3 (Central Asian Strain), possuem forte restrição geográfica (GAGNEUX; BRITES, 2017).

Figura 2 – Linhagens de *Mtb* adaptadas aos humanos (Linhagem 1 à 7) e sua distribuição pelo globo.



Fonte: Coscolla et al (2014).

Legenda: Árvore filogenética de máxima verossimilhança (A). Distribuição das linhagens entre os países do mundo (B, C e D).

As linhagens de *Mtb* são ditas “ancestrais” ou “modernas” de acordo com a presença ou ausência de uma região no genoma denominada de *TbD1*, entretanto, isto não reflete necessariamente seu tempo evolucionário (SMITH et al., 2009). As linhagens denominadas como “modernas” são a 2, 3 e 4, pois possuem a região *TbD1* no genoma, enquanto as demais são chamadas “ancestrais”, há região citada é deletada. As cepas MTBC responsáveis pelos maiores surtos na população humana, cepas da sublinhagem Beijing (Linhagem 2) e sublinhagem Haarlem (Linhagem 4), possuem a deleção da região específica *TbD1* (SMITH et al., 2009).

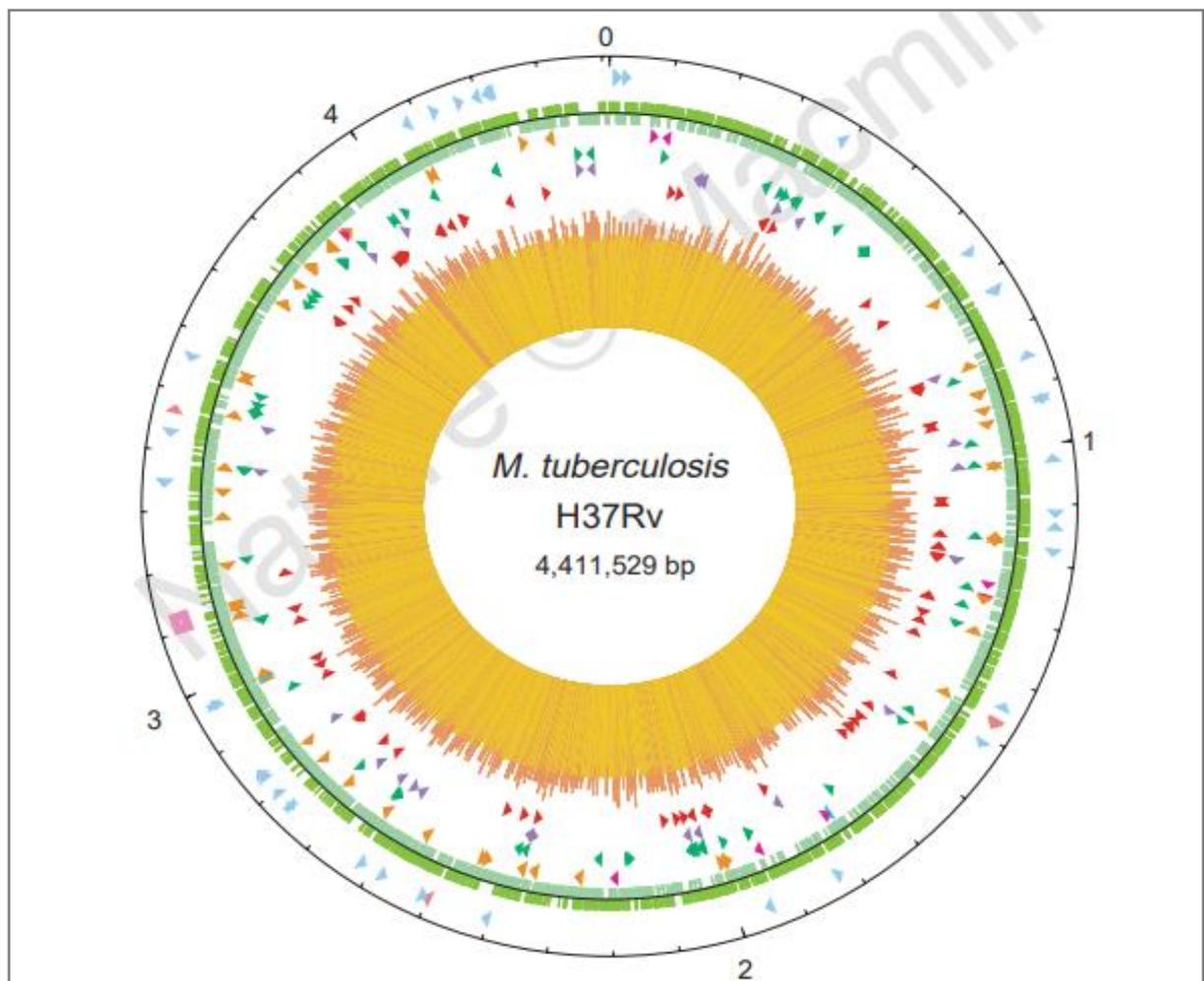
Acredita-se que todas as linhagens MTBC evoluíram no mesmo período, a partir de um ancestral comum mais recente (SMITH et al., 2009). Atualmente, a teoria mais plausível é que o ancestral das cepas do MTBC era um organismo similar ao *Mycobacterium canettii*, um patógeno facultativo com reservatório ambiental. Além disso, presume-se que a transição entre

este ancestral, similar ao *M. canettii* e ao patógeno obrigatório foi um ponto crucial para a expansão global do complexo MTBC (GAGNEUX, BRITES, 2017).

2.5.1 O Genoma do *Mycobacterium tuberculosis*

Um dos maiores avanços científicos nas pesquisas sobre a tuberculose foi o sequenciamento do genoma completo da cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv, em 1998 por Cole e colaboradores (Figura 3) e sua re-anotação em 2002 por Camus e colaboradores (COLE et al., 1998; CAMUS et al., 2002). Após a disponibilização da sequência, mais informações quanto à genética do patógeno foram estudadas pela comunidade científica (LAMICHHANE; MILIC, 2018). Além disso, genes importantes para o crescimento, virulência e persistência foram e estão sendo descobertos (EHEBAUER; WILMANN, 2011).

Figura 3 - Mapa Circular do Cromossomo *Mycobacterium tuberculosis* Cepa de Referência H37Rv.



Fonte: Cole *et al* (1998).

A anotação da sequência genômica original continha 4.411.529 pares de base, com pelo menos 3.924 *open reading frames* (ORFs) preditas e 50 sequências de RNA (Cole et al., 1998; CAMUS et al., 2002). Atualmente, segundo o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (do inglês *National Centre of Biotechnology Information*) o genoma apresenta um total de 3.991 ORFs previstas e 70 sequências de RNA estável conhecidas e apresenta um alto conteúdo de Guanina - Citosina (G+C) (65,6%). Além disso, a capacidade codificante (*coding*) do seu genoma é de aproximadamente 91% (LAMICHHANE; MILIC, 2018).

O patógeno difere radicalmente de outras bactérias já que boa parte da capacidade codificante está associada à produção de enzimas envolvidas na lipogênese e lipólise (COLE et al., 1998; CAMUS et al., 2002). A maioria dos genes foram e estão sendo identificados através da homologia das sequências com proteínas conhecidas de outros microorganismos e experimentalmente através de eletroforese bidimensional, espectrometria de massa e técnicas de bioinformática (LEE et al., 2006; LAMICHHANE; MILIC, 2018).

Até o momento, aproximadamente 40% dos genes codificantes de proteínas foram atribuídos à alguma função específica e 40% foram classificados como hipotéticos conservados. Os genes remanescentes, por sua vez, estão relacionados às micobactérias, pois não apresentam similaridade genética com outras sequências microbianas (LAMICHHANE; MILIC, 2018).

O elevado conteúdo G+C, distribuído de forma homogênea ao longo do genoma, demonstra que a sequência não sofreu interferências através de transferência horizontal ao longo da sua evolução (BORITSCH et al., 2016). Além disso, a composição aminoacídica do proteoma micobacteriano é reflexo dessa proporção de nucleotídeos, pois apresenta aminoácidos como glicina, alanina, prolina e arginina em maior número do que os aminoácidos codificados por nucleotídeos ricos em Adenina + Timina (A+T) como lisina e asparagina (LAMICHHANE; MILIC, 2018). Dois grandes grupos de proteínas, as Prolina Ácido Glutâmico (PE) e Ácido Glutâmico-Prolina-Prolina (PPE), foram identificadas através de análises do proteoma. Ambas representam 10% do genoma micobacteriano e são importantes fatores de virulência e patogênese (MUKHOPADHYAY; BALAJI, 2011).

O genoma do Mtb é rico em sequências de DNA repetitivo, principalmente de sequências de inserção (MUKHOPADHYAY; BALAJI, 2014). As sequências de inserção (IS do inglês *Insertion Sequence*) são pequenos segmentos móveis de DNA, de até 2,5 kilobases, que codificam apenas sua capacidade de transposição (BORITSCH et al., 2016; JAGIELSKI et al., 2016). A maioria das IS do Mtb H37Rv estão inseridas em regiões intergênicas ou não codificantes, e muitas vezes próximas a RNAs de transferência (BORITSCH et al., 2016).

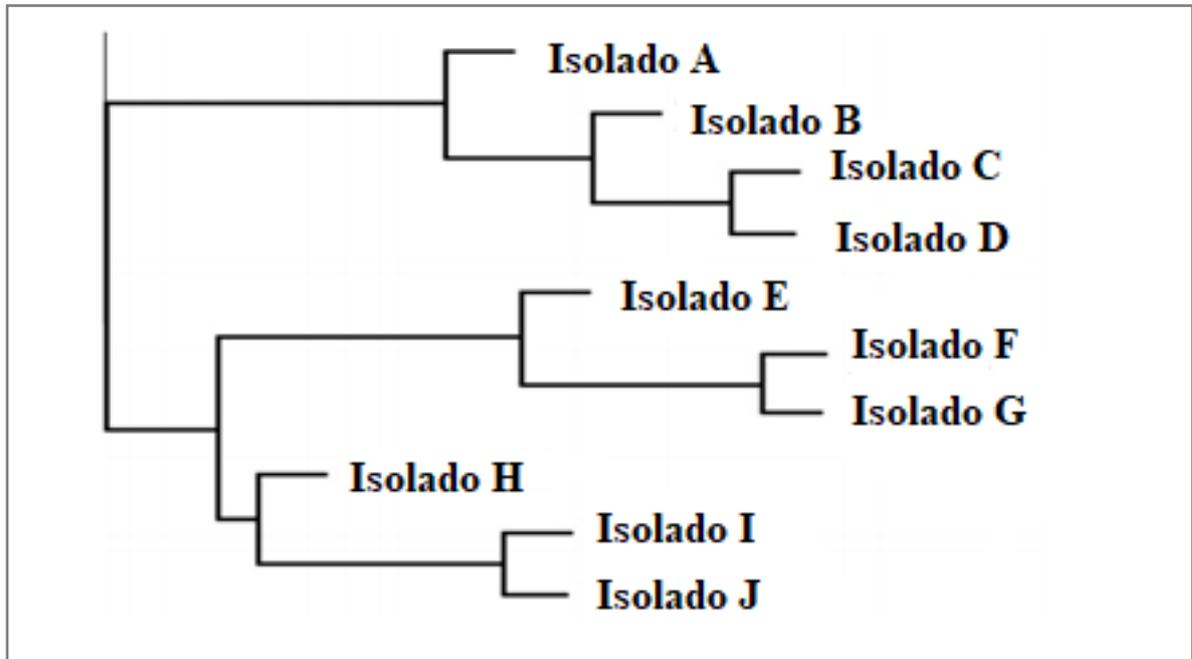
Entretanto, os elementos IS podem levar à alteração da expressão gênica de genes adjacentes (JAGIELSKI et al., 2016). Vinte e nove elementos de inserção diferentes, pertencentes a quatro famílias de IS, foram identificados no genoma da cepa H37Rv (COLE et al., 1998). Apenas oito desses elementos estão presentes no Mtb H37Rv em mais do que uma única cópia. A IS1557 está presente em três cópias, enquanto a IS1081 e IS6110 ocorrem em mais cópias no genoma (JAGIELSKI et al., 2016).

2.6 Epidemiologia Molecular

A epidemiologia tradicional estuda a distribuição, os determinantes e as causas relacionadas aos problemas da saúde pública com o objetivo de prevenir e promover o controle efetivo das enfermidades. Entretanto, algumas importantes questões quanto aos mecanismos biológicos de agravos infecciosos e crônicos não podem ser respondidas através dos métodos epidemiológicos tradicionais. O ramo da epidemiologia que utiliza as ferramentas da biologia molecular é chamado de epidemiologia molecular (EYBPOOSH et al., 2017).

A epidemiologia molecular busca entender a distribuição ou o *clustering* de variantes genéticas, cepas, sorotipos ou outras formas de agrupamento molecular de patógenos (CARROLL et al., 2014). Os *clusters* são o agrupamento dos isolados provenientes de diferentes pacientes que possuem o mesmo *fingerprints* de DNA (MURRAY; SCHRAUFNAGEL; HOPEWELL, 2002). A relação epidemiológica entre os isolados é calculada e convertida em árvores filogenéticas ou dendogramas de similaridade (Figura 4), e estes também podem ser utilizados para representar a história evolucionária entre espécies ou entidades baseadas nas suas características genéticas (CARROLL et al., 2014).

Figura 4 - Esquema representativo de um dendograma.



Fonte: Adaptado Carroll *et al.* (2014, Tradução nossa).

Legenda: O dendograma ou árvore filogenética é uma figura que representa a história evolutiva entre os organismos estudados com base nas suas características genéticas. A figura mostra um exemplo hipotético e a distância genética entre os isolados e um progenitor específico.

O desenvolvimento de estudos epidemiológicos utilizando dados moleculares tem auxiliado os biólogos e epidemiologistas na identificação de aspectos até então desconhecidos das doenças infecciosas, entre eles, a etiologia, a patogenia, os reservatórios, os padrões de circulação e a transmissão dos agentes nas diversas configurações ambientais (EYBPOOSH *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, a epidemiologia molecular em conjunto com a epidemiologia clássica se tornou uma ferramenta essencial no estudo de casos de tuberculose (ORDUZ; RIBON, 2015). Através dessa área de estudo é possível responder questões quanto à fonte da infecção, ao tempo de infecção (quantificar transmissão recente), identificar os *links* e fatores de risco associados à transmissão, diferenciar reinfeção de recaída, rastrear a distribuição geográfica e avaliar a expansão clonal de cepas específicas. Além disso, é possível determinar as bases genéticas relacionadas à virulência, o tropismo por órgãos específicos, a transmissibilidade e a resistência a drogas (ORDUZ; RIBON, 2015; JAGIELSKI, 2016).

A tipagem molecular do *Mycobacterium tuberculosis* tem sido objeto de pesquisa ao longo dos anos e os diversos métodos existentes se baseiam na diversidade genética desses

organismos (MERKER et al., 2017; JAGIELSKI et al., 2016). É uma ferramenta importante em estudos epidemiológicos, por exemplo, na investigação de surtos nas comunidades e nos ambientes hospitalares, e no estabelecimento de *links* epidemiológicos entre contatos casuais (MERKER et al., 2017; EI et al., 2016). Além disso, a classificação da cepa pode ser útil para o manejo clínico dos pacientes, já que alguns marcadores genéticos do Mtb têm sido associados à resistência a drogas, falha terapêutica e até mesmo a uma maior capacidade de transmissibilidade (EI et al., 2016).

O Mtb possui forte clonalidade e eventos de transferência horizontal de genes são incomuns (GAGNEUX; BRITES, 2017). As variações no genoma geralmente ocorrem por mutações e, entre elas destacam-se os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), deleções ou inserções de pequenas porções de DNA por elementos móveis e recombinações ou alterações no DNA associadas à replicação de repetições de sequências de DNA (*tandem repeats*) (SCHURCH; VAN SOOLINGEN, 2012). Por não poderem ser readquiridas, as deleções genômicas são úteis como marcadores filogenéticos de MTBC (GAGNEUX et al., 2006).

A baixa diversidade genética do Mtb (1 SNP por 2kb) e o alto grau de clonalidade, tornam a aplicação de técnicas clássicas de tipagem molecular de bactérias como a *pulsefield gel eletroforesis*, que requer grande variação cromossomal, ou o *multi-locus sequence typing*, que usa a alta diversidade de genes *house-keeping* para discriminação das cepas, inaplicáveis a esse patógeno (GAGNEUX, BRITES, 2017).

Diversos métodos alternativos de tipagem molecular para o MTBC foram desenvolvidos ao longo dos anos. O método de tipagem molecular é dito ideal quando é reprodutível e estável, possui um alto poder discriminatório e de concordância epidemiológica, é adaptável, de fácil execução e interpretação, e possui um bom custo benefício. Atualmente, as principais técnicas disponíveis para a tipagem de Mtb são a RFLP-IS6110 (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism – IS6110*), o *Spoligotyping*, MIRU-VNTR (do inglês *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeat*) e o Sequenciamento de Genoma completo (do inglês *Whole Genome Sequence – WGS*) (EI et al., 2016).

2.6.1 Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação - IS6110

O polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação da IS6110 (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism IS6110*) é um método de genotipagem se baseia na variabilidade no número de cópias da sequência específica no DNA das bactérias do complexo

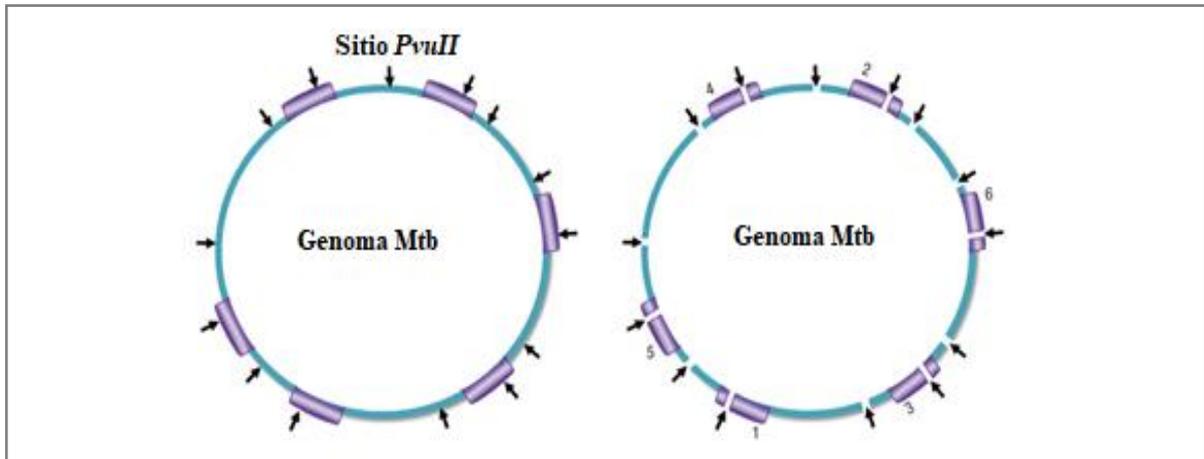
MTBC (MERKER et al., 2017). A *IS6110* é um elemento de inserção encontrado no genoma de membros do complexo MTBC e está relacionado à família dos elementos móveis IS3, descoberta originalmente em *Escherichia coli* e espécies de *Shigella* (ORDUZ; RIBÓN, 2015; NARAYANAN; DESIKAN, 2015). O seu comprimento é de 1.355 pares de base (pb) com 28 pb de repetições terminais invertidas (do inglês *terminal inverted repeats*, TIRs) nas extremidades da sequência da IS, e contém duas *open reading frames* (ORF), parcialmente sobrepostas, a *orfA* e *orfB* que codificam uma enzima transposase (JAGIELSKI et al., 2016).

