



**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Medicina Tropical
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais**

Ismari Perini Furlaneto

USO DO *SPOLIGOTYPING* PARA GENOTIPAGEM DE *Mycobacterium tuberculosis* OBTIDOS A PARTIR DE LÂMINAS CORADAS PELA TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN PERTENCENTES A PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR RESIDENTES NOS MUNICÍPIOS PARAENSES DE BELÉM E ANANINDEUA, PARÁ, BRASIL

Belém

2010

ISMARI PERINI FURLANETO

USO DO *SPOLIGOTYPING* PARA GENOTIPAGEM DE *Mycobacterium tuberculosis* OBTIDOS A PARTIR DE LÂMINAS CORADAS PELA TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN PERTENCENTES A PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR RESIDENTES NOS MUNICÍPIOS PARAENSES DE BELÉM E ANANINDEUA, PARÁ, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, área de concentração Patologia das Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Karla Valéria Batista Lima

Belém

2010

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical, Belém-PA**

Furlaneto, Ismari Perini

Uso do *Spoligotyping* para genotipagem de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos a partir de lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen pertencentes a pacientes com tuberculose pulmonar residentes nos municípios paraenses de Belém e Ananindeua, Pará, Brasil / Ismari Perini Furlaneto; orientadora, Karla Valéria Batista Lima. — 2010.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2010.

1. Tuberculose – Belém (PA). 2. Tuberculose – Ananindeua (PA).
3. *Mycobacterium tuberculosis*. I. Lima, Karla Valéria Batista, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.995098115

Ficha catalográfica elaborada por Marta G.Gonçalves NMT/UFPA – CRB2 1164

ISMARI PERINI FURLANETO

USO DO *SPOLIGOTYPING* PARA GENOTIPAGEM DE *Mycobacterium tuberculosis* OBTIDOS A PARTIR DE LÂMINAS CORADAS PELA TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN PERTENCENTES A PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR RESIDENTES NOS MUNICÍPIOS PARAENSES DE BELÉM E ANANINDEUA, PARÁ, BRASIL

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, área de concentração Patologia das Doenças Tropicais, pela seguinte comissão:

Orientadora:

Profa. Dra. Karla Valéria Batista Lima
Núcleo de Medicina Tropical – Universidade Federal do Pará

Avaliadores:

Profa. Dra. Maria Paula Cruz Schneider
Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Maísa Silva de Sousa
Núcleo de Medicina Tropical – Universidade Federal do Pará

Dra. Lena Líllian Canto de Sá
Instituto Evandro Chagas

Data e local de aprovação: Belém, 10 de junho de 2010.

DEDICATÓRIA

Ao Márcio, por compartilhar sonhos, projetos e realizações.
Ao José e ao Matheus, vocês me fazem entender porque é tão maravilhoso viver.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha força e por permitir que maravilhas aconteçam a seus filhos.

Aos meus pais, Irênio e Luzineth, e à minha irmã, Irlani, pelo amor incondicional e pela presença constante em minha vida.

A minha família, Márcio, José e Matheus, por todo o apoio, amor, aconchego e por compreenderem minhas ausências; vocês são meu porto seguro.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Karla Valéria Batista Lima, exemplo de constante dedicação, estímulo e conduta pessoal e profissional. Obrigada pela oportunidade de realizar mais um trabalho sob sua orientação e pela confiança em mim depositada em todos os momentos, por todos esses anos.

A Dra Maria Luiza Lopes, chefe da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas, por acreditar neste projeto e permitir sua realização dentro da SABMI.

A Dra. Elizabeth Santos, diretora do Instituto Evandro Chagas, pelo profissionalismo, acolhimento e confiança que possibilitam a realização de diversas pesquisas dentro da Instituição, permitindo o fortalecimento do IEC e confirmando sua vocação na Região.

Ao Dr. Nelson Veiga e toda a equipe do LABGEO/IEC/SVS/MS (Douglas Gasparetto, João Monteiro, Nelson Soffiatti, Lena Rodrigues e Carolina Andrade), pelo empenho e entusiasmo em colaborar com este projeto.

A Secretaria de Saúde de Ananindeua, pela parceria e apoio no projeto, especialmente ao Moacir Barreiros, responsável técnico pelo LABGEO/SESAU/Ananindeua e sua equipe, por não medir esforços nesta empreitada.

Ao Núcleo de Medicina Tropical – UFPA por fornecer condições de crescimento científico, especialmente ao Prof. Dr. Juarez Simões Quaresma, profissional exemplar; sou grata por acreditar e apoiar este trabalho desde o início.

Ao Dr. Harrison Magdinier Gomes, obrigada por todo entusiasmo, auxílio e por compartilhar seu inestimável conhecimento, sempre de forma atenciosa e dedicada.

Ao Prof. Dr. Manuel Ayres, pelo entusiasmo contagiante e pela incansável busca e partilha do conhecimento. Obrigada pela revisão dos testes estatísticos e pela imensa confiança em mim depositada.

A Emilyn Costa Conceição, companheira em busca da “membrana perfeita”, e quem melhor definiu nossa vocação: “espoligotistas”. Agradeço pela incansável e inestimável colaboração.

As amigas de longa data, Ana Roberta Fusco e Michele Lima de Brito, pelo apoio constante e exemplo de profissionalismo e dedicação. Obrigada por todos estes anos em que compartilham comigo seus valiosos conhecimentos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e da SABMI, aos queridos colegas do Mestrado e aos excelentes profissionais do NMT e àqueles que, embora não citados, contribuíam de maneira grandiosa para a realização deste projeto. Muito obrigada a todos!

A CAPES, pela bolsa.

*"No valor da ciência, está o valor da vida;
fora da vida, a ciência não tem a menor finalidade"*

Manoel Dias de Abreu (1892-1962)

RESUMO

A tuberculose (TB) é um grande problema de saúde pública, intimamente ligada aos fatores sócio-econômicos, e tem como principal agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*. O *Spoligotyping* é uma técnica baseada em PCR-hibridização reversa que permite detectar e diferenciar simultaneamente membros do Complexo *M. tuberculosis* diretamente de amostras clínicas, como em amostras obtidas de lâminas de Ziehl-Neelsen (ZN), evitando problemas associados ao lento crescimento destes microrganismos, tornando-se assim uma importante ferramenta para o monitoramento de cepas em diferentes contextos epidemiológicos, sendo capaz de revelar o caráter biogeográfico destas. A possibilidade de caracterizar genética, demográfica e geograficamente estes microrganismos pode contribuir para o entendimento de como a doença é transmitida e para a implementação das ações para seu controle e combate. Desta forma, foi realizado um estudo retrospectivo que avaliou amostras obtidas a partir de lâminas coradas pela técnica de ZN, confeccionadas por laboratórios da rede pública dos municípios paraenses de Belém e Ananindeua entre outubro de 2007 e março de 2008. A maioria (61,3%) dos 163 casos incluídos no estudo pertencia ao gênero masculino e 68,0% dos casos tinham entre 20 e 49 anos, com média de idade de 38 anos. A aplicação do *Spoligotyping* neste tipo de amostras apresentou bom rendimento, com 146 (89,6%) padrões de hibridização completos e concordantes entre si após as duplicatas. Destes, 142 foram considerados para comparação com o banco de dados internacional de *Spoligotyping* (SpolDB4), dentre os quais foram observados 67 espoligotipos ou genótipos distintos, compreendendo 95 (67%) casos com padrões compartilhados por duas a 20 amostras e 47 (33%) casos com padrões únicos. Quarenta e oito (71,6%) genótipos eram conhecidos e 19 (28,4%) ainda não haviam sido relatados no SpolDB4. As famílias LAM e T foram as mais frequentes, concentrando 56 (39,4%) e 35 (24,6%) casos, respectivamente, e as famílias Haarlem e EAI compreenderam 12 (8,45%) amostras cada. A geolocalização dos casos permitiu visualizar a distribuição dos espoligotipos nos municípios estudados, evidenciando alguns agrupamentos com mesmo genótipo, mostrando-se útil para direcionar e auxiliar investigações futuras.

Palavras-chave: Tuberculose. *Mycobacterium tuberculosis*. *Spoligotyping*. Ziehl-Neelsen. Geolocalização.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a major public health problem, closely linked to socioeconomic factors, and its main causative agent *Mycobacterium tuberculosis*. The Spoligotyping is based on PCR-reverse hybridization that permit identification and differentiation of *M. tuberculosis* Complex members directly from clinical samples, as samples from Ziehl-Neelsen stained slides (ZN), avoiding problems associated with slow growth of these microorganisms, thus becoming an important tool for the monitoring of strains in different epidemiological settings, being able to reveal the biogeographical character of these. The ability to characterize genetic, demographic and geographically these microorganisms can contribute both to understanding how the disease is transmitted and the implementation of actions to its control and combat. Thus, we performed a retrospective study that evaluated the samples obtained from ZN stained slides, made by public health laboratories from Belém and Ananindeua between October 2007 and March 2008. Most (61.3%) of 163 cases included in the study belonged to the males and 68.0% of cases were between 20 and 49 years with a mean age of 38 years. Application of Spoligotyping in this kind of samples showed good performance, with 146 (89.6%) hybridization patterns of complete and consistent with each other after the duplicates. Of these, 142 were considered for comparison with the international database of Spoligotypes (SpolDB4), of which 67 were observed different spoligotype or genotypes, including 95 (67%) cases were shared by two to 20 samples and 47 (33%) with unique patterns. Forty-eight (71.6%) genotypes were known and 19 (28.4%) have not been reported in SpolDB4. LAM and T families were more frequent, concentrating 56 (39.4%) and 35 (24.6%) cases, respectively, and Haarlem, and EAI families comprised 12 (8.45%) samples each. Spatial localization of cases allowed to visualize the distribution of spoligotypes in the cities studied, revealing some groups with the same genotype, proving to be useful to guide and assist future investigations.

Key-words: Tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis*. Spoligotyping. Ziehl-Neelsen. Spatial localization.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C.	Antes de Cristo
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BM	Banho-maria
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAS	<i>Central-Asian</i>
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CQE	Controle de Qualidade Externo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi-nucleotídeo trifosfatado
DP	Desvio padrão
DR	<i>Direct Repeat</i>
DVR	<i>Direct Variable Repeat</i>
EAI	<i>East African-Indian</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAOR	Fórum da Amazônia Oriental
GPS	<i>Global Position System</i>
HGDI	<i>Hunter-Gaston Discriminatory Index</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC	Instituto Evandro Chagas
IS	Seqüência de inserção
LACEN-PA	Laboratório Central do Pará
LAM	<i>Latin American and Mediterranean</i>
M	Molar
<i>M. africanum</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. caprae</i>	<i>Mycobacterium caprae</i>
<i>M. pinnipedii</i>	<i>Mycobacterium pinnipedii</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

MDR	Multidroga resistente
mg	Miligrama(s)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto(s)
MIRU	<i>Micobacterial Interspaced Repetitive Unit</i>
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
ng	Nanograma
ODBC	<i>Open DataBase Connectivity</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PGG	<i>Principal Genetic Group</i>
PGRS	<i>Polymorphic GC-Rich Sequences</i>
pmol	Picomoles
PO	Espoligotipo 'pseudo-órfão'
PPD	Derivado Protéico Purificado
PvuII	Enzima de restrição isolada de <i>Proteus vulgaris</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
RX	Raios X
SABMI	Seção de Bacteriologia e Micologia
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SIDA/AIDS	Síndrome da Imunodeficiência humana Adquirida
SIG	Sistema de Informação Geográfica
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIT	<i>Shared International Type</i>
SNP	<i>Single-Nucleotide Polymorphisms</i>
SpolDB4	4ª versão do Banco Mundial de Espoligotipos
SSPE	<i>Saline-Sodium Phosphate-EDTA</i>

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose multidroga resistente
U	Unidade(s)
UL	Unidade(s) Laboratorial(ais)
UPGMA	<i>Unweighted Pairs-Group Method of Arithmetic means</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
VO	Espoligotipo ‘verdadeiro órfão’
ZN	Ziehl-Neelsen
μL	microlitro(s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	VISÃO HISTÓRICA DA TUBERCULOSE	16
2.2	EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE	17
2.2.1	A Tuberculose no Mundo e no Brasil	17
2.2.2	Situação Regional, Estadual e Municipal da Tuberculose	19
2.3	PROPRIEDADES GERAIS DAS MICOBACTÉRIAS	20
2.4	O COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2.5	A BIOLOGIA MOLECULAR E O <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
2.5.1	Técnicas Moleculares Aplicadas à Genotipagem do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
2.5.1.1	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism – IS6110 (RFLP-IS6110)</i>	29
2.5.1.2	<i>Spacer Oligonucleotide Typing – Spoligotyping</i>	30
2.5.1.3	<i>Micobacterial Interspaced Unit – Variable Number of Tandem Repeats (MIRU-VNTR)</i>	33
2.5.2	Principais Famílias entre as Espécies de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Baseadas em <i>Spoligotyping</i>	34
2.6	ANÁLISE ESPACIAL, GEOPROCESSAMENTO E SAÚDE	40
3	JUSTIFICATIVA	44
4	OBJETIVOS	46
4.1	OBJETIVO GERAL	46
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5	MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1	DESENHO DO ESTUDO	47
5.2	ÁREA GEOGRÁFICA DO ESTUDO	47
5.2.1	Belém	47
5.2.2	Ananindeua	48
5.3	AMOSTRAS	48
5.3.1	Etapas de Seleção das Amostras	49
5.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	49
5.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	49

5.6	AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA DOS CASOS ESTUDADOS	50
5.7	PRECAUÇÕES ÉTICAS	50
5.8	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	50
5.8.1	Extração do DNA	50
5.8.2	Técnica de <i>Spoligotyping</i>	51
5.8.2.1	Fases de Execução do <i>Spoligotyping</i>	53
5.9	GEOLOCALIZAÇÃO DOS CASOS ESTUDADOS	53
5.10	INTERPRETAÇÃO E TABULAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR <i>SPOLIGOTYPING</i>	54
5.11	LOCAIS DE EXECUÇÃO DAS ATIVIDADES	56
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
6	RESULTADOS	57
6.1	AMOSTRAS SELECIONADAS	57
6.2	PERFIL DEMOGRÁFICO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	57
6.3	GENOTIPAGEM POR <i>SPOLIGOTYPING</i>	58
6.3.1	<i>Spoligotyping</i> Aplicado às Amostras de Belém	58
6.3.2	<i>Spoligotyping</i> Aplicado às Amostras de Ananindeua	64
6.3.3	Análise dos Perfis Obtidos por <i>Spoligotyping</i> entre as Amostras de Belém e Ananindeua.....	68
6.4	GEOLOCALIZAÇÃO DOS CASOS	73
6.4.1	Geolocalização dos Casos de Belém	73
6.4.2	Geolocalização dos Casos de Ananindeua	76
7	DISCUSSÃO	79
7.1	ASPECTOS DA POPULAÇÃO INCLUÍDA NO ESTUDO	79
7.2	<i>SPOLIGOTYPING</i> APLICADO ÀS AMOSTRAS OBTIDAS DE LÂMINAS DE ZIEHL-NEELSEN	81
7.3	DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>M. tuberculosis</i> ENTRE AS AMOSTRAS GENOTIPADAS POR <i>SPOLIGOTYPING</i>	84
7.4	GEOLOCALIZAÇÃO DOS CASOS ESTUDADOS	98
8	CONCLUSÕES	101
9	PERSPECTIVAS	102
10	REFERÊNCIAS	103
11	ANEXOS	131

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa, curável, que tem como principal agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*, mas também pode ser causada por outras micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (CMTB) (CATALDI; ROMANO, 2007; EUZÉBY, 2009).

A doença pode se apresentar sob as formas pulmonar e extrapulmonar (renal, hepática, esplênica, medular, nervosa e etc.) e tem como característica ser universal e atingir preferencialmente indivíduos imunossuprimidos e/ou que vivam em condições sócio-econômicas desfavoráveis (CAVALCANTI, 2006). A principal via de transmissão é a aérea, de pessoa a pessoa, quando um doente de TB pulmonar bacilífera fala, espirra ou tosse, lançando no ar gotículas de tamanhos variados, contendo no seu interior o bacilo (BRASIL, 2005a). Estima-se que, durante um ano, em uma comunidade, um indivíduo bacilífero poderá infectar, em média, de 10 a 15 pessoas (BRASIL, 2005a).

Apesar de ser uma doença potencialmente prevenível e curável, a TB é ainda hoje um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (RODRIGUES et al., 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que haja, anualmente, 2 milhões de mortes devido a TB, e que 98% delas ocorrem em países em desenvolvimento, afetando principalmente adultos jovens em idade produtiva (OMS, 2009a). O Brasil, juntamente com outros 21 países em desenvolvimento, alberga 80% dos casos mundiais da doença (OMS, 2009b). Aparecem como agravantes deste quadro a epidemia pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o crescimento demográfico, o aumento da miséria, a má estruturação da rede de saúde pública, os grandes movimentos migratórios e a resistência do bacilo aos quimioterápicos. Tais fatores apontam para a necessidade de medidas enérgicas e eficazes de saúde pública (NATAL, 1998).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), o diagnóstico laboratorial da TB é fundamentado nos seguintes métodos: bacterioscópico (baciloscopia e cultura), radiológico, broncoscopia, prova tuberculínica cutânea (PPD), anátomo-patológico (histológico e citológico), sorológico, bioquímico e molecular (BRASIL, 2005a).

A genotipagem do *M. tuberculosis* em diversos países mostrou ser um ótimo instrumento no estudo das relações de clonalidade e dispersão entre cepas de uma determinada população e os grupos populacionais sob maior risco, principalmente nos casos onde a ligação epidemiológica não é identificada com o traçado convencional de contatos.

Diversas técnicas de biologia molecular podem ser usadas com este fim, como as técnicas RFLP-IS6110, MIRU-VNTR, *Spoligotyping*, entre outras. Esta última apresenta menor diversidade genética, no entanto, tem a vantagem de ser aplicável em DNA obtido de amostras clínicas diversas (KAMERBEEK et al., 1997; SUFFYS, 2000), inclusive daquelas provenientes de lâminas de microscopia (SURESH et al., 2007; van DER ZANDEN et al., 1998), sendo normalmente aplicada como método de triagem.

O estudo da distribuição espacial de algumas doenças endêmicas fornece informações que não seriam visualizadas trabalhando apenas com dados tabulares, visto que o georreferenciamento das informações permite a visualização de um “retrato geográfico” das endemias, podendo assim contribuir para a formulação de propostas de intervenção mais efetivas (HINO et al., 2006).

A distribuição da infecção em nível mundial, a complexa epidemiologia e história natural, aliada a insuficientes recursos para responder à situação mundial da doença, são fatores que contribuem para tornar a TB um sério problema de saúde pública por muitos anos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VISÃO HISTÓRICA DA TUBERCULOSE

A TB é uma das doenças transmissíveis mais antigas do mundo. Ela esteve presente na humanidade durante toda a pré-história e história humana conhecidas. Deixou sua marca na criatividade humana, música, arte e literatura e influenciou o avanço das ciências biomédicas e da saúde. Seu principal agente, o *Mycobacterium tuberculosis*, pode ter matado mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiano (DANIEL, 2006; LEÃO; PORTAELS, 2007).

Existem registros arqueológicos da doença entre diversos povos. A TB foi documentada no Egito, Índia e China há 5000, 3.300 e 2.300 anos atrás, respectivamente (DANIEL, 2006). Anormalidades esqueléticas típicas, incluindo a doença de Pott, foram encontradas em múmias egípcias e andinas (LEÃO; PORTAELS, 2007). Existem relatos de evidência da TB em ossos humanos pré-históricos encontrados na Alemanha e datados de 8.000 anos A.C. (REDE TB, 2009).

Um dos mais significativos e completos estudos sobre a TB foi realizado pelo alemão Robert Koch (1843-1910), que cultivou e isolou o *M. tuberculosis*, identificando-o como o agente etiológico da doença e, que passou a ser conhecido, desde então, como bacilo de Koch (DUCATI et al., 2004).

Nas Américas, existem citações de achados compatíveis com TB em múmias pré-colombianas. Entretanto, foi com a chegada dos europeus que a doença realmente se manifestou, de forma grave e aguda entre os ameríndios. No Brasil, a chegada dos missionários trouxe também a disseminação da TB entre os índios. Vários religiosos morreram de ou com TB, como Manoel de Nóbrega e José de Anchieta, entre outros (REDE TB, 2009).

O avanço mais importante na histórica batalha contra a TB veio com a introdução de drogas efetivas para o tratamento e da terapia preventiva entre as décadas de 1940-1960,

reduzindo consideravelmente a mortalidade e fazendo com que as comunidades médicas e de saúde pública considerassem a TB como erradicada, principalmente nos países industrializados. No entanto, fatores sociais, econômicos e de saúde pública que fomentavam a propagação da TB não foram eliminados (COBERLY et al., 2001; DUCATI et al., 2004; LEÃO; PORTAELS, 2007).

Então, por volta do ano de 1985, os casos de TB voltaram a aumentar novamente nestes países. O aumento da população prisional, o número crescente de desabrigados, o uso de drogas injetáveis, as superlotações habitacionais e o aumento da imigração de pessoas provenientes de países onde a doença continuou sendo endêmica contribuíram para este ressurgimento. Além disso, o declínio das atividades de controle da TB e a epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA/AIDS) foram os dois principais fatores alimentando-se mutuamente na reemergência da TB (LEÃO; PORTAELS, 2007). Atualmente, nos países mais desenvolvidos, a TB continua um problema quase restrito aos imigrantes dos países pobres e de outras populações marginalizadas (RODRIGUES et al., 2007).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

2.2.1 A Tuberculose no Mundo e no Brasil

Apesar de ser uma doença potencialmente prevenível e curável, a TB continua sendo um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. Aproximadamente um terço da população mundial está infectada com o *M. tuberculosis*, sob risco, portanto, de desenvolver a doença (OMS, 2009a).

A estimativa da incidência da TB no mundo pode ser avaliada graficamente através dos relatórios fornecidos anualmente pelos diversos países à OMS e também através de mapas que ilustram a incidência da doença em todo o mundo, conforme pode ser observado na figura abaixo (Figura 1).

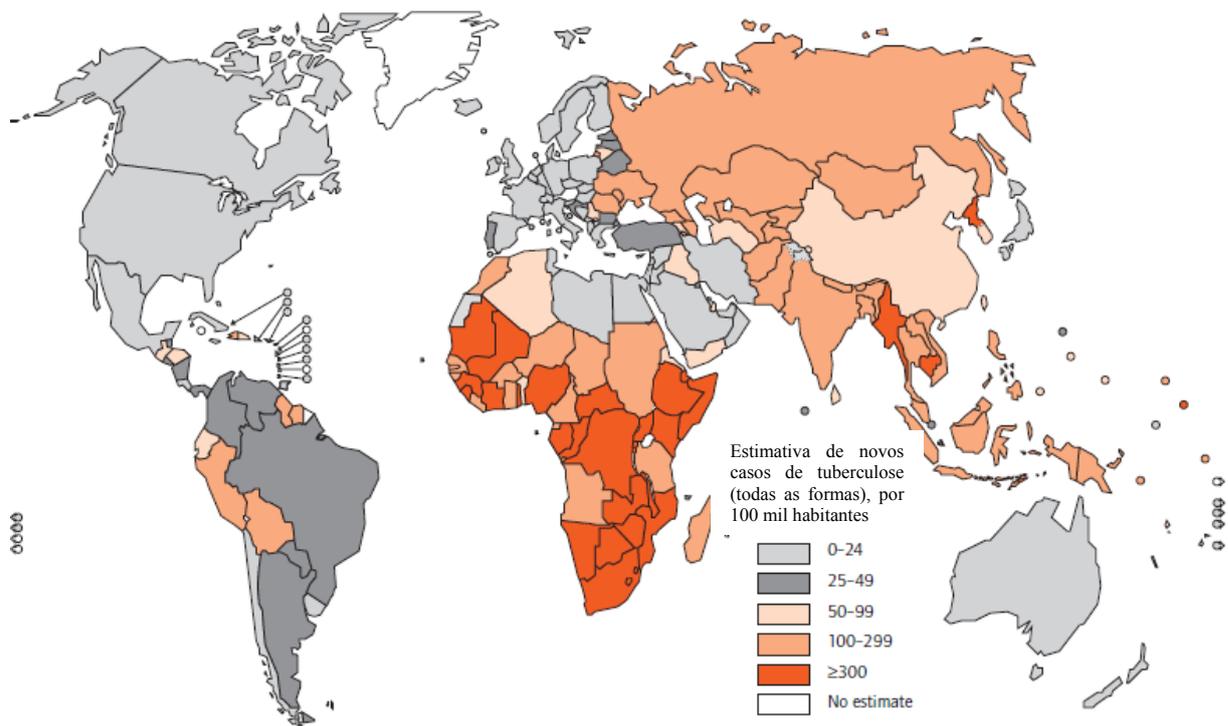


Figura 1: Distribuição mundial das taxas estimadas de incidência da tuberculose, 2008.
Fonte: OMS, 2009b.

A distribuição geográfica da doença é universal, no entanto, a TB concentra-se em 22 países que abrigam 80% dos casos existentes no mundo, dos quais 10 estão situados na Ásia, nove na África, um na Europa, um no Oriente Médio e um na América Latina – o Brasil, que, em 2007, ocupava a 18ª posição entre estes países, assumindo, em 2008, a 19ª posição neste *ranking* (OMS, 2009b).

Baseada em dados de vigilância, a OMS estimou que, em 2008, a prevalência mundial da TB foi de 11,1 milhões de casos (164/100.000 habitantes), com 9,4 milhões de novos casos, incluindo 2,6 milhões de novos casos bacilíferos e 1,8 milhões de mortes, considerando os casos de co-infecção com o HIV (OMS, 2009b).

Quanto à incidência, depois de um pico de 143/100.000 habitantes em 2004, a taxa de incidência global estimada caiu para 139/100.000 habitantes em 2008, porém a velocidade deste decréscimo é lenta e o número total de mortes e casos continua a aumentar devido o aumento populacional (OMS, 2009a).

Em 2008 foram notificados no Brasil 73.395 novos casos de TB, todas as formas, e 7.284 mortes devido à doença, correspondendo a uma incidência de 38/100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade estimada em 3,8/100.000 habitantes, respectivamente. Destes, 45.505 (62%) eram novos casos pulmonares bacilíferos (OMS, 2009b). No Brasil, a TB é a 4ª causa de mortes por doenças infecciosas e a 1ª causa de mortes em pacientes com AIDS (BRASIL, 2010).

A emergência de focos de tuberculose multirresistente (TBMR), tanto nos Estados Unidos da América (EUA), no início dos anos 90, quanto atualmente, nos países que compunham a antiga União Soviética, tem mobilizado o mundo para a questão da TB. A TBMR está presente em 63 dos 72 países que participaram do inquérito mundial realizado no período de 1994-1999 (HIJJAR; OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2001). Estima-se que houve, em 2007, cerca de 0,5 milhão de casos de TBMR no mundo, sendo que destes, 435.470 casos (85%) ocorreram nos 27 países com maior carga da doença. No Brasil, ocorreram 406 e 428 casos em 2007 e 2008, respectivamente (DALCOLMO, comunicação pessoal, 2010). São esperados cerca de 500 casos em 2010 (OMS, 2009b).

Em relação à co-infecção TB/HIV, em 2008, cerca de 15% de todos os casos incidentes de TB no mundo eram soropositivos para o HIV, enquanto que no Brasil este percentual foi de 21% (OMS, 2009b).

2.2.2 Situação Regional, Estadual e Municipal da Tuberculose

De acordo com dados fornecidos pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), a região Norte apresentou em 2007 a maior taxa de incidência de TB entre as regiões brasileiras, com 45,02/100.000 habitantes, sendo que o Pará foi o estado que concentra o maior número de casos novos da doença, tendo respondido por 48% das notificações neste mesmo ano, com 3.312 casos novos e uma taxa de incidência estimada em 45,69/100.000 habitantes, a 4ª maior entre os estados brasileiros (BRASIL, 2008b).

Com este quadro, o Pará abriga 11 das 315 cidades definidas pelo Ministério da Saúde como prioritárias para o controle da TB no Brasil, que juntas concentram 75% dos

casos da doença no país. Belém, a capital do estado, Ananindeua e outras nove cidades somam 60% dos casos no Pará (BRASIL, 2005b). Em 2009, foram confirmados 1.762 e 125 casos novos de TB de todas as formas em Belém e Ananindeua, respectivamente (BRASIL, 2009b), sendo que os registros da capital representaram 42% dos casos de todo o estado (BRASIL, 2009a), configurando-se como a 5ª maior taxa de incidência entre as capitais brasileiras, com 79/100.000 habitantes (BRASIL, 2008b). Em relação aos casos novos de TB pulmonar nestes municípios em 2009, ocorreram 1.389 casos em Belém e 120 casos em Ananindeua (BRASIL, 2009b).