Os elementos IS estão dispersos ao longo do genoma, porém, algumas regiões *hot spots* para a sua integração no cromossomo têm sido descritos na literatura (JAGIELSKI et al., 2016). As regiões onde a *IS6110* se insere preferencialmente incluem o locus DR (do inglês *Direct Repeat*), a região do gene da fosfolipase (*plc*), a família dos genes PE e PPE (Prolina-Prolina-Ácido glutâmico), as regiões intergênicas *dnaA-dnaN*, e até mesmo em outras ISs, como por exemplo, na *IS1547* (JAGIELSKI et al., 2016).

O número de cópias da *IS6110* varia no genoma de acordo com a espécie e cepa. Além disso, este elemento genético é altamente instável, o que induz rearranjos genéticos com uma alta frequência (EI et al., 2016; NARAYANAN; DESIKAN, 2015) e alterações do *fingerprint* após algumas gerações, tornando-o um útil marcador em estudos de epidemiologia molecular (VAN SOOLINGEN et al., 1991; NARAYANAN; DESIKAN, 2015).

A técnica de RFLP-*IS6110* é baseada na digestão do DNA genômico do *Mtb* com a endonuclease *PvuII* que cliva a sequência da *IS6110* em fragmentos, os quais são separados por gel eletroforese (Figura 5). Em seguida, os fragmentos são transferidos para uma membrana e hibridizados com uma sonda marcada específica para a sequência de inserção, assim gerando um padrão de bandeamento específico para cada cepa (Figura 6). Este padrão reflete a variabilidade, em número e posição, dos elementos *IS6110* ao longo do cromossomo. A comparação dos padrões de RFLP pode ser realizada através de um software específico onde são analisados o tamanho das bandas de DNA e o estabelecimento dos *clusters* obtidos pela técnica (EI et al., 2016; MERKER et al., 2017).

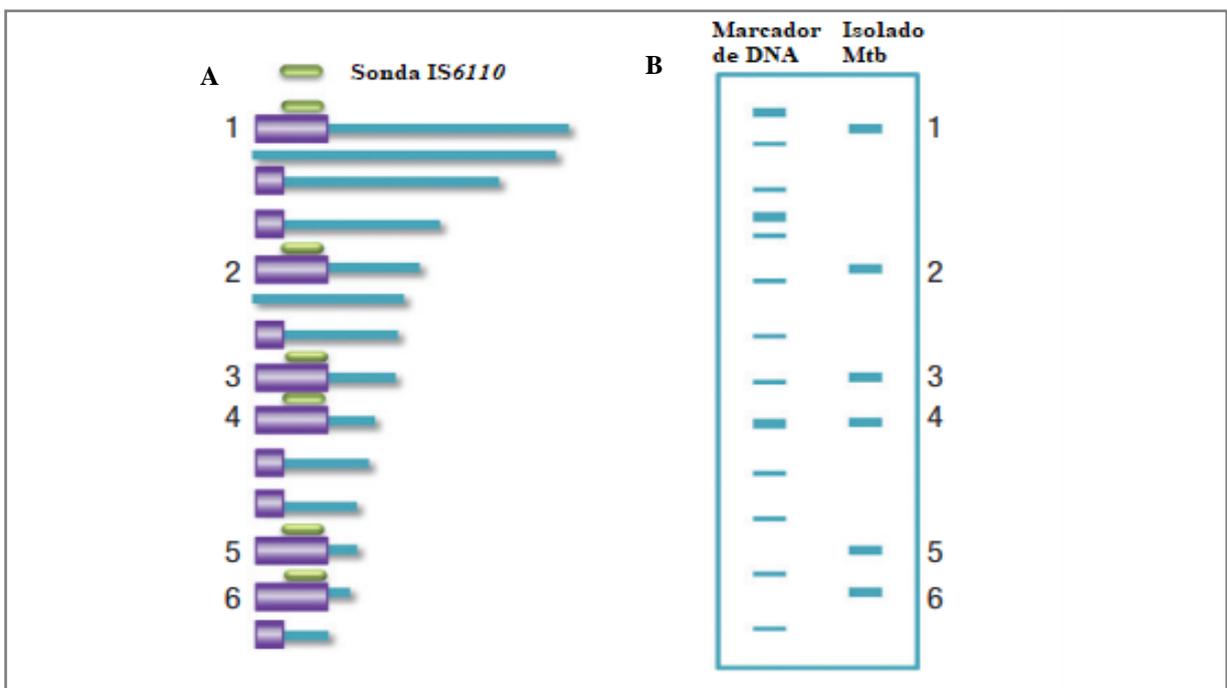
Figura 5 – Representação Esquemática dos sítios de restrição da enzima PvuII no genoma de *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: Adaptado Ei *et al* (2016, Tradução nossa).

Legenda: Esquema representativo do genoma do *M. tuberculosis* com os segmentos de inserção IS6110 e os sítios de ação da enzima de restrição PvuII (setas).

Figura 6 – Representação da Técnica RFLP-IS6110.



Fonte: Adaptado Ei *et al*. (2016, Tradução nossa).

Legenda: (A) Demonstra os fragmentos de DNA de diferentes comprimentos que serão transferidos a membrana de hibridização. (B) Visualização dos fragmentos após a transferência. Representam uma única cópia de IS6110 cercada por sequências de DNA de diferentes comprimentos.

Entre as principais vantagens do método estão o seu alto poder discriminatório, a reprodutibilidade, a estabilidade temporal dos perfis e o grande número de estudos para comparação (NARAYANAN; DESIKAN, 2015; EI et al., 2016). A RFLP-IS6110 possui limitações técnicas como a necessidade de grande concentração de DNA intacto (2 – 3 µg) para a digestão enzimática (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). Devido a isso, é necessária a cultura previa dos isolados bacterianos e a extração do DNA genômico, o que consome bastante tempo e recursos laboratoriais e humanos (EI, 2016). Portanto, por ser lenta e laboriosa, ultimamente tem sido utilizada apenas como uma ferramenta retrospectiva em estudos filogenéticos (MERKER et al., 2017).

Além disso, esta técnica de tipagem possui um baixo poder discriminatório nos isolados que apresentem cinco ou menos cópias da IS6110, como por exemplo, na espécie de *M. bovis* e algumas sublinhagens de *M. tuberculosis*, o que diminui o poder de resolução da técnica impossibilitando o estabelecimento de links epidemiológicos (MERKER et al., 2017; EI et al., 2016). Nestes casos, o poder de discriminação pode ser melhorado com o uso de outras ferramentas moleculares de tipagem, como *spoligotyping* ou MIRU-VNTR, explicadas detalhadamente a seguir.

2.6.2 Spoligotyping

O locus de repetições diretas (do inglês *direct repeats* - DR) está presente em todas as linhagens do complexo MTBC (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). A região DR é composta por sequências repetidas de múltiplas variâncias diretas (DVRS) e cada uma é composta por 49 repetições de 36 pares de base e uma sequência espaçadora variável de 35 à 41 pares de base (NARAYANAN; DESIKAN, 2015; EI et al., 2016).

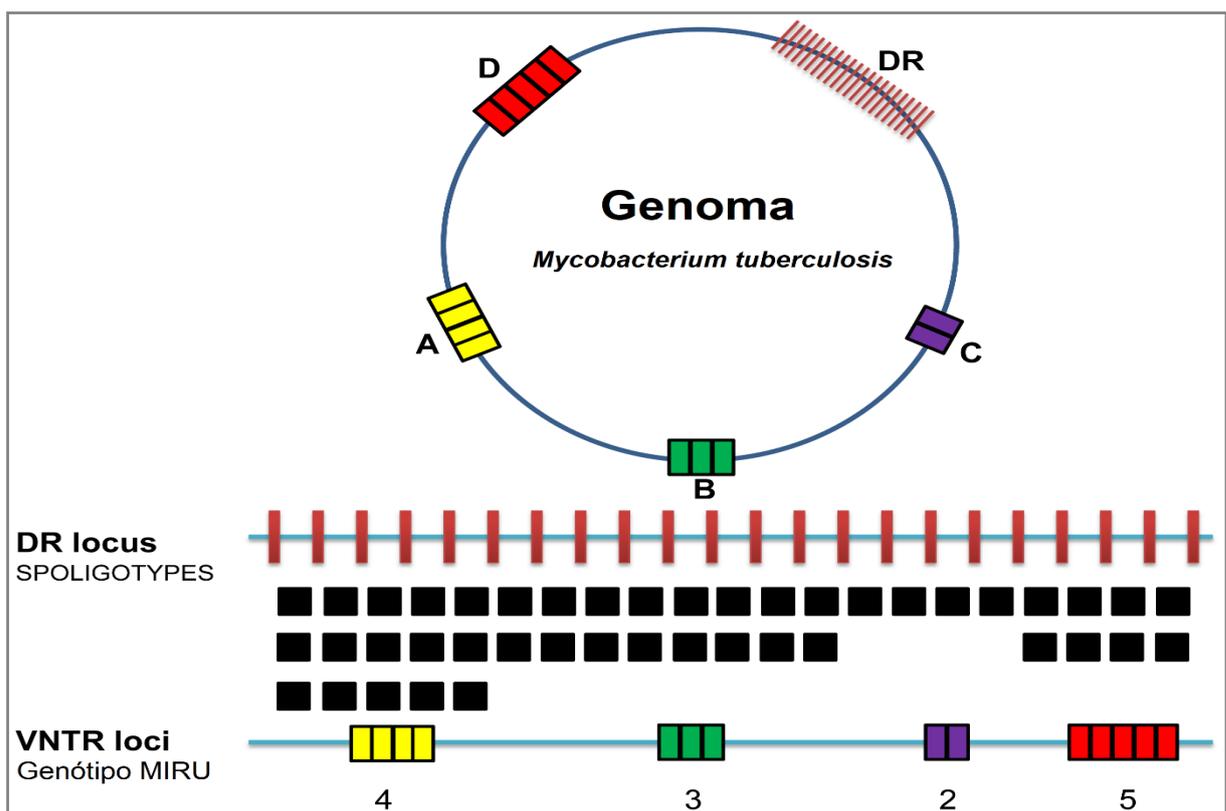
A região DR está localizado em um *hot spot* para a integração do elemento de inserção IS6110 e a região é caracterizada por extenso polimorfismo e pela presença variável de DVRS, resultante da recombinação homóloga entre DRs cromossômicos adjacentes ou distantes (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). Em algumas situações pode ocorrer a deleção das regiões espaçadoras no genoma bacteriano (SUPPLY et al., 2006).

O *spoligotyping* foi a primeira técnica de genotipagem baseada na amplificação por PCR e usada em larga escala para o complexo MTBC (MERKER et al., 2017). A técnica se baseia na identificação da presença e localização das regiões espaçadoras que separam DRs em um locus específico do genoma do Mtb (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). Atualmente, 43 tipos de espaçadores micobacterianos foram identificados, destes 37 são típicos da cepa de referência

Mtb H37Rv e os outros seis caracterizam a cepa *M. bovis* BCG (NARAYANAN; DESIKAN, 2015).

A amplificação por PCR utiliza um par de primers que tem como alvo as sequências das DRs que flanqueiam cada espaçador (MERKER et al., 2017). Posteriormente, os amplicons são hibridizados com o conjunto referência de 43 espaçadores imobilizados em uma membrana (MERKER et al., 2017). Portanto, para cada isolado o ensaio produz uma serie de bandas, ou padrão, que são detectados através da quimiofluorescência (Figura 7) (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). O padrão obtido demonstra a presença ou ausência dos espaçadores, onde bandas escuras denotam a hibridização e presença da região espaçadora, enquanto que a não hibridização revela ausência da região espaçadora (EI, 2016). O padrão é lido na forma de código binário (1- presença; 0- ausência), que facilmente é interpretado (EI et al., 2016; NARAYANAN; DESIKAN, 2015).

Figura 7- Ilustração esquemática da técnica *Spoligotyping* e MIRU-VNTR.



Fonte: Adaptado Comas *et al.* (2009, Tradução nossa).

Legenda: Os métodos de genotipagem ilustrados acima são a técnica do *Spoligotyping* e MIRU-VNTR. O Spoligotyping baseia-se na detecção de 43 espaçadores únicos que estão localizados no locus de repetição direta (DR). A representação mostra uma sequência de padrões de quadrados brancos e preto indicando a presença ou ausência dos espaçadores, respectivamente. Por sua vez, a técnica MIRU-VNTR baseia-se na identificação dos diferentes números de repetições dos *loci* espalhados pelo genoma bacteriano (A, B, C e D). O número de

repetições em cada locus gerar um código numérico único que é utilizado para estabelecer ligações filogenéticas e epidemiológicas entre as cepas.

O *spoligotyping* pode ser realizado com pequenas quantidades de DNA, o que possibilita uma maior rapidez na execução. Além disso, requer uma menor quantidade de cultivo bacteriano (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). Diversos estudos descrevem a técnica como simples, relativamente barata, e de alto rendimento, mesmo que possua um menor poder discriminatório quando comparada a tipagem molecular por RFLP- IS6110 (Ei et al., 2016). Na literatura, alguns estudos mostraram que cepas com padrão de *spoligotyping* idênticos, formando assim um cluster, podem apresentar perfis de RFLP-IS6110 distintos (MATHEMA et al., 2006). Entretanto, este método é extremamente útil na discriminação dos isolados com poucas cópias do elemento IS6110 (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). Kremer *et al* (1999) mostraram que o *spoligotyping* associado ao RFLP- IS6110 pode gerar um sistema de genotipagem acurado e altamente discriminatório.

2.6.3 Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeat

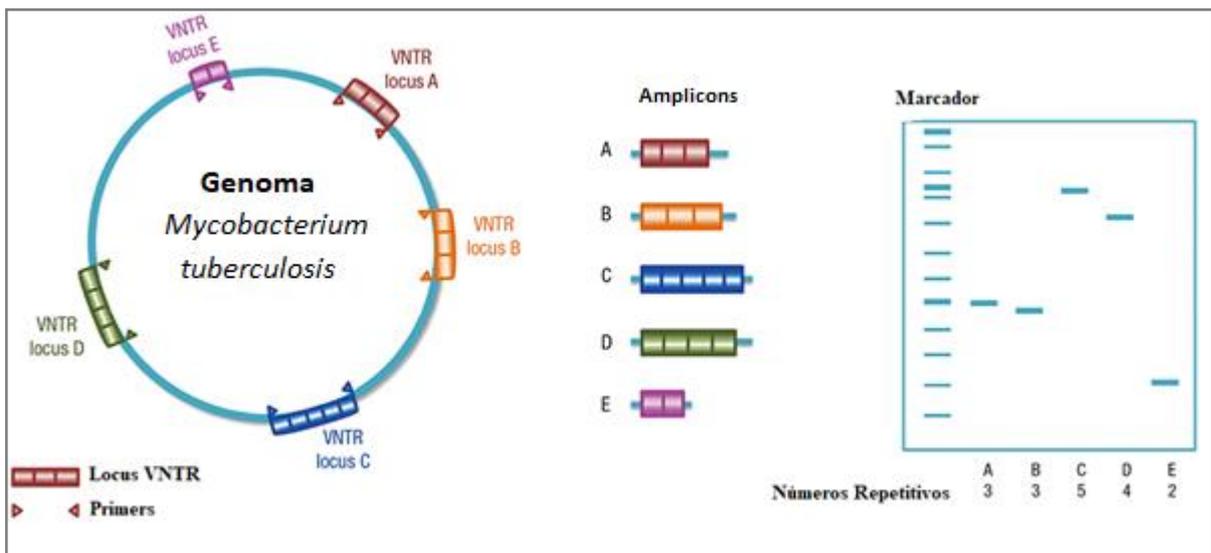
As sequencias de DNA em repetição *tandem* são extremamente comuns em genomas eucarióticos e altamente variáveis nos *loci*, sendo denominados de Repetição em tandem de número variável (do inglês *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) (EI et al., 2016). As VNTRs são utilizadas como marcadores genéticos e fornecem dados simples a partir do número de sequências repetitivas em regiões polimórficas de micro e minissatélites (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). Pequenas sequências repetitivas de DNA foram encontradas em micobactérias por diferentes grupos de pesquisa (EI et al., 2016). Os MIRUs (do inglês *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) são sequencias repetitivas compostas por 40 a 100 pares de bases e estão distribuídas em 41 locais ao longo do genoma da cepa de referência Mtb H37Rv (SUPPLY et al., 2000).

As sequencias MIRUs localizam-se primariamente em regiões intergênicas ao longo do cromossomo micobacteriano (NARAYANAN; DESIKAN, 2015) e não possuem sequências palindrômicas óbvias. Portanto, são repetições em série e a orientação ocorre em direção à transcrição do gene adjacente que contém *open reading frames* (NARAYANAN; DESIKAN, 2015).

O método de genotipagem por MIRU-VNTR (Figura 8) também é uma técnica baseada em PCR, na qual usa primers específicos para amplificação das regiões flaqueadoras dos

MIRUs e em seguida, os tamanhos dos amplicons são analisados (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). O tamanho dos fragmentos amplificados é convertido em um código numérico que representa o número de cópias de um determinado locus (EI et al., 2016). A utilização desse código facilita a análise e comparação de muitos isolados clínicos de *Mtb* entre os estudos (MERKER et al., 2017).

Figura 8 – Esquema representativo do princípio da genotipagem por MIRU-VNTR loci.



Fonte: Adaptado Ei *et al.* (2016, Tradução nossa)

Legenda: Os locus MIRU-VNTR de diferentes números repetitivos espalhados no genoma de *M. tuberculosis* são amplificados por primers específicos para cada locus (A). Tamanhos diferentes de amplicons após PCR (B). Amplicons visualizados após eletroforese em gel, os diferentes tamanhos refletem o número repetitivo de cada locus VNTR (C).

Atualmente, a análise de 24 *loci* é frequentemente utilizada na técnica do MIRU-VNTR. O poder discriminatório da técnica é usualmente proporcional ao número de locus avaliados (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). Supply *et al* (2001), na primeira versão da técnica selecionaram 12 dos 41 loci de VNTR até então identificados, que quando comparado a RFLP-IS6110, o poder discriminatório desta técnica é maior em cepas que possuem poucas cópias de IS6110, e menor em cepas com muitas cópias deste elemento de inserção (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). No entanto, a tipagem com 12 loci possui um baixo poder discriminatório em cepas da família Beijing (EI et al., 2016).

Portanto, devido a essas limitações da MIRU-VNTR 12 *loci*, Supply *et al.* (2006) selecionou um novo padrão para estudos epidemiológicos (15 *loci*) e um novo padrão de alta resolução para estudos filogenéticos (24 *loci*). O conjunto de 15 *loci* apresentou um alto poder

discriminatório em populações de cepas da família Beijing, e a genotipagem realizada com MIRU-VNTR 24 *loci* possui um poder discriminatório equivalente a genotipagem por RFLP-IS6110 (EI et al., 2016).

A MIRU-VNTR é uma técnica confiável, altamente reprodutível, sensível, e específica para cepas do MTBC (EI et al., 2016). Além disso, os MIRUs são estáveis, e a taxa evolutiva das mutações nestes alvos é levemente mais lenta do que o da IS6110, tornando assim o método apropriado para análises epidemiológicas em longo prazo (EI et al., 2016).

A determinação do tamanho de amplicons pequenos é uma das dificuldades relatada durante a análise da técnica, o que pode ser facilmente solucionado através da análise do tamanho dos fragmentos de DNA no sequenciador de DNA por eletroforese capilar fluorescente (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). Além disso, a falha na reação de amplificação é observada com frequência em alguns *loci*, mesmo que alterando as condições da reação e o conjunto de primers (EI et al., 2016). Este fato pode ser atribuído à presença de muitas unidades de repetição, ou até mesmo a deleção da região (EI et al., 2016). Em alguns isolados um único locus pode apresentar dois alelos, e estes podem ser considerados variantes clonais de uma mesma cepa ou a indicar a ocorrência de infecção mista por duas cepas distintas (EI et al., 2016).

Existe atualmente um banco de dados livre e via internet, o MIRU-VNTR*plus*, que realiza a comparação do perfil das cepas do usuário com as cepas de referência das principais linhagens MTBC (MERKER et al., 2017). Além disso, esta ferramenta online permite a construção de árvores filogenéticas, o mapeamento geográfico da informação, uma rápida identificação de linhagens MTBC e a exploração dos dados baseado na combinação de até quatro métodos diferentes de genotipagem (MLVA, *spoligotype*, RFLP e SNPs) (EI et al., 2016; WENIGER et al., 2010).

2.6.4 Sequenciamento do Genoma Completo (WGS)

Até o momento, os marcadores genéticos utilizados para a genotipagem do MTBC analisam apenas regiões polimórficas (COLL et al., 2018). Entretanto, essas regiões representam somente 1% do genoma e fornecem informações limitadas sobre a dinâmica do patógeno (CANNAS et al., 2016). O uso do sequenciamento do genoma completo inicialmente possuía limitada aplicabilidade, pois era uma técnica extremamente laboriosa e levava anos para ser concluído (MCNERNEY et al., 2017). O WGS apenas tornou-se aplicável na rotina de investigações epidemiológicas após o seu desenvolvimento tecnológico, que reduziu

significativamente a complexidade, custo e tempo da técnica (COLL et al., 2018). Esta técnica permite a identificação da cadeia de transmissão do Mtb e estabelece a microevolução genética completa dos isolados (COLL et al., 2018; NIKOLAYEVSKYY et al., 2016). Além disso, diversos estudos demonstram o grande poder discriminatório da técnica em cepas Mtb altamente similares (ROETZER et al., 2013; WALKER et al., 2013; LEE et al., 2015).

Atualmente estão disponíveis várias plataformas de sequenciamento de nova geração (do inglês *Nest-generation Sequencing* – NGS) que permitem a produção de milhões de fragmentos de sequências paralelas de DNA (*reads*) em um curto período (MCNEENEY et al., 2017). O NGS pode ser realizado a partir dos isolados de Mtb após cultura, ou diretamente nos espécimes clínicos (amostra) (IKETLENG et al., 2018). Entre as diversas plataformas, destacam-se nos estudos de epidemiologia molecular de micobactérias, a Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA), SOLiDTM System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Heliscope™ (Helicos BioSciences Corporation, Cambridge, MA, USA) e os instrumentos de sequenciamento em nanopore (CANNAS et al., 2016).

O princípio básico das plataformas NGS existentes é relativamente simples, a DNA polimerase catalisa a incorporação de trifosfatos de desoxirribonucleotídeos marcados com fluorescente (dNTPs) na fita-molde de DNA durante ciclos sequenciais de síntese. A cada ciclo, no momento da incorporação, os nucleotídeos são identificados por excitação do fluoróforo (CANNAS et al., 2016). As plataformas podem ser classificadas de acordo com o tamanho das sequências de DNA produzidas, as curtas (<1000 pares de bases) chamadas de “*short reads*” e as longas (>5000 pares de bases) “*long reads*” (IKETLENG et al., 2018).

Diversos softwares foram desenvolvidos para realização de análises específicas nas sequências geradas. Entre elas, o cálculo do número de SNPs entre genomas, a identificação dos marcadores utilizados na genotipagem (IS6110, MIRU-VNTR, spoligotyping) e aqueles que fornecem informações filogenéticas (SNP, LPS). Além disso, também é possível obter o perfil de resistência a drogas a partir da análise das mutações conhecidamente envolvidas nos diversos mecanismos de resistência. Além de ser um método de tipagem propriamente dito, o WGS pode auxiliar no desenvolvimento de novas ferramentas de tipagem molecular, identificando novos marcadores da variabilidade que possam ser utilizados no monitoramento do Mtb (JAGIELSKI et al., 2016).

Atualmente, o WGS é considerado o padrão ouro para a tipagem molecular, entretanto, possui algumas limitações. A principal delas é a análise do grande volume de sequências geradas, que requer softwares específicos e profissionais treinados que executem a análise eficiente dos resultados gerado (NARAYANAN; DESIKAN, 2015). Outra dificuldade é a

elevada ocorrência de sequências repetitivas inerente ao genoma do Mtb. Neste caso, plataformas que produzam “*short reads*” podem não interligar as sequências de forma correta e ocasionar em uma montagem não fidedigna (IKETLENG et al., 2018). A Tabela 1 demonstra as principais aplicações, vantagens e desvantagens dos métodos de genotipagem do Mtb aqui descritos.

Tabela 1 - Comparação entre os métodos de tipagem molecular mais utilizados em estudos epidemiológicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

(continua)

Técnica	Aplicação	Vantagem	Desvantagem
WGS	Diferenciação de espécies/linhagem; detecção de resistência as drogas; monitoramento de rotas de transmissão e aquisição de resistência;	Pode ser realizado diretamente em amostras clínicas; fornece informação sobre o genoma inteiro; permite a detecção de diversas variantes genéticas na mesma população;	Custo elevado; de difícil análise; as plataformas disponíveis atualmente têm problemas na análise de microssatélites;
MIRU-VNTR	Diferenciação de cepas;	Rápida e fácil execução; sensível, altamente reproduzível e mais discriminatória que a IS6110-RFLP; útil em investigações de larga-escala genética e evolucionária; pode ser realizada diretamente em lisados celulares;	Padrões similares podem, algumas vezes, ser encontrados em cepas não relacionadas;
RFLP-IS6110	Diferenciação de cepas; monitoramento de rotas de transmissão;	Protocolo padronizado; alto poder discriminatório; alta resolução na genotipagem de cepas Beijing;	Laboriosa; requer profissionais treinados e grandes quantidades de DNA; não deve ser usada em isolados com <6 cópias da IS6110;

Tabela 1 - Comparação entre os métodos de tipagem molecular mais utilizados em estudos epidemiológicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

(conclusão)

Técnica	Aplicação	Vantagem	Desvantagem
Spoligotyping	Diferenciação cepa/espécie	Simples e relativamente barata, protocolo padronizado; banco de dados internacionais disponíveis; pode ser realizado diretamente em lisados celulares; e requer pequenas quantidades de DNA;	Baixo poder discriminatório; quando comparado a IS6110-RFLP e MIRU-VNTR; não discriminatório para cepas Beijing;

Fonte: Adaptado Jagielski, et al. (2016, Tradução nossa)

2.7 Tuberculose na População privada de Liberdade

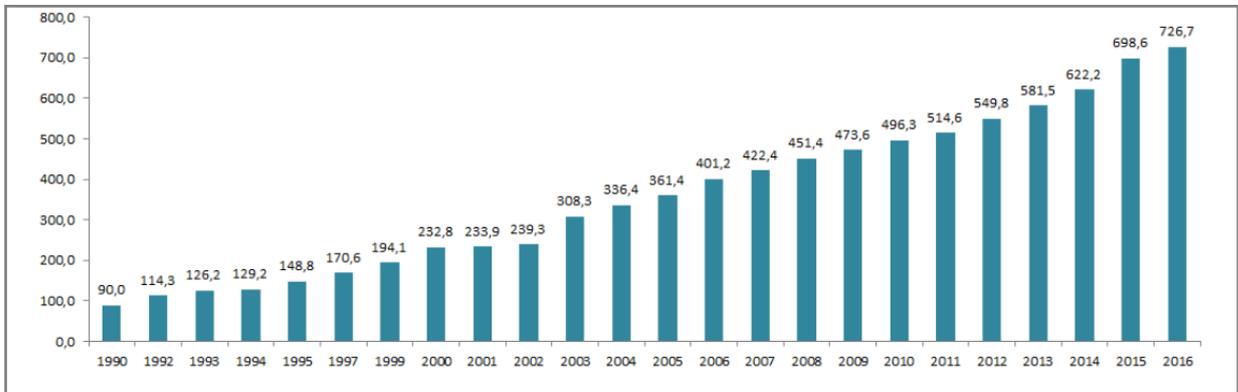
A População Privada de Liberdade (PPL), como já mencionado, é uma das populações que possui um elevado risco à infecção e desenvolvimento da tuberculose. No ano de 2015, aproximadamente 10,35 milhões de pessoas encontravam-se mantidas em unidades prisionais ao redor do mundo, divididos entre detentos aguardando por julgamento, prisioneiros preventivos e sentenciados. Apenas 6,5% dos detentos eram mulheres, ou seja, a grande maioria eram de homens adultos (WALMSLEY, 2015).

A PPL mundial cresceu consideravelmente desde 2000, aproximadamente 20%, um pouco maior do que o crescimento da população geral no mesmo período (18%). Já o crescimento da população prisional feminina foi ainda mais acentuado, de 50%. A taxa de população prisional mundial é de 144 por 100.000 habitantes, entretanto, essas taxas variam consideravelmente entre as diferentes partes do globo (WALMSLEY, 2015).

O Brasil atualmente possui a terceira maior população prisional do mundo, apenas abaixo dos Estados Unidos e China (ALLEN, 2015). Entre 2000 e 2016, a taxa de aprisionamento aumentou em 157% no Brasil. Em junho de 2016, a PPL brasileira ultrapassou a marca de 700 mil pessoas, obtendo um aumento de 707% em relação ao registrado na década de 90 (Figura 9). Ao todo existem no país 368.043 vagas, divididas entre 1.449 estabelecimentos prisionais. O déficit de vagas é de aproximadamente 360.000 e a atual taxa de ocupação das unidades é de 198%, entretanto, este número varia entre os estados brasileiros. O estado com maior taxa de

ocupação é o Amazonas (483,9%), seguido pelo Ceará (309,2%) e Pernambuco (300,6%) (INFOPEN, 2017).

Figura 9 – Número de pessoas privadas de liberdade entre 1990 e 2016.



Fonte: Ministério da justiça, INFOPEN (2017).

Legenda: O gráfico apresenta o aumento no número de pessoas e situação de encarceramento no país entre os anos de 1990 e 2016.

A maioria dos estabelecimentos prisionais no Brasil (49%) é destinada ao aprisionamento de presos provisórios, os demais se dividem entre regime fechado (24%), regime semiaberto (8%), regime aberto (2%), regimes diversos (13%) e medida de segurança (2%) e unidades para realização de exames gerais e criminológicos (1%). Ao todo, 74% das unidades prisionais destinam-se ao sexo masculino, 17% são mistas (com pavilhões específicos a cada sexo), e 7% são unidades inteiramente femininas. Aproximadamente 40% das pessoas presas em 2016 ainda não haviam sido julgadas e condenadas. O perfil da população prisional é formado predominantemente por homens jovens (18 a 29 anos), de raça negra, com baixo grau de escolaridade e baixa renda. O tráfico de drogas é a principal razão pela privação da liberdade (INFOPEN, 2017).

Devido à configuração precária do ambiente prisional, atualmente a saúde da PPL consiste em um grave problema de saúde pública. O confinamento em celas superlotadas, a rotatividade de prisioneiros, a fraca iluminação e a limitada ventilação dos ambientes favorecem a disseminação de doenças transmitidas pelo ar como a tuberculose (DOLAN, K. et al., 2016; ALI et al., 2016).

A prevalência de doenças infecciosas como HIV/AIDS, ISTs (Infecções Sexualmente Transmissíveis), hepatites virais e a tuberculose no ambiente penal é 50 vezes maior do que na comunidade (ALLEN, 2015). A tuberculose e o HIV afetam essa população em particular de forma drástica em todas as regiões do mundo. A OMS estima que a incidência da TB na população privada de liberdade é de 4.500 por 100.000 habitantes. Este número é alarmante, uma

vez que a incidência mínima de uma epidemia é de 250 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2015).

Desde 2003, o Brasil vem implementando programas de saúde voltados ao sistema prisional visando à inclusão da população carcerária em ações e serviços do SUS. O coeficiente de incidência da TB nos presídios brasileiros é elevado (932 casos por 100 mil habitantes) e o PNCT também prevê uma série de ações estratégicas orientadas ao controle da doença nessa população (BRASIL, 2011). No âmbito prisional, seguindo as normas internacionais, busca-se a detecção baseada na demanda espontânea dos detentos, além da busca ativa sistemática entre ingressos e dos já encarcerados, a supervisão do tratamento e a promoção de campanhas informativas que ajudam a conscientização da PPL, guardas e familiares (LAROUZÉ et al., 2015).

Atualmente, dois métodos de rastreamento para a TB nos presídios são utilizados. O primeiro é a busca dos sintomáticos respiratórios e, o segundo, a busca de casos com base na identificação de alteração radiológica. Uma vez que um caso de TB é detectado, se faz necessário o exame de todos os contatos. Em outras palavras, toda a PPL de uma cela ou galeria que mantenham um convívio diário com o paciente. Além disso, o teste rápido para detecção da infecção por HIV também deve ser oferecido de forma sistemática a PPL no momento da admissão e de forma periódica aos já encarcerados. Nos casos dos contatos intracela, que são portadores de HIV/AIDS, é recomendado a quimioprofilaxia com isoniazida (BRASI, 2011; FREITAS et al., 2016; SCHMITT et al., 2014).

O estado de Pernambuco possui 84 estabelecimentos prisionais com capacidade para 9.987 detentos. No ano de 2014, 28.927 indivíduos estavam em situação de aprisionamento, portanto, havia um déficit de aproximadamente 19.000 vagas. Além disso, a maior parte da PPL pernambucana (59%) estava encarcerada na zona urbana do estado, principalmente na Região Metropolitana do Recife (RMR) (CNJ, 2014).

O sistema prisional da capital pernambucana é composto por quatro unidades, a Colônia Penal Feminina do Recife (Bom Pastor) e as três unidades do Complexo Prisional do Curado, os presídios: ASP Marcelo Francisco de Araújo, Frei Damião de Bozano e o Juiz Antônio Luiz Lins de Brito. No último levantamento estavam encarcerados em seus estabelecimentos prisionais 6.084 presos, número muito acima da capacidade das unidades que é de 2.003, portanto com um déficit de 4.081 vagas (CNJ, 2014).

Assim como em outras regiões do país, o déficit de vagas ocasiona situações de superlotação das instituições, quadro que acarreta condições perigosas, insalubres e desumanas. Muitas das celas não possuem janelas ou um sistema adequado de ventilação, o que acarreta na

presença de mofo e favorece a transmissão de doenças. Em Pernambuco, a prevalência do vírus HIV nas prisões é 42 vezes maior que a média observada na população brasileira e a de tuberculose é cerca de 100 vezes maior (ACEBES, 2015).

3 JUSTIFICATIVA

A tuberculose ainda é um grave problema de saúde pública em Pernambuco e merece um enfrentamento mais contundente para reduzir o número de casos. Em 2016, o estado notificou 4.646 casos novos de tuberculose e apresentou a terceira maior taxa de incidência do país, sendo Recife considerada uma das capitais brasileiras com maiores taxas de incidência da doença. Além da elevada incidência de casos novos na comunidade urbana, sabe-se que aproximadamente 10% dos casos novos da doença em Pernambuco estão concentrados na população privada de liberdade, que muitas vezes, estão associados a outras enfermidades como HIV, hepatite e sífilis.

Atualmente, a situação da tuberculose nas penitenciárias do estado de Pernambuco é crítica, sendo a incidência da doença mais elevada nas penitenciárias do município de Recife. A transferência dos detentos entre as unidades prisionais é uma prática comum. Neste contexto, a PPL com tuberculose pode representar um grande risco para a transmissão da doença entre os contatos intracela e os presídios. Pouco se sabe sobre a dinâmica de transmissão da tuberculose nos sistemas prisionais de Recife. Neste contexto, a tipagem molecular do *M. tuberculosis* é uma poderosa ferramenta no monitoramento da transmissão da doença, detecção de surtos e controle da TB.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Quais os perfis genéticos dos isolados de *M. tuberculosis* de indivíduos privados de liberdade entre os presídios do complexo prisional do município de Recife no período de 2015 a 2016?

5 HIPÓTESE

Os isolados de *M. tuberculosis* circulantes entre os três presídios do complexo prisional Professor Aníbal Bruno do município de Recife apresentam distintos perfis genéticos.

6 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade genética de isolados clínicos de *M. tuberculosis* e investigar a epidemiologia molecular da tuberculose de indivíduos privados de liberdade do complexo prisional Professor Aníbal Bruno no município de Recife, Pernambuco.

6.1 Objetivos Específicos

- a) Descrever o perfil clínico epidemiológico dos pacientes com tuberculose relacionados aos isolados clínicos provenientes das unidades prisionais do Complexo Prisional Professor Aníbal Bruno;
- b) Caracterizar a diversidade genética dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* através da técnica *MIRU-VNTR*;
- c) Analisar a frequência dos genótipos de *M. tuberculosis* circulantes em cada unidade do complexo prisional;
- d) Comparar os perfis genéticos dos isolados de *M. tuberculosis* da PPL circulantes entre os três presídios do Complexo Prisional;
- e) Correlacionar as linhagens de Mtb de acordo com os casos de coinfeção TB-HIV e de recidiva por TB.

7 METODOLOGIA

O presente tópico descreve os procedimentos metodológicos adotados para execução do estudo.

7.1 Desenho de Estudo

Esta pesquisa se trata de um estudo transversal dos genótipos das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de 70 isolados clínicos de pacientes com tuberculose pulmonar do Complexo Prisional Professor Aníbal Bruno, diagnosticados no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2016. O complexo prisional avaliado é constituído de 3 unidades prisionais: ASP Marcelo Francisco de Araújo (PAMFA), Frei Damiao de Bozan (PFDB) e Juiz Antônio Luiz Lins de Brito (PJALLB), sendo estas localizadas no município de Recife, Pernambuco. As amostras de escarro foram encaminhadas para o Laboratório Municipal de Saúde Pública Professor Oswaldo Gonçalves Lima para a identificação bacteriológica (baciloscopia, cultura e/ou GeneXpert MTB/RIF®). O teste para a identificação fenotípica da sensibilidade as drogas anti-TB foi realizado através do sistema BACTEC®-960-MGIT™ (BD – EUA), no Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE) de acordo com o preconizado pelo Manual Nacional de Vigilância Laboratorial de Tuberculose. Os cultivos foram transferidos para o laboratório de Imunoepidemiologia do Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) onde atualmente pertencem à coleção de isolados clínicos de Mtb sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Michelle Rabello e estão conservados em meio 7H9/OADC/Glicerol 10% no Laboratório de Biossegurança Nível 3 IAM/FIOCRUZ.

7.2 Critérios de Inclusão e de exclusão

Foram incluídos no estudo isolados de Mtb provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar com diagnóstico bacteriológico confirmado pela cultura no período 2015-2016. As amostras de pacientes que apresentaram cultura bacteriana contaminada por fungos ou por outros microrganismos foram excluídas do estudo.