2.3 PROPRIEDADES GERAIS DAS MICOBACTÉRIAS

São bacilos imóveis, retos ou ligeiramente curvos, não formadores de esporos, aeróbios estritos, que possuem alto conteúdo (61-71%) genômico de guanina e citosina (G + C) e alto teor (60%) de lipídios extremamente raros na parede celular, os ácidos micólicos. Esta característica confere às micobactérias a capacidade de álcool-ácido resistência, sendo por isso denominados bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), o que as distingue das demais bactérias (BARRERA, 2007; KONEMAN et al., 2001).

A alta concentração de ácidos micólicos contribui para a hidrofobicidade destes microrganismos, sua resistência a danos (dessecação, desinfetantes químicos) e sobrevivência dentro de macrófagos, entre outros, podendo atuar também como reserva de carbono e provavelmente contribuindo para a lenta taxa de crescimento de algumas espécies, limitando a absorção de nutrientes (DUCATI et al., 2004; LEÃO; PORTAELS, 2007).

A baciloscopia corada pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN), seguindo técnica padronizada pelo MS, explora esta característica de álcool-ácido resistência das micobactérias. Ela permite que, com a ação do calor, o corante fucsina empregado se fixe na estrutura lipídica da parede celular, resistindo à posterior descoloração pelo álcool-ácido, fazendo com que os BAAR apareçam ao exame microscópico corados em vermelho brilhante, contrastando com o fundo azul devido a outro corante utilizado (azul de metileno) como corante de fundo ou contraste (Figura 2).

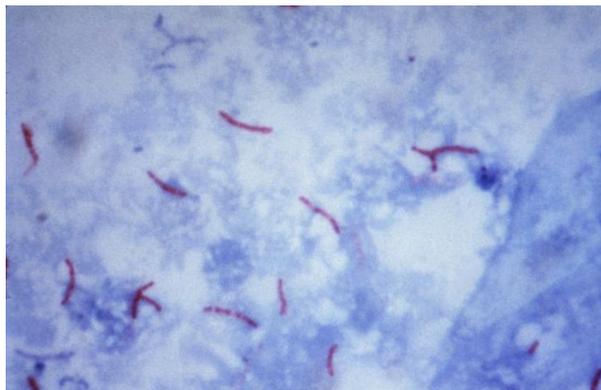


Figura 2. Fotomicrografia evidenciando bacilos álcool-ácido resistentes corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (ampliado 1000x).

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2009. Disponível em: <<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>>.

Espécimes clínicos das vias respiratórias (escarro, lavado broncoalveolar, lavado brônquico, biópsia brônquica) são utilizados na baciloscopia, que, apesar dos avanços tecnológicos na micobacteriologia, continua sendo particularmente importante no combate à TB por ser de baixo custo e por detectar os casos bacilíferos, ou seja, casos infecciosos da forma pulmonar da doença, responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão (BRASIL, 2008a).

2.4 O COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mycobacterium tuberculosis* faz parte de um grupo de espécies estreitamente relacionadas, coletivamente conhecidas como Complexo *M. tuberculosis* (CMTB), que é composto por sete membros: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (BIFANI et al., 2009; CATALDI; ROMANO, 2007; EUZÉBY, 2009; MATHEMA et al., 2006). Os membros do CMTB são os agentes causadores da TB em humanos e animais e, apesar da estreita relação genética, eles diferem em epidemiologia, patogenia, distribuição geográfica, preferência por hospedeiros específicos e na importância em causar a TB doença em humanos (BARRERA, 2007; BROSCHE et al., 2002).

Geneticamente, todos os membros deste complexo são extremamente semelhantes, com 99.9% de similaridade em nível de nucleotídeo e sequências idênticas de ácido ribonucleico (RNA) ribossomal 16S (16SrRNA) (BARRERA, 2007; BROSCHE et al.,

2002). Entre outras características únicas, como a extrema homogeneidade genética, os membros do CMTB apresentam em comum a sequência de inserção IS6110. A IS6110 é um elemento transponível que é membro da família IS3 das ISs ou elementos móveis (BIFANI et al., 2009; MAHILLON; CHANDLER, 1998)

O *M. tuberculosis*, conhecido como bacilo de Koch ou BAAR, é o principal agente etiológico da TB no homem e é indiscutivelmente o mais bem sucedido patógeno bacteriano humano, causando milhões de mortes em todo o mundo. Estabelece sua infecção preferencialmente no sistema pulmonar, mas pode causar a doença em outras partes do organismo (DUCATI et al., 2004).

Os principais hospedeiros do *M. bovis* são os bovinos, porém afeta muitos outros mamíferos, incluindo o homem. Em humanos, é a causa mais frequente de TB zoonótica, sendo clinicamente indistinguível da TB causada pelo *M. tuberculosis*. Antes de serem introduzidas técnicas de pasteurização do leite e de outros produtos lácteos, o *M. bovis* foi importante causa da doença em humanos, especialmente a TB intestinal em crianças, diminuindo drasticamente a partir de então. Foram descritos casos de TB humana devido ao *M. bovis* em diversos países da África, Europa, Ásia, Oceania e nas Américas, incluindo o Brasil (CATALDI; ROMANO, 2007).

Baseados na origem geográfica e em propriedades bioquímicas, as espécies de *M. africanum* têm sido subdivididas em dois principais subgrupos: subtipo I, originários do oeste africano e relacionados com o *M. bovis* e subtipo II, vindos do leste da África e relacionados com o *M. tuberculosis*. O *M. africanum* é predominantemente isolado na África e, em certas áreas deste continente, atribui-se a ele proporções significativas de TB pulmonar. Também há relatos de isolamentos esporádicos deste microrganismo na Europa e nos EUA, incluindo um surto de *M. africanum* mutidrogá-resistente (CATALDI; ROMANO, 2007).

Isolado primariamente como agente causal de TB em roedores selvagens, e utilizado como cepa vacinal na África por mais de 15 anos, o *M. microti* foi recentemente identificado com agente etiológico de TB pulmonar em humanos imunocompetentes e imunodeprimidos (CATALDI; ROMANO, 2007).

Originalmente descrito em hospedeiros bovinos e caprinos em países europeus, o *M. caprae* foi isolado em humanos e em espécies selvagens, como javalis e veados. Em algumas regiões da Europa Central, o *M. caprae* é a maior causa de TB bovina e é também predominante causa da doença em humanos (CATALDI; ROMANO, 2007).

O *M. pinnipedii* foi isolado primariamente de leões marinhos selvagens e em cativeiro e de pele de focas na Nova Zelândia e Austrália. Microrganismos semelhantes foram isolados a partir da mesma espécie na América Latina e também de uma anta brasileira. Recentemente, a sua capacidade de causar doença tem sido demonstrada experimentalmente e, o fato de ter sido isolado de um treinador de focas australiano e de bovinos na Nova Zelândia, sugere que o *M. pinnipedii* possa causar infecção em uma ampla gama de hospedeiros (CATALDI; ROMANO, 2007).

2.5 A BIOLOGIA MOLECULAR E O *Mycobacterium tuberculosis*

O estudo da biologia molecular representa hoje uma das áreas de maior potencial para a realização de pesquisas na área biomédica, considerando-se não apenas sua grande relevância clínica e epidemiológica, mas também a possibilidade de aplicação de ferramentas recentemente desenvolvidas a um número bastante amplo de doenças (PINHO, 2006). Uma integração da biologia molecular, clínica médica, estatística e epidemiologia clássica – a epidemiologia molecular – tornou-se uma importante ferramenta no estudo dos fatores de risco ambientais e genéticos das doenças, assim como no esclarecimento da etiologia e distribuição das mesmas entre as populações (MATHEMA et al., 2006).

O desenvolvimento da biologia molecular nos últimos anos aumentou substancialmente as possibilidades para o estudo da epidemiologia das doenças infecciosas. Desde então, grande interesse se voltou para a TB e, também, para outras micobacterioses. Com isso, um grande número de diferentes métodos de biologia molecular tem sido desenvolvido para avaliar as relações genéticas entre *M. tuberculosis* e entre outras cepas micobacterianas (MOSTRÖM et al., 2002).

Com o desenvolvimento da reação em cadeia mediada pela polimerase – PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em 1983 por Kary Banks Mullis, houve uma verdadeira revolução no campo da genética. A PCR e suas variações permitem amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pouca quantidade de material, podendo ser capaz de detectar até uma cópia de DNA de qualquer célula (BARNES; BARROWS, 1993; EISENACH et al., 1990; MESQUITA et al., 2001). Esta técnica pode ser utilizada na realização de estudos de DNA obtidos a partir dos mais diversos materiais, incluindo amostras de arquivo e de fontes escassas, como tecidos fixados em formol e embebidos em parafina e materiais fixados em lâminas coradas pelas técnicas de ZN, de Papanicolau e de Giemsa (BAREA et al., 2004; FURLANETO et al., 2007; MARCHETTI et al., 1998; POLJAK et al., 2000; van DER ZANDEN et al., 2003), possibilitando assim seu uso na realização de estudos retrospectivos.

Ao contrário de muitas outras doenças que afetam as populações, a TB pode ser tratada e controlada e ter o risco de sua transmissão reduzido quanto melhor for o sistema de busca e tratamento. Um aspecto crucial para a compreensão da dinâmica da transmissão da TB é a habilidade para controlar a disseminação de cepas específicas na população.

A genotipagem desempenha papel indireto na interrupção da transmissão da TB, pela identificação de *links* epidemiológicos e de fontes de transmissão insuspeitas (MILLER et al., 2002). Questões pendentes no passado, como estimativas populacionais de transmissão recente e a habilidade de distinguir reativação endógena de re-infecção exógena, têm sido possíveis graças ao desenvolvimento e à utilização de uma variedade de técnicas moleculares (BARNES; CAVE, 2003; CHAVES et al., 1999; MATHEMA et al., 2006).

Diversas outras características epidemiológicas são elucidadas com as técnicas moleculares: a determinação da origem de uma infecção em um paciente (familiar ou comunitária); a detecção precoce de organismos que adquiriram resistência a antibióticos; a identificação de casos de transmissão recente; detecção de infecções mistas entre pacientes; a identificação de fontes de contaminação laboratorial, entre outros. Além disso, são úteis para monitorar a distribuição geográfica e propagação de clones de *M. tuberculosis* de importância em saúde pública (ALLAND et al., 1994; BARNES; CAVE, 2003; CARRICAJÓ et al., 1999; DE GHELDRE et al., 1997; FOXMAN, RILEY, 2001; MATHEMA et al., 2006,

NARAYANAN, 2004; SMALL et al., 1993; van SOOLINGEN; KREMER; HERMANS, 2007).

Em relação à TB, aliadas à epidemiologia clássica, as técnicas moleculares possibilitam rastrear geograficamente a transmissão do bacilo, identificar padrões de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente sem conexão epidemiológica, identificar linhagens com propriedades particulares, como a alta infectividade, virulência e resistência às drogas, fornecendo dados que podem ser aplicados no estudo da transmissão global e na vigilância desta doença (BARNES; CAVE, 2003; FOXMAN; RILEY, 2001).

Apesar de o genoma do CMTB ser altamente restrito e conservado em relação a outros patógenos bacterianos, estas espécies têm regiões genômicas polimórficas. Assim como os genomas eucarióticos, os genomas procarióticos (como o do *M. tuberculosis*) são pontuados por sequências monoméricas repetidas periodicamente (MATHEMA et al., 2006).

Vários elementos genéticos contribuem para o polimorfismo do DNA destas espécies, como as repetições diretas DR (*Direct Repeats*), as sequências de inserção IS e os elementos repetitivos denominados MIRUs (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*), que contém *loci* hipervariáveis denominados VNTRs (*Variable Numbers of Tandem Repeats* – número variável de repetições *em tandem*), que são abundantes entre muitos genomas bacterianos (FRIEDMAN et al., 1995; MATHEMA et al., 2006; PANDOLFI, 2007; ROSS et al., 1992; SANTOS; KIPNIS; KIPNIS, 2007; SUPPLY et al., 2000). O fato de os genomas destas espécies serem ricos em DNA repetitivo tem sido explorado pela tipagem molecular e, desta forma, os conhecimentos obtidos com estas análises permitiram a discriminação entre as espécies.

As sequências de inserção – IS são pequenos elementos genéticos móveis distribuídos em vários sítios e em números variáveis de cópias no DNA genômico servindo como sondas, permitindo assim a comparação do número e tamanho dos fragmentos que os contêm. Thierry et al., (1990) foram os primeiros a descreverem a IS6110, uma sequência de 1.355 pb, exclusiva do CMTB.

A IS6110 codifica quatro enzimas necessárias às suas próprias transposição e inserção e é flanqueada por repetições invertidas imperfeitas de 28 pb, o que gera um alvo de

duplicação de 3 a 4 pb na inserção, sendo que a perda é geralmente acompanhada por deleções (“cicatrices genômicas”) das regiões que elas flanqueiam. A IS6110 pode transpor para dentro de genes funcionais ou sequências regulatórias e, portanto, pode alterar a expressão gênica e conseqüentemente o perfil protéico, alterando assim, em alguns casos, o fenótipo (BIFANI et al., 2009; McEVOY et al., 2007).

Apesar de terem sido notadas regiões preferenciais (“hot spots”) para inserção desta IS, ela está distribuída aleatoriamente por todo genoma, em número de cópias que vão desde clones desprovidos de qualquer IS6110 àqueles com até 26 cópias, que são espécie e linhagem dependentes (GOUGET de la SALMONIÈRE et al., 1997; MATHEMA et al., 2006; MOSTRÖM et al., 2002).

A diversidade observada no número de cópias e posição genética da IS6110 entre estirpes não relacionadas de *M. tuberculosis* pode ser utilizada para verificar processos microevolutivos e, além disso, estudos filogenéticos baseados nos polimorfismos de nucleotídeos únicos – SNPs (*Single-Nucleotide Polymorphisms*) têm mostrado que o número de cópias e a posição da IS6110 são similares dentro de linhagens distintas, suportando seu significado evolutivo. Isolados com perfis distintos de IS6110 parecem agregar-se “socialmente” e, portanto, concentrar-se geograficamente em locais onde podem ser endêmicos (BIFANI et al., 2009).

Devido a IS6110 ter se mostrado bastante conservada entre diferentes cepas e devido ao elevado polimorfismo numérico e posicional apresentado por esta IS, ela tornou-se uma excelente ferramenta na diferenciação das espécies do complexo de outras micobactérias e pela qual cepas podem ser genotipadas, sendo amplamente utilizada em estudos epidemiológicos (CAVE et al., 2001; COROS; DeCONNO; DERBYSHIRE, 2008; GOUGET de la SALMONIÈRE et al., 1997; McEVOY et al., 2007; NIEMANN et al., 2000; NIEMANN; RICHTER; RÜSCH-GERDES, 1999, 1999). Esta sequência foi descrita também como a que produz maior acurácia no diagnóstico da TB (FLORES et al., 2005), sendo utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico da TB e para confirmação molecular de *M. tuberculosis* em isolados clínicos (CONCEIÇÃO et al., 2009; MACENTE; RIBEIRO, 2009).

A restrição da presença da IS6110 somente nas espécies do CMTB surgiu da hipótese de que estas bactérias são incapazes de permutarem DNA. No entanto, a

identificação de um elemento semelhante ao IS6110 em uma cepa de *M. smegmatis* sugere a transferência lateral de gene entre as espécies micobacterianas (COROS; DeCONNO; DERBYSHIRE, 2008).

A região de repetição direta DR, ou *locus* DR, presente exclusivamente no genoma do CMTB, é composta de cópias múltiplas e bem conservadas de DRs de 36 pb, intercaladas por sequências espaçadoras únicas e curtas de 35 a 41 pb de comprimento, que em conjunto são denominadas repetições diretas variáveis, as DVRs (*Direct Variable Repeats*) (HERMANS et al., 2001; KAMERBEEK et al., 1997; van EMBDEN et al., 2000).

A observação de que o *locus* DR geralmente flanqueia um ou dois elementos IS6110 indica que esta é uma região “*hot spot*” para a integração desta sequência, porém não está claro se isto é causado por uma preferência de integração da IS no *locus* DR ou por uma diminuição na frequência de excisão destes elementos, uma vez já integrados (HERMANS et al., 2001). Atualmente, 94 sequências espaçadoras foram identificadas, das quais 43 são utilizadas para a diferenciação das micobactérias do CMTB (van EMBDEN et al., 2000).

A análise destes sítios de integração e da própria região DR revelou que este *locus* é polimórfico tanto no comprimento quanto na composição. Estudos sugerem que a sua evolução e a diversidade genética gerada pode ser resultado de pelo menos quatro diferentes mecanismos: por transposição mediada pela IS6110; por recombinação homóloga entre as sequências DR adjacentes ou distantes, levando à excisão do material recombinado (DVRs) durante a replicação do DNA; por falha no deslizamento da polimerase (“*strand slippage*”) durante a replicação, levando à duplicação das sequências DVRs ou ainda por mutações de ponto. Estes últimos mecanismos são raros, no entanto a frequência de deleções das DVRs é mais comum. Acredita-se ainda que a perda sucessiva destas DVRs seja irreversível, sem a habilidade de adquirir fragmentos de DNA adicionais e, desta forma, a evolução é unidirecional. (DRISCOLL, 2009, GROENEN et al., 1993; HERMANS et al., 2001; KAMERBEEK et al., 1997; MATHEMA et al., 2006; van EMBDEN et al., 2000; VITOL et al., 2006; WARREN et al., 2002).

A deleção de DVRs específicas gera “assinaturas” ou padrões de *Spoligotyping* (espoligopadrões), que parecem ser únicos para uma família de cepas em particular. No entanto, a alta similaridade entre alguns destes padrões indica a possibilidade de que estas

deleções tenham resultado em uma evolução convergente, ou seja, levando ao aparecimento de padrões idênticos em cepas de *M. tuberculosis* filogeneticamente não relacionadas (MATHEMA et al., 2006; WARREN et al., 2002).

O *locus* DR pode conter uma ou duas cópias da IS6110, que geralmente ocorrem *em tandem* (FANG et al., 1999; GROENEN et al., 1993; GUTIERREZ et al., 1999). Uma minuciosa avaliação dos dados de sequenciamento do *locus* DR feita por Groenen et al., (1993) revelou que a inserção desta IS no *locus* DR pode ser simétrica, gerando uma DR dividida em dois fragmentos iguais, ou assimétrica, resultando em um fragmento de 6 pb e outro de 30 pb. O resultado disso é que, com a divisão da DVR ocorre a “perda” do alvo para um dos *primers* e a não amplificação de um espaçador, mesmo ele estando presente no *locus* (FILLIOL et al., 2000; LEGRAND et al., 2001).

Marcadores moleculares linhagem-específicos, como a sequência IS6110 e o *locus* DR têm sido explorados no desenvolvimento de diversos métodos que diferenciam isolados clínicos baseados no polimorfismo genético do DNA do *M. tuberculosis* (WARREN et al., 2002). Estas técnicas permitem a distinção dessas linhagens, sendo úteis também para a diferenciação dos membros do CMTB além de facilitarem os estudos epidemiológicos (van EMBDEN et al., 1993).

Os métodos atualmente mais utilizados para a este fim são a genotipagem do *M. tuberculosis* utilizando o polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição da sequência de inserção IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorfism – RFLP-IS6110*), o *Spoligotyping (Spacer Oligonucleotide Typing)* e o MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats*) (CDC, 2009; MATHEMA et al., 2006; SUFFYS et al., 2000).

A figura 3 ilustra a posição das principais regiões polimórficas (IS6110, MIRUs e DR) no genoma do *M. tuberculosis*, que servem como base para as técnicas de genotipagem mais comumente utilizadas.

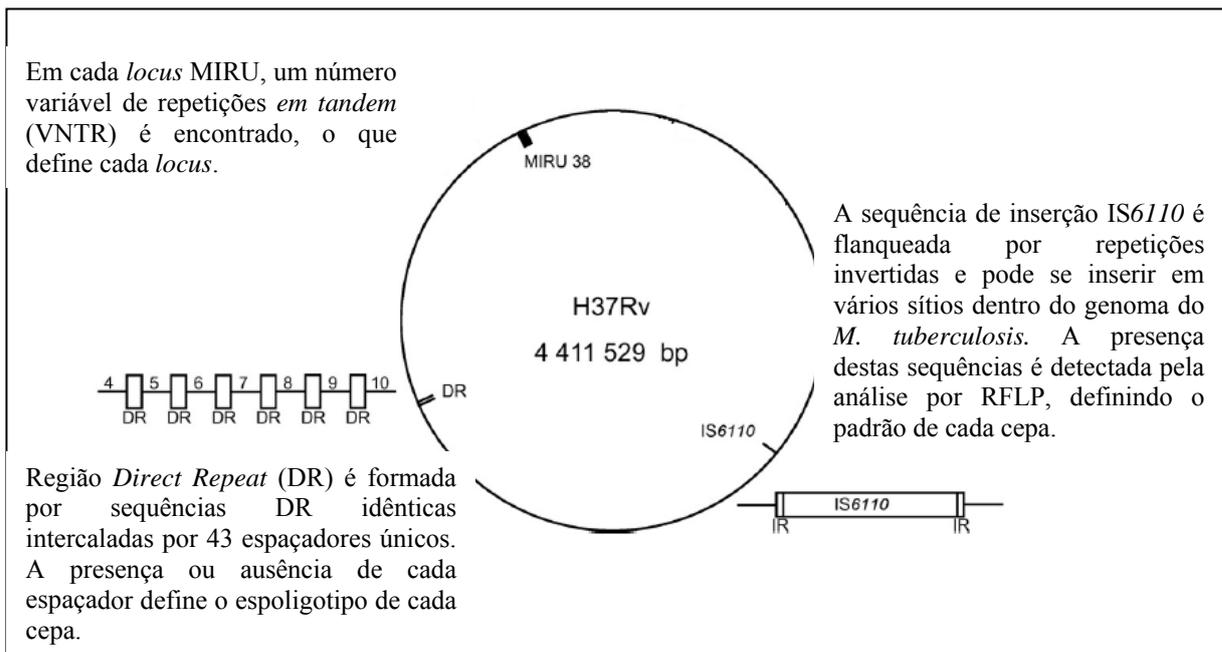


Figura 3. Representação esquemática do genoma do *M. tuberculosis*, indicando algumas das regiões polimórficas que servem de base genética para as técnicas de genotipagem. O cromossomo circular da cepa de referência H37Rv é mostrado juntamente com exemplos dos principais elementos genéticos usados para a genotipagem das estirpes. Para simplificar, somente um *locus* MIRU e uma *IS6110* são exibidos.

Fonte: Adaptado de Nicol; Wikinson, 2008.

2.5.1 Técnicas Moleculares Aplicadas à Genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis*

2.5.1.1 *Restriction Fragment Length Polymorphism* – *IS6110* (RFLP – *IS6110*)

A genotipagem por RFLP-*IS6110* detecta variações geradas pelo elemento de inserção *IS6110*; é um método de genotipagem altamente discriminatório, amplamente utilizado no estudo epidemiológico da TB (CDC, 2008).

É realizado de acordo com um protocolo padronizado internacionalmente e compreende a purificação do DNA genômico a partir de cultura, digestão do DNA por enzima de restrição (*PvuII*) que gera fragmentos de diferentes comprimentos que são posteriormente separados por tamanho em eletroforese em gel de agarose. A seguir, desnaturação do DNA no gel, transferência do DNA do gel para uma membrana de nitrocelulose, fixação do DNA à membrana e posterior marcação com sonda genética, seguida de hibridização da sonda com o

DNA e, por último, lavagem, revelação e documentação da amostra (CDC, 2008; van EMBDEN et al., 1993).

Apesar de ser o padrão-ouro no *fingerprinting* dos membros do CMTB, esta técnica possui limitações quando utilizada para tipar linhagens com baixo número de cópias da sequência IS6110, onde as posições de bandas apresentam menor polimorfismo, resultando em baixa diversidade (KAMERBEEK et al., 1997; RADHAKRISHNAN; KUMAR; MUNDAYOOR, 2001), levando a sugerir a necessidade do emprego de vários métodos para se aumentar o poder discriminatório (PANDOLFI et al., 2007).

Ao contrário das análises por *Spoligotyping* e MIRU-VNTR, cujos resultados podem ser facilmente traduzidos em designação numérica específica, o RFLP produz padrões complexos aos quais não podem ser dadas derivações matemáticas simples, dificultando esta análise quando se trabalha com grande número de amostras, onde os padrões gerados não podem ser comparados visualmente – como acontece quando se trabalha com apenas duas amostras em um mesmo gel –, exigindo assim sofisticados programas computacionais (CDC, 2008).

Além disso, tem alto custo quando comparada às demais, é trabalhosa e demorada, pois requer, ao contrário das técnicas baseadas em PCR, crescimento de um grande número de bacilos para extração de DNA em quantidade e qualidade suficientes para a análise, inviabilizando seu uso em situações onde seja de suma importância obter resultados rápidos, como em surtos, por exemplo, além de não poder ser utilizada em casos onde os bacilos não são mais viáveis (CDC, 2008; PANDOLFI et al., 2007; SCOTT et al., 2005). Desta forma, é tendência mundial a substituição desta técnica por outras de execução mais rápida e facilitada (PANDOLFI et al., 2007).

2.5.1.2 *Spacer Oligonucleotide Typing – Spoligotyping*

A tipagem por *Spoligotyping*, ou espoligotipagem, baseia-se no polimorfismo de DNA presente em uma região cromossômica específica e exclusiva do CMTB, o *locus* DR. Este *locus* contém um número variável de cópias de uma repetição direta de 36 pb, múltiplas e bem

conservadas, intercaladas por 43 seqüências espaçadoras específicas e não repetitivas de 35-41 pb (Figura 3). As linhagens variam em número de seqüências DR e quanto à presença ou ausência destes espaçadores, e evoluem através da perda sucessiva dos mesmos na região DR, sem a habilidade de readquirir os espaçadores perdidos (GROENEN et al., 1993; KAMERBEEK et al., 1997; MATHEMA et al., 2006).

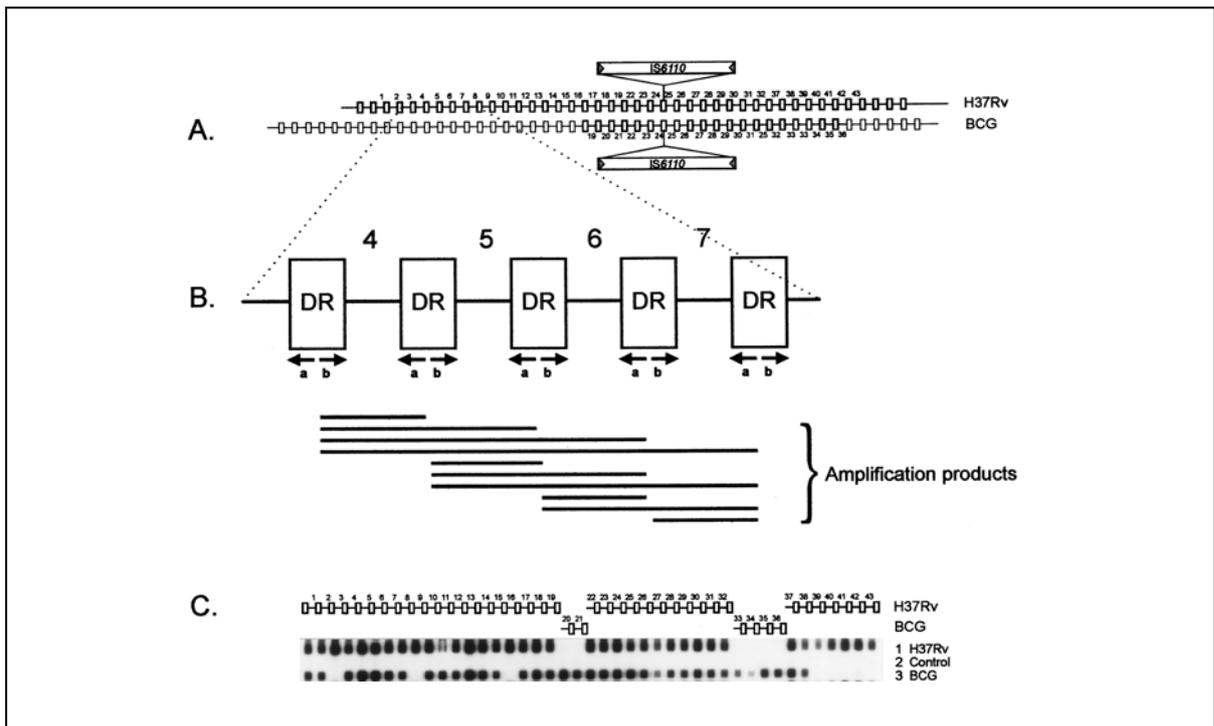


Figura 4. (A) Esquema da estrutura do locus DR no genoma micobacteriano. (B) Princípio da amplificação *in vitro* da região DR por PCR. (C) Padrões de hibridização (espoligopadrões) de DNA micobacteriano amplificado de cepas de *M. tuberculosis* H37RV e de *M. bovis* BCG (a ordem dos espaçadores corresponde à sua ordem no genoma).