7.3 Coleta e análise dos dados epidemiológicos

Os dados demográficos, clínicos e epidemiológico foram obtidos do sistema *online* do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) do Laboratório Municipal de Saúde Pública

Professor Oswaldo Gonçalves Lima e dos dados da ficha de notificação registrados no Sistema de Informação sobre Doenças de Notificação Compulsória do Brasil (SINAN). Em seguida, estas variáveis foram armazenadas em um banco de dados do pesquisador (SPSS software, versão 24.0, EUA) para analisar suas respectivas frequências.

7.4 Extração de DNA genômico dos isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*

O DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis* foi extraído de colônias de micobactérias cultivadas em meio Löwenstein Jensen. Uma alça de bactérias de cada cultivo foi transferida para os microtubos contendo 400 µl tampão TE (10mM Tris-HCl / 1mM EDTA, pH 8,0) e estes foram inativados através de uma incubação a 80°C durante 30 min. Para a digestão da parede celular foi adicionado 50 µl de lisozima (10mg/ml) com uma incubação *overnight* a 37°C. No dia seguinte, uma solução de Proteinase K/SDS (10%) (75 µl) foi adicionada seguida de uma incubação a 65°C por 10 min. Logo após foram adicionados o NaCl 5M (100 µl) e o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (100 µl), sendo submetidos a nova incubação a 65°C por 10 min. A separação do DNA foi realizada através da adição de 750 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e as fases foram separadas por centrifugação (7 min a 12.000 rpm). O sobrenadante foi retirado e o DNA foi precipitado após a adição de 400 µl de álcool isopropanol seguido de uma incubação a -20°C *overnight*. No dia seguinte, uma centrifugação foi realizada (15 min a 12.000 rpm) e o sobrenadante foi novamente desprezado. O etanol a 70% conservado no -20°C foi utilizado para a lavagem do precipitado, centrifugou-se por 5min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado a temperatura ambiente até a total secagem do *pellet* formado. O DNA foi então ressuspendido com 20 µl de tampão TE 1x/RNase 0,4 mg/ml e armazenados no -20°C até a realização das análises moleculares (VAN EMBDEN et al., 1993; VAN SOOLINGEN et al., 1991).

7.5 Genotipagem dos isolados de *M. tuberculosis* por MIRU- VNTR

Os isolados clínicos foram genotipados de acordo com o método padrão de 24 *loci* MIRU-VNTR (Supply et al., 2006). Por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com 24 oligonucleotídeos. Os marcadores analisados incluíram os 15 loci altamente discriminatórios (Miru 04, Miru 26, Miru 40, VNTR 47, VNTR 52, VNTR 53, Miru 10, Miru 16, Miru 31, VNTR 42, VNTR 43, ETRA, QUB 11b, 1995 e QUB 26) e os 9 loci auxiliares (VNTR 46, VNTR 48, VNTR 49, Miru 20, Miru 24, Miru 27, Miru 02, Miru 23 e Miru 39). O controle

positivo usado para a reação foi a cepa referência de *M. tuberculosis* H37Rv. Os produtos amplificados de tamanho variável, foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% e solução tampão TBE 0,5x (89 mM Tris-6 Borato, 2 mM EDTA) e os tamanhos dos produtos de cada locus foi determinado por comparação com um marcador de 50pb e 100pb de DNA (Invitrogen). A quantidade de alelos foi determinada de acordo com a tabela publicada por Supply (2006), que relaciona o tamanho do fragmento obtido com a quantidade de cópias. Baseado na quantidade de alelos, cada amostra recebeu um código numérico que foi utilizado para descrever o perfil genético.

7.6 Análises estatísticas MIRU-VNTR

O presente tópico descreve as análises estatísticas realizadas através da ferramenta online MIRU-VNTR*plus*.

7.6.1 Busca por similaridade

A busca por similaridade entre os isolados e as linhagens globais foi realizada na plataforma MIRU-VNTR*plus* utilizando as distâncias máximas de <0.17 e <0.3. A distância de <0.17 é o padrão proposto pela ferramenta online MIRU-VNTR*plus* e corresponde à tolerância de no máximo 4 locus de diferença. Entretanto, se um baixo número de amostras for relacionado às linhagens do banco de dados do MIRU-VNTR*plus*, o valor de <0,3 é sugerido e corresponde à tolerância de 7 loci diferentes. Os perfis genéticos que não apresentaram semelhança a nenhuma das linhagens globais armazenadas no banco de dados MIRU-VNTR*plus* foram denominados perfis órfãos (ALLIX-BÉGUEC; FAUVILLE-DUFAUX; SUPPLY, 2008).

7.6.2 Cálculo da diversidade alélica

O índice de diversidade alélica VNTR (h) foi utilizado para avaliar a diversidade dos alelos observados nos vários locos VNTR. O valor de h foi calculado usando a fórmula descrita por Selander et al., 1986. O índice é utilizado na avaliação da amostra, onde é considerada com um alto poder discriminatório $h > 6$, moderadamente discriminatória se $0,3 \geq h \leq 0,6$ e com baixo poder discriminatório se $h < 0,3$ (SOLA et al. 2003).

7.6.3 Dendograma

A partir do perfil de MIRU-VNTR dos conjuntos de 15 e 24 loci de cada isolado, foram construídos dendogramas de similaridade utilizando o método de grupo de pares não ponderados usando linkage médio (UPMGA) e o coeficiente *categorical*, de acordo com as instruções da plataforma online MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org>).

7.6.4 Análise de *cluster*

A definição de *cluster* foi baseada em padrões idênticos utilizando o padrão MIRU-VNTR (BORGDORFF et al., 2011). A taxa de *clustering* ou de clusters foi calculada de acordo com a equação a seguir, onde $T = (nc - c)/n$, onde nc é o número total de amostras agrupadas, c é o número de agrupamentos encontrados e n é o número total de casos na amostra (BIDOVEC-STOJKOVIC ; ZOLNIR-DOVC ; SUPPLY, 2011).

7.6.5 Poder discriminatório

O poder discriminatório do método MIRU-VNTR também foi calculado e comparado pelo índice discriminatório de *Hunter Gaston Discriminatory Index* (HGDI). O cálculo do poder discriminatório é utilizado para determinar se o método de tipagem foi capaz de distinguir duas amostras randômicas de uma população. A fórmula utilizada está disponível no endereço eletrônico http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/, onde o valor de D , índice discriminatório, pode variar de 0 a 1, onde 0 os isolados da população avaliada são idênticos e 1 o método diferenciou todos os isolados avaliados (HUNTER; GASTON, 1988).

7.7 Aspectos éticos

Este projeto está vinculado ao projeto de “Epidemiologia molecular da tuberculose no estado de Pernambuco” e que possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 38794414.4.0000.5190). As informações clínicas dos pacientes ficarão sob a responsabilidade do grupo de pesquisa envolvido na execução deste projeto. Estes dados serão utilizados com finalidade científica, sendo compilados e analisados a fim de serem divulgados em eventos e revistas científicas.

8 RESULTADOS

O presente tópico descreve todos os resultados obtidos no estudo.

8.1 População de estudo

O presente estudo avaliou um total de 70 isolados clínicos de Mtb obtidos de pacientes diagnosticados com TB pulmonar através do exame da cultura no Laboratório Municipal de Saúde Pública Professor Oswaldo Gonçalves Lima entre os anos de 2015 e 2016. Os isolados estavam relacionados a casos de TB do Complexo Prisional Professor Aníbal Bruno (PPL) que é composto pelas seguintes unidades prisionais: ASP Marcelo Francisco de Araújo (PAMFA), Frei Damiao de Bozan (PFDB) e Juiz Antônio Luiz Lins de Brito (PJALLB). A Tabela 2 demonstra a distribuição dos casos segundo as unidades prisionais de origem e a frequência observada que foi a seguinte: 35,71% (N=25/70) PAMFA, 34,29% (N=24/70) PFDB e 24,29% (N=17/70) PJALLB. Apenas para quatro isolados não foi possível identificar a origem da unidade prisional sendo incluído no complexo AB (5,71%; N=4/70) (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de Isolados de Mtb genotipados correlacionados a unidade prisional de origem do paciente/presidiário.

Unidade prisional	N de isolados tipados (%)
PAMFA	25 (35,71%)
PFDB	24 (34,29%)
PJALLB	17 (24,29%)
AB	4 (5,71%)
Total	70

Fonte: Elaborado pela autora.

8.1.1 Características clínico-epidemiológicas e demográficas

A partir do banco de dados laboratorial (GAL) foi possível obter informações sobre os pacientes como nome, sexo, idade e o resultado dos testes diagnósticos como a baciloscopia, teste molecular rápido (GeneXpert MTB/RIF®) e o teste de sensibilidade as drogas anti-TB (BACTEC®-960-MGIT). Através do sistema laboratorial encontrou-se as solicitações e os resultados dos exames de 67 pacientes e notou-se que dois isolados clínicos de Mtb eram oriundos do mesmo paciente (duplicidade de amostra). Todos os isolados avaliados pertenciam a pacientes de unidades prisionais masculinas. Os dados clínicos e epidemiológicos estão

sumarizados na Tabela 3. A idade entre os pacientes da população encarcerada variou entre 18 a 56 anos, sendo a idade média de 27 anos e a faixa etária mais acometida pela doença a de 18 a 34 anos (94,03%, N=63/67) (Tabela 3).

O exame de baciloscopia foi realizado em 62,68% dos isolados, sendo positivo em 55,22% (N=37/67), negativo em 7,46% (N=5/67) e não realizado em 25,38% (N=17/67) dos casos. O teste molecular rápido (GeneXpert) foi realizado em 13 (19,4%) amostras clínicas, destas uma (1,5%) foi negativa e as restantes (17,91%, N=12/67) foram positivas para o DNA de Mtb e sensíveis à rifampicina. O teste molecular não foi realizado em 51 isolados (76,12%) e em três casos (4,47%) não havia informações no banco de dados. Observou-se que o teste de sensibilidade às drogas anti-TB (BACTEC®-960-MGIT) foi realizado para apenas 30 isolados (44,77%), sendo 29 (43,28%) sensíveis às drogas e uma (1,5%) resistente à isoniazida e rifampicina (1636/16 R PJALLB). Esse teste não foi realizado em 4 casos (5,97%) e não havia informações no banco de dados de 33 (40, 25%) isolados (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados epidemiológicos e dos exames laboratoriais de rotina dos casos de TB dos pacientes privados de liberdade (N=67).

(contínua)

Variáveis clínicas e epidemiológicas	Número de casos relacionados aos isolados clínicos de Mtb de PPL genotipados (67 pacientes)
Faixa etária	
<18 anos	-
18 a 34 anos	63 (94,03%)
35 a 54 anos	3 (4,47%)
>55 anos	1 (1,50%)
Baciloscopia	
Positiva	37 (55,22%)
Negativa	5 (7,46%)
Não realizada	17 (25,37%)
Não se aplica/informada	8 (11,95%)
Teste molecular rápido (TMR-TB)	
Detectável sensível rifampicina	12 (17,91%)
Detectável resistente rifampicina	-
Não detectável	1 (1,50%)
Não realizado	51 (76,12%)
Não informado	3 (4,47%)

Tabela 3 - Dados epidemiológicos e dos exames laboratoriais de rotina dos casos de TB dos pacientes privados de liberdade (N=67).

(conclusão)

Variáveis clínicas e epidemiológicas	Número de casos relacionados aos isolados clínicos de Mtb de PPL genotipados (67 pacientes)
Teste de sensibilidade	
Resistente apenas a isoniazida	-
Resistente apenas a rifampicina	-
Resistente a isoniazida e rifampicina	1 (1,50%)
Resistente a outras drogas de 1ª linha	-
Sensível	29 (43,28%)
Não realizado	4 (5,97%)
Não informado	33 (49,25%)

Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 4 sumariza os dados clínico-epidemiológicos obtidos através das fichas de notificação e correspondem a 45 prisioneiros. Dos casos avaliados neste estudo, 32,83% (N=22/67) não foram notificados ao SINAN, portanto, não foi possível obter nenhum dado além dos descritos anteriormente. A raça/cor de pele parda foi a mais frequentemente observada (64,44%). Na população estudada 17,77% (N=8/45) tinham o ensino básico incompleto e 28,9% (N=13/45) o fundamental incompleto (Tabela 4).

A forma clínica de TB mais frequentemente encontrada foi a pulmonar (97,78%, N=44/45), além de uma mista (pulmonar/pleural) (2,22%). Quanto ao tipo de entrada, a maioria eram casos novos (73,3%; N=33/45), 22,22% (N=10/45) recidivas e a mesma frequência (2,22%; N=1/45) foi observada para reingresso por abandono e transferência. Em relação a coinfeção com o HIV, em 84,48% o teste foi negativo, observou-se três pacientes portadores do vírus (6,66%) e estava em andamento para quatro pacientes (8,9%). Na maioria dos casos (95,56%) não havia informação de outros agravos. A radiografia do tórax foi feita em cinco (11,11%) casos suspeitos e não realizada em 88,89% (N=40/45) (Tabela 4).

Os hábitos de vida disponíveis para avaliação eram o uso de álcool, drogas e tabagismo e foram de 17,77% (N=8/45), 24,44% (N=11/45) e 24,44% (N=11/45) na PPL genotipada, respectivamente. Em relação ao desfecho a maioria dos casos foi tratado com sucesso (77,78%) enquanto um 2,22% abandonaram o tratamento. Não foram notificados óbitos por TB ou por outras causas entre os casos genotipados (Tabela 4).

Tabela 4 – Dados clínico-epidemiológicos e demográficos dos casos de TB notificados e genotipados dos pacientes privados de liberdade genotipadas.

(contínua)

Variáveis clínicas e epidemiológicas	Número de casos relacionados aos isolados clínicos de Mtb de PPL genotipados (45 pacientes)
Raça/Cor	
Branca	10 (22,22%)
Negra	4 (8,9%)
Parda	29 (64,44%)
Amarela	-
Indígena	-
Não informada/ignorada	2 (4,44%)
Escolaridade	
Analfabeto	1 (2,22%)
1º ao 4º ano incompleto	8 (17,77%)
4ª completo	1 (2,22%)
5ª ao 8º ano incompleto	13 (28,9%)
Fundamental completo	-
Médio incompleto	3 (6,67%)
Médio completo	1 (2,22%)
Superior incompleto	-
Superior completo	-
Não se aplica	-
Não informado/ignorado	18 (40%)
Forma clínica TB	
Pulmonar	44 (97,78%)
Extrapulmonar	-
Mista	1 (2,22%)
Não informado	-
Tipo de entrada	
Caso novo	33 (73,34%)
Recidiva	10 (22,22%)
Reingresso após abandono	1 (2,22%)
Não sabe	-
Transferência	1 (2,22%)
Pós-óbito	-
Não informado	-

Tabela 4 – Dados clínico-epidemiológicos e demográficos dos casos de TB notificados e genotipados dos pacientes privados de liberdade genotipadas.

(continua)

Variáveis clínicas e epidemiológicas	Número de casos relacionados aos isolados clínicos de Mtb de PPL genotipados (45 pacientes)
Doenças e Agravos	
HIV	3 (6,66%)
Diabetes	-
Cardiopatía	-
Hanseníase	-
Asma	-
DST	-
Não informado	43 (95,56%)
Testes diagnósticos	
Teste HIV	
Positivo	3 (6,66%)
Negativo	38 (84,44%)
Em andamento	4 (8,9%)
Não realizado	-
Não informado	-
Radiografia de Tórax	
Suspeito	5 (11,11%)
Normal	-
Outra Patologia	-
Não realizado	40 (88,89%)
Não informado	-
Hábitos de vida	
Alcoolismo	8 (17,78%)
Tabagismo	11 (24,44%)
Uso drogas ilícitas	11 (24,44%)
Situação do encerramento	
Cura	35 (77,78%)
Abandono	1 (2,22%)
Óbito por TB	-
Óbito por outra causa	-
Transferência	8 (17,78%)
Mudança diagnóstico	-

Tabela 4 – Dados clínico-epidemiológicos e demográficos dos casos de TB notificados e genotipados dos pacientes privados de liberdade genotipadas.

(conclusão)

Variáveis clínicas e epidemiológicas	Número de casos relacionados aos isolados clínicos de Mtb de PPL genotipados (45 pacientes)
TB DR	-
Mudança esquema	-
Falência	-
Abandono primário	-
Não informado	1 (2,22%)

Fonte: Elaborado pela autora.

8.2 Perfil genético dos Isolados de Mtb: MIRU-VNTR 15 loci e 24 loci

A técnica de genotipagem escolhida para avaliar os 70 isolados de Mtb circulantes no complexo prisional foi a MIRU-VNTR. Todos os isolados foram genotipados com sucesso pela referida técnica e os padrões de 15 e 24 *loci* foram avaliados: considerando o padrão de 15 *loci* foi obtido um poder discriminatório de 0,9503 (HGDI) e 47 genótipos distintos, sendo 42 perfis únicos e 5 *clusters* com 27 isolados (32,8%). A análise dos 24 *loci* obteve um maior poder discriminatório (HGDI= 0,9694) e um maior número de genótipos (N= 54), sendo 51 perfis únicos e 3 *clusters* com 18 isolados (23%) (Tabela 5).

Tabela 5 – O poder discriminatório da técnica MIRU-VNTR e taxa de clustering.

Conjunto de Loci MIRU-VNTR	HGDI	Número de genótipos distintos	Número de Perfis únicos	Número de cluster	Taxa de clustering
15 loci	0,9503	47	42	5	32,8%
24 loci	0,9694	54	51	3	23%

Fonte: Elaborado pela autora.

Para melhor identificar as linhagens/sublinhagens de Mtb relacionadas aos isolados foram utilizadas as distâncias máximas de <0,17 e < 0,3. Observou-se que o percentual de linhagens identificadas no conjunto de 15 *loci* e de 24 *loci*, na distância <0,17 foram de 24,29% e 37,14%, respectivamente. Em relação à distância de <0,3 foram identificadas nos conjuntos de 15 *loci* e 24 *loci*, 58,57% e 84,29% de similaridade respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise similaridade entre os isolados clínicos de Mtb e as linhagens/sublinhagens globais usando diferentes distancias máximas

Distância máxima	<0,17	<0,3
15 Loci	24,29%	58,57%
24 Loci	37,14%	84,29%

Fonte: Elaborado pela autora.

Utilizando o MIRU-VNTR 24 loci, considerado o método padrão para a análise filogenética observou-se as seguintes linhagens/sublinhagens: Haarlem (45,71%), LAM (12,86%), X (11,43%), Beijing (10%), *Multiple matches* (4,29%) e perfis órfãos (15,71%) (Tabela 7).

Tabela 7 – Proporção das linhagens/sublinhagens identificada para os isolados de Mtb através da plataforma MIRU-VNTR_{plus}.

Proporção da linhagem/sublinhagem						
		Distância	<0,17		<0,3	
Linhagem	Sublinhagem	Loci	15	24	15	24
Desconhecido			75,7% (N= 53)	62,85% (N= 44)	41,43% (N= 29)	15,71% (N= 11)
<i>Multiple matches</i>		-	-	-	-	4,29% (N= 3)
	Haarlem		24,3% (N= 17)	30% (N= 21)	42,86% (N= 30)	45,71% (N= 32)
Linhagem 4	LAM	-	-	1,43% (N= 1)	5,71% (N= 4)	12,86% (N= 9)
	X	-	-	1,43% (N= 1)	1,43% (N= 1)	11,43% (N= 8)
Linhagem 2	Beijing	-	-	4,29% (N=3)	8,57% (N= 6)	10% (N= 7)

Fonte: Elaborado pela autora.