Fonte: Adaptado de Kamerbeek et al., 1997.

Os padrões ou perfis de *Spoligotyping* (espoligopadrões) são obtidos através de amplificação da região DR por PCR (que utiliza um *primer* biotilado) e posterior hibridização dos produtos amplificados com oligonucleotídeos complementares às regiões espaçadoras, que estão imobilizados em uma membrana de *nylon*, onde os 43 espaçadores de seqüência conhecida estão previamente sensibilizados. Após a hibridização, a membrana é incubada com conjugado streptavidina-peroxidase. O resultado é obtido pela hibridização ou não de cada seqüência espaçadora, resultando em um padrão de hibridização que é comparado entre as diferentes amostras.

A detecção destes padrões é feita pela análise visual da membrana, graças à ação da peroxidase, que se liga à biotina ligada aos produtos de PCR e catalisa a reação, resultando em emissão fluorescência, que é registrada em filme de autorradiografia (Raio-X).

Por fundamentar-se na amplificação por PCR, é vantajosa para tipar *M. tuberculosis* diretamente em amostras clínicas, dispensando a etapa de crescimento do microrganismo, além da possibilidade de ser usada em espécimes não mais viáveis para cultivo, permitindo também a simultânea detecção e diferenciação de membros do CMTB (DONOGHUE et al., 2004; FLETCHER et al., 2003; KAMERBEEK et al., 1997; MAZARS et al., 2001). É uma valiosa ferramenta molecular, especialmente nos casos onde as cepas apresentam poucas cópias do IS6110 e quando o DNA está altamente fragmentado, pois pequenos fragmentos de 55 a 60 pb são suficientes para fornecer um resultado positivo, tornando viável sua utilização em estudos com material escasso, como os de origem arqueológica (BAUER et al., 1999; LEÃO; PORTAELS, 2007).

Esta técnica tem a vantagem de ser de rápida execução, ter boa reprodutibilidade, não requerer investimento excessivo em equipamentos específicos, além de permitir a análise de um grande número de cepas e facilitar a diferenciação das espécies do CMTB pela simples análise visual (DAVID et al., 2004).

Os resultados são expressos em um código binário de 43 dígitos (1 = hibridização; 0 = ausência de hibridização), que podem ser convertidos em um formato mais curto, o código octal, de 15 dígitos. Pela designação octal, o código binário é lido em 14 grupos de três dígitos cada (o 43º espaçador é lido sozinho, simplesmente como 0 ou 1), seguindo regras padronizadas (DALE et al., 2001). Assim, cada série binária 000, 001, 010, 011, 100, 101, 110 e 111 é lida respectivamente como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Isto permite e facilita a comparação de resultados obtidos em diferentes laboratórios (CDC, 2008; DALE et al., 2001). (Quadro 1).

Mazars et al. (2001) descreveram as condições específicas de amplificação de cada *loci*, que envolvem a hibridização dos *primers* à região flanqueadora dos MIRUs. O tamanho dos fragmentos é verificado visualmente por posterior separação dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose. Os resultados são relatados como denominações de 12, 15 ou 24 caracteres, sendo que cada caractere é correspondente ao número de repetições em um dos *loci* listados em uma ordem padrão (CDC, 2008). Consiste em um sistema altamente reprodutível e rápido, havendo geração de genótipos confiáveis baseado no estudo detalhado dos *loci* contendo VNTRs do genoma do CMTB.

A análise por MIRU pode ser automatizada, diminuindo-se o tempo de realização da técnica e a chance de erros e facilitando a manipulação das amostras, sendo, porém, mais cara que a sua versão manual, tendo seu uso justificado apenas em estudos de grande número de amostras (SUPPLY et al., 2001). Produz resultados intrinsecamente digitais que podem ser facilmente catalogados em uma base de dados de computador, cujos padrões gerados podem ser comparados aos de uma base de dados internacional (BARNES; CAVE, 2003; CDC, 2008). Além disso, pode ser aplicado diretamente a culturas sem purificação do DNA (BARNES; CAVE, 2003).

A técnica MIRU-VNTR possibilita uma comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas e permite seu rastreamento, de forma semelhante ao RFLP, sendo, no entanto, de execução muito mais fácil.

2.5.2 Principais Famílias entre as Espécies de *M. tuberculosis* Baseadas em *Spoligotyping*

Agrupamentos de isolados em famílias, baseados nos sistemas de genotipagem comumente utilizados, são, na maioria, dependentes do limiar de similaridade entre as cepas, que é determinado pelos investigadores. Geralmente, uma linhagem familiar pode ser descrita como um grupo de isolados que compartilham biomarcadores específicos ou propriedades indicativas de um ancestral recente em comum (MATHEMA et al., 2006).

Em linguagem epidemiológica, um *cluster* é definido como dois ou mais isolados obtidos de diferentes pacientes com genótipos idênticos ou quase idênticos (SMALL; BEHR,

1997). Isolados agrupados têm uma elevada probabilidade de estarem envolvidos na mesma cadeia de transmissão recente da doença, e isto pode ser confirmado pela investigação das ligações epidemiológicas entre estes pacientes. Isolados que não pertencem a nenhum *cluster* indicam provável reativação da infecção latente (SMALL; BEHR, 1997; VITOL, 2006).

Em 1993, com a descoberta da natureza polimórfica do *locus* DR e o posterior desenvolvimento do método *Spoligotyping*, baseado nesta variabilidade, introduziram-se conceitos e ferramentas mais modernos, rápidos, reprodutíveis e com baixo custo para a genotipagem do CMTB (HERMANS et al., 1991; KAMERBEEK et al., 1997; RASTOGI; SOLA, 2007).

Informações baseadas em *Spoligotyping* têm descrito famílias e subfamílias de cepas que demonstram perfis ou padrões de *Spoligotyping* específicos, que se distinguem uns dos outros pela presença ou ausência de certos espaçadores entre as regiões DR. No entanto, agrupamentos de cepas em um grupo ou família, baseados em padrões de *Spoligotyping* comuns, muitas vezes exibem diferentes – porém relacionados – perfis de RFLP-IS6110, com 60% de similaridade entre os mesmos (MATHEMA et al., 2006; VITOL et al., 2006). Desta forma, embora grupos de isolados que compartilham o mesmo padrão de *Spoligotyping* possam representar cadeias de transmissão recente, eles também podem representar similaridades genéticas mais amplas (ancestral comum distante); já aqueles com padrões de diferentes podem ser seguramente considerados genótipos distintos (HAYWARD; WATSON, 1998).

Sreevatsan et al., (1997), baseados na combinação de polimorfismos presentes no genoma das espécies pertencentes ao CMTB, classificaram as mesmas em três Grupos Genéticos Principais (PGG – *Principal Genetic Group*). Muitas famílias de *M. tuberculosis* foram identificadas baseadas no padrão de *Spoligotyping* e agrupadas em um dos três PGG. O PGG1 inclui as famílias *East African-Indian* (EAI), *Beijing* e *Central Asian* (CAS) ou Dheli. O PGG2 inclui as famílias *Harlem*, *Latin American and Mediterranean* (LAM) e X. A família T e outras famílias ainda não muito bem caracterizadas estão classificadas no PGG3 (GOH et al., 2005; RAHIM et al., 2007; RASTOGI; SOLA, 2007).

Em estudo posterior realizado por Brosch et al., (2002), que analisaram a distribuição de 20 regiões variáveis resultantes de eventos de inserção e deleção no genoma

de espécies do CMTB, estas espécies foram divididas, com base na presença ou ausência de uma sequência específica de 2Kb (TbD1), em cepas “antigas” (*‘ancient’ strains*), denominadas TbD1+ e cepas “modernas” (*‘modern’ strains*), denominadas TbD1-, respectivamente (RASTOGI; SOLA, 2007). São classificadas como da linhagem “moderna” as famílias Beijing, LAM, Haarlem, T, X e *Family33* (F33 – Família 33) e da linhagem “antiga” a família EAI (GOH et al., 2005; RASTOGI; SOLA, 2007).

Atualmente, um total de 62 linhagens/sublinhagens do CMTB são detalhadas na 4ª e última versão do Banco de Dados Internacional de *Spoligotypes* (SpolDB4), que descreve 1.939 (91,4% dos isolados) padrões de *Spoligotyping* compartilhados por duas ou mais amostras (*Spoligo-International-Type number* – SIT) e 3.370 (8,6% dos isolados) padrões únicos, representando um total de 39.295 isolados clínicos provenientes de indivíduos de 141 países (BRUDEY et al., 2006).

Na versão *on line* deste banco de dados, o SITVIT (Disponível em: <<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>>), estão depositadas atualmente 36.609 entradas, das quais 2.436 são de cepas isoladas no Brasil, porém nem sempre de origem brasileira, 1.734 entradas são de cepas de origem brasileira (isoladas no Brasil e em outros países) e 1.661 entradas são de cepas de origem brasileira e isoladas no Brasil (SITVIT, 2010).

O SITVIT é um banco de dados exclusivo dos dois principais marcadores moleculares: espoligotipos e MIRU-VNTRs; é um *website* totalmente interativo que também fornece ferramentas para conversão dos códigos octal em binário e vice-versa, além de fornecer mapas da distribuição geográfica das linhagens e informações sobre a origem e número de cada amostra depositada.

Além do SITVIT, foi desenvolvido o SpotClust (VITOL et al., 2006; disponível em: <<http://cgi2.cs.rpi.edu/~bennek/SPOTCLUST.html>>), um algoritmo computacional que usa modelos matemáticos de distribuição de probabilidades para classificar as bactérias do CMTB entre prováveis famílias e subfamílias, baseado em seus padrões de *Spoligotyping*, tendo como modelo as famílias descritas previamente na 3ª versão do Banco de Dados Internacional de *Spoligotypes* (SpolDB3). Ele incorpora informações biológicas sobre a

evolução dos espoligotipos, porém sem a intenção de obter a filogenia completa do CMTB e também está disponível para livre consulta na *internet* (VITOL et al., 2006).

O SpotClust atribui, aos perfis submetidos à comparação, uma família e subfamília definidas por *Spoligotyping* entre as 36 disponíveis, indicando a probabilidade dos mesmos de pertencer a cada uma delas: *M. tuberculosis* (Beijing, T1-T4, Haarlem1-3, X1-X3, EAI1-5, CAS, LAM1-10, S, H37Rv e *Family33-36*), *M. bovis* BCG, *M. africanum* e *M. microti* (VITOL et al., 2006). Para padrões de *Spoligotyping* não relatados previamente, é uma ótima ferramenta adicional que pode alocar estes padrões em famílias (ELDHOLM et al., 2006).

Métodos que atribuem padrões obtidos por *Spoligotyping* em famílias são necessários para explorar de forma satisfatória os resultados obtidos com a caracterização genética no controle da TB. Estudos de epidemiologia molecular têm revelado, nos últimos anos, que certas cepas emergentes de *M. tuberculosis*, que induzem às formas mais severas de TB, têm manifestado altas taxas de falência ao tratamento que outras, podendo assim ser responsáveis por acentuar a carga da doença em alguns países (LAN et al., 2003).

Alguns estudos que investigaram a associação entre certos genótipos de *M. tuberculosis* e resistência às drogas utilizadas no tratamento da TB, demonstraram que em certas regiões do mundo têm surgido cepas pertencentes às famílias Beijing e Haarlem associadas à resistência às drogas (rifampicina, estreptomicina, isoniazida, etambutol) (BROWN et al., 2010; DALLA COSTA et al., 2009; ECA, 2006; MARAIS et al., 2006), e também a associação entre a resistência à pirazinamida e à estreptomicina e cepas da subfamília LAM1 (BROWN et al., 2010). Além disso, têm sido descritas mutações específicas em genes de *M. tuberculosis* que conferem resistência à rifampicina ou estreptomicina, particularmente nas cepas pertencentes às famílias Beijing, LAM e Haarlem (DALLA COSTA et al., 2009; LIPIN et al., 2007).

Ferramentas como as descritas (SITVIT e SpotClust) estão disponíveis para acesso livre na *internet*, permitindo que os pesquisadores de diversos locais do mundo comparem os perfis obtidos em seus estudos utilizando *Spoligotyping* e MIRU-VNTR (este último somente disponível no SITVIT), além de possibilitarem que estes perfis sejam depositados nos respectivos bancos de dados, permitindo assim que os resultados de estudos

locais possam ser analisados e comparados com a população global de *M. tuberculosis* circulantes no mundo.

As três principais famílias genotípicas, LAM, Harleem e T são as mais frequentes na África, América Central, Europa e América do Sul. Estas famílias englobam 80% de todos os isolados brasileiros incluídos no SpolDB4 (BRUDEY et al., 2006). Lima et al (2010), ao avaliarem a diversidade de *M. tuberculosis* isolados no Pará no período de 1998 a 2007, relatam que estas três famílias foram responsáveis por 75,5% dos isolados avaliados.

Na tabela 1 estão descritas as principais famílias/subfamílias agrupadas em SITs de acordo com as frequências de distribuição mundial e seus respectivos números SIT, padrões de *Spoligotyping* e códigos octais.

2.6 ANÁLISE ESPACIAL, GEOPROCESSAMENTO E SAÚDE

Compreender a distribuição espacial de dados oriundos de fenômenos ocorridos no espaço constitui hoje um grande desafio para a elucidação de questões centrais em diversas áreas do conhecimento, inclusive na saúde. Isto tem se tornado possível graças à disponibilidade de sistemas de informação geográfica (SIG) de baixo custo e de relativa facilidade de manipulação. Estes sistemas permitem a visualização de variáveis como a distribuição dos casos de uma doença, por exemplo, através de mapas, necessitando, para isso, dispor de um banco de dados e de uma base geográfica, como o mapa de um município (CÂMARA et al., 2004).

O uso de mapas e a preocupação com a distribuição geográfica de doenças são bastante antigos. Um estudo clássico foi realizado pelo médico britânico John Snow que utilizou o mapeamento para localizar casos de cólera, relacionando-os posteriormente às diferentes bombas públicas de abastecimento de água durante uma epidemia da doença em Londres, no ano de 1854. Esta situação, onde a origem da epidemia foi identificada sem que se conhecesse qual o agente etiológico envolvido, foi considerada um dos primeiros exemplos de análise espacial, demonstrando a importância da relação espacial entre os dados para a compreensão do fenômeno (CÂMARA et al., 2004; HINO et al., 2006).

Na caracterização dos problemas de análise espacial são considerados três tipos de dados: Eventos ou Padrões Pontuais, Superfícies Contínuas e Áreas com Contagens e Taxas Agregadas. Fenômenos expressos através de ocorrências identificadas como pontos localizados no espaço, como a ocorrência de doenças, por exemplo, são denominados processos pontuais. Neste caso, o objeto de interesse é a própria localização espacial do evento em estudo e o objetivo é estudar a distribuição espacial desses pontos, testando hipóteses sobre o padrão observado: se é aleatório ou, ao contrário, se este se apresenta em aglomerados ou regularmente distribuídos. Com isso, também se busca estabelecer o relacionamento de ocorrência de eventos com características do indivíduo, incorporando a possibilidade de haver algum fator ambiental (CÂMARA et al., 2004).

A urbanização tem sido um fator predominante no estabelecimento humano em escala mundial. Particularmente em países em desenvolvimento, os moradores de cidades

vivem em diferentes condições ambientais como moradia, emprego, estilo de vida e alimentação, entre outros, tendo sua saúde afetada pela poluição, superpopulação, estresse e pobreza. O espaço, desta forma, exerce pressões econômicas e políticas sobre a sociedade, criando condições diferenciadas para sua utilização por grupos sociais (CARVALHO; PINA; SANTOS, 2000).

Conhecer as condições de vida e saúde dos diversos grupos populacionais é uma etapa indispensável do processo de planejamento da oferta de serviços e da avaliação do impacto das ações de saúde. A saúde pública e o ambiente estão intrinsecamente influenciados pelos padrões de ocupação do espaço, de forma que não basta descrever as características das populações, mas é necessário localizar o mais precisamente possível onde estão acontecendo os agravos, que serviços a população está procurando, o local de potencial risco ambiental e as áreas onde se concentram situações sociais vulneráveis (CARVALHO; PINA; SANTOS, 2000).

Na vigilância epidemiológica, a análise da distribuição espacial de agravos possibilita determinar padrões da situação de saúde de uma área, evidenciar disparidades espaciais que levam à delimitação de áreas de risco para a mortalidade ou incidência de eventos mórbidos, possibilitando planejar e programar atividades de prevenção e controle de doenças em grupos homogêneos segundo determinados riscos (CARVALHO; PINA; SANTOS, 2000).

O geoprocessamento é definido como um conjunto de tecnologias voltadas para a coleta e tratamento de informações espaciais com determinado objetivo, executadas por sistemas específicos para cada aplicação (BARCELLOS et al., 2008). É um termo amplo, que engloba diversas tecnologias de tratamento e manipulação de dados geográficos, através de programas computacionais, das quais se destacam o sensoriamento remoto, a digitalização de dados, a utilização de Sistemas de Posicionamento Global (GPS) e os SIG (CARVALHO; PINA; SANTOS, 2000). O georreferenciamento dos eventos de saúde é importante na análise e avaliação de riscos à saúde coletiva, particularmente as relacionadas com o meio ambiente e com o perfil sócio-econômico da população (SKABA et al., 2004).

Estudos conclusivos envolvendo a análise da distribuição espacial de certas morbidades têm sido desenvolvidos no Brasil. No estudo desenvolvido por Chiesa et al.

(2002), buscou-se descrever o uso de técnicas de geoprocessamento a fim de caracterizar as desigualdades sociais que se configuravam em condições de risco aos agravos respiratórios em crianças de uma área abrangida por um Centro de Saúde Escola de São Paulo. Os autores visualizaram a contribuição do estudo para o reconhecimento das condições de risco no território de responsabilidade de uma unidade básica de saúde, possibilitando discussão na perspectiva da promoção da melhoria das condições de saúde daquela população.

Em seu estudo, Lapa et al. (2006) avaliaram a distribuição espacial de casos de hanseníase em residentes em Olinda, Pernambuco, no período de 1991 a 2000 e concluíram que o uso da técnica da distribuição espacial aplicada ao caso da hanseníase na área do estudo permitiu identificar que o problema não se dava de forma homogênea, além de ter sido possível observar diferenças entre subáreas, relativas aos focos da doença, que poderiam orientar estratégias e ações para o seu controle.

Hino et al. (2007) propuseram ilustrar, por meio dos agravos de saúde ocorridos na cidade de Ribeirão Preto, de que forma uma ferramenta de um SIG associada à conhecimentos específicos poderia contribuir na tomada de decisões no município. Os mapas temáticos obtidos ilustraram a distribuição da densidade de casos de dengue, hanseníase e tuberculose no município como uma maneira complementar de análise de informações de saúde, apontando as áreas prioritárias para o controle destas doenças.

Em estudo realizado em Montreal, Canadá, cidade com baixa incidência de TB, foram detectadas áreas com alta concentração de casos da doença. A utilização de técnicas espaciais permitiu verificar que isso ocorria em quatro áreas onde havia concentração maior de estrangeiros e em uma área com predomínio de cidadãos canadenses, havendo, porém, sobreposição de áreas. No entanto, a utilização de técnicas moleculares (RFLP-IS6110 e *Spoligotyping*) permitiu verificar que, embora existisse sobreposição espacial de uma zona de alta incidência entre estrangeiros e outra de nascidos no Canadá, havia pouca evidência de transmissão entre os dois grupos, porém muita evidência de transmissão entre aquele grupo de estrangeiros (HAASE et al., 2007).

Cafrune (2009) observou, através do mapeamento dos casos incluídos em seu estudo realizado em Porto Alegre, áreas com agrupamentos de casos compartilhando o mesmo

perfil de *Spoligotyping*, e ressaltou a importância de aumentar a vigilância e investigação naquela região.

A análise espacial de padrões epidemiológicos tem valor na avaliação das relações entre saúde e ambiente e no seu controle, pois o conhecimento da estrutura e dinâmica espacial possibilita a caracterização da situação em que ocorrem eventos de saúde, permitindo ações de controle, alocação de recursos e preparo de ações de emergência (HINO, 2004).

Desta forma, a simples função descritiva da construção de mapas temáticos, que permite a visualização da distribuição pontual de eventos de interesse, como a ocorrência de doenças, melhora o entendimento da distribuição da doença e pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais específicas para conter sua disseminação.

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento da biologia molecular nos últimos anos tem aumentado substancialmente as possibilidades para o estudo da epidemiologia das doenças infecciosas. A TB é um exemplo de doença infecciosa em que técnicas de biologia molecular permitiram a obtenção de informações que seriam difíceis ou até mesmo impossíveis de serem conseguidas por meio de métodos laboratoriais convencionais (PANDOLFI et al., 2007).

Desde a descoberta da natureza polimórfica do DNA do *M. tuberculosis*, a diferenciação de cepas tornou-se um instrumento valioso no estudo da epidemiologia da TB. A genotipagem do *M. tuberculosis* pode ser útil na elucidação da história natural da epidemia da TB e na avaliação dos esforços para o controle da doença. O reconhecimento de cepas individuais de *M. tuberculosis* permite avaliar melhor a transmissão da TB pelo agrupamento daquelas com perfis moleculares idênticos isoladas em dois ou mais indivíduos, formando *clusters*, sugerindo transmissão recente, ou seja, que esses indivíduos tiveram contato recente ou pertencem à mesma cadeia de transmissão. Para tanto, foram desenvolvidas técnicas de tipagem molecular utilizando marcadores genéticos, como a região contendo “*Direct Repeats*” (BRASIL, 2002).

Diversos estudos baseados em biologia molecular, aliados ou não à epidemiologia clássica, têm sido desenvolvidos em diferentes países com a finalidade de descrever o perfil genético das cepas de *M. tuberculosis* envolvidas na transmissão da doença (DIAZ et al., 2001; SINGH et al., 2007), na resistência às drogas (DURMAZ et al., 2007; JOU et al., 2005; TANVEER et al., 2008), na avaliação dos perfis moleculares das linhagens envolvidas na transmissão da TB em locais de alta (BORSUK et al., 2005) e baixa incidência (HADDAD et al., 2006), entre outros, tornando-se ferramentas úteis para analisar a transmissão e a evolução destes agentes e caracterizar a dinâmica de transmissão da doença.

Estudos semelhantes vêm sendo realizados no Brasil (BORSUK et al., 2005; CAFRUNE et al., 2009; FANDINHO et al., 2000; MENDES et al., 2007a; 2007b), no entanto há pouca disponibilidade de estudos que avaliem a variabilidade genética do *M. tuberculosis* na Região Norte e, principalmente, no Pará (GOMES, 2006; LIMA, 2005; De SOUSA, 2003; RITACCO et al., 2008). Além disso, poucos estudos foram realizados utilizando o

Spoligotyping diretamente em DNA extraído de amostras clínicas (CAFRUNE et al., 2009; HEYDERMAN et al., 1998), especialmente de lâminas de baciloscopia (SURESH et al., 2007), que seria uma fonte potencialmente representativa de amostras para avaliar a diversidade genética de *M. tuberculosis* circulantes em todo o estado, principalmente naqueles locais onde não se dispõe da cultura do bacilo.

Desta forma, a possibilidade de aplicar com sucesso uma técnica de genotipagem como *Spoligotyping* em amostras de *M. tuberculosis* associados à infecção pulmonar em Belém e Ananindeua, e de visualizar como os casos geneticamente relacionados estão distribuídos geograficamente, poderá contribuir com o entendimento do perfil de distribuição clonal destas cepas e a identificação do padrão geral de ocorrência da doença, além de ser útil para guiar os esforços no combate e controle da TB nestes locais e, posteriormente, no Pará com um todo.

Como já foi demonstrado, a rápida e precoce obtenção de informações a respeito da identidade das cepas é importante para permitir o tratamento apropriado a ser iniciado, assim como para estabelecer medidas de controle da infecção a serem implementadas, pois o conhecimento de tipos sabidamente relacionados à multirresistência pode ser útil em alertar sobre a possível infecção com tais cepas e também em auxiliar no manejo clínico da doença durante seu curso (BROWN et al., 2010; CAFRUNE, 2009; DALLA COSTA et al., 2009; DIGUIMBAYE et al., 2006; ECA, 2006; GORI et al., 2005b; GOYAL et al., 1997a; IGNATOVA et al., 2006; LIPIN et al., 2007; MARAIS et al., 2006; NAMOUCHI et al., 2008).

Diante do exposto, é de grande importância o conhecimento dos perfis genéticos de *M. tuberculosis* circulantes e da distribuição espaço-temporal destes diferentes genótipos envolvidos na TB pulmonar nos municípios de Belém e Ananindeua, de modo a contribuir para a implementação das ações para seu controle e combate, dada a relevância do caráter preventivo para a política e as ações de saúde.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar genética, demográfica e geograficamente os casos de tuberculose pulmonar com baciloscopia positiva identificados nas Unidades Laboratoriais (UL) para o diagnóstico e controle da tuberculose dos municípios paraenses de Belém e Ananindeua, no período de outubro de 2007 a março de 2008.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Apresentar as características demográficas dos casos de tuberculose pulmonar com baciloscopia positiva incluídos no estudo;
- Realizar a caracterização genética, por *Spoligotyping*, das espécies do Complexo *M. tuberculosis* obtidas das amostras incluídas no estudo;
- Descrever as principais famílias genotípicas, definidas por *Spoligotyping*, encontradas entre os casos estudados;
- Avaliar a reprodutibilidade do *Spoligotyping* para o tipo de amostra investigada;
- Geolocalizar os casos com baciloscopia positiva para BAAR incluídos no estudo;
- Ilustrar a distribuição espaço-temporal dos perfis genéticos obtidos por *Spoligotyping* dos casos estudados na região.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo é do tipo descritivo e analítico transversal retrospectivo.

5.2 ÁREA GEOGRÁFICA DO ESTUDO

5.2.1 Belém

Belém, capital do estado do Pará, é cidade mais populosa do estado e a segunda mais populosa da Região Norte, com população estimada em 2009 de 1.437.600 habitantes (IBGE, 2010a) e localiza-se geograficamente a 48°30'14'' W de longitude e 1°27'21'' S de latitude. Sua região metropolitana é composta por cinco municípios (Belém, Ananindeua, Marituba, Benevides e Santa Bárbara) que totalizam 2.105.621 habitantes (IBGE, 2010a), sendo que a maioria da população reside em zona urbana.

O município de Belém está dividido em 71 bairros, com um território de 1.065 km², sendo a porção continental correspondente a 365.93 km², ou 34.36% da área total e a porção insular, composta por 39 ilhas, que correspondente a 699.07 km², ou 65.64%. (BELÉM, 2010). Localizada em plena faixa equatorial, a cidade de Belém limita-se ao norte com a Baía do Marajó, ao leste com os municípios de Benevides, Santo Antônio do Tauá, Ananindeua e Santa Bárbara, ao sul com o município de Acará e a oeste com as Baías do Guajará e Marajó (BELÉM, 2010).

5.2.2 Ananindeua

O município de Ananindeua é o segundo mais populoso do estado, com população estimada em 2009 de 505.512 habitantes (IBGE, 2010a). Possui área territorial com 185 km² (IBGE, 2010a) e está localizado geograficamente na longitude de 48°22'20" W e latitude de 01°21'56" S. É margeado pelo Rio Maguari onde localizam-se suas 14 ilhas. Limita-se ao norte e a oeste com o município de Belém, ao sul com o rio Guamá, a leste com o município de Marituba e a noroeste com o município de Benevides. Está dividido político-administrativamente em cinco Pólos (Pólos I a V) (ANANINDEUA, 2010).

5.3 AMOSTRAS

Foram utilizadas lâminas provenientes da rotina do Controle de Qualidade Externo (CQE) realizado pelo Laboratório Central do Pará (LACEN/PA). O LACEN/PA recebe, para a realização do CQE, lâminas de baciloscopia enviadas por todas as Unidades Laboratoriais (UL) do estado, que produzem estes exames para o diagnóstico e controle da TB. O LACEN/PA tem parceria com o Laboratório de Biologia Molecular/SABMI desde 2006 (FURLANETO et al., 2007; SOUSA et al., 2007) e cedeu as amostras especialmente para este estudo (Anexo A). As lâminas utilizadas foram coradas pelo método de ZN, sendo classificadas como BAAR indeterminado (1-9 BAAR/100 campos), BAAR + (10-99 BAAR/100 campos), BAAR ++ (1-10 BAAR/campo/50 campos) e BAAR +++ (>10BAAR/campo/20 campos) (BRASIL, 2008a), confeccionadas no período de outubro de 2007 a março de 2008.