A diversidade alélica de cada locus MIRU-VNTR foi avaliada e classificada como descrito na metodologia e está resumida na Tabela 8. O índice da diversidade alélica foi alto ($h > 0,6$) para 9 loci avaliados (VNTR 52, VNTR 53, MIRU 10, VNTR 42, ETRA, QUB11b, VNTR 1955, QUB26 e MIRU 23). De acordo com esta análise, 11 loci (MIRU 26, MIRU 40, VNTR 47, MIRU 16, MIRU 31, VNTR 43, VNTR 46, VNTR 48, VNTR 49, MITU 20 e MIRU 27) apresentaram um poder discriminatório moderado ($0,3 \leq h \leq 0,6$), enquanto que quatro alvos (MIRU 4, MIRU 24, MIRU 02 e MIRU 39) foram pouco polimórficos ($h < 0,3$) (Tabela 8).

Tabela 8 – A diversidade alélica (h) entre os 24 loci MIRU-VNTR avaliados.

Locus	Diversidade Alelica (h)	Quantidade de alelos	Poder discriminatório
15 loci			
MIRU 4	-0,01	1	Baixo
MIRU 26	0,4	4	Moderado
MIRU 40	0,52	5	Moderado
VNTR 47	0,42	2	Moderado
VNTR 52	0,61	5	Alto
VNTR 53	0,61	4	Alto
MIRU 10	0,64	4	Alto
MIRU 16	0,41	4	Moderado
MIRU 31	0,36	4	Moderado
VNTR42	0,72	5	Alto
VNTR 43	0,53	5	Moderado
ETRA	0,62	5	Alto
QUB11b	0,65	4	Alto
VNTR 1955	0,62	6	Alto
QUB26	0,69	7	Alto
Adição 9 loci auxiliares			
VNTR 46	0,59	4	Moderado
VNTR 48	0,42	3	Moderado
VNTR 49	0,35	2	Moderado
MIRU20	0,5	2	Moderado
MIRU 24	0,17	4	Baixo
MIRU 27	0,35	2	Moderado
MIRU 02	0,12	2	Baixo
MIRU 23	0,65	4	Alto
MIRU 39	0,22	3	Baixo

Fonte: Elaborado pela autora.

Neste estudo, observou-se 10 isolados com perfil alélico misto. Conforme podemos observar na Tabela 9, alelos duplos foram observados em diferentes loci e variaram em relação ao número de loci (um a seis) por isolado, sendo, portanto, três isolados (3064/15 PAMFA, 3782/15 PFDB e 4423/15 PAMFA) associados à variação clonal, e sete relacionados à infecção mista (4453/15 PAMFA, 2015/16 PFDB, 2281/16 PAMFA, 271/16 PAMFA, 1711/16 PJALLB, 2052/16 PJALLB e 2374/16 PAMFA) (Tabela 9).

Tabela 9 – Isolados de Mtb que apresentaram perfil alélico misto.

Locus ID	MIRU 4	MIRU 26	MIRU 40	VNTR 47	VNTR 52	VNTR 53	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 31	VNTR 42	VNTR 43	ETRA	QUB11b	1955	QUB26	VNTR 46	VNTR 48	VNTR 49	MIRU 20	MIRU 24	MIRU 27	MIRU 02	MIRU 23	MIRU 39
3064	2	5	3	4	3	2	5	3	3	2	3	3	5	2	7/ 6	2	2	3	1	1	3	2	3	2
3782	2	5	3	4	2	2	3	3	3	2	3	3	5	2	8	2	1 / 2	3	1	1	3	2	3	2
4423	2	5	1	1	2	3	4	2	3	3/ 4	4	2	3	3	3	4	1	5	2	1	3	2	6	2
4453	2	5	1/ 2	1	2	2/ 3	4	1/ 3	3	4	4	2	2	3	7	4	1 / 2	3	2	1	3	2	6	2
2015	2	5/ 4	3/ 1	4/ 2	3	2/ 1	4	3	3	2/ 1	4	3	4	4	5	4	2	3	2	1	3	2	5 / 6	2
2281	2	5	3/ 1	4/ 1	3/ 2	2	3	3	2	2/ 3	3	3	5	2	7	2	2 / 1	3	1	1	2	2	3	2
271	2	5	1	1	2	2	4	1	3	2/ 3	8	2	4	2	3	4 / 2	1	5 / 4	2 / 1	1	2 / 3	2	5	2
1711	2	5	1	1	2	2	4	1	3	3	4	4	4/ 3	2	5	4	1	5	2	1	2	2	6 / 5	2
2052	2	4/ 5	3/ 1	4/ 2	3	1/ 2	4/ 3	3	3	1/ 2	4	5	4	4	5	4	2	3	2	1	3	1	6	2
2374	2	*	1	1	2	2/ 3	4	3/ 2	3	2	4	5	3	3	5	4	2 / 1	3 / 4	2	1	3	2	5	1

Fonte: Elaborada pela autora.

8.2.1 Análise do dendograma de similaridade entre os isolados de Mtb

A avaliação das características dos *clusters* observados através do algoritmo UPMGA nos 70 isolados clínicos foi realizada através de dois dendogramas com o MIRU-VNTR 15 loci e 24 loci (Figura 10 e Figura 11). A análise de genotipagem por MIRU-VNTR 15 loci demonstrou um agrupamento de 27 isolados distribuídos em cinco *clusters* (A, B, C, D e E) (Figura 10), enquanto que com a análise de 24 loci foi obtido um agrupamento de 18 isolados em três *clusters* (B2, B3 e D2) (Figura 11). Os *clusters* observados em ambos os dendogramas variaram também em número e composição de isolados. Os formados a partir da análise de 15 loci possuem entre 2 a 15 isolados (Figura 10) e os obtidos com 24 loci de 2 a 12 isolados (Figura 11).

Encontrou-se no dendograma de MIRU-VNTR 15 loci as seguintes características: o *cluster* A foi composto por dois isolados (1764/16 e 2211/16) obtidos em 2016 de pacientes provenientes de diferentes presídios, o PAMFA e o PFDB, respectivamente. O *cluster* C foi

formado por dois isolados (5320/15 e 5439/15) de 2015 de pacientes da mesma unidade prisional (PFDB). O *cluster* E foi composto por quatro amostras (2014/16, 2057/16, 322/15 e 323/15) nos dois anos avaliados, três pertencentes a unidade prisional PFDB e um identificado como AB (Figura 10). Após a análise com MIRU 24 loci, os isolados clínicos agrupados nos *clusters* A, C e E com o padrão de MIRU 15 loci, passaram a apresentar perfis únicos (Tabela 11 e Figura 11).

O maior *cluster* observado no estudo pelo algoritmo UPMGA através do MIRU-VNTR 15 loci foi o *cluster* B, com 15 isolados (1623/16 PAMFA, 1753/16 PFDB, 1817/16 PFDB, 1847/16 PFDB, 1856/16 PFDB, 1859/16 PAMFA, 1873/16 PJALLB, 2017/16 PAMFA, 2219/16 PJALLB, 3287/15 PFDB, 4643/15 PFDB, 472/15 AB, 473/16 PAMFA, 492/15 PFDB e 4996/15 PFDB) no período de 2015 a 2016, estando relacionados a pacientes encarcerados nas três unidades prisionais (Figura 10). Após a avaliação dos 24 loci, os isolados relacionados ao *cluster* B passaram a compor dois novos *clusters*, o B2 com 12 isolados (1623/16 PAMFA, 1753/16 PFDB, 1817/16 PFDB, 1847/16 PFDB, 1856/16 PFDB, 2017/16 PAMFA, 3287/15 PFDB, 4643/15 PFDB, 472/15 AB, 473/16 PAMFA, 492/15 PFDB e 4996/15 PFDB) e o B3 com dois isolados (1859/16 PAMFA E 2219/16 PJALLB). Apenas um dos isolados (1873/16 PJALLB) do *cluster* B passou a apresentar perfil único (Figura 11).

Quatro isolados (1700/16, 2554/16, 5545/15 e 474/15 AB) formaram o *cluster* D no MIRU-VNTR 15 loci, obtidos de dois pacientes do PAMFA, um do PJALLB e um a unidade não foi identificada (AB). O *cluster* D2, na análise dos 24 loci apresentou as mesmas características do *cluster* D (número e composição) (Figura 10 e Figura 11).

Para melhor avaliar a diversidade genética além das linhagens foram analisadas as sublinhagens pertencentes a cada *cluster* encontrado no estudo. Foram observadas quatro sublinhagens (Haarlem, LAM, X e Beijing) e dentre estas a sublinhagem Haarlem foi a mais observada (Tabela 10).

Demonstrou-se que os isolados agrupados no *cluster* D (Figura 10 e Tabela 10) não possuíam similaridade com os genótipos das linhagens globais. Estes isolados clínicos foram agrupados no *cluster* D2 na 24 loci por apresentarem similaridade a sublinhagem X (linhagem 4) (Tabela 10 e Figura 11). Independente do conjunto de loci avaliado, os isolados clínicos que constituíram os *clusters* B (Figura 10), B2 e B3 (Figura 11) apresentavam perfil semelhante à sublinhagem Haarlem (linhagem 4) (Tabela 10).

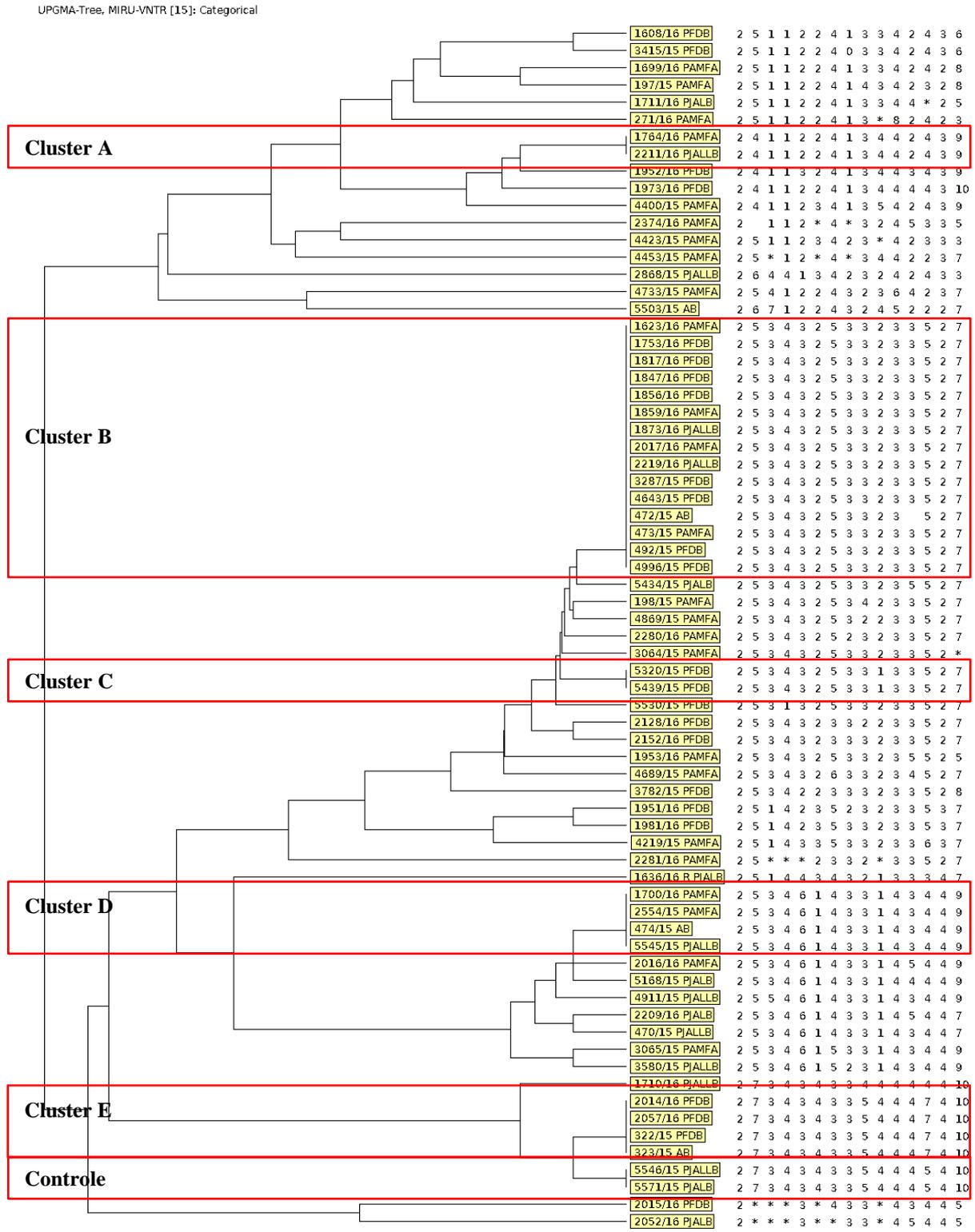
Tabela 10 – Linhagens e Sublinhagens dos *clusters* obtidos pelas análises de MIRU-VNTR 15 e 24 loci

Linhagem	Sublinhagem	Cluster 15 loci	Cluster 24 loci
Desconhecido	-	D (n=4)	-
Linhagem 4	Haarlem	B (n=15 e C (n=2)	B2 (n=12) e B3 (n=2)
	LAM	A (n=2)	-
	X	-	D2 (n=4)
Linhagem 2	Beijing	E (n=4)	-

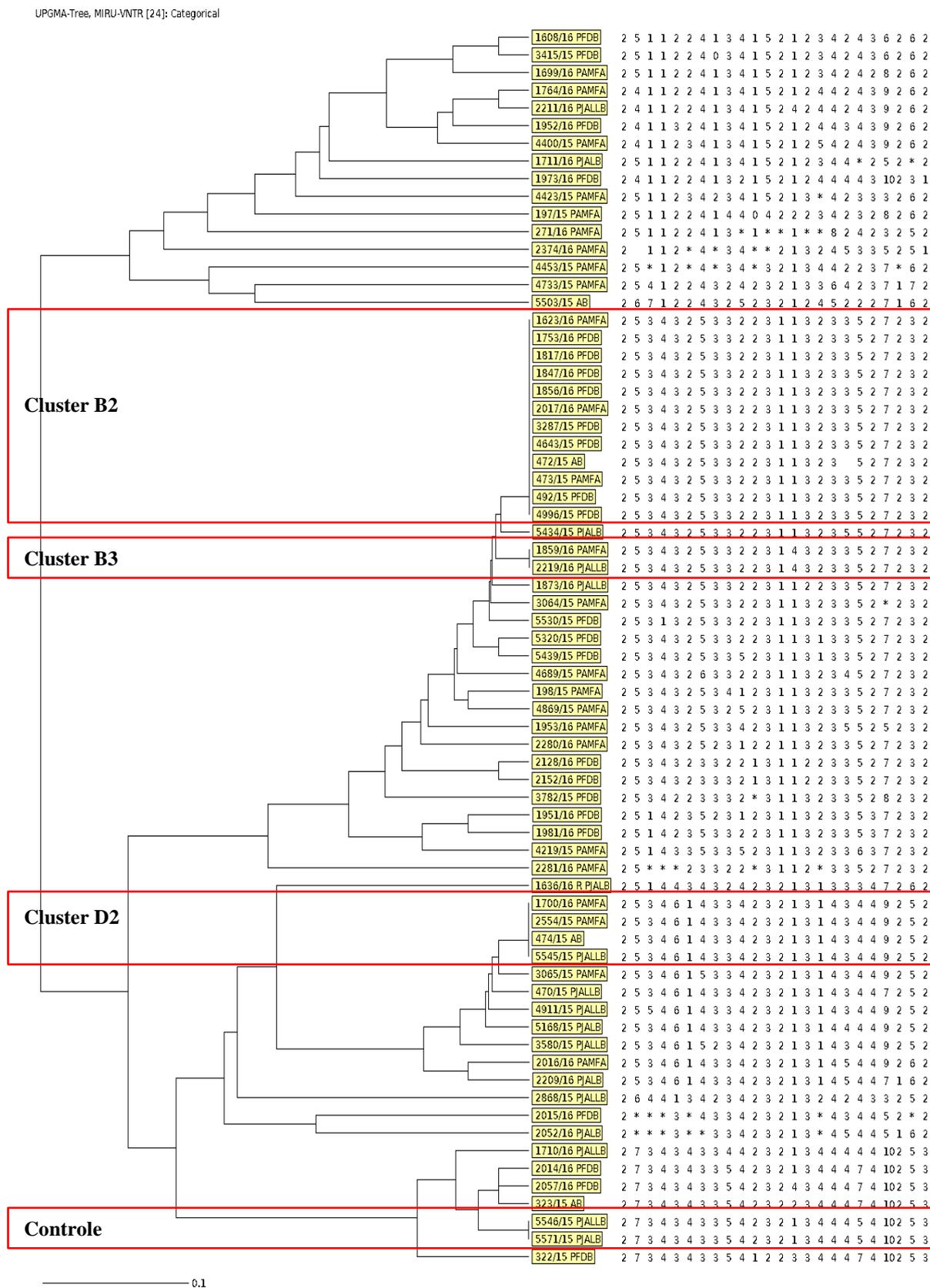
Fonte: Elaborado pela autora.

Demonstrou-se que a cepa de maior circulação entre os três presídios do complexo prisional era pertencente a sublinhagem Haarlem nos anos 2015 e 2016 (*cluster* B2).

Figura 10 - Dendrograma de similaridade UPMGA 15 loci MIRU-VNTR.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 – Dendograma de similaridade UPMGA 24 loci MIRU-VNTR

Fonte: Elaborada pela autora.

8.3 Diversidade de genótipos de Mtb circulantes em cada unidade do Complexo Prisional Aníbal Bruno

Na Tabela 11 é demonstrado o número de isolados e a diversidade de genótipos encontrados em cada unidade prisional avaliada, associando esses dados a linhagem/sublinhagem semelhante ao perfil encontrado.

Tabela 11 – Proporção das linhagens/sublinhagens identificadas para os isolados de Mtb de cada unidade prisional através da plataforma MIRU-VNTR_{plus}.

Unidade Prisional	Linhagem	Sublinhagem	N isolados	N genótipos	
PAMFA (N=25)	Desconhecida		20% (N=5)	5	
	Linhagem 4	Haarlem	44% (N=11)	9	
		X	12% (N=3)	2	
		<i>multiple matches</i> (Haarlem e X)		4% (N=1)	1
		LAM	20% (N=5)	5	
	Linhagem 2	Beijing	-	-	
				N = 22	
PFDB (N=24)	Desconhecida		8,3% (N=2)	2	
	Linhagem 4	Haarlem	66,7% (N=16)	9	
		X	-	-	
		<i>multiple matches</i> (Haarlem e X)		-	-
		LAM	12,5% (N=3)	3	
	Linhagem 2	Beijing	12,5% (N=3)	3	
				N = 17	
PJALLB (N=17)	Desconhecida		17,6% (N=3)	3	
	Linhagem 4	Haarlem	23,5% (N=4)	4	
		X	23,5% (N=4)	4	
		<i>multiple matches</i> (Haarlem e X)		11,8% (N=2)	2
		LAM	5,9% (N=1)	1	
	Linhagem 2	Beijing	17,6% (N=3)	3	
				N = 17	

Fonte: Elaborado pela autora.

Na unidade prisional PAMFA foram avaliados 25 isolados clínicos de Mtb que apresentaram 22 perfis diversos. Foi observada a linhagem Euro Americana (linhagem 4) entre os isolados de Mtb, sendo a sublinhagem mais frequente a Haarlem (44%), seguida da LAM (20%) e X (12%). Demonstrou-se que 20% dos isolados desta unidade não apresentaram associação a nenhuma das linhagens do banco de dados MIRU-VNTR*plus*. Foi observado um isolado com perfil *multiple matches*, relacionado as sublinhagens Haarlem e X (Tabela 11).