As amostras de pacientes residentes em Belém foram provenientes de UL pertencentes ao Centro Saúde Escola do Marco (CSEM) e Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB), que na época da realização dos exames eram referência estadual e regional para o tratamento da TB, respectivamente, e as amostras pertencentes aos pacientes residentes em Ananindeua foram provenientes de oito UL para o diagnóstico e controle da TB deste município, sendo que estas compreenderam a totalidade das baciloscopias realizadas para o diagnóstico e controle da TB em Ananindeua no período do estudo.

5.3.1 Etapas de Seleção das Amostras

Os resultados do estudo são apresentados por caso. Desta forma, foi necessário fazer uma triagem inicial, selecionando uma lâmina por paciente, pois alguns destes realizaram o exame mais de uma vez, contando assim com mais de uma entrada no banco de dados; este procedimento correspondeu à primeira etapa de seleção. No entanto, a fim de avaliar a reprodutibilidade da técnica em amostras distintas do mesmo paciente, foi selecionada, aleatoriamente, uma lâmina extra de cada paciente, para aqueles que realizaram o exame mais de uma vez, correspondendo esta à segunda etapa de seleção.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas no estudo lâminas com baciloscopia positiva para BAAR, de origem pulmonar, coradas pelo método de ZN, provenientes de pacientes residentes nos municípios paraenses de Belém e Ananindeua, sem restrição de gênero e idade, confeccionadas no período de outubro de 2007 a março de 2008 pelas UL incluídas no estudo, que estivessem acompanhadas da cópia do Livro de Registro de Baciloscopia e Cultura, e submetidas ao CQE do LACEN-PA. Foram utilizadas lâminas confeccionadas para diagnóstico e controle da TB.

5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas do estudo as demais lâminas de baciloscopia que não atenderam a todas as especificações descritas no item 5.4.

5.6 AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA DOS CASOS ESTUDADOS

Os dados demográficos referentes aos pacientes que foram obtidos a partir dos dados contidos no Livro de Registro de Baciloscopia e Cultura, encaminhados pela UL de origem, juntamente com as lâminas de baciloscopia, estão descritos abaixo:

- Nome completo;
- Gênero;
- Data de nascimento/idade na ocasião do exame;
- Endereço de residência;
- Unidade Laboratorial de origem da lâmina.

5.7 PRECAUÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos do Instituto Evandro Chagas (CEP/IEC/SVS/MS) em 06 de abril de 2009, parecer nº 003/2009, protocolo CEP/IEC nº 0004/2009, CAAE: 0004.0.072.073-09 (Anexo B).

5.8 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

5.8.1 Extração do DNA

O DNA utilizado foi extraído conforme proposto por Furlaneto et al., (2007). Cada amostra foi removida cuidadosamente da lâmina e recolhida diretamente para um microtubo estéril, onde foram adicionados 305µL de solução de digestão, preparada com 150 µL de tampão de lise (Tris HCl pH 9,0 300mM, EDTA 100mM, sucrose 4,8%, SDS 1,25%), 150 µL de tampão de homogeneização (Tris HCl pH 8 10mM, NaCl 60mM, EDTA pH 8

10mM, sacarose 5%) e 5 µL de proteinase K (10mg/mL de água ultrapura [Qiagen]), e em seguida lacrados e incubados em BM (56°C/4 h). Após esta etapa, foram adicionados aos microtubos 100 µL de NaCl 5 M (Proquimios, RJ), seguido de homogeneização por inversão e centrifugação (12.000 rpm/5 min) (MCD-200, Hsiangtai Mach., Taiwan) à temperatura ambiente, para a precipitação de proteínas. O sobrenadante (DNA) foi cuidadosamente transferido para outro microtubo estéril, e foram adicionados a ele 700 µL de etanol absoluto (Merck, Alemanha) gelado, seguido de homogeneização por inversão e resfriamento (-20°C/60 min), para auxiliar na precipitação do DNA. Em seguida, o DNA foi concentrado por centrifugação (12.000 rpm/5 min/4°C) (NT 805, Novatécnica, S.P.) e o etanol desprezado por inversão cuidadosa dos microtubos. Foi adicionado ao sedimento 1 mL de etanol 70% (v/v) gelado (Merck, Alemanha), seguido de mistura por inversão e nova centrifugação (12.000 rpm/5 min/4°C). O etanol foi removido por inversão cuidadosa do microtubo seguida por evaporação. Por fim, o DNA foi hidratado com 100µL de água ultrapura autoclavada (56°C/300 rpm/15 min).

Para monitorar a ocorrência de falsos-negativos, em cada extração foi incluída uma lâmina nova que recebeu o mesmo tratamento das lâminas contendo as amostras, servindo assim de controle negativo na PCR para amplificação da sequência DR.

5.8.2 Técnica de *Spoligotyping*

A técnica foi realizada conforme descrito por Kamerbeek et al., (1997), com algumas adaptações (PARWATI et al., 2003). Foram utilizados os *primers* DRa (5' biotilado GGTTTTGGGTCTGACGAC 3') e DRb (5' CCGAGAGGGGACGGAAAC 3') e, como controles positivos, 20 ng das cepas *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG (Isogen, Bioscience BV). Para cada 18 amostras, foi incluído um controle negativo (água ultrapura autoclavada ou material recolhido de lâmina nova utilizada na extração), que foi processado junto com as amostras. Para cada 40 amostras, foi utilizado um par de controles positivos (*M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG). O teste original e as duplicatas, tanto na 1ª como na 2ª fase, foram realizados em dias diferentes utilizando membranas distintas.

As reações foram realizadas com 5 µL de DNA extraído das amostras em estudo, 20 pmoles de cada um dos *primers* DRa e DRb, 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen™, Life Technologies), 3.0 mM de MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha), tampão de reação 1X (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,0 U de HotStar *Taq* DNA polimerase (Qiagen, Hilden, Alemanha), solução Q 1X (Qiagen, Hilden, Alemanha) para um volume final de 50 µL. As amplificações por PCR foram realizadas em termociclador (PX2, ThermoHybaid, Inglaterra) através do seguinte programa: uma fase inicial de 3 min a 96°C, 45 ciclos de 96 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 30 seg e um ciclo final de 5 min a 72 °C.

Para hibridização, 30 µL dos produtos de PCR foram diluídos em 150 µL de 2XSSPE (0,02 M Na₂HPO₄*2 H₂O, 0,36 M NaCl, 2 mM EDTA; pH 7,4) / 0.1%SDS e desnaturados a 99 °C por 10 minutos, seguidos de rápido resfriamento. As amostras diluídas foram aplicadas em canais paralelos do *miniblotter* (MN45, Immunetics, Cambridge, MA) contendo uma membrana (Isogen, Bioscience BV, Holanda) previamente sensibilizada (250 mL de 2XSSPE/0.1%SDS, 5 min/60°C), de modo que ficassem perpendiculares às linhas dos 43 oligonucleotídeos imobilizados na membrana. O *miniblotter* foi então selado e mantido na posição horizontal por 60 min a 60°C em estufa de hibridização (MA-430, Marconi, SP), sem agitação.

Ao final deste tempo, as amostras foram aspiradas e a membrana foi lavada duas vezes com 2XSSPE/0.5% SDS (10 min/60°C) e depois incubada (60 min/42°C) com um conjugado streptavidina-peroxidase (1:1000) diluído em 2XSSPE/0.5%SDS, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com 2XSSPE/0.5%SDS (10 min/42°C) e recebeu mais duas lavagens com 2XSSPE sob agitação, por 5 min em temperatura ambiente.

A detecção dos sinais de hibridização foi realizada pela sensibilização de filme autorradiográfico (Ortho, AGFA, Argentina) através de reação de quimioluminescência (Kit Immobilion Western, Millipore, EUA), o que permitiu a definição dos padrões de *Spoligotyping* pela presença ou ausência dos 43 espaçadores presentes entre as sequências DR.

5.8.2.1 Fases de Execução do *Spoligotyping*

Também a fim de verificar a reprodutibilidade da técnica, todos os testes foram executados em duplicata, a partir de nova amplificação do DNA para todas as amostras, em dias diferentes e utilizando membranas distintas. De acordo com as etapas de seleção das amostras, o *Spoligotyping* foi realizado em duas fases:

- 1ª Fase: execução do *Spoligotyping* em duplicata para as amostras da 1ª etapa de seleção (amostras de Belém e de Ananindeua);
- 2ª Fase: execução do *Spoligotyping* em duplicata para as amostras extras da 2ª etapa de seleção (amostras de Belém e de Ananindeua).

5.9 GEOLOCALIZAÇÃO DOS CASOS ESTUDADOS

A localização dos casos incluídos no estudo foi feita através do registro de coordenadas geográficas (latitude e longitude) no local de residência de cada um, com o auxílio de aparelho receptor do Sistema de Posicionamento Global - GPS (GPS Map60CSx, GARMIN, Olathe, Kansas), e a base de dados formada com estas informações utilizou *software* compatível para integrar as bases cartográficas, imagens digitais e o conteúdo do estudo (ArcGIS 9.2, ESRI, EUA; TerraView 3.1, INPE, Brasil). Os endereços foram organizados em planilha do Excel[®] e, posteriormente, para facilitar a identificação dos mesmos, foram agrupados por Bairro (no caso de Belém) ou por Pólo (em Ananindeua).

O georreferenciamento dos casos de Belém foi realizado com o apoio do Laboratório de Geoprocessamento do Instituto Evandro Chagas (LABGEO/IEC/SVS/MS) e dos casos de Ananindeua foi realizado com o apoio do Laboratório de Geoprocessamento da Secretaria de Saúde do município de Ananindeua (LABGEO/SESAU/Ananindeua).

A base cartográfica do município de Belém foi cedida pelo IBGE para o LABGEO/IEC/SVS/MS e a de Ananindeua foi cedida pela Secretaria de Saneamento do município de Ananindeua para o LABGEO/SESAU/Ananindeua.

Foram inseridos nos mapas círculos coloridos, cujas posições representavam a localização geográfica e cujas cores representavam os diferentes perfis de *Spoligotyping* de cada caso.

5.10 INTERPRETAÇÃO E TABULAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR *SPOLIGOTYPING*

Após revelação, os perfis de hibridização obtidos com os 43 espaçadores foram transformados em formato binário (1 = presença de sinal e 0 = ausência de sinal) e introduzidos em uma planilha Excel[®] (Microsoft, EUA) e, junto com os perfis, foram criadas colunas contendo o código da amostra e os seus respectivos dados demográficos.

Esta planilha foi inserida na plataforma BioNumerics (BioNumerics 5.1, AppliedMaths, Bélgica) utilizando um “*Open DataBase Connection Protocol*” (ODBC) e, para a visualização dos *clusters* e estrutura populacional, foi construído um dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e algoritmo UPGMA. Foi definido como um *cluster* ou agrupamento um grupo de duas ou mais amostras que tiveram padrões idênticos de *Spoligotyping* provenientes de indivíduos distintos (100% de similaridade).

Os padrões obtidos pelo *Spoligotyping* foram comparados com os depositados no banco de dados SpolDB4 (BRUDEY et al., 2006) e SITVIT (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>) e foi feito agrupamento dos espoligotipos identificados em famílias segundo as regras descritas por Brudey et al. (2006). Genótipos não encontrados no SpolDB4 e SITVIT foram analisados pelo SpotClust (VITOL et al., 2006) para serem classificados em prováveis famílias. Espoligopadrões que não pareavam com nenhum outro padrão existente nos bancos de dados (SITVIT e SpolDB4) foram definidos como ‘verdadeiros órfãos - VO’ e aqueles que pareavam com um padrão definido como ‘órfão’ (*orphan*) nos bancos de dados foram designados neste estudo como ‘pseudo-órfão - PO’.

Foi estabelecido um consenso de intensidade dos sinais de hibridização e estes padrões foram examinados visualmente por dois avaliadores diferentes na intenção de diminuir erros causados por quaisquer artefatos sistemáticos que pudessem gerar dúvidas quanto aos resultados obtidos. Os espoligopadrões foram considerados ‘completos’ quando não houve dúvida quanto à presença de hibridização nos espaçadores e esta se apresentou definida e com intensidade constante, e ‘incompletos’ quando houve dúvida quanto à hibridização, como nos casos onde esta apresentou sinal fraco, indefinido e/ou irregular, sempre considerando os resultados obtidos nas duas fases de execução da técnica.

A taxa de diversidade dentro de cada família genotípica foi calculada dividindo-se o número de espoligotipos relacionados a uma família em particular pelo número total de amostras pertencentes a esta mesma família e a taxa total de diversidade da população de *M. tuberculosis* encontrada no estudo foi calculada pela razão entre o número total de espoligopadrões e o número total de amostras (ELDHOLM et al., 2006).

O índice discriminatório da técnica de *Spoligotyping*, ou HGDI (*Hunter-Gaston Discriminatory Index*), foi calculado como estabelecido por Hunter e Gaston (1988) através da seguinte fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

onde N é o número total de cepas (amostras) tipadas, s é o número total de padrões diferentes obtidos pelo método utilizado e n_j é o número de cepas (amostras) provenientes de cada padrão j . O HGDI varia entre 0.00 e 1.00, com o valor 0.00 indicando que todas as cepas são indistinguíveis e com o valor 1.00 indicando que todas as cepas da amostra são diferenciadas. O poder discriminatório aceitável para garantir confiabilidade na interpretação dos resultados foi definido como $HGDI > 0.9$ (HUNTER; GASTON, 1988).

O poder discriminatório de um método de tipagem está relacionado à sua habilidade em distinguir entre duas cepas não relacionadas, ou seja, é a probabilidade de que duas cepas retiradas aleatoriamente de uma população sejam classificadas em diferentes tipos por um método (DE JONG et al., 2009; HUNTER; GASTON, 1988).

5.11 LOCAIS DE EXECUÇÃO DAS ATIVIDADES

Para alcançar os objetivos propostos, houve colaboração interinstitucional, cujas atividades estão listadas no quadro 2.

Atividade	Laboratório	Instituição
Extração de DNA	Laboratório de BM/SABMI	IEC (Ananindeua-PA)
<i>Spoligotyping</i>	Laboratório de BM/SABMI	IEC (Ananindeua-PA)
Georreferenciamento dos casos de Belém-PA; Confecção dos mapas.	LABGEO	IEC (Ananindeua-PA)
Georreferenciamento dos casos de Ananindeua-PA; Confecção dos mapas.	LABGEO	SESAU (Ananindeua-PA)

Quadro 2. Atividades realizadas e locais de execução.

BM: Biologia Molecular; SABMI: Seção de Bacteriologia e Micologia; IEC: Instituto Evandro Chagas; LABGEO: Laboratório de Geoprocessamento; SESAU: Secretaria Municipal de Saúde de Ananindeua.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características demográficas dos pacientes foram testadas utilizando o teste Qui-Quadrado de Aderência (proporção de homens e mulheres no estudo), o Qui-Quadrado de Independência (proporção de homens e mulheres em agrupamentos ou entre perfis únicos) e o Teste *t de Student* (médias das idades entre indivíduos agrupados e os não agrupados).

O Qui-Quadrado: Partição e o Teste dos Resíduos foram utilizados para testar a diferença de rendimento na obtenção de espiligopadrões completos produzidos por amostras classificadas como BAAR indeterminado, BAAR +, BAAR ++ e BAAR +++. A reprodutibilidade dos resultados após as duplicatas foi testada através do teste Kappa.

Todos os testes foram executados com o auxílio do *software* BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) e resultados com $p \leq 0.05$ (bilateral) foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

6.1 AMOSTRAS SELECIONADAS

Após serem submetidas ao CQE-LACEN/PA e confirmadas como positivas quanto à presença de BAAR, foram enviadas para o estudo 419 lâminas confeccionadas no período selecionado. Destas, 116 (27,7%) lâminas foram excluídas inicialmente por estarem em desacordo com os critérios de inclusão, como aquelas lâminas cujos dados relativos ao endereço dos pacientes estavam ausentes ou incompletos (42 lâminas), lâminas que continham material de origem extrapulmonar (02 lâminas: linfonodo e abscesso paravertebral) e, ainda, lâminas de pacientes que não residiam nos municípios incluídos no estudo (72 lâminas).

Foram selecionadas para a primeira fase de execução da técnica de *Spoligotyping* 102 e 61 lâminas e, para a segunda fase, 32 e 28 lâminas, pertencentes a pacientes residentes em Belém e Ananindeua, respectivamente, totalizando assim 134 lâminas de pacientes de Belém e 89 lâminas de pacientes de Ananindeua. Desta forma, o total de testes executados nas duas fases, incluindo as duplicatas, foi de 446 testes.

6.2 PERFIL DEMOGRÁFICO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Em relação à idade dos indivíduos cujas lâminas foram incluídas no estudo, a média de idade observada entre os casos de Belém e Ananindeua foi, respectivamente, de 38,24 (DP \pm 15,99) anos e de 38,15 (DP \pm 16,22) anos, variando entre oito e 77 anos entre os casos de Belém e entre 15 e 81 anos entre os casos de Ananindeua. No geral, a média de idade foi de 38,21 (DP \pm 16,02). Sessenta e três (67,0%) indivíduos de Belém e 37 (69,8%) indivíduos de Ananindeua tinham entre 20 e 49 anos (Gráfico 1), sendo que 68,0% do total de casos estavam nesta faixa etária. As idades de 17 pacientes não constavam nos registros.

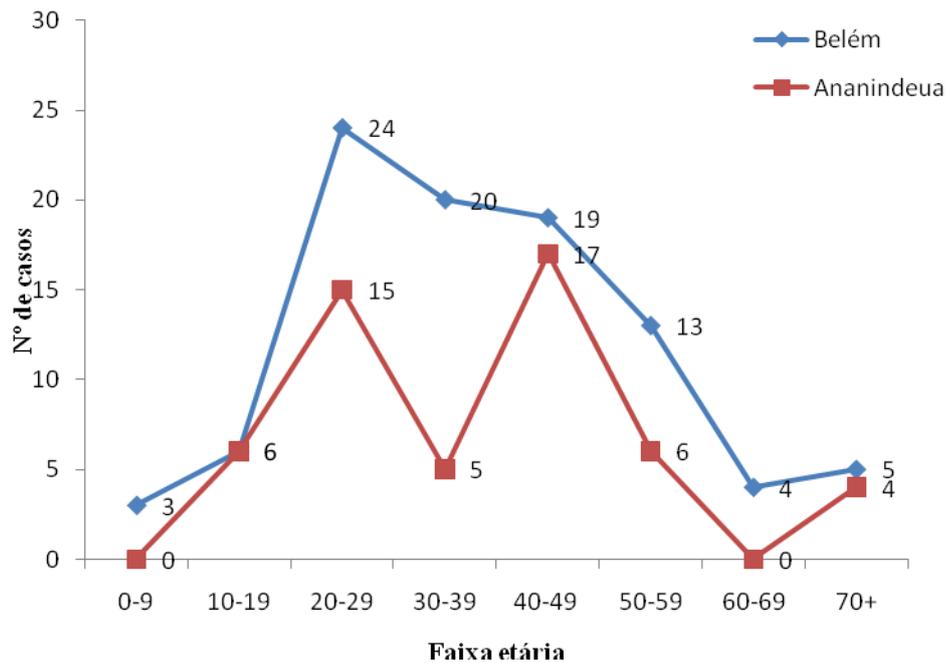


Gráfico 1. Distribuição, por faixa etária, dos casos de Belém e Ananindeua incluídos no estudo. Fonte: Livro de Registro de Baciloscopia e Cultura do Hospital Universitário João de Barros Barreto e Centro de Saúde Escola do Marco, 2007-2008.

Quanto ao gênero, 62 (60,8%) e 38 (62,3%) indivíduos eram do gênero masculino entre os casos em Belém e Ananindeua, respectivamente. No total, foram incluídos no estudo 63 mulheres (38,7%) e 100 homens (61,3%), correspondendo a uma razão feminino:masculino de 0.63. A diferença entre esta proporção foi significativa ($p=0.0048$).

6.3 GENOTIPAGEM POR *SPOLIGOTYPING*

6.3.1 *Spoligotyping* Aplicado às Amostras de Belém

Entre as 102 amostras positivas avaliadas na 1ª fase, 93 (91,2%) apresentaram padrões completos e nove (8,8%) apresentaram padrões considerados incompletos (sinal fraco/indefinido de hibridização), que permaneceram sem definição mesmo após a duplicata. Das amostras que apresentaram padrões completos, 92 (98,9%) apresentaram padrões reprodutíveis após a duplicata, enquanto que uma (1,1%) amostra (Mix1*) apresentou, após

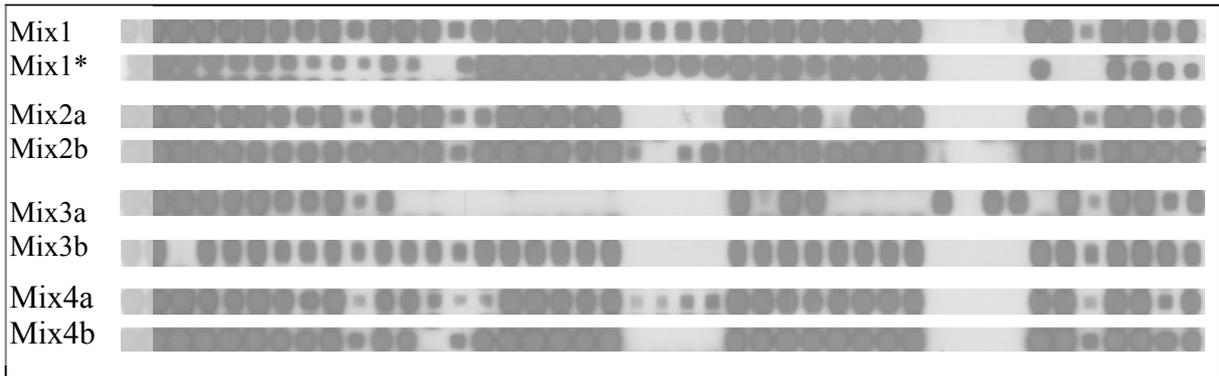


Figura 5. Espoligopadrões obtidos após hibridização em membrana de *Spoligotyping*.

Mix1 e Mix1*: Espoligopadrões gerados pela mesma amostra do mesmo paciente no teste original e após duplicata, respectivamente, ambos na 1ª fase. Mix2a-4a: Espoligopadrões obtidos de amostras de três pacientes distintos na 1ª fase. Mix2b-4b: Espoligopadrões obtidos de amostras de três pacientes distintos na 2ª fase. Para as amostras 2, 3 e 4 os resultados das duplicatas foram concordantes. *Resultado discordante após duplicata.

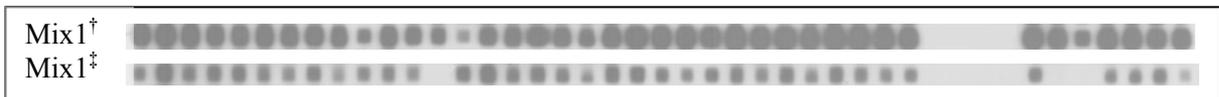


Figura 6. Espoligopadrões obtidos após hibridização em membrana de *Spoligotyping* para a amostra denominada “Mix1” na segunda fase de execução da técnica.

Mix1†: teste original; Mix1‡: após duplicata.

Os controles positivos *M. tuberculosis* H37RV e *M. bovis* BCG apresentaram os espoligopadrões característicos: ausência dos espaçadores 20, 21 e 33-36 em H37Rv e ausência dos espaçadores 3, 9, 16 e 39-43 em BCG. Quanto aos 16 controles negativos, não houve sinais de hibridização em nenhum espaçador. Foi observado padrão reprodutível (nenhuma discordância entre os padrões obtidos nas duplicatas) em 123 amostras positivas e a reprodutibilidade observada entre os resultados apresentados pelas amostras de Belém foi de 92,0% ($p < 0.0001$).

Das nove amostras que apresentaram padrões incompletos, cinco (55,6%) eram BAAR + e uma (11,1%) era BAAR indeterminado, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas quando comparadas com as amostras BAAR ++ e BAAR +++ ($p = 0.2335$).

Desta forma, do total de 134 amostras avaliadas, pertencentes aos 102 casos de Belém selecionados para o estudo, foram considerados para classificação de acordo com o SpolDB4 e comparação com o banco de dados SITVIT os perfis obtidos por 89 amostras, correspondentes a 89 (87,3%) casos diferentes, por terem apresentado espoligopadrões

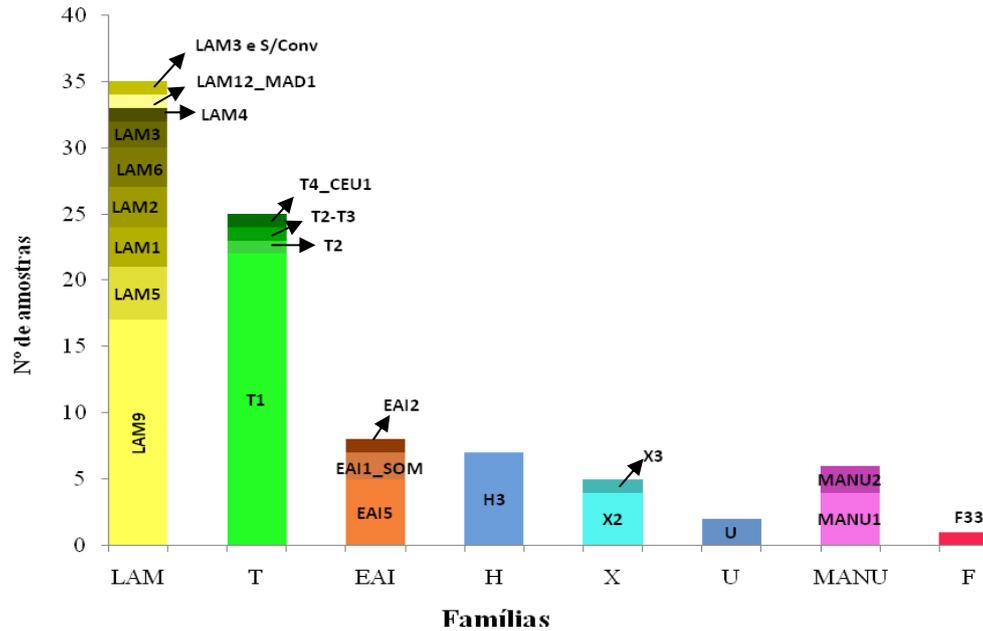


Gráfico 2. Distribuição dos 89 casos genotipados por *Spoligotyping* no município de Belém, entre outubro de 2007 e março de 2008, de acordo com classificação em família e subfamília proposta por Brudey et al., (2006) e Vitol et al., (2006).

A comparação com o banco de dados SITVIT revelou que 10 espoligotipos entre os padrões únicos não puderam ser alocados em nenhum SIT existente, pois sete deles não pareciam com nenhum perfil já descrito no SITVIT, sendo designados aqui como órfãos “verdadeiros” (VO1-7), e três eram “pseudo-órfãos” (PO1-3), ou seja, já foram referenciados uma única vez no SITVIT, pareando com perfis oriundos do Brasil (Brasília), Itália (Roma) e Portugal (Lisboa), respectivamente. Também entre os espoligotipos que formaram grupos houve um que foi classificado como órfão verdadeiro (VO8), compartilhado neste estudo por duas amostras (Tabela 3).

Para os espoligotipos classificados como “VO” e “PO” foi feita uma análise utilizando o SpotClust, que permitiu que eles fossem alocados em prováveis famílias/subfamílias, cujas probabilidades variaram de 0,663 a 0,999: quatro foram classificados como pertencentes à família LAM, três à família EAI, dois à família T e os demais foram alocados nas famílias Haarlem e F33 (Tabela 3).

Am	Espoligopadrão	F	SIT	Fam
Mix5a	ooovvvvvvvvooooooooooooooooovvvvooooovovvvvvvvv	1	ND	EAI2
Mix5b	ovvvvvvvvvvvvvvvvvvvooooooooovvvvvvvvvovvvvvvvv	2	ND	F33

Quadro 3. Ilustração esquemática dos espoligopadrões apresentados por amostras distintas pertencentes ao mesmo paciente na 1ª fase (Mix5a) e na 2ª fase (Mix5b), indicando a família em que cada espoligopadrão foi classificado, de acordo com Vitol et al., (2006).

Am: Amostra; F: Fase de execução do *Spoligotyping*; SIT: *Spoligo-International-Type number*; Fam: Família; ND: Não descrito.



Figura 7. Espoligopadrões apresentados por amostras distintas pertencentes ao mesmo paciente na 1ª fase (Mix5a) e na 2ª fase (Mix5b) de execução do *Spoligotyping*.