Na unidade prisional PFDB, foram analisados 24 isolados, que apresentaram 17 perfis distintos relacionados às linhagens Euro Americana (linhagem 4) e a linhagem Leste Asiática (linhagem 2). Dentre as sublinhagens associadas a linhagem 4 foram encontradas a Haarlem (66,7%) e a LAM (12,5%). A sublinhagem Beijing (linhagem 2) foi associada a 12,5% dos isolados. De todos os isolados analisados 8,3% relacionados aos casos de TB do PFDB apresentaram perfis órfãos (desconhecidos) (Tabela 11).

No presídio PJALLB avaliou-se 17 isolados, os quais apresentavam perfis distintos entre si e com representantes de todas as linhagens e sublinhagens descritas no estudo. A sublinhagem Haarlem (23,5%) e X (23,5%) foram as mais encontradas, seguida Beijing (17,6%), e LAM (5,9%). Dois isolados (11,8%) apresentaram perfis semelhantes às sublinhagens Haarlem e X e 17,6% dos isolados não tinham perfis que se relacionassem as linhagens globais. Demonstrou-se que das três unidades prisionais a PJALLB apresentou o perfil genético mais diversificado das estirpes de Mtb circulantes (Tabela 11).

8.4 Correlação entre os casos de coinfeção TB-HIV e de recidiva por tuberculose com as sublinhagens de Mtb

Neste estudo foram identificados três pacientes coinfectados com o HIV, dois da unidade prisional PFDB (492/15 e 1753/16) e um do presídio PJALLB (2868/15) (Tabela 14). Os isolados relacionados a esses casos apresentaram semelhança com a sublinhagem Haarlem da linhagem 4 e dois isolados (1753/16 e 2868/16) estavam associados a casos de recidiva da TB (Tabela 12).

Tabela 12 – Associação entre casos de coinfeção TB-HIV e a sublinhagem observada nos isolados relacionados

Isolado relacionado ao caso TB-HIV	Sublinhagem associada
492/15 PFDB	Haarlem
1753/16 PFDB	Haarlem (cluster B2)
2868/15PJALLB	Haarlem

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando os isolados de casos notificados como recidiva (n=10) observou-se perfis distintos e foram relacionados às sublinhagens Beijing, Haarlem e LAM (Tabela 15). Entre estes isolados foi observada a presença de uma cepa mista (4453/15 PAMFA) e três isolados pertencentes ao cluster B2 (4643/15 PFDB, 1623/16 PAMFA e 1753/16 PFDB) (Tabela 13).

Tabela 13 – Associação entre o caso de recidiva e a sublinhagem observada nos isolados relacionados

Isolado relacionado ao caso de recidiva	Sublinhagem associada
322/15 PFDB	Beijing
2868/15PJALLB	Haarlem
4643/15 PFDB	Haarlem (cluster B2)
4453/15 PAMFA	Desconhecido
1623/16 PAMFA	Haarlem (cluster B2)
1753/16 PFDB	Haarlem (cluster B2)
1952/16 PFDB	LAM
2014/16 PFDB	Beijing
2057/16 PFDB	Beijing
5503/15 AB	Desconhecido

Fonte: Elaborada pela autora.

9 DISCUSSÃO

Um dos maiores desafios para a saúde pública nos sistemas prisionais é o controle da tuberculose. Estima-se que a prevalência da doença encontrada na população privada de liberdade em Recife chega a ser 27 vezes maior do que na população livre (LIRA, 2018). A SERES (Secretaria Executiva de Ressocialização do Estado de Pernambuco) em 2017 divulgou em relatório que 42% dos internos do Complexo Prisional Aníbal Bruno estão à espera de julgamento (CIDH, 2017). Fato que demonstra a intensa mobilidade desta população, o que facilitaria a disseminação de doenças infectocontagiosas como a TB. Em ambos, âmbito prisional e comunidade, pois estes indivíduos podem ser condenados e transferidos para outras unidades prisionais ou obtêm a absolvição e reingressam na comunidade.

Este é o primeiro estudo sobre a caracterização molecular de isolados clínicos do *M. tuberculosis* realizado na população privada de liberdade das unidades prisionais do Complexo Prisional Aníbal Bruno no Recife, Pernambuco. Entre os anos de 2015 e 2016 foram notificados 4.141 casos de tuberculose na cidade do Recife, destes 9,32% (N= 386) pertenciam a população privada de liberdade.

A elevada prevalência da TB observada no ambiente prisional recifense pode ser atribuída a diversas razões destacando-se: a superlotação das unidades (aproximadamente 350%), isto é, o alto número de indivíduos dividindo ambientes muitas vezes insalubres, com pouca ventilação e exposição à luz solar. Além disso, a própria vulnerabilidade socioeconômica dessa população contribui para este cenário epidemiológico. Como observado neste estudo e em outras regiões do Brasil, a maioria dessa população possui baixo nível educacional (até nove anos de escolaridade) (CARBONE et al., 2015; KUHLIS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2018; REIS et al., 2016; SANCHEZ et al., 2011; VALENÇA et al., 2015) e uma parcela variável relata o uso de álcool, tabaco e drogas ilícitas (ROCHA et al., 2013; REIS et al., 2015; VALENÇA et al., 2015).

Avaliou-se 70 isolados clínicos de *Mtb* relacionados aos pacientes com TB do complexo prisional AB diagnosticados no Laboratório Municipal de Saúde Pública Professor Oswaldo Gonçalves Lima com cultura positivas, no período de 2015 a 2016. O baixo número de amostras neste estudo provavelmente foi influenciado por falta de insumos para a realização da cultura em todas as amostras enviadas do presídio no período estudado. Foram genotipados aproximadamente 11% (N=45/386) dos casos de TB notificados no mesmo período nas unidades prisionais. Apesar do reduzido número de amostras, é provável que essa coleção de isolados de *Mtb* seja representativa dos casos confirmados das unidades do complexo Aníbal

Bruno, levando em consideração a grande variabilidade genética observada característica da dispersão variável do Mtb. No entanto mais estudos são necessários para elucidar a estrutura da tuberculose nos presídios no estado de Pernambuco. Entretanto, este foi o primeiro estudo que forneceu um detalhamento da estrutura genética das cepas de *M. tuberculosis* na PPL de Recife, Pernambuco. Neste contexto, se estabeleceu pela primeira vez uma linha de base dos genótipos observados em isolados clínicos com Mtb sendo possível avaliar o perfil dos Mtb circulantes entre essas unidades.

As características clínicas, epidemiológicas e demográficas dos pacientes com tuberculose relacionados aos isolados genotipados foram avaliadas. A maior parte dos casos estudados declarou ser da raça/cor da pele parda, dado semelhante ao perfil dos pacientes com TB no país (VALENÇA et al., 2015; VIANA; GONÇALVES; BASTA, 2016). A idade média desses indivíduos foi de 27 anos e mostrou-se concordante com estudos de epidemiologia molecular conduzidos em unidades prisionais do Rio de Janeiro e Santa Catarina (HUBER et al., 2014; MEDEIROS et al., 2018; SANCHEZ et al., 2011) e estudos de detecção da tuberculose nas unidades prisionais (BOURDILLON et al., 2017; PAIAO et al., 2016). Todavia, nas unidades do sistema prisional do Rio Grande do Sul, a idade média observada variou de 30 a 33 anos (CARBONE et al., 2015; KUHLIS et al., 2012; REIS et al., 2016; VALENÇA et al., 2015).

Macedo et al (2017) observou que a maior parte da população privada de liberdade brasileira acometida pela doença encontrava-se na faixa etária de 18 aos 35 anos (73,28%). Neste estudo observamos que mais de 90% dos casos de TB na PPL de Recife possuíam esta faixa etária. O grupo de jovens adultos economicamente ativos, também é o mais atingido pela doença na população brasileira em liberdade (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2018; FERNANDES et al., 2018; TELAROLLI; LOFFREDO, 2019). Estes dados corroboram com a predominância da tuberculose entre indivíduos adultos tanto no ambiente prisional como na população livre.

A forma da TB e o tipo de entrada mais prevalentes no período estudado foram, respectivamente, pulmonar (97,78%) e casos novos (73,34%), dado semelhante ao encontrado na PPL brasileira com tuberculose (91,5% e 78,1%) (MACEDO; MACIEL; STRUCHINER, 2017). Outro achado importante observado neste trabalho, foi o número de casos de recidiva (22,22%) da doença entre os casos de PPL genotipados. Uma prevalência semelhante também foi encontrada entre os prisioneiros com TB de uma unidade prisional de Santa Catarina (MEDEIROS et al., 2018).

A baciloscopia é o teste diagnóstico da TB mais utilizado no mundo, devido a sua rápida realização e o custo benefício (OSTA; SILVA; GONÇALVES, 2018). No presente estudo, o exame microscópico foi realizado para a maioria dos casos avaliados sendo positivo em aproximadamente 55%. Este dado é inferior ao encontrado por Medeiros et al. (2018) e na população brasileira em geral (VALENCA et al., 2015). Por sua vez, o exame de cultura foi realizado para todos os pacientes notificados e avaliados, uma vez que, as amostras foram obtidas do cultivo do bacilo.

Dentre as variáveis clínicas, o agravo HIV foi o único observado entre os indivíduos relacionados aos isolados genotipados. A proporção de HIV positivos nesse estudo (6,66%) foi superior ao observado no Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (CARBONE et al., 2017; NAVARRO et al., 2016) e semelhante à dos casos de TB de duas unidades prisionais do Rio Grande do Sul, a Penitenciária Estadual de Jacuí (PEJ) e a Prisão Regional de Santa Cruz do Sul (KUHLLIS et al., 2012; REIS et al., 2016). Entretanto, em outras unidades prisionais do Brasil, o índice da coinfeção com HIV é superior, como o encontrado em unidades de Santa Catarina (32,8%), Rio de Janeiro (15,8%) e nas unidades brasileiras de forma geral (9,3%) (BOURDILLON et al., 2017; MACEDO; MACIEL; STRUCHINER, 2017; MEDEIROS et al., 2018).

A técnica utilizada na genotipagem dos isolados clínicos foi a MIRU-VNTR e os padrões de 15 e 24 loci foram utilizados para avaliar os *links* epidemiológicos e filogenéticos, respectivamente. O índice discriminatório para o MIRU-VNTR 15 e 24 loci foi elevado de 0,95 a 0,96, respectivamente neste estudo. Semelhante ao encontrado a zheng et al. (ref 10 irã) e isto mostra a aplicação bem-sucedida da técnica até mesmo sem a associação do IS6110-RFLP ou Spoligotyping (ASANTE-POKU et al., 2014).

A linhagem Euro Americana é a linhagem causadora da tuberculose que apresenta uma distribuição global bem diversa, fato atribuído a diversidade genética e fenotípica de suas sublinhagens (STUCKI et al., 2016)). Neste estudo, a análise da genotipagem por MIRU-VNTR demonstrou a presença de duas linhagens genéticas de Mtb circulando nos presídios de Recife, a linhagem Euro-americana (70%) e a linhagem Leste Asiática (10%), ambas compreendiam 80% dos isolados avaliados. As sublinhagens de Mtb LAM, Haarlem e T são as mais comumente observadas da linhagem Euro Americana nas Américas Sul e Central, Caribe, Europa e África Central (DEMAY et al., 2012). Dentre os isolados avaliados, foram encontradas circulando no Complexo Prisional Professor Aníbal Bruno as sublinhagens Haarlem (45,71%), LAM (12,86%) e X (11,43%) da linhagem 4 (Euro Americana).

Neste estudo, verificamos uma alta frequência da sublinhagem Haarlem nas três unidades prisionais avaliadas (PAMFA, PFDB e PJALLB). Corroborando com este dado, uma unidade prisional da Colômbia (La Esperanza) também relatou um elevado número de isolados relacionados a esta sublinhagem, entretanto, a frequência foi ligeiramente mais elevada (68,4%). Outros três estudos também conduzidos na América latina relatam a predominância desta linhagem. Dois entre os isolados de Mtb XDR do Peru (43,66%) e Bolívia (39,4%), e o outro conduzido na população com TB da cidade de Medellín, Colômbia (48,7%), (CACERES et al., 2014; MONTESERIN et al., 2013; REALPE et al., 2014). Além disso, observa-se que entre os isolados de Mtb avaliados esta linhagem (Haarlem) é semelhante ao perfil do maior *cluster* encontrado, em ambos conjuntos avaliados (*cluster* B e B2).

A presença da família LAM na América Latina é associada a colonização lusitano-hispanista, uma vez que, os países mediterrânicos possuem elevada prevalência desta linhagem entre as estirpes de Mtb circulantes (BÓS et al., 2014; DAVID et al., 2005). A frequência de isolados relacionados a sublinhagem LAM (12,86%) difere do encontrado em estudos moleculares conduzidos em presídios do sul do país, onde a proporção encontrada varia de 40% a 70% (KUHLIS et al., 2012; HUBER et al., 2014; MEDEIROS et al., 2018). Além disso, contrasta também com o encontrado na população livre do Brasil e da América Latina, onde a maioria dos isolados de Mtb genotipados são pertencentes a esta sublinhagem (ABADIA et al., 2009; BALCELLS et al., 2015; CANDIA et al., 2007; CEREZO et al., 2012; DANTAS et al., 2015; HUBER et al., 2014; FLORES-LÓPEZ et al., 2017; MONTESERIN et al., 2013; NOGUTI et al., 2010; OELEMANN et al., 2011; SOARES et al., 2013; TAYPE et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014; VON GROLL et al., 2010). Ademais, não encontramos neste estudo isolados relacionados a *cluster* (24 loci MIRU-VNTR) com perfil semelhante a LAM.

A sublinhagem X ocorre principalmente nas Américas, e em menores proporções em alguns países da África do Sul, Ásia e Europa (STUCKI et al., 2016). A ocorrência de isolados semelhantes ao perfil desta sublinhagem foram observados neste estudo e dentre eles o *cluster* D2. A presença desta família foi descrita em dois estudos de epidemiologia molecular brasileiros relacionados a casos de TB em presídios, um no Rio Grande do Sul (3%) e o outro no Rio de Janeiro (5,7%) (HUBER et al., 2014; KUHLEIS et al., 2012). Todavia, menores frequências desta sublinhagens foram observadas.

Os primeiros isolados de Mtb da sublinhagem Beijing no Brasil foram descritos em 2002 e em apenas 0,8% dos isolados avaliados (GOMES et al., 2011). Após este estudo sua presença tem sido descrita em pesquisas conduzidas no Rio de Janeiro (0,54% e 0,45%) e São Paulo (0,95%) mantendo um perfil semelhante ao encontrado por Gomes et al. (2011)

(OELEMANN et al., 2011; VASCONCELLOS et al., 2014; MARTINS et al., 2013). Acredita-se que esta linhagem possua vantagens adaptativas contra as defesas do hospedeiro e ao tratamento medicamentoso, estando ligada a elevadas taxas de mutação, hipervirulência e até mesmo uma progressão mais rápida da doença (CASALI et al., 2012; JONG et al., 2008; FORD et al., 2013; GLYNN et al., 2002; PARWATI; VAN CREVEL; VAN SOOLINGEN, 2010). A sublinhagem Beijing (Linhagem 2), foi associada ao perfil de 10% dos isolados genotipados. Além disso, os isolados relacionados a esta sublinhagem foram obtidos de pacientes de apenas duas unidades prisionais avaliadas (PFDB e PJALLB). Até o nosso conhecimento nenhum estudo conduzido na região nordeste detectou esta sublinhagem entre seus isolados.

No que diz respeito à tuberculose drogarresistente (TB DR), apenas um caso foi observado (1636/16 R PJALLB) neste estudo e a genotipagem revelou que este isolado está mais próximo das sublinhagens X e Haarlem. As linhagens LAM e Haarlem no Brasil estão mais associadas a casos de MDR (PERRIZZOLO et al., 2012; MENDES et al., 2011). A tuberculose drogarresistente na população brasileira de forma geral é encontrada em baixa porcentagem (0,77%) (BOLETIM, 2019). Todavia, alguns estudos de epidemiologia molecular conduzidos na população encarcerada têm notado uma maior frequência de resistência, que varia aproximadamente entre 6% a 23% dos casos avaliados (SANCHEZ et al., 2011; KUHLIS et al., 2012; VALENÇA et al., 2015; REIS et al., 2015). O único isolado clínico multirresistente (1636/16 R PJALLB) não foi encontrado no banco de notificação de casos de TB no SINAN. Provavelmente, este paciente foi notificado no Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose (SITE TB), no qual não tivemos acesso.

A baixa prevalência de TBDR evidenciada no nosso estudo pode ser reflexo do maior número de casos novos encontrados, da própria incidência baixa da TBDR no estado de Pernambuco e da falta do diagnóstico específico, uma vez que, os testes de sensibilidade as drogas anti-TB foram realizados em uma pequena parcela dos casos de TB notificados no período avaliado.

Neste estudo também avaliamos a presença de *clusters* entre os isolados de Mtb dos três presídios, ou seja, a presença de isolados de Mtb com mesmo perfil genotípico. Como esperado, a identificação dos *clusters* variou de acordo com o número de loci MIRU-VNTR avaliados, sendo obtido um maior número de *clusters* com análise de 15 loci (32,8%) do que o observado com 24 loci (23%), resultado este esperado por ter um elevado poder discriminatório. Fato que contrasta com o encontrado em outros estudos brasileiros no ambiente prisional. A proporção de *clusters* encontrada foi bem mais elevada, variando de aproximadamente 58% a 87% entre os isolados avaliados. Entretanto, as técnicas utilizadas em outros trabalhos (Spoligotyping,

RFLP-IS6110, MIRU-VNTR 12 loci) possuem um menor poder discriminatório do que a utilizada no nosso estudo (0,9694) (SANCHEZ et al., 2012; KUHLEIS et al., 2012; HUBER et al.; 2012; VALENÇA et al., 2015; SACCHI et al., 2015; REIS et al., 2016). Por sua vez, Medeiros et. Al. (2018) utilizando a associação das técnicas MIRU-VNTR (12 loci) e o *Spoligotyping*, observou uma taxa de clusterização de 36,8%, próxima a encontrada no nosso estudo quando avaliamos os 15 loci MIRU-VNTR.

Notou-se que o maior *cluster* encontrado na avaliação dos 24 loci (B2) circula tanto entre os casos novos como em pacientes com recidiva, sugerindo que esta cepa possa estar sendo transmitida entre as unidades prisionais anteriormente ao período avaliado, uma vez que foi detectada em pacientes com recidiva diagnosticados no começo de 2015. No entanto, a partir dos dados disponíveis neste estudo não é possível definir se estes casos de estão associados a reinfeção exógena ou à recidiva do caso inicial.

As infecções mistas têm sido descritas na literatura com mais frequência devido aos avanços das técnicas utilizadas em estudos de epidemiologia molecular. Estes casos representam um dos grandes desafios para o controle da tuberculose (TB). Neste estudo, dez isolados (14,2%) possuíam um perfil alélico misto para um mesmo locus MIRU-VNTR, onde sete isolados foram considerados como infecções mista e três como variação clonal. Embora diferentes métodos de genotipagem possam ser empregados para a detecção de infecção mista em amostras clínicas, a MIRU-VNTR entre os isolados de *Mtb* avaliados demonstrou ser sensível e com bom poder discriminatório. Além disso, um excelente custo benefício é atribuído a esta técnica quando comparada a outras sobretudo pela rapidez e alto poder discriminatório (COHEN et al., 2012; HUYEN et al., 2013).