Os controles positivos *M. tuberculosis* H37RV e *M. bovis* BCG apresentaram os espoligopadrões característicos: ausência dos espaçadores 20, 21 e 33-36 em H37Rv e ausência dos espaçadores 3, 9, 16 e 39-43 em BCG. Não foi observada hibridização em nenhum espaçador entre os 10 controles negativos. Padrão reprodutível (nenhuma discrepância entre os padrões apresentados após as duplicatas) foi observado em 79 amostras positivas e a reprodutibilidade apresentada entre os resultados das amostras de Ananindeua foi de 89,9% ($p < 0.0001$).

Todas as sete amostras que apresentaram padrões incompletos eram classificadas como BAAR +, apresentando diferença significativa quando comparados aos resultados obtidos por amostras BAAR++ ($p = 0.0473$).

Foram identificados 36 espoligopadrões distintos entre as 53 amostras (correspondentes a 53 casos) consideradas para classificação de acordo com o SpolDB4 e comparação com o banco de dados SITVIT. Vinte e seis (49,1%) amostras foram reunidas em nove agrupamentos com duas a seis amostras cada e 27 (50,9%) amostras representaram espoligotipos únicos, dos quais 20 já foram reportados no SITVIT e sete ainda não pareciam com nenhum outro perfil já descrito neste banco de dados, recebendo aqui a denominação de “órfãos verdadeiros” (VO9-15) (Tabelas 4 e 5).

Dos 36 espoligopadrões observados, 28 tinham um SIT previamente descrito (Tabela 4).

n=10; LAM8, n=1; LAM6, n=4; LAM5, n=1; LAM5e9, n=1; LAM3, n=1; LAM2, n=1 e LAM1, n=2), seguida pela família T, que apresentou somente uma subfamília, a T1, com 10 (18,9%) amostras.

A família Haarlem foi representada por cinco (9,4%) amostras (H3, n=4 e H1, n=1), quatro (7,5%) amostras pertenciam à família X (X3, n=2 e X2, n=2) e quatro (7,5%) pertenciam à família EAI (EAI5, n=3 e EAI3, n=1). As demais famílias – U, MANU, S e F33 – reuniram nove (17,1%) amostras, com quatro, duas, duas e uma amostra cada, respectivamente. A distribuição dos casos de acordo com classificação em família e subfamília proposta por Brudey et al., (2006) e Vitol et al., (2006) está demonstrada no gráfico 3.

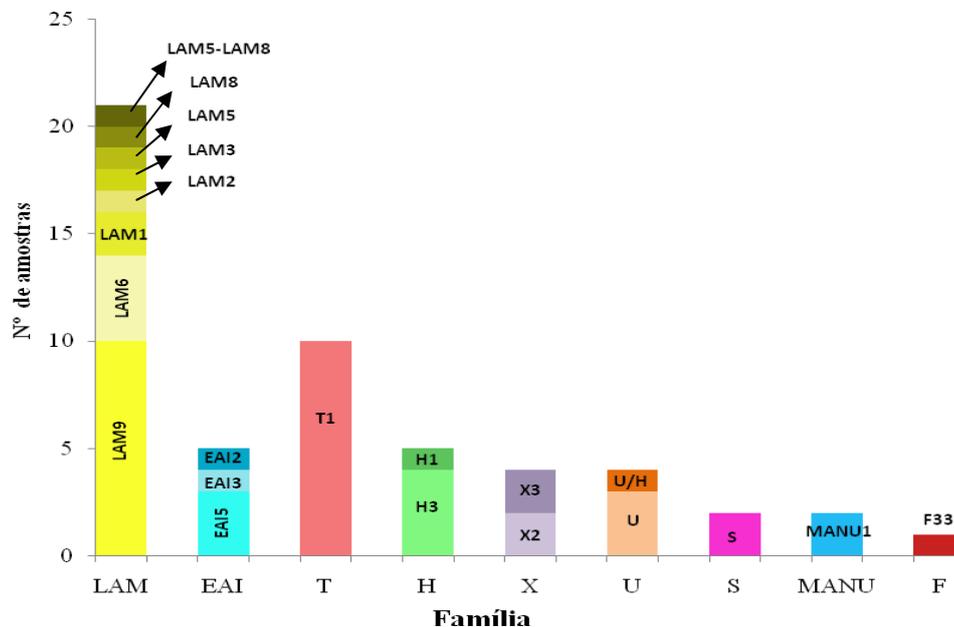


Gráfico 3. Distribuição dos 53 casos genotipados por *Spoligotyping* no município de Ananindeua, entre outubro de 2007 e março de 2008, de acordo com classificação em família e subfamília proposta por Brudey et al., (2006) e Vitol et al., (2006).

6.3.3 Análise dos Perfis Obtidos por *Spoligotyping* entre as Amostras de Belém e Ananindeua

Ao serem agrupados os resultados de Belém e Ananindeua, obteve-se, das 163 amostras inicialmente selecionadas para o estudo (correspondentes a 163 casos distintos), um total de 146 (89,6%) amostras com padrões de hibridização completos e resultados

concordantes entre si, 16 (9,8%) amostras sem padrões definidos e uma (0,6%) amostra com resultado discrepante, gerando uma reprodutibilidade de 88,4% ($p < 0.0001$). No entanto, apesar de gerarem padrões completos e resultados concordantes entre si após a duplicata, quatro (2,4%) amostras apresentaram resultados discordantes de outras amostras do mesmo paciente que foram avaliadas na 2ª etapa dos testes. Assim, para efeito de comparação com os bancos de dados, foram consideradas 142 amostras.

A atribuição destes 142 casos em famílias utilizando os bancos de dados disponíveis (SpolDB4, SITVIT e SpotClust) mostrou que as quatro famílias mais representativas no estudo, LAM, T, Haarlem e EAI foram representadas por 56, 35, 12 e 12 amostras, respectivamente. Estas famílias concentraram 81,0% do total de amostras e abrigaram também espoligotipos ainda não relatados (VO) nos bancos de dados disponíveis. A taxa de diversidade (número de espoligotipos dividido pelo número de casos) dentro de cada uma das principais famílias genotípicas variou entre 48, 37, 42 e 67% para as famílias LAM, T, Haarlem e EAI, respectivamente.

Nas duas regiões estudadas, foram observados 67 espoligotipos distintos, sendo que 48 (71,6%) exibiram espoligotipos conhecidos, com um SIT descrito, 15 (22,4%) não foram identificados no banco de dados, e, portanto, classificados como “verdadeiros órfãos” (VO) e quatro (6,0%) foram classificados como espoligotipos “pseudo-órfãos” (PO), por parearem cada um com um espoligotipo descrito como órfão no SpolDB4.

A figura 9 ilustra a distribuição geral das amostras, de acordo com a classificação em famílias e subfamílias, assim como suas frequências. Noventa e cinco amostras (67%) formaram 20 agrupamentos com duas a 20 amostras cada enquanto que 47 (33%) amostras corresponderam a espoligotipos únicos neste estudo. O índice discriminatório (HGDI) para a tipagem por *Spoligotyping* foi de 0.962.

O dendrograma (Figura 9) construído com base nos padrões de *Spoligotyping* apresentado pelas amostras evidencia que os espoligotipos mais frequentes foram os tipos SIT53 (20 amostras; 14,1%), SIT42 (15 amostras; 10,6%), SIT100 (seis amostras; 4,2%), SIT50 (cinco amostras; 3,6%), SIT64 (cinco amostras; 3,6%), SIT93 (cinco amostras; 3,6%), SIT137 (cinco amostras; 3,6%), SIT17 (quatro amostras; 2,8%), SIT129 (quatro amostras; 2,8%) e SIT740 (quatro amostras; 2,8%).

PRINT PREVIEW (67 entries)

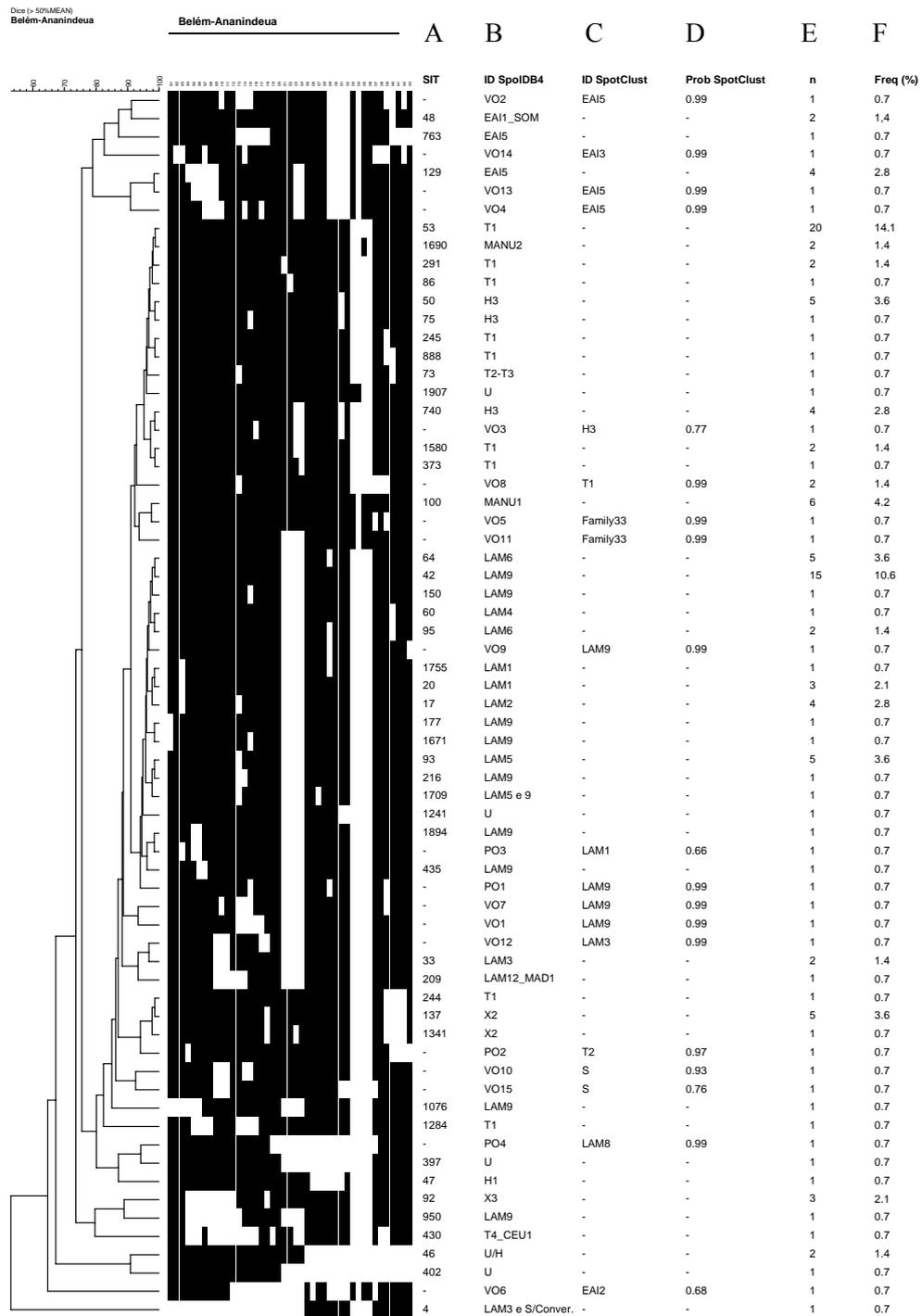


Figura 9. Dendrograma baseado nos padrões de *Spoligotyping* de 142 amostras de *M. tuberculosis* obtidas de espécimes clínicos provenientes de pacientes residentes nos municípios de Belém e Ananindeua. Este dendrograma, baseado no coeficiente de similaridade de Dice e elaborado pelo método de agrupamento UPGMA, mostra a presença dos 10 principais SITs encontrados no estudo (SITs 53, 42, 100, 50, 64, 93, 137, 17, 129, 740). Também podem ser observados 20 agrupamentos contendo entre 2-20 amostras. Colunas A (SIT); B (Família/Subfamília segundo Brudey et al., 2006); C (Família/Subfamília segundo Vitol et al., 2006); D (Probabilidade de pertencer à família designada pelo SpotClust); E (nº de amostras) e F (Frequência no estudo). UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages*; SIT: *Spoligo-International Type number*; ID: Identificação; Prob: Probabilidade; n: nº de amostras; Freq: Frequência; VO: órfão verdadeiro; PO: pseudo-órfão.

A distribuição das amostras agrupadas e o SIT em que foram classificadas podem ser visualizados no gráfico 4.

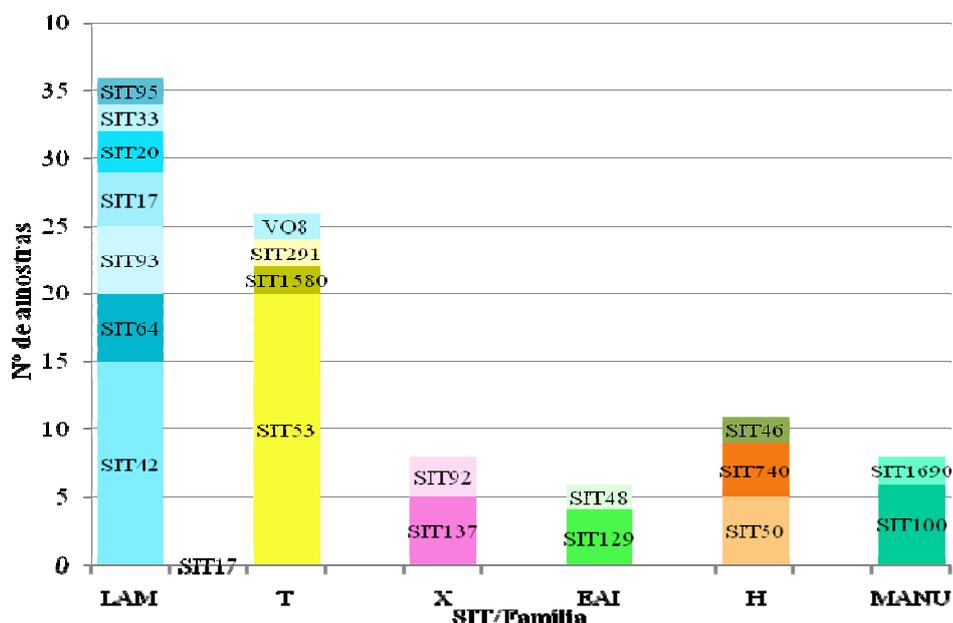


Gráfico 4. Distribuição dos 95 casos agrupados que foram genotipados por *Spoligotyping*, pertencentes aos municípios de Belém e Ananindeua, entre outubro de 2007 e março de 2008, de acordo com classificação por número de SIT (BRUDEY et al., 2006).

SIT: *Spoligo-International-Type number*; VO: espoligotipo órfão verdadeiro.

Nem todos os SITs encontrados no estudo estavam presentes em ambos os municípios, alguns ocorrendo somente em Belém, como os SIT4 (LAM3 e S/Convergente), SIT33 (LAM3), SIT48 (EAI1_SOM), SIT60 (LAM4), SIT73 (T2-T3), SIT177 (LAM9), SIT209 (LAM12_MAD1), SIT 216 (LAM9), SIT244 (T1), SIT245 (T1), SIT373 (T1), SIT430 (T4_CEU1), SIT435 (LAM9), SIT763 (EAI5), SIT888 (T1), SIT 1076 (LAM9), SIT 1341 (X2) SIT1580 (T1), SIT1690 (MANU2) e SIT1907 (U) ou somente em Ananindeua: SIT47 (H1), SIT75 (H3), SIT86 (T1), SIT150 (LAM9), SIT291 (T1), SIT397 (U), SIT402 (U), SIT950 (LAM9), SIT 1241 (U), SIT1284 (T1), SIT1671 (LAM9), SIT1709 (LAM5 e 9), SIT1755 (LAM1) e SIT1894 (LAM9).

O mesmo aconteceu com algumas famílias, como a família S, que só ocorreu em Ananindeua, entre os casos “VO”. De modo contrário, as famílias LAM, T, Haarlem, X, MANU, EAI e U, assim como a F33, que surgiu para “acolher” espoligotipos com a maioria

dos espaçadores presentes (VITOL et al., 2006), foram representadas em Belém e Ananindeua. Não foram encontrados espoligotipos pertencentes às famílias *Beijing*, *M. bovis* e *Central-Asian* entre as amostras avaliadas.

Quanto à carga bacilar, 46% das amostras eram BAAR+, e, somando-se com as amostras BAAR indefinido, quase metade delas tinham baixa carga bacilar, como demonstrado no gráfico 5.

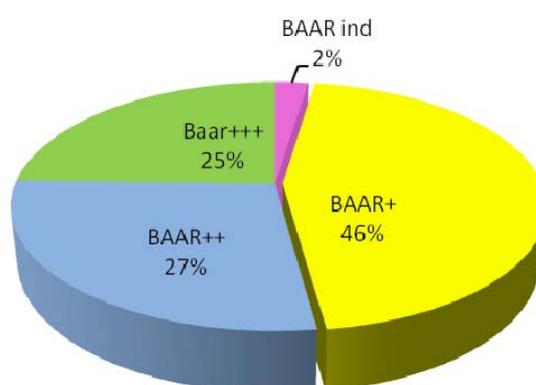


Gráfico5. Distribuição das amostras segundo classificação, em número de cruzes, após realização do Controle de Qualidade Externo executado pelo LACEN-PA.

BAAR: Bacilo Álcool-Ácido Resistente; Ind: Indeterminado (1-9 BAAR em 100 campos). BAAR+: 10-99 BAAR em 100 campos; BAAR++: 1-10 BAAR/campo em 50 campos; BAAR+++ : >10 BAAR/campo em 20 campos.

Quanto ao rendimento, houve diferença significativa ($p = 0.0377$) quanto à obtenção de padrões de hibridização completos apresentados por amostras classificadas como BAAR+ e BAAR++ quando comparados com os apresentados pelas amostras com outras positivities (BAAR indefinido e BAAR+++).

Quanto à idade dos indivíduos, a média apresentada pelos que faziam parte de agrupamentos foi de 38,0 anos e a média de idade dos que apresentaram espoligotipos únicos foi de 36,9 anos, diferença que não foi estatisticamente significativa ($p = 0.7032$). Não houve diferença significativa entre as frequências observadas de indivíduos do sexo masculino ou feminino que foram agrupados ou que estavam entre os espoligotipos únicos ($p=0.0767$).

6.4 GEOLOCALIZAÇÃO DOS CASOS

6.4.1 Geolocalização dos Casos de Belém

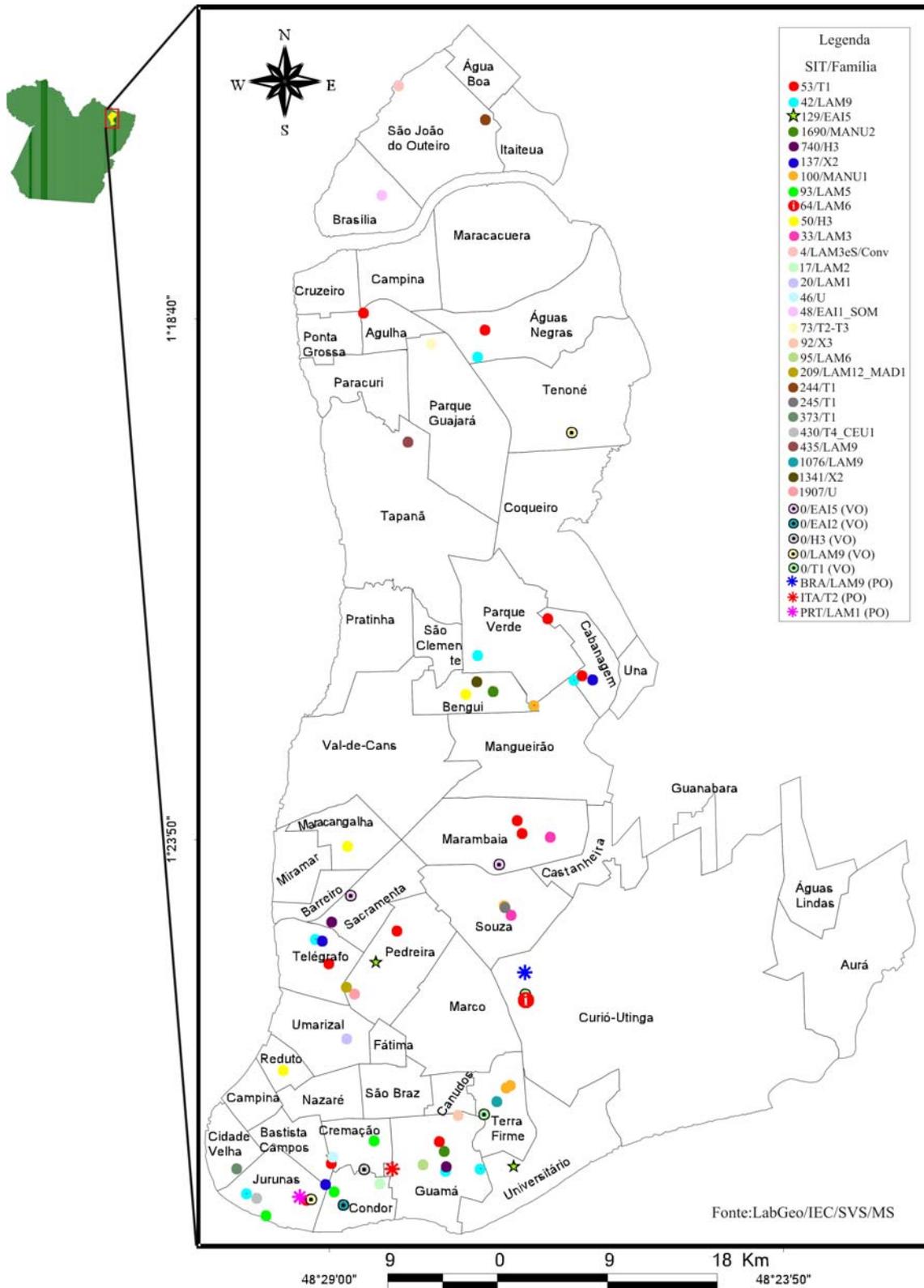
Dos 102 casos de Belém, foram registradas as coordenadas geográficas de 81 (79,4%) casos, não sendo possível localizar o endereço dos demais (21 casos; 20,6%) apesar de constarem no Livro de maneira aparentemente completo. A distribuição de todos os casos geolocalizados em Belém de acordo com o nível de caracterização genética por *Spoligotyping* (SIT, Família ou não identificados) está representada na tabela 4.

Tabela 4. Distribuição dos casos de Belém geolocalizados e não geolocalizados de acordo com o nível de caracterização molecular por *Spoligotyping*.

Nível de caracterização molecular dos casos	Casos geolocalizados	Casos não geolocalizados	Total
SIT	64	17	81
VO	08	01	09
PO	03	-	03
Não identificados	06	03	09
Total	81	21	102

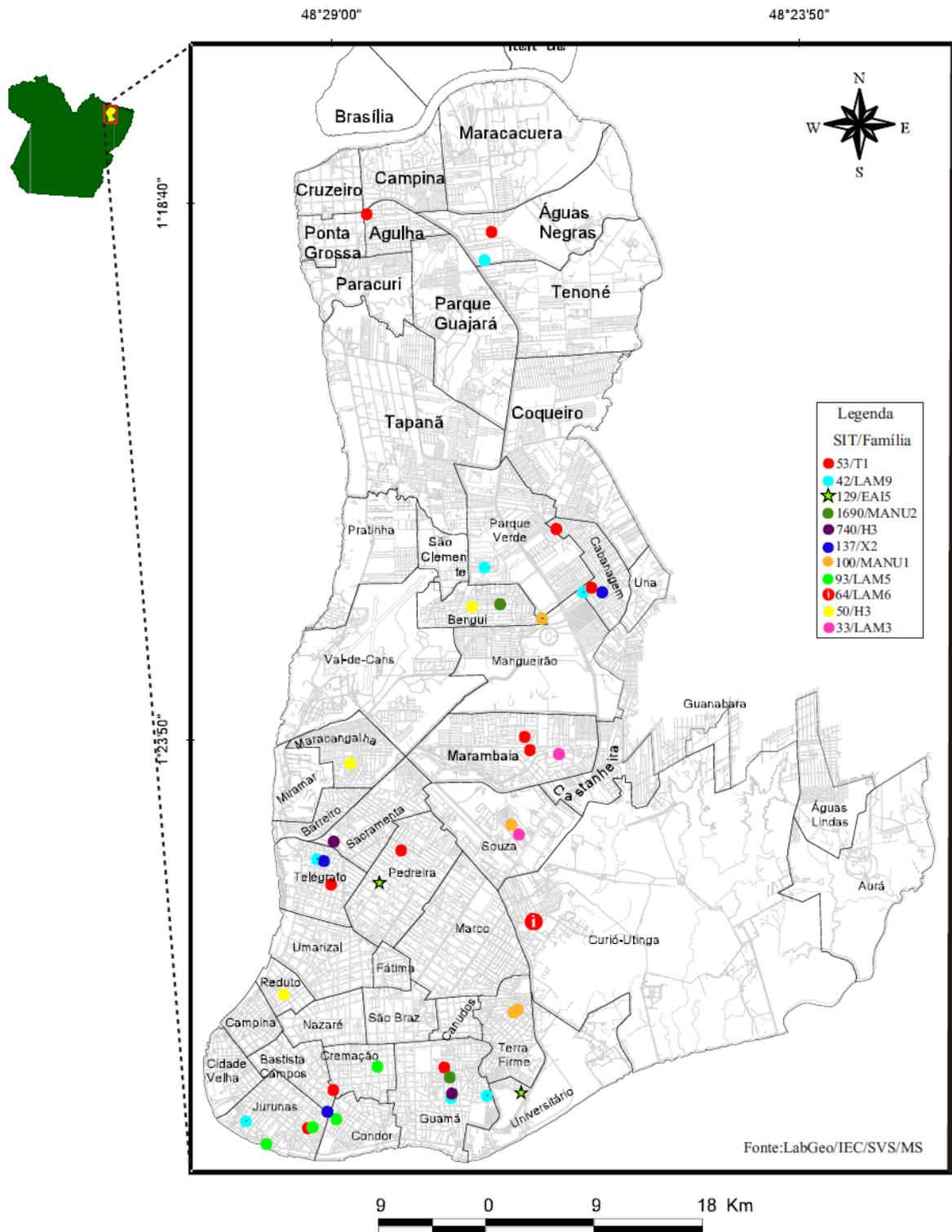
SIT: *Spoligo-International-Type number*; VO: “órfãos verdadeiros”; PO: pseudo-órfãos.

Os 81 casos estavam distribuídos por 29 dos 71 bairros da capital. Os bairros que mais concentraram casos que puderam ser geolocalizados foram o Guamá (nove casos; 11,1%), o Jurunas (seis casos; 7,4%) e Terra Firme (cinco casos; 6,2%). A distribuição por bairro, dos casos geolocalizados que puderam ser identificados por número SIT ou por Família (VO ou PO) pode ser observada no mapa 1.



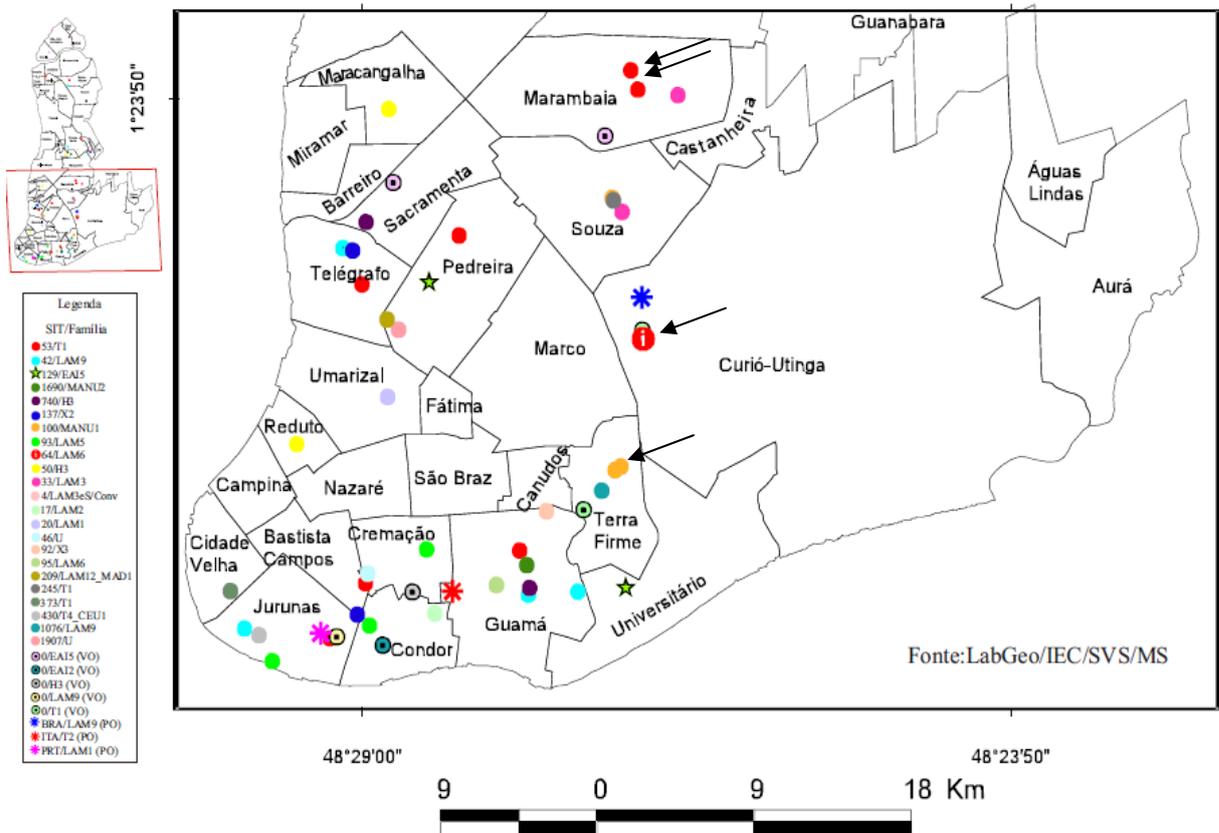
Mapa 1. Mapa ilustrando a localização geográfica, por endereço de residência, dos 75 casos geolocalizados no município de Belém/PA que puderam ser identificados por número SIT ou por Família (VO ou PO). Cada círculo representa um caso e cada cor está associada a um perfil de *Spoligotyping*, conforme legenda. Fonte: LabGeo/IEC/SVS/MS

Entre os 60 casos agrupados por *Spoligotyping*, 42 (70,0%) puderam ser geolocalizados e estão apresentados no mapa 2.



Mapa 2. Mapa ilustrando a localização geográfica, por endereço de residência, dos casos agrupados por *Spoligotyping* no município de Belém/PA. Cada círculo representa um caso e cada cor está associada a um perfil de *Spoligotyping*, conforme legenda.
Fonte: LabGeo/IEC/SVS/MS

A distância entre os casos agrupados variou de 0m (mesma residência) para o SIT64 (Bairro Curió-Utinga) a 18.400m para o SIT42 (um caso no bairro Jurunas e outro no bairro Agulha). Menores distâncias entre casos também foram encontradas para o SIT100 (100m entre pontos), SIT53 (290m entre pontos) e o SIT93 (500m entre pontos). O mapa 3 ilustra a distribuição dos pontos na área sul de Belém; as menores distâncias encontradas entre casos agrupados (SIT64, SIT100 e SIT53) estão indicadas pelas setas.



Mapa 3. Mapa ilustrando a distribuição dos casos na região sul de Belém/PA. As setas estão indicando os três agrupamentos que apresentaram a menor distância observada entre pontos (SIT53, SIT 64 e SIT100).

Fonte: LabGeo/IEC/SVS/MS

6.4.2 Geolocalização dos Casos de Ananindeua

Entre os 61 casos de Ananindeua, foram localizados os endereços de 33 (54,1%) casos, dos quais foram registradas suas coordenadas geográficas. Não foi possível localizar o

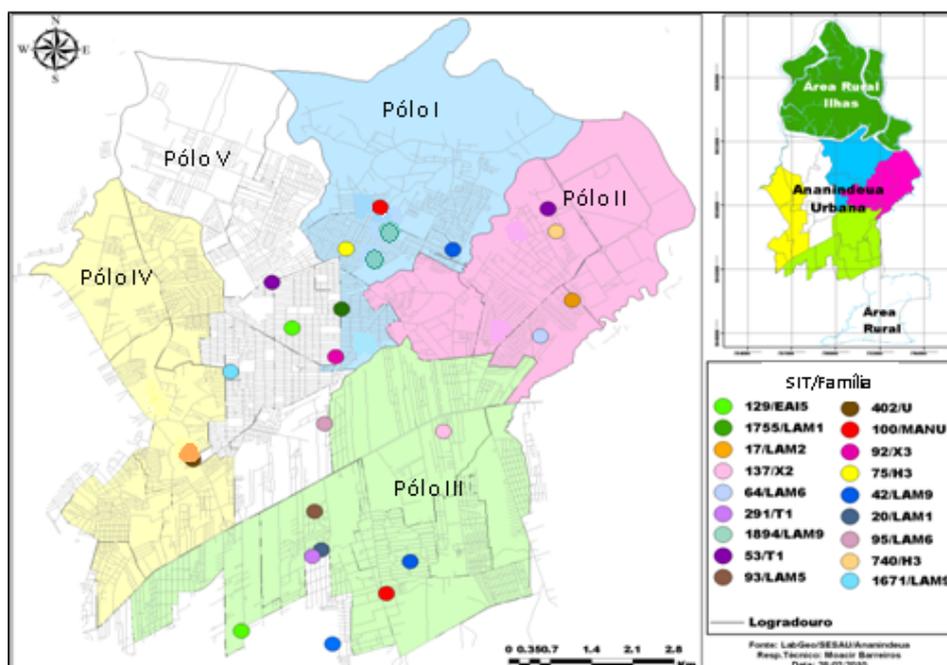
endereço de 28 (45,9%) casos. A distribuição geral dos casos geolocalizados, de acordo com o nível de caracterização genética por *Spoligotyping* (SIT, Família ou não identificados), está representada na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição dos casos de Ananindeua geolocalizados e não geolocalizados de acordo com o nível de caracterização molecular por *Spoligotyping*.

Nível de caracterização molecular dos casos	Casos geolocalizados	Casos não geolocalizados	Total
SIT	25	20	45
VO	06	02	08
PO	-	01	01
Não identificados	02	05	07
Total	33	28	61

SIT: *Spoligo-International-Type number*; VO: “órfãos verdadeiros”; PO: pseudo-órfãos.

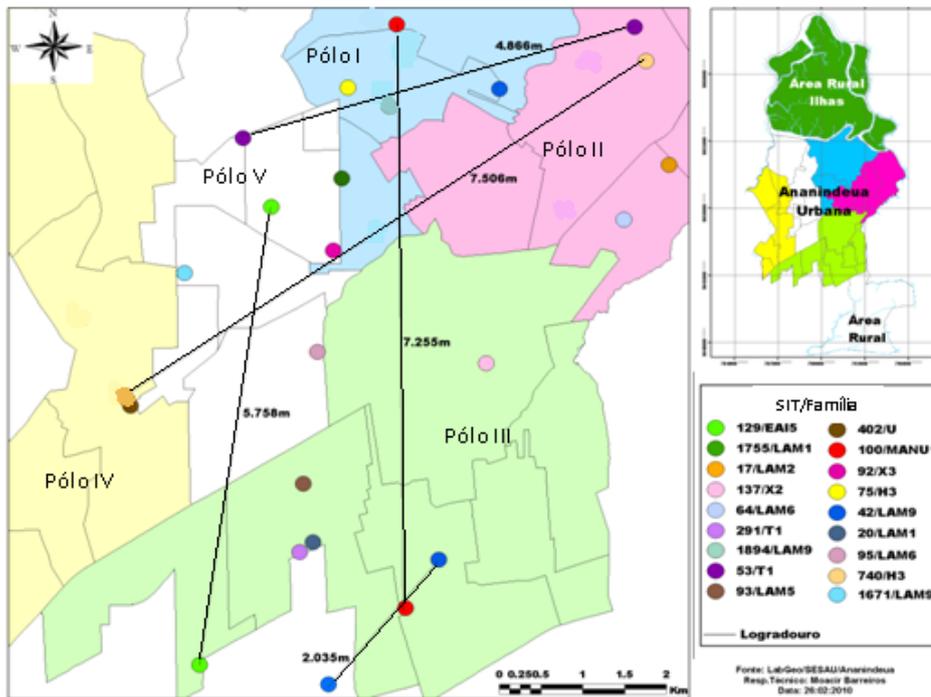
Nove (27,3%) casos dos 33 geolocalizados estavam no Pólo I, oito (24,2%) no Pólo III, seis (18,2%) no Pólo II, seis (18,2%) no Pólo IV e quatro (12,1%) estavam no Pólo V. O Mapa 4 ilustra apenas a distribuição dos 25 casos que puderam ser identificados por número SIT.



Mapa 4. Mapa ilustrando a localização geográfica, por endereço de residência, dos 25 casos geolocalizados no município de Ananindeua/PA que puderam ser identificados por número SIT. Cada círculo representa um caso e cada cor está associada a um perfil de *Spoligotyping*, conforme legenda.

Fonte: LabGeo/SESAU/Ananindeua

Somente dois casos geolocalizados que se apresentaram agrupados estavam no mesmo Pólo. Foi o caso do SIT42 (LAM9), onde os dois pontos, cada um correspondendo a um indivíduo, estavam no Pólo III, a uma distância de 2.035m um do outro, que foi a menor distância encontrada entre casos agrupados em Ananindeua. A maior distância foi de 7.255m, onde cada membro do SIT100 (MANU1) estava em Pólos distintos (Pólos I e III) (Mapa 5).



Mapa 5. Mapa ilustrando as menores distâncias, em linha reta, entre casos agrupados no município de Ananindeua/PA.

Fonte: LabGeo/SESAU/Ananindeua

Apesar de uma triagem prévia que excluiu 10% (42 lâminas) da amostra inicial pelo fato de os endereços estarem ausentes ou incompletos, não foi possível localizar todas as residências dos 163 casos selecionados para o estudo. Mesmo assim, a partir dos dados de endereço que constavam nas cópias do Livro de Registro de Baciloscopia e Cultura fornecidas pela UL de origem das lâminas, foi possível obter a localização pontual (coordenadas) de 114 (69,9%) casos ao todo, considerando os dois municípios incluídos no estudo.

7 DISCUSSÃO

7.1 ASPECTOS DA POPULAÇÃO INCLUÍDA NO ESTUDO

No presente estudo observou-se que aproximadamente 62% dos casos pertenciam ao gênero masculino, percentual similar ao encontrado por outros estudos envolvendo pacientes com TB no Brasil, onde também foi encontrada predominância de homens (ACOSTA, 2008; CAFRUNE, 2009; DALCOLMO et al., 1999; FANDINHO et al., 1999; HINO, 2004; LIMA, 2005; MENDES et al., 2007a; 2007b; TINDÓ et al., 2004; SANTO et al., 2009; SEVERO; LEITE, 2005; WATANABE; RUFFINO-NETTO; 2001). No entanto, em um estudo realizado em 2006 com pacientes portadores de TB atendidos por uma Unidade de Saúde da capital paraense, a proporção de homens observada, de 51,8%, foi inferior à encontrada neste estudo, porém mesmo assim superior à proporção de mulheres (RODRIGUES et al., 2006).

A diferença entre a proporção de homens e mulheres no presente estudo foi significativa ($p=0.0048$), apresentando razão entre os gêneros (feminino:masculino) de 0.63, maior que a observada por Tindó et al. (2004) em estudo que incluiu pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar no Rio de Janeiro/RJ, que foi de 0.5 para ambos os casos. Na ocasião, os autores identificaram diferenças etárias entre as taxas de notificação, com aumento de casos entre mulheres na faixa de 14 a 34 anos e também relataram que o padrão radiológico típico da TB foi mais frequente entre os homens, que também apresentaram maior positividade ao exame baciloscópico (não significativo). Em relação à proporção de cada gênero entre os casos agrupados ou únicos neste estudo, não houve diferença significativa.

Em uma revisão, Borgdorff et al. (2000) avaliaram 29 inquéritos realizados em 14 diferentes países da África, Ásia, Europa e América do Sul e encontraram razões entre os gêneros feminino:masculino que variaram até 1.0 e diminuíram com o aumento da idade em quase todos os casos. Esta diminuição também foi observada no presente estudo (resultados não mostrados).

Dados de prevalência sugerem que a tuberculose é "mais uma doença de homens que de mulheres" (BORGDORFF et al., 2000). No entanto, são observadas diferenças entre as regiões geográficas e grupos etários. Além disso, a características biológicas (idade, estado nutricional) e o risco de exposição (estilo de vida, ocupação) também fornecem explicações para estas diferenças.

Embora a diferença entre as proporções da doença observadas entre os gêneros seja atribuída geralmente ao acesso diferencial aos serviços de saúde, principalmente aos serviços diagnósticos, pelas mulheres, ela pode ser na realidade devido às questões epidemiológicas (ALLOTEY; GYAPONG, 2008; BORGDORFF et al., 2000). Jiménez-Corona et al. (2006) encontraram em seu estudo evidências de que as maiores taxas de TB pulmonar entre os homens devia-se parcialmente à dinâmica de transmissão local, relacionada às aglomerações e à deficiência de ventilação no ambiente de trabalho, além de comportamentos que podem influenciar a progressão da doença, como o consumo de álcool e tabaco. Em relação ao consumo abusivo do álcool, foi demonstrado em estudo realizado em Washington que, na verdade, não era o consumo de álcool o fator de risco para a transmissão da TB naquele cenário, mas sim o fato de os indivíduos frequentarem o mesmo ambiente (bar) para o consumo (TABET et al., 1994), reforçando o papel do fator 'exposição' como de elevada importância para a transmissão.

Estudos de revisão relacionam maior ocorrência de TB entre homens como resultado de diferenças nas notificações devido a fatores epidemiológicos (BORGDORFF et al., 2000; HOLMES et al., 1998). Desta forma, estudos que avaliam o papel de cada gênero em relação à TB devem ter um equilíbrio na coleta e análise dos dados para captar não só as experiências de homens e mulheres, mas também da dinâmica das relações sociais e as interações de outros determinantes críticos da saúde, sejam eles sociais, culturais ou ambientais (ALLOTEY; GYAPONG, 2008).

Segundo dados do IBGE, relativos ao último Censo realizado em 2000, 46,5% das populações residentes em Belém e Ananindeua concentravam-se na faixa etária de 20 a 49 anos (IBGE, 2010a) e, no presente estudo, mais de 68% dos casos tinham entre 20 e 49 anos. Proporção semelhante foi observada por Hino (2004) em estudo realizado em Ribeirão Preto/SP, onde 71,3% dos casos se encontravam entre 20 e 49 anos, e por Watanabe e

Ruffino-Netto (2001), que relataram que 78,3% dos casos de TB em seu estudo também se concentraram nesta faixa etária.

Em estudo realizado em Belém, que investigou a diversidade genética de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina, Lima (2005) observou que 68% dos casos incluídos no estudo possuíam entre 15 e 44 anos de idade. Em outro estudo realizado em pacientes com TB na capital paraense, Rodrigues et al. (2006) observaram maior frequência de indivíduos (46,1%) na faixa etária de 20 a 40 anos. Todos estes achados estão de acordo com o que tem sido descrito na literatura, de que a TB é uma doença que afeta principalmente adultos jovens, geralmente entre 15 e 59 anos, grupo mais social e economicamente produtivo (AERTS; JOBIM; 2004; CAFRUNE, 2009; TINDÓ et al., 2004; OMS; 2007).

Quanto à média de idade observada neste estudo, de 38,3 anos, foi próxima às encontradas em outros estudos semelhantes (CAFRUNE, 2009; MENEZES et al., 2006; TINDÓ et al., 2004). Comparando a média de idade dos casos que foram agrupados (38,0 anos) e dos que estavam entre os padrões únicos (36,9 anos) não foi constatada diferença estatística, porém se observa que média de idade dos pacientes agrupados é aproximadamente um ano maior que a dos não agrupados. Em seu estudo, Sequera et al. (2008) observaram o contrário: a idade dos pacientes cujos isolados apresentaram padrões únicos foi quase dois anos maior que os agrupados, e sugeriram que este fato poderia refletir maior reativação em pacientes com mais idade causada por cepas que não faziam parte das que estavam sendo transmitidas naquele cenário. De fato, é observado que, com o avanço da idade, também aumenta a reativação da doença (HOUBEN; GLYNN, 2009).

7.2 SPOLIGOTYPING APLICADO ÀS AMOSTRAS OBTIDAS DE LÂMINAS DE ZIEHL-NEELSEN

O controle da TB requer métodos que rapidamente sejam capazes de detectar e rastrear as fontes de infecção, a fim de interromper a transmissão da doença. Além disso, o ideal é que estes métodos possam diferenciar entre casos de transmissão recente e reativação, e possam ser aplicados diretamente em espécimes clínicos, aumentando assim a oferta de amostras e diminuindo o tempo de resposta frente a um surto.

Os recentes avanços no campo da biologia molecular têm proporcionado o desenvolvimento de técnicas que permitem a rápida identificação e o rastreamento de cepas específicas de *M. tuberculosis* que circulam no mundo. A maioria destas técnicas explora o polimorfismo presente no genoma do *M. tuberculosis*, utilizando vários elementos repetitivos do DNA como marcadores genéticos e geram perfis genéticos estirpe-específicos, conhecidos como “*fingerprints*”.

Em geral, cepas que compartilham o mesmo perfil genético, ou *fingerprint*, formando agrupamentos, são associadas com transmissão recente, enquanto aquelas que apresentam perfis únicos devem representar transmissão remota e, portanto, reativação de cepas adquiridas em passado mais distante (BURGOS; PYM, 2002; KATO-MAEDA; SMALL, 2000; van SOOLINGEM, 2001). É importante ressaltar que a formação destes agrupamentos é dependente de vários fatores, tais como a duração do estudo, as taxas de imigração e emigração dentro da área do estudo, o risco anual de infecção, a idade dos indivíduos, co-infecção pelo HIV, entre outros (HAAS et al., 1999; HOUBEN; GLYNN, 2009; MURRAY, 2002a; 2002b; MURRAY; NARDELL, 2002).

Embora o RFLP-IS6110 seja o método padrão-ouro para tipagem de membros do CMTB, diversas desvantagens no seu uso – como o alto custo, a necessidade de DNA em grande quantidade e pureza e *softwares* sofisticados para análise dos dados –, levaram ao desenvolvimento de outras técnicas (van SOOLINGEN, 2001). Nos últimos anos, foram desenvolvidos métodos de tipagem baseados em PCR (FRIEDMAN et al., 1995; KAMERBEEK et al., 1997; SUPPLY et al., 2000) que têm principalmente a vantagem de necessitarem de pouca quantidade de bacilos como alvo para tipagem e serem de execução mais fácil. Destes, por sua simplicidade e demais vantagens, o *Spoligotyping* é atualmente o mais utilizado, também como método de tipagem secundário para cepas com menos de cinco cópias da IS6110 (BAUER et al., 1999; GOUGET de la SALMONIÈRE et al., 1997; GOYAL et al., 1997b; KREMER et al., 1999; van SOOLINGEN, 2001).

A técnica de *Spoligotyping* tem sido empregada com sucesso em diversos tipos de amostras, tais como tecidos preservados em parafina, amostras de escarro, tecidos mumificados e também lâminas coradas pela técnica de ZN, tanto recentes quanto antigas (CAFRUNE, 2009; GORI et al., 2005b; GOYAL et al., 1999; SURESH et al., 2007; van der ZANDEN et al., 1998; QIAN et al., 1999, ZINK et al., 2003).

No presente estudo, que utilizou DNA extraído de esfregaços fixados em lâminas de ZN, padrões completos foram obtidos em 89,6% das amostras (considerando somente as que tiveram resultados concordantes após duplicata). Utilizando a mesma fonte de DNA (lâminas de ZN) van der ZANDEN et al. (1998) obtiveram resultados similares, conseguindo tipar com sucesso 80% de suas amostras. Suresh et al. (2007), aplicando o *Spoligotyping* em material extraído de lâminas de ZN em estudo realizado na Índia, obtiveram espoligopadrões completos em 77,4% das amostras testadas, diferença 12,2% menor quando comparada à reprodutibilidade obtida neste estudo.

Quando aplicada diretamente em amostras clínicas (escarro, amostras de tecidos conservadas em parafina), a técnica foi capaz de produzir resultados conclusivos e diferentes proporções: 57,9% em estudo realizado por Zink e Nerlich (2004), que buscaram diferenciar os membros do CMTB em amostras de biópsia arquivadas; 58% em estudo conduzido por Qian et al. (1999), que investigaram a ocorrência do genótipo Beijing em amostras de biópsia pulmonar datadas de 1956 a 1990 em Pequim, China; 86,9% em espécimes clínicos (tecido pulmonar e extrapulmonar) preservados por um período de um a 10 anos em parafina (van der ZANDEN et al., 1998); 95% em estudo realizado por Cafrune (2009), que aplicou a técnica diretamente em amostras de escarro provenientes de pacientes diagnosticados com TB pulmonar em Porto Alegre/RS. Percentual similar foi observado por Gazouli et al. (2005), que tiparam com sucesso, utilizando *Spoligotyping*, 95,8% das amostras de origem pulmonar (biópsia parafinada de pulmão e lavado broncoalveolar) e extrapulmonar (biópsia parafinada de linfonodo) na Grécia.

De modo geral, como observado em outros estudos (CAFRUNE et al., 2009; SURESH et al., 2007) o sucesso na amplificação do *locus* DR foi dependente da carga bacilar das amostras, já que 75% dos padrões indefinidos neste trabalho eram de amostras classificadas como BAAR+. Suresh et al. (2007) sugeriram que as diferenças observadas por eles nas intensidades dos sinais de hibridização – gerando padrões incompletos – ou até mesmo na ausência de hibridização seriam devido às concentrações de DNA próximas ao limite de detecção da PCR.

Neste estudo, uma amostra BAAR++ (2,3%) e duas amostras BAAR+++ (5,2%) não apresentaram perfis completos de *Spoligotyping*, diferente do que foi observado por Suresh et al. (2007), que relataram que 100% das amostras classificadas como BAAR++ e

BAAR+++ mostraram bom sinal de hibridização e padrões reprodutíveis. No entanto, van der Zanden et al. (2003) descreveram situação semelhante, onde uma amostra (2,7%) com alta carga bacilar resultou em espoligopadrão incompleto. Cafrune (2009) sugeriu que isto pode ocorrer em função da não homogeneização das amostras, resultando em distribuição disforme dos bacilos nas mesmas. Quanto às amostras classificadas como BAAR indefinido (1-9 BAAR/100 campos), apenas uma (25%) não produziu espoligopadrão completo.

Considerando que a única amostra que apresentou resultado discordante na duplicata (Mix1) apresentou os mesmos resultados em outro momento, pode-se dizer que os padrões das duplicatas foram concordantes em sua totalidade e, que desta forma, não houve interferência nos padrões apresentados pelas amostras positivas e, além disso, a ausência de hibridização entre os controles negativos demonstra que a técnica é reprodutível. No entanto, considera-se importante utilizar reagentes que evitem o carreamento de DNA e posterior contaminação, como uracil DNA glicosilase e dUTP (LONGO; BERNINGER; HARTLEY, 1990; SURESH et al., 2007; van der ZANDEN et al., 2003).

7.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *M. tuberculosis* ENTRE AS AMOSTRAS GENOTIPADAS POR *SPOLIGOTYPING*

Padrões obtidos por *Spoligotyping* podem ser comparados com os mais de 39 mil depositados em um banco de dados totalmente interativo e de acesso livre na *internet*, o SITVIT, mantido pelo Instituto Pasteur de Guadalupe, provenientes de mais de 140 países. Desta forma, obtém-se um cenário atualizado e “instantâneo” das populações locais e globais de *M. tuberculosis* circulantes e adquire-se gradualmente um conhecimento mais profundo sobre a distribuição destes genótipos (BRUDEY et al., 2006; GOMES, 2006). Para os perfis ainda não descritos, o SpotClust, um algoritmo exclusivo para padrões gerados por *Spoligotyping*, também está disponível na *internet*, permitindo a classificação destes padrões em famílias, facilitando assim a comparação de dados entre diversos estudos.

Aplicando o *Spoligotyping* para caracterização genética de *M. tuberculosis* obtidos a partir de lâminas de Ziehl-Neelsen pertencentes a pacientes residentes em Belém e Ananindeua, obtivemos um cenário da distribuição das famílias de *M. tuberculosis* circulantes

nestas áreas durante o período do estudo. Uma comparação dos espoligotipos obtidos neste estudo com os depositados no Banco Internacional de Espoligotipos, SITVIT, mostrou que, entre as 142 amostras que apresentaram espoligopadrões completos e resultados concordantes, foram observados 67 espoligotipos distintos.

O índice discriminatório HGDI observado neste estudo foi de 0.962, demonstrando um poder discriminatório acima do limite aceitável para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos pela técnica de *Spoligotyping*. Índices inferiores aos encontrados neste estudo para a mesma técnica utilizada isoladamente foram encontrados por Ferdinand et al. (2003), que relataram HGDI de 0.957, por Da Silva et al. (2008) e von GROLL et al. (2008) que descreveram HGDI de 0.959 em suas análises e por Scholante Silva et al. (2009) e De Jong et al. (2009), que relataram HGDI de 0.94. No entanto, quando combinado com outra técnica, como o VNTR, o poder discriminatório aumenta, como demonstrado por Ferdinand et al. (2003) e por von GROLL et al. (2008), que descreveram HGDI de 0.980 e 0.995, respectivamente.

Pertenciam à família LAM 39,4% dos casos, enquanto que 24,6% pertenciam à família T, 8,5% à família Haarlem e 8,5% à família EAI. Estes resultados são concordantes com as afirmações de Brudey et al. (2006), que descrevem que três principais famílias genotípicas (LAM, T e Haarlem) são as mais frequentes nas Américas do Sul e Central assim como também na África e Europa. Em estudo realizado na Guiana Francesa (GUERNIER et al., 2008), estas quatro famílias também foram as que reuniram maior número de casos.

Também foram encontradas as maiores frequências entre estas famílias em outros estudos realizados no Brasil (POSSUELO et al., 2008; SANTOS et al., 2009; SCHOLANTE SILVA et al., 2009; TRINDADE, 2006) e em outros países da América Latina (DALLA COSTA et al., 2009; GUERNIER et al., 2008). Cafrune (2009) relata que 75% dos isolados avaliados em seu estudo, realizado em Porto Alegre/RS, pertenciam às famílias LAM, T e Haarlem e que a família LAM, sozinha, respondeu por 37% do total, resultado semelhante ao observado neste estudo, em que a família LAM concentrou 39,4% dos casos. No entanto, foi menor que o observado por Trindade (2006) em Sergipe, onde a família LAM foi responsável por quase 57% dos casos.

A família LAM também foi a mais prevalente em estudos realizados no Rio de Janeiro por Lapa e Silva et al. (2008) e por Ventura et al. (2009), respondendo por 42,7% e 45,8% dos casos, respectivamente, no Mato Grosso do Sul (57,5%) (SANTOS et al., 2009), no Rio Grande do Sul (38%) (SCHOLANTE SILVA et al., 2009), no Paraguai (52,3%) (CANDIA et al., 2007) e na Venezuela (34%) (SEQUERA et al., 2008). Entre indígenas da tribo amazônica Suruí, em Rondônia, todos os isolados foram classificados como pertencentes a esta família, e, pela diversidade de padrões apresentados, sugeriu-se que o genótipo LAM tenha sido introduzido nesta comunidade há tempos (BASTA et al., 2006).

Em estudo realizado por Gomes (2006), foram avaliados isolados provenientes de 11 estados brasileiros, incluindo o Pará. Observou-se, na ocasião, que as famílias LAM, T e Haarlem foram representadas por 46,5%, 19,7% e 13,3% do total de isolados, respectivamente, proporções semelhantes às encontradas neste estudo.

Os 10 espoligotipos mais frequentes neste estudo (17, 42, 50, 53, 64, 93, 100, 129, 137 e 740) agruparam mais da metade (51,7%) dos casos e figuraram também entre os principais encontrados em estudo realizado no Pará com isolados obtidos no período de 1997 a 2003 (LIMA et al., 2010), compreendendo 42,0% das cepas em questão, com exceção do SIT740, que não foi relatado neste último. Amplamente distribuídos, os espoligotipos SIT53 (T1) e SIT42 (LAM9) agruparam maior número de amostras, englobando, juntos, 24,7% de todos os casos deste estudo, fato que pode sugerir que ambos são mais facilmente transmitidos e possivelmente mais adaptados. Eles ocupam, respectivamente, a 2ª e a 5ª posição entre os mais frequentes no SpolDB4 (BRUDEY et al., 2006) e reuniram 15,9% dos casos no estudo de Lima et al (2010).

Alguns dos perfis encontrados com maior frequência no presente estudo também estavam entre os mais prevalentes em diversos outros estudos realizados no Brasil por Borsuk et al. (2005) (SITs 53 e 42), Cafrune (2009) (SITs 17, 42, 50, 53 e 64), Malaspina et al. (2008) (SITs 42 e 53), Scholante Silva et al. (2009) (SITs 50 e 53), Vasconcellos et al. (2008) (SIT53), Trindade (2006) (SITs 42 e 64), por Gomes (2006) (SITs 50, 53); no Paraguai por Candia et al. (2007) (SITs 42, 50 e 93); na Venezuela por Mancilla et al. (2006) (SIT53), Sequera et al. (2008) (SITs 17, 42 e 93) e Aristimuño et al. (2006) (SITs 17, 20, 42, 50, 53 e 93); em Portugal por David et al. (2007) (SITs 42, 50, 53 e 64); na Guiana Francesa por Guernier et al. (2008) (SITs 42, 50, 53 e 64); na Itália por Sola et al. (2001) (SITs 42, 50 e

53); na Turquia por Durmaz et al. (2007) (SITs 50 e 53) e na Índia por Singh et al. (2007) (SIT53).