Os pacientes que apresentam infecções por cepas *Mtb* distintas estão mais propensos à falha terapêutica, pois, podem apresentar perfis de sensibilidade distintos (ZETOLA, 2014; ZHENG, 2015; COHEN et al., 2016; TARASHI et al., 2017). Estes casos podem estar associados a uma nova infecção com cepa distinta ou a recidiva da doença, o que é comum em ambientes confinados como as prisões. Corroborando com este fato, dentre os isolados avaliados neste estudo, um (4453/15 PAMFA) estava associado a um perfil genotípico característico de infecção mista e era um caso de recidiva da doença.

Em áreas endêmicas para a doença como o Brasil, a reinfeção é a principal causa das taxas de recorrência observadas (HIJAR et al., 2005). A recorrência da TB pode ser atribuída à reativação endógena (recidiva) de uma infecção original ou infecção via exógena (reinfecção) por uma nova cepa *Mtb* (GUERRA-ASSUNÇÃO et al., 2015; SCHIROLI et al., 2015; VIEIRA; LEITE; ADREONI, 2017). Devido à proporção de casos de recidiva encontradas

neste estudo foi analisado sua associação a linhagem relacionada ao isolado de Mtb de cada caso e a presença de *cluster*. As sublinhagens observadas entre os casos de recidiva foram a Haarlem, Beijing e LAM.

Os isolados do *cluster* B2, associados a esse tipo de entrada e pertencentes a linhagem Haarlem, podem apontar na verdade a ocorrência de uma reinfecção exógena e não um caso de recidiva. Corroborando com esta hipótese um dos isolados deste cluster (1753/15 PFDB) estava relacionado a um paciente também infectado com HIV. Já foi descrito na literatura que em situações de co-infecção TB/HIV, a recorrência da tuberculose está mais associada a reinfecção exógena do que a recidiva (MIDDELKOOP, 2014; GUERRA-ASSUNÇÃO et al., 2015). Por fim, três cepas Beijing foram associadas a esse desfecho. Diversos estudos têm mostrado uma alta correlação entre a ocorrência de recidiva da TB e a sublinhagem Beijing (BURMAN et al., 2009; HUYEN et al., 2013).

Na literatura, as sublinhagens Haarlem e Beijing tem sido associada a grandes surtos tuberculose, deste modo, demonstrando sua contribuição na disseminação global da TB (BRITES; GAGNEUX, 2017). Portanto, a elevada presença destas duas famílias entre os isolados de Mtb circulantes no Complexo Prisional Aníbal Bruno é preocupante. Demonstra ainda a importância da identificação das estirpes predominantes através do monitoramento epidemiológico e molecular nos ambientes prisionais, o que pode auxiliar em medidas específicas de controle da doença na PPL. Além disso, notamos que os isolados relacionados a pacientes/detentos da unidade prisional PJALLB apresentaram perfis genéticos mais diversos em relação as outras unidades avaliadas.

No presente estudo devem ser considerados algumas limitações. A falta de investigação dos contatos intracela relacionados aos pacientes com isolados de Mtb genotipados, limitou a capacidade de estabelecer os *links* epidemiológicos, a impossibilidade de realizar o rastreamento de cada paciente e a grande mobilidade dessa população. A falta de informações sobre a movimentação destes prisioneiros entre as três unidades avaliadas também foi um fator limitante, ou seja, podemos apenas sugerir a interação entre os casos relacionados aos isolados pertencentes aos *clusters* encontrados neste estudo. Não pode ser esquecido a ocorrência de inconsistências entre as informações clínicas, epidemiológicas e demográficas encontradas entre os bancos de dados avaliados (GAL e SINAN). Apesar de terem sido tipados 70 isolados clínicos apenas os dados de 45 casos foram encontrados no banco do SINAN. Por outro lado, podem ter ocorrido erros de digitação, que impossibilitaram a localização destes pacientes no banco de notificação.

Esse estudo enfatiza a necessidade de melhorar o entendimento epidemiológico, incluindo melhores descrições da epidemiologia molecular e dinâmica de transmissão do Mtb no sistema prisional como uma prioridade de saúde pública no Brasil.

10 CONCLUSÃO

Esse foi o primeiro estudo de epidemiologia molecular da tuberculose em unidades prisionais da cidade do Recife. A análise dos padrões obtidos através da técnica MIRU-VNTR nos permitiu concluir que a tipagem por MIRU-VNTR é uma ferramenta útil para o estudo da diversidade genética dos isolados clínicos de Mtb. Foram observados genótipos e linhagens diversas entre as estirpes causadoras da TB na PPL das unidades prisionais do Complexo Prisional Aníbal Bruno. A baixa taxa de clusterização entre os isolados sugere que a fonte de infecção na maioria dos casos provavelmente não é comum, sendo a reativação de uma infecção latente a possível explicação. A técnica utilizada foi capaz de detectar as infecções mistas, fato que pode facilitar o manejo do tratamento específico. Portanto, as análises genotípicas dos casos de tuberculose podem fornecer subsídios para os órgãos gestores de saúde elaborarem programas preventivos e de controle da tuberculose específicos para o ambiente carcerário. Todavia, futuros estudos temporais da epidemiologia molecular em Recife são necessários para avaliar a dinâmica da transmissão do *M. tuberculosis* entre as unidades prisionais e a comunidade, além de relacionar os fatores de risco associados ao surgimento da TB.

REFERÊNCIAS

- ABADÍA, E. et al. *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. **BMC infectious diseases**, London, v. 9, n. 1, p. 122, 6 ago. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-122>. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-9-122>>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- ACEBES, C. M. **A crise do sistema prisional do estado de Pernambuco**. Disponível em: <https://www.hrw.org/pt/report/2015/10/19/282335/>>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- ALI, S. et al. Drug resistance and population structure of *M. tuberculosis* isolates from prisons and communities in Ethiopia. **BMC infectious diseases**, London v. 16, n. 1, p. 1-10, 21 Nov. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-2041-x>. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12879-016-2041-x>>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- ALLEN, R. **Global Prison Trends 2015**. 2015. Disponível em: <https://cdn.penalreform.org/wp-content/uploads/2015/04/PRI-Prisons-global-trends-report-LR.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2018.
- ALLIX-BÉGUEC, C.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; SUPPLY, P. Three-Year Population-Based Evaluation of Standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 1398-1406, Apr. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02089-07>. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/jcm/46/4/1398.full.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- ALMEIDA, P.; PALOMINO, J. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 66, n. 7, p.1417-1430, 9 maio 2011. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr173>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/66/7/1417/786529>>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- ALSDURF, H. et al. The cascade of care in diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 11, p.1269-1278, nov. 2016. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(16\)30216-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(16)30216-x). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330991630216X?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- ANDREA, C. et al. Active and latent tuberculosis in Brazilian correctional facilities: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, London, p. 1 – 8. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-0764-8>. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-0764-8>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

ASANTE-POKU, A. et al. Evaluation of Customised Lineage-Specific Sets of MIRU-VNTR Loci for Genotyping *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in Ghana. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, 25 Mar. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092675>. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0092675>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BALCELLS, M. E. et al. A First Insight on the Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Complex as Studied by Spoligotyping and MIRU-VNTRs in Santiago, Chile. **PLoS One**, San Francisco, ano 2015, v. 10, n. 2, p. e0118007, 11 fev. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118007>. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0118007&type=printable>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BAPTISTA, I. et al. Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p.1147-1152, dez. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762002000800015>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000800015&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 02 dez. 2017.

BARBERIS, I.; BRAGAZZI, N.I.; GALLUZZO, L.; MARTINI, M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene: J Prev Med Hyg**, Pisa, v. 58, n. 1, p.E9 - E12, mar. 2017.

BERG, R. D.; RAMAKRISHNAN, L. Insights into tuberculosis from the zebrafish model. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 18, n. 12, p.689-690, dez. 2012. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2012.10.002>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432783/pdf/2421-4248-58-E9.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

BIDOVEC-STOJKOVIC, U.; ZOLNIR-DOVC, M.; SUPPLY, P. One year nationwide evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping on Slovenian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Respiratory Medicine**, London, p. 67-73, set. 2011. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0954-6111\(11\)70014-2](https://doi.org/10.1016/S0954-6111(11)70014-2). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0954611111700142?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 46, n. 9, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/22/Boletim-raca-cor-09-04-15-v2.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 49, n. 11, 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/26/2018-009.pdf>>. Acesso em: 02 maio. 2018.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, v. 50, n. 9, 2019.

Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/22/2019-009.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

BORITSCH, E. C. et al. Key experimental evidence of chromosomal DNA transfer among selected tuberculosis-causing mycobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 113, n. 35, p.9876-9881, 15 ago. 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1604921113>. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/pnas/113/35/9876.full.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2017.

BOS, K. I. et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. **Nature**, London, v. 514, p. 494-497, 23 out. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13591>. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature13591.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BOURDILLON, P. et al. Increase in Tuberculosis Cases among Prisoners, Brazil, 2009–2014. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.23, n.3, p. 496-499. mar. 2017. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2303.161006>. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/3/16-1006_article>. Acesso em: 02 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Justiça e Segurança Pública. Departamento Penitenciário Nacional. **Levantamento Nacional de Informações Penitenciárias Atualização - Junho de 2017**. Organização Marcos Vinícius Moura Silva. Brasília: Ministério da Justiça e Segurança Pública, Departamento Penitenciário Nacional, 2019. Disponível em: <http://depen.gov.br/DEPEN/noticias-1/noticias/infopen-levantamento-nacional-de-informacoes-penitenciarias-2016/relatorio_2016_22111.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.

CONSELHO NACIONAL DE JUSTIÇA (Brasil). **Dados das Inspeções nos estabelecimentos Penais**. Brasília: CNJ, 2014. Disponível em: <http://www.cnj.jus.br/inspecao_penal/mapa.php>. Acesso em: 5 fev. 2018.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. Strain Variation in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, p.1-26, 2017. Springer International Publishing. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7>.

BURMAN, W. J. et al. Relapse Associated with Active Disease Caused by Beijing Strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 7, p.1061-1067, jul. 2009. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1507.081253>. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/7/08-1253_article>. Acesso em: 20 jan. 2019.

BUSATTO, C. et al. Tuberculose ativa versus Tuberculose Latente: uma revisão de literatura. **Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 4, n. 3, p.60-64, set. 2015. Disponível em: <<http://jic-abih.com.br/index.php/jic/article/view/116/pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

CÁCERES, O. et al. Characterization of the Genetic Diversity of Extensively-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Peru. **PLoS ONE**, San Francisco, ano 2016, v. 9, n. 12, p. 1-22, 9 dez. 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112789>.

CAMBAU, E.; DRANCOURT, M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 20, n. 3, p.196-201, mar. 2014. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12555>.

CAMUS, J. et al. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Microbiology**, [s.l.], v. 148, n. 10, p.2967-2973, 1 out. 2002. Microbiology Society. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-148-10-2967>.

CANDIA, N. et al. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. **BMC Microbiology**, London, v. 7, n. 1, p.75-84, 2007. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-7-75>.

CANNAS, A. et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains: a fundamental tool for tuberculosis control and elimination. **Infectious Disease Reports**, Pavia, v. 8, n. 2, p.38-42, 24 jun. 2016. PAGEPress Publications. DOI: <http://dx.doi.org/10.4081/idr.2016.6567>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4927935/pdf/idr-2016-2-6567.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2018.

CARROLL, L. N. et al. Visualization and analytics tools for infectious disease epidemiology: A systematic review. **Journal of Biomedical Informatics**, San Diego, v. 51, p.287-298, out. 2014. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbi.2014.04.006>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5734643/pdf/nihms-587381.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2018.

CASALI, N. et al. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. **Genome Research**, New York, v. 22, n. 4, p.735-745, 31 jan. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.128678.111>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317155/pdf/735.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2017.

CEREZO, I. et al. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p.657-663, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134811002607?via%3Dihub>. Acesso em: 10 nov. 2017.

CHAISSON, R. E.; BISHAI, W. R. Overview of Tuberculosis. **Handbook of Tuberculosis**, [s.l.], p.1-15, mar. 2017. Springer International Publishing. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-26273-4>.

CORTE INTERAMERICANA DE DIREITOS HUMANOS. **Resolução, 15 de novembro de 2017**. Medidas Provisórias a respeito da República Federativa do Brasil. [Brasília, 2017].

Assunto do Complexo Penitenciário de Curado. Disponível em:

<http://www.corteidh.or.cr/docs/medidas/curado_se_05_por.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2018.

CLEMENTINO, F. et al. Tuberculosis Control Actions: Analysis Based on The Access and Primary Health Care Quality Improvement Program. **Texto & Contexto - Enfermagem**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.1-9, 2016. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0104-07072016004660015>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/tce/v25n4/0104-0707-tce-25-04-4660015.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

COHEN, T. et al. Mixed-Strain *Mycobacterium tuberculosis* Infections and the Implications for Tuberculosis Treatment and Control. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 25, n. 4, p.708-719, 1 out. 2012. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00021-12>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3485752/pdf/zcm708.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

COHEN, T. et al. Mixed-Strain *Mycobacterium tuberculosis* Infections among Patients Dying in a Hospital in KwaZulu-Natal, South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 1, p.385-388, 27 out. 2010. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01378-10>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3020455/pdf/1378-10.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

COHEN, T. et al. Within-Host Heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* Infection Is Associated With Poor Early Treatment Response: A Prospective Cohort Study. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 213, n. 11, p.1796-1799, 14 jan. 2016. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw014>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4857469/pdf/jiw014.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2018.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, London, v. 393, n. 6685, p.537-544, jun. 1998. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/31159>.

COLL, F et al. Genome-wide analysis of multi- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Genetics**, New York, v. 50, n. 2, p.307-316, 22 jan. 2018. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-017-0029-0>.

COMAS, I et al. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. **Nature Genetics**, New York, v. 42, n. 6, p.498-503, 23 maio 2010. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.590>.

COMAS, I. et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nature Genetics**, New York, v. 45, n. 10, p.1176-1182, 1 set. 2013. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2744>.

COSCOLLA, M. et al. *M. tuberculosis* T Cell Epitope Analysis Reveals Paucity of Antigenic Variation and Identifies Rare Variable TB Antigens. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 18, n. 5, p.538-548, nov. 2015. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.008>. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758912/pdf/nihms-730292.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

COSTA, R.; SILVA, M.; GONÇALVES, I. Diagnóstico laboratorial da tuberculose: Revisão de literatura. **Rev Med Minas Gerais**, Belo Horizonte, ano 2018, v. 28, n. 5, p. 197-206.

Disponível em:

<<http://periodicos.unievangelica.edu.br/index.php/refacer/article/view/3411/2406>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

DANIEL, T. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, London, v. 100, n. 11, p.1862-1870, nov. 2006. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>.

DANTAS, N. et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 15, n. 1, p.1-11, 1 ago. 2015. Springer Nature. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1057-y>. Disponível em:

<<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-015-1057-y>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

DAVID, S. et al. Update on the Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the Fernando Fonseca Hospital (Amadora-Sintra, Portugal). **Rev Port Pneumol**, Lisboa, ano 2005, v. 11, n. 6, p. 513-531, 1 dez. 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0873-2159\(15\)30526-2](https://doi.org/10.1016/S0873-2159(15)30526-2). Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0873215915305262?via%3Dihub>>.

Acesso em: 10 jan. 2019.

DEMAY C et al. SITVITWEB—a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**. 2012. June;12(4):755–66. DOI:

<https://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.004>. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134812000317?via%3Dihub>>.

Acesso em: 18 fev. 2018.

DOLAN, K. et al. Global burden of HIV, viral hepatitis, and tuberculosis in prisoners and detainees. **The Lancet**, London, v. 388, n. 10049, p.1089-1102, set. 2016. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30466-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30466-4). Disponível em:

<[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)30466-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)30466-4/fulltext)>.

Acesso em: 18 fev, 2018.

DUARTE, R. et al. Tuberculosis, social determinants and co-morbidities (including HIV).

Revista Portuguesa de Pneumologia (english Edition), [s.l.], p.1-5, dez. 2017. Elsevier BV.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.11.003>. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2173511517301641?via%3Dihub>>.

Acesso em: 24 jan. 2018.

DUNN, J. J.; STARKE, J. R.; REVELL, P. A. Laboratory Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Disease in Children. **Journal of Clinical Microbiology**,

Washington, v. 54, n. 6, p.1434-1441, 16 mar. 2016. American Society for Microbiology.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.03043-15>. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879301/pdf/zjm1434.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

EI, P. W. et al. Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a Review of Frequently Used Methods. **Journal of Korean Medical Science**, Seoul, v. 31, n. 11, p.1673-1683, 2016. Korean Academy of Medical Sciences (KAMJE). DOI: <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2016.31.11.1673>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5056196/pdf/jkms-31-1673.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

EYBPOOSH, S. et al. Molecular epidemiology of infectious diseases. **Electronic Physician**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.5149-5158, 25 ago. 2017. Mehr Publishing Group. DOI? <http://dx.doi.org/10.19082/5149>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5614305/pdf/epj-09-5149.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2018.

FERNANDES, P. *et al.* Sex and age differences in *Mycobacterium tuberculosis* infection in Brazil. **Epidemiol Infect**, Cambridge, ano 2019, v. 146, n. 12, p. 1503–1510, 1 mar. 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.1017/S0950268818001450>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6092217/pdf/nihms967473.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

FLORES-LÓPEZ, C. A. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Baja California, Mexico: A result of human migration? **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 55, p.378-383, nov. 2017. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.001>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134816302799?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

FORBES, B. A. et al. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 31, n. 2, p.1-66, 31 jan. 2018. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00038-17>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5967691/>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

FORD, C. B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. **Nature Genetics**, New York, v. 45, n. 7, p.784-790, 9 jun. 2013. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2656>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3777616/pdf/nihms477333.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

FREITAS, R. S., ZERMIANI, T. C., NIEVOLA, M. T. S., NASSER, J. N., DITTERICH, R. G. Política nacional de atenção integral á saúde das pessoas privadas de liberdade no sistema prisional: uma análise do seu processo de formulação e implantação. **Revista de Políticas Públicas**, v. 20, n. 1, 171-184.

GAGNEUX, S. et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, Wahington, v. 103, n. 8, p.2869-2873, 13 fev. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0511240103>. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1413851/pdf/pnas-0511240103.pdf>>.
Acesso em: 20 fev. 2018.

GLAZIOU, P. et al. Global Epidemiology of Tuberculosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 34, n. 01, p.003-016, 4 mar. 2013. Georg Thieme Verlag KG. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1333467>.

GLYNN, J. R. et al. Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 8, p.843-849, ago. 2002. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid0805.020002>. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12141971/>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

GOMES, H. et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p.649-656, jun. 2012. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.027>. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134811003078?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

GUERRA-ASSUNÇÃO, J. A. et al. Recurrence due to Relapse or Reinfection With *Mycobacterium tuberculosis*: A Whole-Genome Sequencing Approach in a Large, Population-Based Cohort With a High HIV Infection Prevalence and Active Follow-up. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 211, n. 7, p.1154-1163, 21 out. 2014. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu574>. Disponível em:
<<https://academic.oup.com/jid/article/211/7/1154/2910506>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

HIJJAR, M. A. et al. Epidemiologia da tuberculose: importância no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p.310-314, 2005.