A superfamília *Latin American and Mediterranean* tem ampla distribuição mundial, estando presente nos países Africanos, Americanos e Europeus, onde responde por 51% dos casos de TB em Portugal (BRUDEY et al., 2006; DAVID et al., 2007). Também é prevalente na região do Mediterrâneo (34% Argélia; 55% Marrocos; 30% Espanha) e do Caribe (30% Cuba e Haiti; 17.4% Guiana Francesa). Foi encontrada associação entre este genótipo e mutações específicas que conferem resistência à rifampicina e à estreptomicina em estudo realizado por Lipin et al. (2007) na Rússia.

Na América do Sul, cerca de 50% das cepas são pertencentes à superfamília LAM, que é altamente presente na Venezuela (65%). Ela é definida pela ausência simultânea das DVRs 21-24 e 33-36 (BRUDEY et al., 2006). Sugere-se que ela teve origem a partir da domesticação do gado e se espalhou através da migração humana (SOLA et al., 2001), estando presente atualmente em todos os continentes e que sua presença na América do Sul se deve à histórica colonização Lusitana e Espanhola (GUERNIER et al., 2008).

Entre os espoligotipos pertencentes à família LAM (e suas variantes) encontrados neste estudo, alguns têm ampla distribuição geográfica (SITs 4, 17, 20, 33, 42, 60, 64, 93), outros têm distribuição mais restrita (SITs 95, 150, 177, 209, 216, 435, 950, 1076, 1671, 1709 e 1755) e os SITs 1894 e 1907 são endêmicos, descritos somente no Brasil (SCHOLANTE SILVA et al., 2009; SITVIT, 2010). Os SITs 20 e 1755 (LAM1) e os SITs 42, 150 e 177 (LAM9), foram descritos recentemente em Portugal, onde se reporta que estas subfamílias são altamente prevalentes (DAVID et al., 2007).

Entre os SITs citados, alguns ainda não foram descritos em Belém (SITs 4, 60, 150, 216, 435, 1671, 1755, 1894 e 1907) e outros ainda não foram referenciados no Brasil (SITs 209, 950 e 1709), ocorrendo, porém, em países vizinhos ou com relações com o Brasil, como Venezuela, EUA, Itália, Espanha (SITVIT, 2010). O SIT4 foi descrito recentemente em caso de resistência às principais drogas anti-TB (rifampicina, isoniazida e etambutol) na Turquia (BULUT et al., 2009).

Além destes, existem ainda os que não puderam ser classificados por um número SIT, como no caso dos perfis órfãos (VO8) e pseudo-órfãos (PO). O SIT209

(LAM12_MAD1), descrito como novo no SpolDB4, é pouco frequente e tem localização restrita, com 44% deste tipo ocorrendo em Madri, Espanha, razão pela qual esta subfamília foi ‘batizada’ com a sigla ‘MAD’, de *Madrid* (BRUDEY et al., 2006).

A superfamília T, a segunda mais abundante neste estudo, também é encontrada em todos os continentes e corresponde por aproximadamente 30% de todas as entradas no SpolDB4 (BRUDEY et al., 2006). É referenciada na literatura como “*ill-defined T family*”, ou seja, família T “mal definida”, incluindo uma série de subgrupos filogeneticamente distintos, necessitando ainda que sejam definidas deleções específicas (DVRs) que a caracterizem (BRUDEY et al., 2006; FILLIOL et al., 2006; STREICHER et al., 2007).

A família T foi representada aqui por quatro tipos de distribuição universal (SITs 53, 73, 86 e 291), dos quais somente o SIT53 foi descrito em Belém, e sete de localização restrita (SITs 244, 245, 373, 430, 888, 1284 e 1580). Dos tipos de ampla distribuição, os SITs 73 e 86, já foram isolados na Guiana Francesa e o SIT291 já foi isolado na Venezuela e no Perú, porém nenhum destes tinha sido descrito em Belém até o momento. Entre os de localização restrita, somente o SIT1284 foi descrito em Belém, sendo que os demais já foram isolados em outras cidades do Brasil (Rio de Janeiro, Brasília, Fortaleza, Belo Horizonte, Recife) e também em países vizinhos, como Guiana Francesa e Venezuela. O SIT244, conhecido como “*Portuguese type*”, é predominante em Portugal e no Brasil, que respondem por 21,1% e 13,2% das entradas deste tipo no SITVIT, respectivamente (RAHIM, 2007; SITVIT, 2010).

De todos os espoligotipos pertencentes à família T, somente o SIT888 (T1) e o SIT430 (T4_CEU1) ainda não foram descritos no Brasil, porém ambos já tiveram isolados originários do Equador e o SIT430 também foi descrito na Venezuela (ARISTIMUÑO et al., 2006; RAHIM et al., 2007; SITVIT, 2010). Oitenta e quatro por cento das entradas do SIT430 são provenientes do Equador, isoladas de pacientes residentes na ocasião em Nova Iorque. Este genótipo é provavelmente derivado do SIT39, frequente na Europa e África do Sul, com o qual apresenta similaridade (BRUDEY et al., 2006).

No continente europeu, a família Haarlem representa 25% de todos os isolados. Fora da Europa, é encontrada principalmente na América Central e região do Caribe, sugerindo uma ligação entre esta família e a colonização europeia pós-Colombo (BRUDEY et

al., 2006). Ela tem sido associada à multirresistência às drogas anti-TB, e a associação deste genótipo com surtos de cepas resistentes demonstra claramente seu potencial epidêmico (DOUSTDAR; KHOSRAVI; FARNIA, 2009; FARNIA et al., 2006; MARDASSI et al., 2005). É caracterizada pela ausência simultânea das DVRs 31 e 33-36.

Entre as amostras avaliadas, 8,5% pertenciam à família Haarlem, representada pelos SITs 47, 50 e 75, de distribuição universal, sendo que os dois primeiros contam com isolados provenientes de Belém (6,6% e 10,2%, respectivamente) (SITVIT, 2010), e pelo SIT740, de localização restrita, ainda não descrito no Brasil, contando com isolados na região do Caribe (Guadalupe). O tipo SIT47 é abundante na Áustria, Itália, Holanda, EUA e, na América do Sul, está presente na Argentina, no Brasil, no Paraguai e na Venezuela (ARISTIMUÑO et al., 2006; BRUDEY et al., 2006; CANDIA et al., 2007; LIMA et al., 2010; SEQUERA et al., 2008). Lima et al. (2010) relatam que 26,3% dos casos avaliados em seu estudo, realizado com isolados provenientes de pacientes do Pará, pertenciam à família Haarlem.

Foi relatada associação entre cepas do tipo SIT50 (H3) e a resistência à isoniazida em isolados provenientes da América Latina, incluindo o Brasil (DALLA COSTA et al., 2009), o que levou aos autores a sugerirem que esta família parece favorecer a emergência de cepas multidroga resistentes (MDR), o que poderia explicar em parte o sucesso da disseminação deste genótipo no continente Sul Americano.

A linhagem *East-African and Indian* é altamente prevalente no Oriente Médio, Ásia Central e Oriental e Oceania, assim como no sudeste Asiático, particularmente nas Filipinas (73%), Mianmar e Malásia (53% em ambas) e no Vietnã e Tailândia (32% em ambas) (BRUDEY et al., 2006). Na América do Sul, sua presença é pouco relatada. De fato, nenhum isolado desta família foi observado em alguns estudos realizados recentemente no Brasil (CAFRUNE et al., 2009; MALASPINA et al., 2008; SCHOLANTE SILVA et al., 2009), no Paraguai (CANDIA et al., 2007), na Venezuela (ARISTIMUÑO et al., 2006; SEQUERA et al., 2008) e no Chile (MANCILLA et al., 2006). É caracterizada pela ausência simultânea das DVRs 29-32 e 34 (BRUDEY et al., 2006). Foi associada à multidroga resistência em estudo realizado no Paquistão (TANVEER et al., 2008).

A presença da família EAI foi relatada na Guiana Francesa (12,2%) por Guernier et al. (2008) e no Brasil por Gomes (2006), que observou particularidades em relação à distribuição desta família no país. Entre isolados de 11 estados brasileiros avaliados em seu estudo, Gomes (2006) relatou a presença de cepas EAI somente no Pará, em Pernambuco e no Rio de Janeiro, sendo que 76,2% dos isolados eram provenientes do Pará. Entre os tipos encontrados pelo autor, estavam presentes os SITs 48 e 129, também encontrados no presente trabalho e em outro estudo realizado no Pará, por Lima et al. (2010), onde 7,9% dos isolados avaliados pertenciam à família EAI.

No banco de dados SITVIT, o SIT48 conta com apenas cinco casos de origem brasileira, sendo que um deles foi isolado em Caiena (Guiana Francesa) e os outros quatro em Belém. O mesmo é relatado para o SIT129, que conta com três casos de origem brasileira, sendo um isolado em Belém e dois isolados em Caiena. O outro tipo encontrado aqui, pertencente à esta família, foi o SIT763, de localização restrita, pouco isolado na Europa e América do Norte, e sem nenhum registro brasileiro ainda.

Devido à baixa frequência de representantes da família EAI no Brasil e pelo conhecido fluxo intenso de pessoas entre o Brasil – principalmente Belém – e a Guiana Francesa, uma hipótese é que o Brasil ‘importou’ estas estirpes da Guiana Francesa, suspeita levantada também por Gomes (2006) ao avaliar seus resultados.

Segundo Moura e Hazeu (2003), um estudo realizado pelo Fórum da Amazônia Oriental (FAOR) revela que o estado do Pará é destaque nas discussões sobre tráfico de seres humanos no Brasil, sendo apontado como um dos estados com várias rotas, tanto com destino aos países vizinhos quanto para a Europa. Os principais destinos dos emigrantes originários de Belém e Ananindeua na América Latina são o Suriname, a Guiana Francesa e a Venezuela (ALMEIDA, 2004; 2008; FIGUEIREDO; HAZEU, 2006).

A linhagem “X” é atualmente uma família bem caracterizada que contém poucas cópias da IS6110, e por isso tem sido designada como “*European low IS6110 copy*” (WARREN et al., 2004a). Definida pela ausência simultânea das DVRs 18 e 33-36, é altamente prevalente nas Américas do Norte e Central e pode estar ligada a uma ascendência anglo-saxã, sendo encontrada em áreas colonizadas pelos ingleses, como no Reino Unido, EUA, Austrália, África do Sul e no Caribe (BRUDEY et al., 2006).

A família X foi representada aqui pelos tipos SIT137 (X2), SIT92 (X3) e SIT1341 (X2), que reuniram 6,4% dos casos. O tipo SIT92, de distribuição universal, também foi encontrado por Malaspina et al. (2008) em Ribeirão Preto/SP, por David (2007) em Portugal e por Cafrune et al. (2009) em Porto Alegre, que também relataram a ocorrência do SIT137 entre suas amostras. No entanto, nenhum destes três tipos foi encontrado por Gomes (2006), porém os tipos SIT92 e SIT137 foram relatados por Lima et al (2010), sendo que ambos os estudos avaliaram isolados provenientes do Pará. Todavia, 33,3% das entradas brasileiras do SIT92 presentes no banco de dados SITVIT foram isolados em Belém, que também é responsável por 42,3% dos isolados do tipo SIT137 de origem brasileira no SITVIT, que neste estudo agrupou 3,6% das amostras.

É relatado que a recentemente descrita família MANU tem origem na Índia e pode ser um clone ancestral das cepas do PGG1. É encontrada na Índia, em Madagascar, Bangladesh, África do Sul e em alguns países europeus, porém em baixa frequência (BRUDEY et al., 2006). Neste estudo, foi representada pelas subfamílias MANU1 (ausência da DVR 34), com o tipo SIT100 e pela subfamília MANU2 (ausência das DVRs 33-34), com o SIT1690. O tipo SIT100, apesar de contar com 4,3% dos casos neste estudo e com 0,6% dos casos no estudo de Lima et al (2010), ainda não consta no Banco Mundial de Espoligotipos com entradas provenientes do Brasil e tampouco na América Latina. É um genótipo localizado, com 53,2% dos isolados originários da Índia. Também foi descrito nos EUA, sendo que destes casos, 14,3% eram de origem haitiana (SITVIT, 2010).

O SIT1690, que contou com duas amostras neste estudo, conta com duas entradas no Banco Mundial de Espoligotipos, sendo uma de isolado de Brasília e outra descrita em Nova Iorque (SITVIT, 2010).

Os demais genótipos encontrados, como os SITs 46, 397, 402 e 1241, não puderam ser classificados em famílias na atual versão do Banco Mundial de Espoligotipos, o SpolDB4. Desta forma, foram ‘rotulados’ na ocasião como “U”, de “*Unknown*” (desconhecido). Destes, até o momento, somente o tipo SIT1241 já foi descrito em Belém, sendo que todos eles já foram isolados no Brasil (CAFRUNE et al., 2009; LIMA et al., 2010; SCHOLANTE SILVA et al., 2009; SITVIT, 2010).

Quanto aos tipos aparentemente “órfãos” encontrados neste estudo, verificou-se que quatro deles compartilhavam perfis idênticos no SITVIT, onde os mesmos estavam relatados como ‘*orphan*’, já que até o momento da consulta não parecavam com nenhum outro padrão depositado neste banco de dados. Desta forma, foram designados no presente trabalho como pseudo-órfãos, recebendo o ‘rótulo’ ‘PO’, e compartilhavam seus espoligopadrões com tipos provenientes de Brasília, Brasil (PO1; LAM9), Roma, Itália (PO2; T2), Lisboa, Portugal (PO3, LAM1) e Nova Iorque, EUA (PO4; LAM8) (SITVIT, 2010). Pela estreita relação entre o Brasil e estes países (Itália, Portugal e EUA), pode-se sugerir que são casos possivelmente importados.

Entre os tipos designados como ‘órfãos verdadeiros’ (‘VO’), 33,3% puderam ser classificados na família EAI (VITOL et al., 2006), demonstrando que a presença desta família genotípica no Pará é importante, como também foi observado por Gomes (2006). Desta forma, é uma situação que merece atenção quanto à determinação das possíveis rotas de entrada das cepas desta família no estado assim como do surgimento de novos tipos desta mesma linhagem. A ocorrência de um espoligotipo encontrado neste estudo (VO9) muito semelhante a um único encontrado em Belém deve ser verificada com o auxílio de outro método de tipagem, como o MIRU-VNTR, já que a diferença em um único espaçador pode ser resultado de dificuldades técnicas na tipagem (HAYWARD; WATSON, 1998), não caracterizando espoligotipos distintos.

Entre as amostras avaliadas, não foram observados genótipos pertencentes às famílias Beijing e CAS e nem de tipos pertencentes às outras espécies do CMTB, como o *M. bovis*, por exemplo. De fato, a presença do genótipo Beijing é raramente observada em pacientes com TB na América do Sul (DALLA COSTA et al., 2009), especialmente no Brasil, onde respondeu por 0,8% dos casos avaliados por Ritacco et al. (2008), sendo que estes ocorreram no estado de São Paulo, entre cepas MDR e não há relato da presença de genótipos pertencentes à família CAS no Brasil (BRUDEY et al., 2006; SITVIT, 2010).

O fluxo migratório moderno, principalmente com destino metropolitano, pode explicar em parte a presença de certos genótipos encontrados no Pará e em outros estados brasileiros (BAENINGER, 2003; GOMES, 2006). A população brasileira tem sido muito influenciada por distintas ondas migratórias, em grande parte influenciada por fatores econômicos. Na década de 90, o Brasil recebeu um número importante de imigrantes

(regulares e irregulares) de países Asiáticos, Caribenhos e da própria América Latina, tornando-se um destino importante para os latino-americanos, tanto os de países fronteiriços quanto os dos não-fronteiriços (AMARAL, 2005; OIM, 2010).

Além dos fluxos já mencionados, o Brasil vem contando com a entrada de imigrantes com origem em Portugal, Japão, Itália, Espanha, EUA, Inglaterra, Alemanha e França (AMARAL, 2005; BAENINGER, 2000; 2003; Migration Policy Institute, 2010).

Em sentido inverso, a emigração de brasileiros para o estrangeiro à procura de um emprego é um fenômeno que se tornou mais evidente na última década, mas a presença de brasileiros em países vizinhos ocorre desde a década de 60. Em grande parte, são trabalhadores provenientes do Pará, Amapá, Maranhão e Amazonas em busca de oportunidades de emprego, atraídos pelos salários oferecidos.

A presença de brasileiros também em países da Europa, nomeadamente em Portugal, Bélgica e Reino Unido, está em ascensão. Holanda, Espanha, França e Itália também são destinos em potencial (FIGUEIREDO; HAZEU, 2006; OIM, 2010). Além disso, o tráfico de pessoas, especialmente mulheres para exploração sexual, tem se tornado um problema cada vez mais importante no Brasil (OIM, 2010). Desse modo, o século 21 inicia-se reforçando as tendências dessa migração, consolidando o Brasil na rota dos deslocamentos populacionais internacionais, tanto no que se refere à saída de brasileiros quanto à entrada de estrangeiros no país (BAENINGER, 2000; 2003).

A taxa de diversidade total encontrada neste estudo foi de 47,2%. Proporções menores foram encontradas em Portugal (23,9%) (DAVID et al., 2007), Zimbábue (25,2%) (EASTERBROOK et al., 2004), Guiana Francesa (34,9%) (GUERNIER et al., 2008), Polônia (42,0%) (AUGUSTYNOWICZ-KOPEC'; JAGIELSKI; ZWOLSKA, 2008) e na Índia (42,8%) (SINGH et al., 2004) e maior (52%) foi relatada na Tanzânia (ELDHOLM et al., 2006). A alta diversidade clonal de *M. tuberculosis* dentro da região estudada pode ser devida à incidência elevada de TB nestes locais. Entretanto, o número de amostras utilizadas é reduzido em relação à expectativa total de casos e isso pode ter tido alguma influência nos resultados.

Warren et al. (1999) levantaram a hipótese de que áreas onde a TB é epidêmica teriam relativamente poucas cepas circulantes, no entanto encontraram vários isolados únicos e pequenos agrupamentos entre isolados de *M. tuberculosis* provenientes de duas comunidades com alta incidência da doença em Cape-Town, África do Sul. Outros estudos também relataram alto grau de diversidade genética em comunidades com alta incidência de TB em seus estudos (WARREN et al., 1996; YANG et al., 1995).

Entre as famílias encontradas neste estudo, as que apresentaram menor taxa de diversidade foram as famílias MANU (25,0%) e T (37,0%). O sucesso de uma família em particular, onde esta apresentaria maior adaptabilidade e conseqüentemente menor diversidade, poderia sugerir uma possível co-evolução entre famílias de *M. tuberculosis* específicas e a população hospedeira, mas também poderia ser devido ao tamanho da amostra e ao período de tempo selecionados.

Um estudo que compreenda o total de amostras em um período de tempo maior pode ser feito a fim de confirmar ou não esta hipótese e permitir que sejam feitas inferências sobre a população em geral. Como reportado anteriormente, os fatores tempo e tamanho da amostra têm grande influência. Desta forma, não se pode apontar aqui uma família em particular como a que encontrou melhor adaptação.

A velocidade com que se obtêm respostas utilizando esta técnica em situações onde são necessárias respostas rápidas, como em surtos, por exemplo, a torna valiosa. Ela também permite a comparação de amostras mantidas em estoque e inviáveis para novo cultivo, como nos casos de recidivas, quando se deseja comparar a cepa da infecção em curso com a de uma infecção passada de um mesmo paciente (GOUGET de la SALMONIÈRE et al., 1997).

A utilidade clínica do *Spoligotyping* é amplificada quando se compara dados de pacientes com TB dentro de uma comunidade. A construção e manutenção de um banco de dados que abrigue as informações relativas aos genótipos presentes em determinados locais pode auxiliar no monitoramento de como a doença está se comportando ao longo do tempo.

A tipagem molecular por *Spoligotyping*, atribuindo cada caso a uma família e a um espoligotipo em particular, por si só não é capaz de fornecer informações a respeito da

resistência ou susceptibilidade aos fármacos, porém o conhecimento de tipos reconhecidamente relacionados à multirresistência pode ser útil em alertar sobre a possível infecção com tais cepas e também em auxiliar no manejo clínico destes pacientes (BROWN et al., 2010; CAFRUNE, 2009; DALLA COSTA et al., 2009; DIGUIMBAYE et al., 2006; ECA, 2006; GORI et al., 2005b; IGNATOVA et al., 2006; LIPIN et al., 2007; MARAIS et al., 2006; NAMOUCHI et al., 2008).

Isto foi demonstrado na prática em estudo realizado por Gori et al. (2005b). A técnica foi capaz de diferenciar infecções causadas por *M. tuberculosis* e outras micobactérias em 27% dos casos, auxiliando assim os médicos na correta terapia para cada caso. Em um curto período de tempo (seis dias), também forneceu dados que resultou na modificação do tratamento anti-TB já iniciado em paciente portador de cepa MDR, 34 dias antes de os resultados de susceptibilidade estarem disponíveis, o que confirmou a necessidade desta mudança. As informações obtidas através da técnica foram relevantes na abordagem clínica de 33% dos pacientes incluídos no estudo.

Apesar de terem sido excluídas das comparações com os bancos de dados as amostras que apresentaram perfis de *Spoligotyping* discordantes, quer seja após a duplicata (mesma amostra do mesmo indivíduo – Mix1/1*; um caso) ou após comparar o espoligopadrão apresentado por outra amostra do mesmo indivíduo (porém concordantes após duplicata), como nos casos denominados Mix2/2*-5/5*, não significa que estas situações representem falhas durante a execução da técnica (contaminação cruzada, problemas na membrana ou na montagem do *miniblotter*), pois podem também revelar a presença de diferentes linhagens nestas amostras.

Embora tradicionalmente seja assumido que a TB ativa é resultado de uma infecção com um único clone bacteriano e que recorrências são resultado da reativação da cepa que causou o primeiro episódio, infecções simultâneas por múltiplas cepas ou reinfeção por uma segunda estirpe de *M. tuberculosis* podem ser responsáveis por uma parcela dos casos da doença (BRADEN et al., 2001; RICHARDSON et al., 2002; SHAMPUTA et al., 2006; STAVRUM et al., 2009; WARREN et al., 2004b).

O desenvolvimento de métodos de tipagem de DNA que diferenciam cepas de *M. tuberculosis*, como o RFLP-IS6110, *Spoligotyping* e MIRU, tem permitido, com o uso

combinado destas técnicas, mostrar cepas geneticamente distintas, com diferentes perfis de sensibilidade às drogas anti-TB, presentes no mesmo ou em diferentes espécimes clínicos pertencentes a pacientes com TB (imunocompetentes ou imunodeprimidos), residentes tanto em locais de alta quanto de moderada e baixa incidência, caracterizando assim infecção mista e até mesmo reativação ou reinfecção com cepas distintas após alta por cura (ANDREWS et al., 2008; BRADEN et al., 2001; CAMINERO et al., 2001; DAS et al., 2004; NIEMANN et al., 2000; PAVLIC et al., 1999; RICHARDSON et al., 2002; SHAMPUTA et al., 2006; STAVRUM et al., 2009; van RIE et al., 1999; 2005; WARREN et al., 2004b).

Infecções mistas têm sido atribuídas como possíveis explicações em casos que gerem resultados inconsistentes em testes de susceptibilidade (BRADEN et al., 2001; NIEMANN et al., 2000; YEH; HOPEWELL; DALEY, 1999). Braden et al. (1999) relatam a importância da identificação destas infecções no estudo da epidemiologia molecular da TB, uma vez que infecções mistas podem ser confundidas com reinfecção exógena ou contaminação laboratorial cruzada, podendo subestimar assim importantes conexões epidemiológicas (YEH; HOPEWELL; DALEY, 1999). Warren et al. (2004b) sugeriram, com base nos resultados encontrados em seu estudo, que infecções múltiplas são frequentes, implicando em altas taxas de reinfecção e ausência da imunidade protetora conferida pela infecção inicial.

Neste estudo, 3,1% dos casos genotipados por *Spoligotyping* apresentaram perfis genotípicos diferentes, cujos resultados se confirmaram após as duplicatas, sugerindo a presença de genótipos diferentes numa mesma amostra (Mix1) e em amostras diferentes (Mix2 – 5) de um mesmo paciente. As informações sobre as características dos pacientes e das amostras disponibilizadas juntamente com as lâminas no Livro de Registro de Baciloscopia e Cultura não diferenciavam entre si no que diz respeito ao sítio anatômico, pois todas estavam descritas como amostras de “escarro”.

Também quanto à finalidade do exame, as informações davam conta de que eram exames de diagnóstico, não havendo nenhum de controle de tratamento. No entanto, em dois casos, mesmo com a diferença de 13 e 58 dias de coleta entre as amostras, as mesmas constavam no livro como sendo ambas “1ª amostra”, demonstrando que todas as informações devem ser consideradas com muita cautela. Eram provenientes de indivíduos com média de idade de 43 anos (28, 33, 36, 46 e 73 anos), sendo uma mulher e quatro homens.

Em 60% destes casos, os resultados mostraram a presença de tipos da família T e, em 40%, o tipo SIT53 (T1) estava envolvido, incluindo o caso onde foram observados dois SITs desta família numa mesma amostra (Mix1). Em recente estudo realizado por Stavrum et al. (2009) na África do Sul utilizando amostras MDR, os autores observaram alta frequência de subpopulações mistas de *M. tuberculosis* entre isolados com o tipo SIT53, o que foi confirmado após utilizarem técnicas mais discriminatórias.

Quanto a estes resultados, algumas observações devem ser feitas: embora uma contaminação cruzada pudesse explicar os diferentes resultados apresentados por estas amostras, todas elas mostraram o mesmo padrão de hibridização após a duplicata, realizada em dias distintos, e também não houve indícios de que tenha ocorrido contaminação, já que não houve sinal de hibridização entre os controles negativos. Além disso, mesmo que o *Spoligotyping* não seja tão discriminatório quanto a tipagem por RFLP-IS6110 para distinguir entre cepas de *M. tuberculosis* relacionadas, é altamente improvável que estirpes que apresentem diferentes espoligopadrões sejam a mesma (HAYWARD; WATSON, 1998).

Desta forma, será necessário submeter estas amostras, assim como as amostras que compartilharam o mesmo espoligopadrão a uma técnica secundária baseada em PCR, como o MIRU-VNTR, por exemplo, pois já se demonstrou que a combinação destas duas técnicas tem poder discriminatório semelhante ao da técnica padrão-ouro, o RFLP-IS6110 (MATHEMA et al., 2006).

De certo modo, a tentativa de vincular a diversidade genotípica das cepas ao desfecho do tratamento não depende somente da definição acurada do genótipo, mas também da habilidade de definir claramente o quanto isso influencia clinicamente os resultados, avaliando com cautela tanto fatores intrínsecos às estirpes (tendência de causar doença cavitária, habilidade de disseminar ou causar infecção extrapulmonar) quanto os relacionados ao hospedeiro (imunidade, efeito do tempo).

Devido à dificuldade de definir claramente o papel de cada um destes fatores no desfecho clínico apropriado, a literatura avalia que a relevância da variabilidade genotípica na TB é baseada em modelos animais e, portanto, os resultados não podem ser extrapolados diretamente para os seres humanos (NICOL; WILKINSON, 2008). No entanto, como o

controle da TB depende em parte do tratamento, o impacto da presença de múltiplas cepas causando a doença no manejo clínico da TB necessita ser determinado.

A despeito das limitações, o *Spoligotyping* continua sendo um método de genotipagem altamente informativo, pois, ao classificar isolados em famílias/subfamílias, fornece um bom marcador de clonalidade além do fato de poder ser utilizado em amostras impróprias para o cultivo, tornando-se ferramenta importante em casos onde não é possível obter DNA em quantidade e qualidade necessárias para a execução da técnica padrão-ouro – o que limita o número de amostras representativas – e quando resultados rápidos são imprescindíveis, como em casos de surtos. Além disso, fornece informações a respeito do “caráter geográfico” das cepas, permitindo ao pesquisador uma visão mais ampla a respeito das possíveis rotas de transmissão e evita a manipulação de microrganismos vivos, limitando muito a contaminação laboratorial e dos profissionais envolvidos.