HUBER, D. et al. Insights into the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* using spoligotyping and RDRio in a southeastern Brazilian prison unit. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 26, p.194-202, ago. 2014. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.031>. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134814002007?via%3Dihub>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

HUYEN, M. N. T. et al. Tuberculosis Relapse in Vietnam is Significantly Associated with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 207, n. 10, p.1516-1524, 13 fev. 2013. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit048>. Disponível em:
<<https://academic.oup.com/jid/article/207/10/1516/829366>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

IKETLENG, T. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Next-Generation Whole Genome Sequencing: Opportunities and Challenges. **Tuberculosis Research and Treatment**, Cairo, v. 2018, p.1-8, 9 dez. 2018. Hindawi Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/1298542>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6304523/pdf/TRT2018-1298542.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

JAGIELSKI, T. et al. Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 29, n. 2, p.239-290, 24 fev. 2016. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00055-15>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC26912567/>. Acesso em: 12 nov. 2017.

JONG, B. C. et al. Progression to Active Tuberculosis, but not Transmission, Varies by *Mycobacterium tuberculosis* Lineage in the Gambia. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 198, n. 7, p.1037-1043, out. 2008. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/591504>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18702608/>. Acesso em: 17 fev. 2019.

JONG, B. C.; ANTONIO, M.; GAGNEUX, S. *Mycobacterium africanum*—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 9, p.1-9, 28 set. 2010. Public Library of Science (PLoS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000744>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000744>. Acesso em: 20 nov. 2017.

KUHLEIS, Daniele et al. Tuberculosis in a southern Brazilian prison. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 7, p.909-915, nov. 2012. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762012000700012>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000700012. Acesso em: 03 maio 2017.

LAMICHHANE, Shree Ram; MILIC, Natalie. *Mycobacterium tuberculosis*: GENE AND GENOME ANALYSIS. **Asian Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p.24-33, mar. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Shree_Lamichhane/publication/325710335_Mycobacterium_tuberculosis_Gene_and_Genome_analysis/links/5b710378a6fdcc87df733c2a/Mycobacterium-tuberculosis-Gene-and-Genome-analysis.pdf. Acesso em: 15 jun. 2018.

LAROUZÉ, Bernard et al. Tuberculose nos presídios brasileiros: entre a responsabilização estatal e a dupla penalização dos detentos. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.1127-1130, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311xpe010615>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2015000601127. Acesso em: 20 fev. 2018.

LEE, Robyn S. et al. Population genomics of *Mycobacterium tuberculosis* in the Inuit. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, Washington, v. 112, n. 44, p.13609-13614, 19 out. 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1507071112>.

LEE, Wonsik et al. Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* Exploits Host-derived Fatty Acids to Limit Metabolic Stress. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 288, n. 10, p.6788-6800, 10 jan. 2013. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.445056>.

LIRA, Silvana. **Ações Contingenciais para o enfrentamento da Tuberculose na População Privada de Liberdade. Recife/PE.** Disponível em:

<https://www.seminariosvs.saude.pe.gov.br/sites/default/files/acoes_de_enfrentamento_da_tuberculose_na_populacao_privada_de_liberdade.pdf/>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2019.

LÓPEZ B. et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 133, n. 1, p.30-37, jul. 2003. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02171.x>.

MACEDO, L. R. et al. Tuberculosis in the Brazilian imprisoned population, 2007-2013. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada: Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, ano 2017, v. 26, n. 4, p. 783-794, 1 out. 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742017000400010>.

MALAGHINI, M. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the State of Parana in southern Brazil. **Tuberculosis (Edinb.)**, Edinburgh, v. 89, n. 1, p.101-105, jan. 2009. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2008.07.005>.

MARTINS, M. C. et al. Population structure and circulating genotypes of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in São Paulo state, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 14, p.39-45, mar. 2013. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.015>.

MATHEMA, B. et al. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 4, p.658-685, 1 out. 2006. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00061-05>.

MCNERNEY, R. et al. Removing the bottleneck in whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for rapid drug resistance analysis: a call to action. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 56, p.130-135, mar. 2017. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.422.x>

MENDES, N. H. et al. Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil. **BMC Research Notes**, London, v. 4, n. 1, p.1-8, 29 jul. 2011. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-4-269>.

MEDEIROS, T. F. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains from prison populations in Santa Catarina, Southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 58, p.34-39, mar. 2018. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.010>.

MERKER, M. et al. The Evolution of Strain Typing in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, p.43-78, 2017. Springer International Publishing. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7_3.

MIDDELKOOP, K. et al. Transmission of Tuberculosis in a South African Community with a High Prevalence of HIV Infection. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 211, n. 1, p.53-61, 22 jul. 2014. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu403>.

MIRANDA, S. et al. Spoligotyping of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p.267-273, maio 2011. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762011000300003>.

MONTESERIN, J. et al. Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in patients at risk of drug resistance in Bolivia. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, ano 2013, v. 17, p. 195-201, 17 abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.010>.

MORÁN-MENDOZA, O. et al. Risk factors for developing tuberculosis: a 12-year follow-up of contacts of tuberculosis cases. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, p.1112-1119, 1 mar. 2010. Disponível em: <http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/iatld/10273719/v14n9/s8.pdf?expires=1568221836&id=0000&titleid=3764&checksum=867E4C08D654E88942D0A39883EB8437>. Acesso em: 10 dez. 2019.

MUKHOPADHYAY, S.; BALAJI, K. N. The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Endinb)**, Endinburgh, v. 91, n. 5, p.441-447, set. 2011. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2011.04.004>.

MULENGA, C. et al. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes circulating in Ndola, Zambia. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 10, n. 1, p.177, 17 jun. 2010. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-177>.

MUNAYCO, C. et al. Social determinants and inequalities in tuberculosis incidence in Latin America and the Caribbean. **Rev. Panam. Salud Publica**, Washington, v. 38, n. 3, p.177-85. Set. 2015. Disponível em: <https://www.scielosp.org/article/rpsp/2015.v38n3/177-185/en/>. Acesso em: 10 maio 2018.

MURRAY, J. F.; SCHRAUFNAGEL, D. E.; HOPEWELL, P. C. Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. **Annals of the American Thoracic Society**, New York, v. 12, n. 12, p.1749-1759, dez. 2015. American Thoracic Society. DOI: <http://dx.doi.org/10.1513/annalsats.201509-632ps>.

NAVARRO, P. et al. Prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in Prisoners. **J Bras Pneumol**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 348-355, 31 jul. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37562016000000001>.

NIKOLAYEVSKYY, V. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review. **Tuberculosis (Endib)**, Endinburgh, v. 98, p.77-85, maio 2016. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2016.02.009>.

NOGUEIRA, A. F. et al. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Revista Brasileira de Farmácia**, [s. l.], v. 93, n. 1, p.3-9, dez. 2012. Disponível em: <http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2012-93-1-1.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2017.

NOGUTI, E. N. et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo**

Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p.779-785, set. 2010. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762010000600008>.

OELEMANN, M. et al. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Community Health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p.455-462, 3 maio 2007. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762007005000034>.

OELEMANN, M. C. et al. The Forest behind the Tree: Phylogenetic Exploration of a Dominant *Mycobacterium tuberculosis* Strain Lineage from a High Tuberculosis Burden Country. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 3, p.1-10, 25 mar. 2011. Public Library of Science (PLoS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018256>.

O'GARRA, A. et al. The Immune Response in Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 31, n. 1, p.475-527, 21 mar. 2013. Annual Reviews. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>.

ORDUZ, M.; RIBÓN, W. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. **Tuberculosis - Expanding Knowledge**, [s.l.], p.41-64, 8 jul. 2015. InTech. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/59751>.

PAHO. **Tuberculosis in the Americas**. Washington, D.C.: PAHO, 2018. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49510>>. Acesso: 27 set. 2018.

PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, London, v. 2, p.1-23, 27 out. 2016. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>.

PAIÃO, D. et al. Impact of mass-screening on tuberculosis incidence in a prospective cohort of Brazilian prisoners. **BMC Infectious Diseases**, London, p. 1-16, 3 out. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1868-5>.

PARSONS, L. et al. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 2, p.314-350, 1 abr. 2011. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00059-10>.

PARWATI, I.; VAN CREVEL, R.; VAN SOOLINGEN, D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 10, n. 2, p.103-111, fev. 2010. Elsevier BV. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70330-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70330-5).

PEDRAZZOLI, D. et al. Modelling the social and structural determinants of tuberculosis: opportunities and challenges. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 21, n. 9, p.957-964, 1 set. 2017. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. DOI: <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.16.0906>.

PEPPERELL, C. et al. The Role of Selection in Shaping Diversity of Natural *M. tuberculosis* Populations. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 8, 15 ago. 2013. Public Library of Science (PLoS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003543>.

PERIZZOLO, P. F. et al. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. **Tuberculosis (Edinb)**, Edinburgh, v. 92, n. 1, p.56-59, jan. 2012. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2011.09.008>.

PINTO, M. F. T. et al. Impacto orçamentário da incorporação do GeneXpert MTB/RIF para o diagnóstico da tuberculose pulmonar na perspectiva do Sistema Único de Saúde, Brasil, 2013-2017. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 33, n. 9, p.1-13, 9 out. 2017. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00214515>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v33n9/1678-4464-csp-33-09-e00214515.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2018.

QUISSELL, K.; WALT, G. The challenge of sustaining effectiveness over time: the case of the global network to stop tuberculosis. **Health Policy and Planning**, Oxford, v. 31, n. 1, p.17-32, 17 ago. 2015. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/heapol/czv035>.

RABAHI, M. F. et al. Tuberculosis treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 43, n. 6, p.472-486, dez. 2017. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37562016000000388>.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 12, n. 5, p.352-366, 20 abr. 2012. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3211>.

REALPE, T. et al. Population Structure among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Colombia. **PLoS ONE**, San Francisco, ano 2014, v. 9, n. 4, p. e93848, 18 abr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093848>.

REIS, A. *et al.* Recent transmission of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a prison population in southern Brazil. **Jornal Brasileiro Pneumologia**, Brasília, p. 286-289, 19 jun. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37562016000000023>.

ROCHA, J. *et al.* Respiratory symptoms and active tuberculosis in a prison in Southern Brazil: Associated epidemiologic variables. **Rev Epidemiol Control Infect.**, [S. l.], v. 3, n. 4. 128-133, dez. 2016.

ROETZER, Andreas et al. Whole Genome Sequencing versus Traditional Genotyping for Investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* Outbreak: A Longitudinal Molecular Epidemiological Study. **Plos Medicine**, San Francisco, v. 10, n. 2, p.1-12, 12 fev. 2013. Public Library of Science (PLoS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001387>

RYU, Yon Ju. Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Recent Advances and Diagnostic Algorithms. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, Seoul-si, v. 78, n. 2, p.64-71, 2015. The Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases (KAMJE). DOI: <http://dx.doi.org/10.4046/trd.2015.78.2.64>.

SACCHI, F. et al. Prisons as Reservoir for Community Transmission of Tuberculosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 3, p.452-455, mar. 2015. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2103.140896>.

SALES, C. et al. Tuberculose e a questão social: uma revisão sistemática de estudos brasileiros. **Revista Brasileira Pesquisa e Saúde**, Vitória, v. 4, n. 17, p.156-175, out. 2015. DOI: <https://doi.org/10.21722/rbps.v17i4.14342>.

SÁNCHEZ, A. et al. Extensive *Mycobacterium tuberculosis* circulation in a highly endemic prison and the need for urgent environmental interventions. **Epidemiol. Infect**, Cambridge, p. 853–1861, 12 dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268811002536>.

SCHIROLI, Consuelo et al. Exogenous reinfection of tuberculosis in a low-burden area. **Infection**, München, v. 43, n. 6, p.647-653, 10 mar. 2015. Springer Nature. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-015-0759-9>.

SCHITO, M. et al. Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 61, n. 3, p.102-118, 25 set. 2015. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ609>.

SCHMITT, H. B. B. et al. Evolução do sistema prisional no Brasil. In: SCHMITT, H. B. B. et al. **Políticas Públicas e atenção a saúde das pessoas privadas de liberdade**. 1. ed. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2014. p. 7-25.

SCHÜRCH, A. C.; VAN SOOLINGEN, D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: From phage typing to whole-genome sequencing. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p.602-609, jun. 2012. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.032>.

SELANDER R. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 5, p. 873-884, maio 1986.

SOARES, R. O. et al. *Mycobacterium tuberculosis* belonging to family LAM and sublineage RD Rio: common strains in Southern Brazil for over 10 years. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 4, p.1251-1255, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822013000400032>.

SOLA, C. et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, p. 125–133, 13 fev. 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713480300011X?via%3Dihub>. Acesso em: 10 fev. 2018.

STUCKI, D. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. **Nature Genetics**, New York, 1 dez. 2016, v. 48, n. 12, p. 1535–1543. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/ng.3704>.

SUPPLY, P. et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 12, p.4498-4510, 27 set. 2006. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01392-06>.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 3, p.762-771, 18 jan. 2002. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x>.

TARASHI, S. et al. Mixed infections in tuberculosis: The missing part in a puzzle. **Tuberculosis (Edinb)**, Edinburgh, v. 107, p.168-174, dez. 2017. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2017.09.004>.

TAYPE, C. et al. Genetic diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p.577-585, abr. 2012. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.002>.

TELAROLLI, R.; LOFFREDO, L. Epidemiological characterization of patients at a tuberculosis hospital in the state of São Paulo, Brazil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, ano 2015, v. 36, n. 1, p. 149-152, 1 mar. 2019. Disponível em: <<http://seer.fcfar.unesp.br/rcfba/index.php/rcfba/article/view/222/130>>. Acesso em: 12 abr. 2019.

VALENÇA, M. S. et al. Prevalence of tuberculosis in prisons: risk factors and molecular epidemiology. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, Paris, p. 1182-1187, 5 maio 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.15.0126>.

VAN EMBDEN, JAN D. A. et al. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 4, p. 406-409, fev. 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC262774/pdf/jcm00014-0246.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

VAN SOOLINGEN, D. et al. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 11, p.2578-2586, nov. 1991. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/jcm/29/11/2578.full.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

VASCONCELLOS, S. et al. Strain Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Brazil Based on Genotypes Obtained by Spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing and the Presence of Large Sequence and Single Nucleotide Polymorphism. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e107747, 14 out. 2014. Public Library of Science (PLoS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107747>.

VIANA, P.; GONÇALVES, M.; BASTA, P. Ethnic and Racial Inequalities in Notified Cases of Tuberculosis in Brazil. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 5, 13 maio 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154658>

VIEIRA, A.; LEITE, D.; ADREONI, S. Tuberculosis recurrence in a priority city in the state of São Paulo, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 43, n. 2, p.106-112, abr. 2017. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37562016000000002>.

VON GROLL, A. et al. Fitness study of the RD Rio lineage and Latin American Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p.119-127, fev. 2010. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2009.00611.x>.

WALKER, T. M. et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 13, n. 2, p.137-146, fev. 2013. Elsevier BV. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(12\)70277-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(12)70277-3).

WALMSLEY, Roy. **World Prison Population List**. 2015. Disponível em: <http://www.prisonstudies.org/sites/default/files/resources/downloads/world_prison_population_list_11th_edition_0.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2018.

WARNER, D. F.; KOCH, A.; MIZRAHI, V. Diversity and disease pathogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 23, n. 1, p.14-21, jan. 2015. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.10.005>.

WENIGER, T. et al. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, n. , p.326-331, 10 maio 2010. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq351>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global Tuberculosis Report 2015**. Geneva: World Health Organization, 2015. (WHO Report 2015, n. 20).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global Tuberculosis Report 2017**. Geneva: World Health Organization, 2017. (WHO Report 2017, n.23).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global Tuberculosis Report 2018**. Geneva: World Health Organization, 2018. (WHO Report 2018, n.20).

YRUELA, Inmaculada et al. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Exhibits Lineage-Specific Variations Affecting Protein Ductility and Epitope Recognition. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, evw279, 6 jan. 2017. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evw279>.

ANEXO A - FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE TUBERCULOSE – SISTEMA DE NOTIFICAÇÃO DE AGRAVOS (SINAN)

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO		Nº		
FICHA DE NOTIFICAÇÃO						
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 1 - Negativa 2 - Individual 3 - Surto 4 - Inquérito Tracoma			3 Data da Notificação	<input type="checkbox"/>	
	2 Agravado/doença			Código (IBGE)		
	4 UF	5 Município de Notificação		Código (IBGE)		
	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)			Código	7 Data dos Primeiros Sintomas	
	8 Nome do Paciente			9 Data de Nascimento		
Notificação Individual	10 (ou) Idade 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano		11 Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	12 Gestante 1-1º Trimestre 2-2º Trimestre 3-3º Trimestre 4 - Idade gestacional ignorada 5-Não 6- Não se aplica 9- Ignorado		
	14 Escolaridade 1-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3-5ª a 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4 - Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9- Ignorado 10- Não se aplica		13 Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9- Ignorado			
	15 Número do Cartão SUS		16 Nome da mãe			
	17 Data dos 1ºs Sintomas do 1º Caso Suspeito		19 Local Inicial de Ocorrência do Surto 1 - Residência 2 - Hospital / Unidade de Saúde 3 - Creche / Escola 4 - Asilo 5 - Outras Instituições (alojamento, trabalho) 6 - Restaurante/ Padaria 7 - Eventos 8 - Casos Dispersos no Bairro 9- Casos Dispersos Pelo Município 10 - Casos Dispersos em mais de um Município 11 - Outros Especificar			
	18 Nº de Casos Suspeitos/ Expostos					
Dados de Residência	20 UF	21 Município de Residência		Código (IBGE)	22 Distrito	
	23 Bairro		24 Logradouro (rua, avenida,...)		Código	
	25 Número		26 Complemento (apto., casa, ...)		27 Geo campo 1	
	28 Geo campo 2		29 Ponto de Referência		30 CEP	
	31 (DDD) Telefone		32 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado		33 País (se residente fora do Brasil)	
	Município/Unidade de Saúde					
	Nome		Função	Assinatura		
	Notificação		Sinan NET		SVS 17/07/2006	

DADOS COMPLEMENTARES (ANOTAR TODOS OS DADOS DISPONÍVEIS NO MOMENTO DA NOTIFICAÇÃO)

Notificação Individual	01 Data da coleta da 1ª amostra da sorologia		02 Data da coleta da 1ª amostra de outra amostra		03 Especificar tipo de exame :	
	04 Óbito ? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		05 Contato com caso semelhante ? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado			
	06 Presença de exantema ? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		07 Data do início do exantema		08 Presença de petéquias ou sufusões hemorrágicas ? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	
	09 Foi realizado liquor ? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		10 Resultado da bacterioscopia :			
	11 O paciente tomou vacina contra agravo notificado neste impresso ? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		12 Data da última dose tomada		13 Ocorreu hospitalização ? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	
Local prov. Infecção	15 UF		16 Município do hospital		Código (IBGE)	17 Nome do hospital
						Código
	18 Hipóteses diagnósticas no momento da notificação 1ª Hipótese Diagnóstica - CID 10: _____ 2ª Hipótese Diagnóstica - CID 10: _____					
19 Local provável de infecção (classificação provisória) País: _____ UF: _____ Município: _____ Distrito: _____ Bairro: _____						

ANEXO B - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Título do Projeto: "Epidemiologia molecular da Tuberculose no estado de Pernambuco".

Pesquisador responsável: Michelle Christiane da Silva Rabello

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 17/11/2014

Registro no CAAE: 38794414.4.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 979.311

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 11 de fevereiro de 2018.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 17 de março de 2015.

Coordenadora do CEP/CPqAM

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
CEP / CPqAM / FIOCRUZ