7.4 GEOLOCALIZAÇÃO DOS CASOS ESTUDADOS

Os modelos de localização espacial de doenças parecem constituir poderosas ferramentas de apoio à decisão na distribuição espacial de tecnologias de saúde. De acordo com Assunção et al. (1998), os mapas temáticos são instrumentos poderosos na análise espacial do risco de determinada doença apresentando os seguintes objetivos: i) descrever e permitir a visualização da distribuição espacial da doença na região de interesse; ii) explorar, sugerindo os determinantes locais de doenças e fatores etiológicos a serem investigadas posteriormente e iii) apontar associações entre fatores potenciais de contaminação e áreas de risco elevado.

A proposta do presente estudo, em relação à distribuição espacial dos casos, foi descritiva. Através da localização pontual da residência dos casos e ilustração dos mesmos em mapas, foi possível observar áreas onde houve certo agrupamento de casos com o mesmo perfil de *Spoligotyping*, como aconteceu com os casos pertencentes aos agrupamentos SIT64 (mesma residência), SIT100 (100m) e SIT53 (290m), em Belém. Este fato chama a atenção para a possibilidade de que os casos que possuem o mesmo genótipo participem da mesma cadeia de transmissão, ressaltando a importância de aumentar a vigilância e investigação nesta

área. No entanto, como o período selecionado para obtenção das amostras foi de seis meses e não envolveu a totalidade dos casos com baciloscopia positiva (duas UL de Belém e oito UL de Ananindeua), algumas áreas de ambas as cidades não tiveram nenhum ponto localizado (como foi o caso da parte Leste de Belém), o que não significa que não houve casos nestas localidades.

De forma contrária, percebeu-se que alguns bairros apresentaram maior concentração de pontos (casos), independente do genótipo (SIT), como foi o caso dos bairros Guamá, Jurunas e Terra Firme que, em conjunto, concentraram 24,7% dos casos geolocalizados. Avaliando as características da população residente nos mesmos, observa-se que estão entre os bairros mais populosos da capital paraense e contam com as médias mais elevadas de moradores por domicílio (IBGE, 2010b; 2010c).

Outro fator que influenciou na redução dos casos disponíveis para este estudo foi o fato de que, inicialmente, 27,2% das amostras foram excluídas por motivos relacionados ao endereço (ausente/incompleto/outro município), contrastando com os 2,2% casos excluídos no estudo realizado por Hino (2004) e com os 8,5% na investigação de Dos Santos (2004), pelos mesmos motivos, porém semelhante aos 20,5% não georreferenciados por Cafrune (2009). Em estudo exploratório realizado por Dos Santos et al. (2004), frente à dificuldade de localizar alguns endereços, os autores presumiram que os endereços incompletos e conseqüentemente difíceis de serem localizados pertenciam a áreas carentes, podendo resultar em uma subestimação de casos nos bolsões urbanos de pobreza.

De qualquer maneira, estes fatores não tiveram tanta influência no resultado final deste estudo, já que o mesmo não teve finalidade exploratória ou ecológica e tampouco de ilustrar a incidência dos casos de TB. Além disso, pela própria característica de uma das UL selecionada (HUJBB), que produz muitos exames, porém atende grande número de pacientes de outros municípios, a amostra foi sendo reduzida, aliada em grande parte pela dificuldade de localizar os endereços, pois a única fonte de dados era a cópia do Livro de Baciloscopia e Cultura enviada pelas UL.

Um das dificuldades de se trabalhar com dados secundários é o fato de que, em muitas situações, o registro incompleto – ou até mesmo a falta de registro – das informações impossibilita uma abordagem ampla e fiel dos achados. Neste estudo, este fato foi

evidenciado principalmente em relação aos endereços: muitos não constavam nos registros que acompanhavam as amostras ou, quando constavam, não continham os elementos básicos (rua, número, bairro), fato que tem sido notado nos mais diversos tipos de estudo (CAFRUNE, 2009; HINO, 2004; PINTO, 2008).

Apesar das limitações inerentes aos estudos retrospectivos e que utilizam dados secundários, a localização espacial de 69,9% dos endereços dos casos selecionados, combinada à discriminação molecular de *M. tuberculosis* presentes nas amostras permitiu a confecção de mapas temáticos que exibem a distribuição espaço-temporal das famílias e subfamílias de *M. tuberculosis* circulantes nos dois municípios à época do estudo. Hino (2004), que apresentou a distribuição dos casos de TB no município de Ribeirão Preto, SP, entre 1998 e 2002, conseguiu geolocalizar com sucesso 89,3% dos casos em estudo, proporção semelhante à relatada por Dos Santos et al. (2004), que geolocalizou 91,5% dos casos.

Estudos que avaliam a totalidade de isolados disponíveis de uma determinada área geográfica em um tempo definido podem ajudar a estimar a importância da transmissão recente e a identificar os fatores de risco para a disseminação da TB (HAYWARD; WATSON, 1998). É importante salientar que investigações de traçado convencional de contatos identificam somente uma pequena parcela dos casos envolvidos em uma cadeia de transmissão, salientando a necessidade de novas abordagens (KATO-MAEDA; SMALL, 2000).

Todos estes fatores apontam para a necessidade de melhorar o sistema de coleta, organização e armazenamento de dados, para que eles possam ser acessados quando necessário e, validados, se tornem parte integrante da vigilância da TB e de outras doenças que possam ser objeto de investigação futura. Somente desta forma, estes dados permitirão a utilização de abordagens de estatística espacial que ajudem a definir, de forma clara e segura, os fatores de risco aos quais a comunidade está exposta.

8 CONCLUSÕES

A maioria (61,3%) dos casos incluídos no estudo pertencia ao gênero masculino e 68,0% dos casos tinham entre 20 e 49 anos, sendo que a média geral de idade apresentada foi de 38 anos.

A genotipagem por *Spoligotyping* revelou a diversidade de famílias de *M. tuberculosis* nas áreas de estudo, com predominância das famílias LAM e T, sendo semelhante às reportadas em outros estudos conduzidos no Brasil, chamando a atenção para a proporção, idêntica à da família Haarlem, de tipos pertencentes à família EAI nesta região, que podem ser importados.

A técnica também permitiu identificar vários genótipos novos, ainda não relatados, assim como a presença, entre as amostras, de genótipos que pareiam com tipos órfãos descritos em outros países e no Brasil.

A aplicação do *Spoligotyping* em amostras pulmonares obtidas de lâminas de ZN mostrou rendimento e reprodutibilidade satisfatórios, o que permitirá estudos futuros que avaliem maior quantidade de amostras, aumentando assim a representatividade.

Será necessário aplicar outra técnica, baseada em PCR, para melhor discriminar aquelas amostras que apresentaram os mesmos padrões de *Spoligotyping*, assim como para confirmar ou excluir a natureza mista apresentada por cinco amostras.

A geolocalização dos casos permitiu visualizar a distribuição dos espoligotipos nos municípios incluídos no estudo, no período em que ocorreram, assim como a determinar alguns agrupamentos de casos com mesmo genótipo, se mostrando útil para direcionar e auxiliar investigações futuras.

9 PERSPECTIVAS

Avaliar a aplicabilidade do MIRU-VNTR em amostras estudadas, a fim de obter maior discriminação e esclarecer os casos que possam gerar dúvidas (possíveis infecções mistas). A otimização do MIRU-VNTR para este tipo de amostra está em andamento no Laboratório de Biologia Molecular da SABMI.

Realizar estudo prospectivo, com maior número de amostras e por período de tempo maior, possibilitando coletar dados sócio-demográficos mais completos dos pacientes, com o objetivo de correlacionar estas informações com os dados obtidos por genotipagem e identificar possíveis relações epidemiológicas.

Contribuir para manutenção do banco de dados com perfis obtidos por *Spoligotyping*, que já existe na SABMI, permitindo assim a comparação dos perfis circulantes em estudos prévios realizados na região e com estudos futuros, tanto localmente quanto em maior escala.

Submeter à publicação, em periódicos especializados, os principais resultados observados no estudo, tanto os obtidos com as amostras de Belém (Anexo D) quanto com as de Ananindeua.

10 REFERÊNCIAS

ACOSTA, C. C. D.; CANDIA, N. B.; RUSSOMANO, G.; RITTACCO, V.; ROMERO, N.; GOMES, H. M.; SUFFYS, P. N. Identificação da sub-linhagem RD^{RIO} em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes do Paraguai. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2008. **Caderno de Resumos**. Resumo ID:684-1. Disponível em:< <http://sbmicrobiologia.org.br/PDF/cdsbm/resumos/R0684-1.html>>. Acesso em: 10 fev 2010.

AERTS, D.; JOBIM, R. The epidemiological profile of tuberculosis in southern Brazil in times of AIDS. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 8, n. 6, p. 785-791, 2004

ALLAND, D.; KALKUT, G. E.; MOSS, A. R.; MCADAM, R. A.; HAHN, J. A.; BOSWORTH, W.; DRUCKER, E.; BLOOM, B. Transmission of Tuberculosis in New York City – An Analysis by DNA Fingerprinting and Conventional Epidemiologic Methods. **New Engl J Med**, v. 330, n. 24, p. 1710-1716, jun 1994.

ALLOTEY, P.; GYAPONG, M. Gender in tuberculosis research. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 12, n. 7, p. 831-836, 2008.

ALMEIDA, J. Caiena deporta 500 brasileiros em 5 meses. In: **O Liberal**. 26/11/2004. Disponível em:<<http://www.orm.com.br/oliberal/interna/default.asp?modulo=624&codigo=40312>>. Acesso em 05 fev 2010.

ALMEIDA, J. Exploração e abusos sexuais preocupam. In: **O Liberal**. 27/04/2008. Caderno Atualidades, p. 16.

AMARAL, E. F. Country Profiles. **Shaping Brazil: The Role of International Migration. Jun 2005**. Disponível em:< <http://www.migrationinformation.org/Profiles/display.cfm?ID=311>>. Acesso em 01 mar 2010.

ANANINDEUA. Prefeitura Municipal. **O Município**. Disponível em:<<http://www.ananindeua.pa.gov.br>>.

ANDREWS, J. R.; GANDHI, N. R.; MOODLEY, P.; SHAH, N. S.; BOHLKEN, L.; MOLL, A. P.; PILLAY, M.; FRIEDLAND, G.; STURM, A. W. Exogenous reinfection as a cause of multidrug resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in rural South Africa. **J Infect Dis**, v. 198, p. 1582-1589, dez 2008.

ARISTIMUÑO, L.; ARMENGOL, R.; CEBOLLADA, A.; ESPAÑA, M.; GUILARTE, A.; LAFOZ, C.; LEZCANO, M. A.; REVILLO, M. J.; MARTÍN, C.; RAMÍREZ, C.; RASTOGI, N.; ROJAS, J.; VÁZQUES DE SALAS, A.; SOLA, C.; SAMPER, S. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the first National Survey of Anti-tuberculosis drug resistance from Venezuela. **BMC Microbiol.**, v. 6, n. 90, out 2006.

ASSUNÇÃO, R. M.; BARRETO, S. M.; GUERRA, H. L.; SAKURAI, E. Mapas de taxas epidemiológicas: Uma abordagem Bayesiana. **Cad Saúde Pública**, v. 14, n. 4, p. 713-723, out-dez, 1998.

AUGUSTYNOWICZ-KOPEC', E.; JAGIELSKI, T.; ZWOLSKA, Z. Genetic Diversity of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Collected in Poland and Assessed by Spoligotyping. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 12, p. 4041-4044, dez 2008

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0**. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM/MCT/CNPq, 2007. 364 p.

BAENINGER, R. O Brasil no contexto das migrações internacionais da América Latina. **Rev Com Ciência**, n. 16. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/migracoes/migr09.htm>> Atualizado em 10 dez 2000. Acesso em 15 mar 2010.

BAENINGER, R. O Brasil na rota das migrações internacionais recentes. **Jornal da Unicamp**. Ed. 226, ago 2003. Disponível em :<http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2003/ju226pg2b.html>. Acesso em 15 mar 2010.

BARCELLOS, C.; RAMALHO, W. M.; GRACIE, R.; MAGALHÃES, M. A. F. M.; FONTES, M. P.; SKABA, D. Georreferenciamento de dados de saúde na escala submunicipal: algumas experiências no Brasil. **Epidemiol Serv Saúde**, v.17, n.1, p. 59-70, mar.2008

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassa para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Rev Bras Hematol e Hemot**. V. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

BARNES, P. F.; BARROWS, S. A. Tuberculosis in the 1990s. **Ann Intern Med**, v. 119. n. 5. p. 400 – 410, set. 1993.

BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Current Concepts: Molecular epidemiology of Tuberculosis. **New Engl J Med**, 349(12): 1149-1156, September 2003.

BARRERA, L. The basics of Clinical bacteriology. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007**: From basic science to patient care. Cap. 3, p. 93-112. Disponível em: <<http://www.tuberculosis textbook.com>>. Acesso em: 6 set. 2008.

BASTA, P. C.; OELEMANN, M. A. C.; OELEMANN, W. M. R.; FONSECA, L. S.; COIMBRA JR, C. E. A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum from Suruí Indian subjects, Brazilian Amazon. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 581-584, set 2006.

BAUER, J.; ANDERSEN, A. B.; KREMER, K.; MIORNER, H. Usefulness of Spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strain cultured in Denmark. **J Clin Microbiol**, 37: 2602-2606, 1999.

BELÉM. Prefeitura Municipal. **Plano Diretor**. Dados da Cidade. Disponível em:<<http://www.belem.pa.gov.br>>. Acesso em 25 fev 2009.

BIFANI, P.; KUREPINA, N.; MATHEMA, B.; WANG, X-M.; KREISWIRTH, B. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using IS6110-based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. In: GAUGANT, D. A. **Molecular epidemiology of microorganisms**. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. v. 551, cap. 10. Nova Iorque: Humana Press, 2009. p. 117-128.

BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, M. M.; MADEIRRA, S. de G.; LIMA, C.; BOFFO, M.; MATTOS, I.; SILVA, P. E. A. da; DELLAGOSTIN, O. A. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. **Micr Infect**, v. 7, p. 1338-1344, 2005.

BORGDORFF, M.W.; NAGELKERKE, N.J.D.; DYE, C.; NUNN, P. Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore sex differences in case detection. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 4, n. 2, p. 123-132, fev, 2000.

BRADEN, C. R.; MORLOCK, G. P.; WOODLEY, C. L.; JOHNSON, K. R.; COLOMBEL, A. C.; CAVE, M. D.; YANG, Z.; VALWAY, S. E.; ONORATO, I. M.; CRAWFORD, J. T. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Infect Dis**, v. 33, p. 42-47, set 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose**: uma proposta de integração ensino-serviço. 5. Ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002. 236 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. Ed. Brasília, DF, 2005. (2005a). Cad 7. 816 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Relatório de situação: Pará**. Brasília: MS, 2005. (2005b). 20 p.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília: MS, 2008. (2008a). 436 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Rede Interagencial de Informações para a Saúde. Indicadores e Dados Básicos. 2008. Indicadores de morbidade e fatores de risco. **Taxa de incidência de tuberculose**. (2008b). Disponível em: <<http://www.tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2008>>. Acesso em 04 jan 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Tuberculose. Distribuição dos casos segundo a forma clínica e grupo etário**. (2009a). Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo>. Acesso em: 02 jan 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Tuberculose - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. **Casos confirmados por Forma segundo Ano Diagnóstico. 2009**. (2009b). Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.de>>. Acesso em 05 mar 2010.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. DEVEP/SVS/MS. **Situação da Tuberculose no Brasil**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tb_2009.pdf. Acesso em: 03 jan 2010.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; van SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 99, n. 6, p. 3684–3689, mar 2002.

BROWN, T.; NIKOLAYEVSKYY, V.; VELJI, P.; DROBNIIEWSKI, F. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* strains and phenotypes. **Emerg Infect Dis.**, v. 16, n. 2, p. 272-279, fev 2010.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J. R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W. M.; GORI, A.; ALHAJOJ, S. A.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J.; BAUMANIS, V.; BINDER, L.; CAFRUNE, P.; CATALDI, A.; CHEONG, S.; DIEL, R.; ELLERMEIER, C.; EVANS, J. T.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; FERDINAND, S.; DE VIEDMA, D. G.; GARZELLI, C.; GAZZOLA, L.; GOMES, H. M.; GUTTIEREZ, M. C.; HAWKEY, P. M.; VAN HELDEN, P. D.; KADIVAL, G. V.; KREISWIRTH, B. N.; KREMER, K.; KUBIN, M.; KULKARNI, S. P.; LIENS, B.; LILLEBAEK, T.; LY, H. M.; MARTIN, C.; MARTIN, C.; MOKROUSOV, I.; NARVSKAĀ, O.; NGEOW, Y. F.; NAUMANN, L.; NIEMANN, S.; PARWATI, I.; RAHIM, Z.; RASOLOFO-RAZANAMPARANY, V.; RASOLONAVALONA, T.; ROSSETTI, M. L.; RÜSCH-GERDES, S.; SAJDUDA, A.; SAMPER, S.; SHEMYAKIN, I. G. G.; SINGH, U. B.; SOMOSKOVI, A.; SKUCE, R. A.; VAN SOOLINGEN, D.; STREICHER, E. M.; SUFFYS, P. N.; TORTOLI, E.; TRACEVSKA, T.; VINCENT, V.; VICTOR, T. C.; WARREN, R. M.; YAP, S. F.; ZAMAN, K.; PORTAELS, F.; RASTOGI, N.; SOLA, C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol.**, v. 6, n. 23. p. 23-39, 2006.

BULUT, Y.; YENİŞEHİRLİ, G.; OTLU, B.; SEYFİKLİ, Z.; CELİKEL, S.; YILMAZ, A.; İNONU, A. Primary Drug Resistance and Molecular Epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in the Kelkit Valley. **Turk J Med Sci**, V. 39, N. 1, P. 101-107, 2009

BURGOS, M. V.; PYM, A. S. Molecular epidemiology of tuberculosis. **Eur Respir J**, v. 20, suppl. 36, p. 54s-65s, 2002.

CAFRUNE, P. I. **Avaliação da técnica de Spoligotyping aplicada diretamente em amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose e caracterização epidemiológica.** Dissertação (Bioquímica). f. 100. Universidade Federal do Rio Grande do Sula, Porto Alegre, 2009.

CAFRUNE, P. I.; POSSUELO, L. G.; RIBERIO, A. W.; RIBEIRO, M. O.; UNIS, G.; JARCZEWSKI, C. A.; ROSSETTI, M. L. R.; ZAHA, A. Prospective study applying Spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. **Can J Microbiol**, v. 55, p. 985-900, 2009.

CÂMARA, G.; MONTEIRO, A. M.; FUCKS, S. D.; CARVALHO, M. S. Análise espacial e geoprocessamento. In: **Análise espacial de dados geográficos.** Brasília: EMBRAPA, 2004. Cap. 1. Disponível em: <<http://www.dpi.inpe.br/spoligot/livro/analise/cap1-intro.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2009.

CAMINERO, J. A.; PENA, M. J.; CAMPOS-HERRERO, M. I.; RODRÍGUEZ, J. C.; AFONSO, O.; MARTIN, C.; PAVÓN, J. M.; TORRES, M. J.; BURGOS, M.; CABRERA, P.; SMALL, P. M.; ENARSON, D. A. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European

Island with a moderate incidence of disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, n. 3, p. 717-720, mar 2001.

CANDIA, N.; LOPEZ, B.; ZOZIO, T.; CARRIVALE, M.; DIAZ, C.; RUSSOMANDO, G.; DE ROMERO, N. J.; JARA, J.C.; BARRERA, L.; RASTOGI, N.; RITACCO. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. **BMC Microbiol.**, v. 7, n. 75, ago, 2007.

CARRICAJÓ, A.; VINCENT, V.; BERTHELOT, P.; GERY, P.; AUBERT, G. Mycobacterial cross-contamination of bronchoscope detected by molecular techniques. **J Hosp Infect**, v. 42, p. 252-253, 1999.

CARVALHO, M. S.; PINA, M. de F. de.; SANTOS, S. M. **Conceitos básicos de sistemas de informação geográfica e cartografia aplicados à saúde**. Brasília: OPAS, 2000. 124 p.

CAVALCANTI, V. **Tuberculose: diagnóstico precoce ainda é essencial na luta contra a doença**. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Auditoria. 2006. Disponível em: <<http://sna.saude.gov.br/?id=2875>>. Acesso em: 27 jun. 2009.

CAVE, M D.; EISENACH, K D.; McDERMOTT, P F.; BATES, J H.; CRAWFORD, J T. IS6110: Conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and this utilization in DNA fingerprinting. **Mol Cell Probes**, v. 5, n. 1, p. 73-80, fev. 2001.

CATALDI, A.; ROMANO, M. I. Tuberculosis caused by Other Members of the *M. tuberculosis* Complex. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007 – From basic science to patient care**. Cap. 8, p. 283-314. Disponível em: <<http://www.tuberculosis-textbook.com>> Acesso em: 28 set. 2008.

CDC. **PHIL. Public Health Image Library**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/details.asp>>. Acesso em: 03 mar 2009.

CDC. **Tuberculosis Genotyping Laboratory Procedures**. Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control. 2008. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/genotyping/Chap3/3_CDCLab_2Description.htm> Acesso em 13 jan 2009.

CHAVES, F.; DRONDA, F.; ALONSO-SANZ, M.; NORIEGA, A. Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected. **AIDS**, v. 13, p. 615-620, 1999.

CHIESA, A. M.; WESTPHAL, M. F.; KASHIWAGI, N. M. Geoprocessamento e a promoção da saúde: desigualdades sociais e ambientais em São Paulo. **Rev Saúde Pública**, v.36, n.5, p. 559-567, out.2002.

COBERLY, J. S.; CHAISSON, R. E. **Tuberculosis**. Cap 18, p. 653-695. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books>>. Acesso em: 22 jan 2009.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHE, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E. 3rd; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

CONCEIÇÃO, E. C.; BRITO, M. L.; FURLANETO, I. P.; LIMA, G. L. F.; COSTA, A. R. F.; SILVA, R. N. O.; PRADO, A. F.; LIMA, K. V. B. **Confirmação molecular por PCR IS6110 das baciloscopias para diagnóstico da tuberculose pulmonar no município de Ananindeua, Pará**. In: 25^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. Disponível em: <<http://sbmicrobiologia.org.br/PDF/cdsbm/resumos/R2577-1.html>>

COROS, A.; DeCONNO, E.; DERBYSHIRE, K. M. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific Insertion Sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. **J Clin Microbiol**, v. 190, n. 9, p. 3408-3410, mai. 2008.

DA SILVA, P. A.; FELIX, C.; von GROLL, A.; PRATA, P.; HONSCHA, G. Análise molecular e epidemiológica de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas em Rio Grande, através dos métodos de MIRU-VNTR e Spoligotyping. **J Bras Pneumol**, n. 34, supl. 1R: R60, 2008. Disponível em: <http://www.jornaldepneumologia.com.br/PDF/suplemento_tuberculose.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2009.

DALCOLMO, M. P.; FORTES, A.; DE MELO, F. F.; MOTTA, R.; NETTO, J. I.; CARDOSO, N.; ANDRADE, M.; BARRETO, A. W.; GERHARDT, G. Estudo de efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. **J Pneumol**, v. 25, n. 2, p. 70-77, mar-abr, 1999.

DALCOLMO, M. P. **Casos de TBMR**. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por karlalima@iec.pa.gov.br em 25 fevereiro 2010.

DALE, J. W.; BRITAIN, D.; CATALDI, A. A.; COUSINS D.; CRAWFORD J. T.; DRISCOLL J.; HEERSMA H.; LILLEBAEK T.; QUITUGUA T.; RASTOGI N.; SKUCE R. A.; SOLA C.; VAN SOOLINGEN D.; VINCENT V. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 5, n. 3, p. 216–219, mar 2001.

DALLA COSTA, E. R.; RIBEIRO, M. O.; SILVA, M. S. N.; ARNOLD, L. S.; ROSTIROLLA, D. C.; CAFRUNE, P. I.; ESPINOZA, R. C.; PALACI, M.; TELLES, M. A.; RITACCO, V.; SUFFYS, P. N.; LOPES, M. L.; CAMPELO, C. L.; MIRANDA, S. S.; KREMER, K.; SILVA, P. E. A.; FONSECA, L. S.; HO, J. L.; KRITSKI, A. L.; ROSSETTI, M. L. R. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and *in vitro* susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. **BMC Microbiol.**, v. 9, n. 39, 11 p., fev 2009.

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

DAS, S.; NARAYANAN, S.; HARI, L.; MOHAN. N. S.; SOMASUNDARAM, S.; SELVAKUMAR, N.; NARAYANAN, P. R. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction length polymorphism analysis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 8, n. 2, p. 267-270, 2004.

DAVID, S.; PORTUGAL, C.; ANTUNES, A.; CARDOSO, A.; CALADO, A.; BARROS, V.; SANCHO, L. Identificação molecular pelo método de *Spoligotyping* de estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no Hospital Fernando Fonseca. **Rev Port Pneumol**, v. 10, n. 3, p. 193-200, 2004.

DAVID, S.; RIBEIRO, D. R.; ANTUNES, A.; PORTUGAL, C.; SANCHO, L.; DE SOUSA, J. G. Contribution of Spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. **Infect Genet Evol**, v. 7, n. 5, p. 609-617, mai 2007.

DE GHELDRE, Y.; MAES, N.; ROST, F.; DE RYCK, R.; CLEVENBERGH, P.; VINCENT, J. L. Molecular Epidemiology of an Outbreak of Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Infections and In Vivo Emergence of Imipenem Resistance. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 1, p. 152-160, jan. 1997.

DE JONG, B. C.; ANTONIO, M.; AWINE, T.; OGUNGBEMI, K.; DE JONG, Y. P.; GAGNEUX, S.; DERIEMER, K.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N.; BORG DORFF, M.; HILL, P. C.; ADEGBOLA, R. A. Use of Spoligotyping and Large Sequence Polymorphisms to study the population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in a cohort study of consecutive smear-positive tuberculosis cases in the Gambia. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 994-1001, abr 2009.

DE SOUSA, M. S. **Diagnóstico e Diversidade Molecular de Micobactérias no Estado do Pará**. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Pará. Belém, 2003. 130 p.

DIAZ, R.; GOMEZ, R. I.; RESTREPO, E.; RUMBAUT, R.; SEVY-COURT, J.; VALDIVIA, J. A.; van SOOLINGEN, D. Transmission of tuberculosis in Havana, Cuba: a molecular epidemiological study by IS6110 restriction fragment length polymorphism typing. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 437-443, mai. 2001.

DIGUIMBAYE, C.; HILTY, M.; NGANDOLO, R.; MAHAMAT, H. H.; PFYFFER, G. E.; BAGGI, F.; TANNER, M.; SCHELLING, E.; ZINSSTAG, J. Molecular characterization and drug resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Chad. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 4, p. 1575-1577, abr 2006.

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

DOS SANTOS, C. B.; HINO, P.; DA CUNHA, T. N.; SCATENA VILLA, T. C.; MUNIZ, J. N. Utilização de um Sistema de Informação Geográfica para descrição dos casos de tuberculose. **Bol Pneumol Sanit**, v. 12, n. 1, p. 5-10, 2004.

DRISCOLL, J. F. Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: GAUGANT, D. A. **Molecular epidemiology of microorganisms**. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. v. 551, cap. 10. Nova Iorque: Humana Press, 2009. p. 117-128.

DUCATI, R. G.; BASSO, L. S.; SANTOS, D. S. Micobactérias. In: TRABULSI, Luiz R.; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 4. Ed. São Paulo: Atheneu, 2004. P. 409-413.

DURMAZ, R.; ZOZIO, T.; GUNAL, S.; YAMAN, A.; CAVUSOGLU, C., GUNNEY, C.; SOLA, C.; RASTOGI, N. Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from different regions of Turkey. **Infect Genet Evol**, v. 7, p. 513-519, 2007.

DOUSTDAR, F.; KHOSRAVI, Z. D.; FARNIA, P. *Mycobacterium tuberculosis* genotypic diversity in pyrazinamide-resistant isolates of Iran. **Microb Drug Resist**, v. 15, n. 4, p. 251-256, 2009.

EASTERBROOK, P. J.; GIBSON, A.; MURAD, S.; LAMPRECHT, D.; IVES, N.; FERGUSON, A.; LOWE, O.; MASON, P.; NDUDZO, A.; TAZIWA, A.; MAKOMBE, R.; MBENGERANWA, L.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; DROBNIEWSKI, F. High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study. **J Clin Microbiol**, v.42, n. 10, p. 4536-4544, out 2004.

ECA – European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. Beijing/W Genotype *Mycobacterium tuberculosis* and Drug Resistance. **Emerg Infect Dis.**, V. 12, N. 5, p. 736-743, mai 2006.

EISENACH K. D. et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Dis**, v. 161, n. 5, p. 977-981, mai. 1990.

ELDHOLM, V.; MATEE, M.; MFINANGA, S. G. M.; HEUN, M.; DAHLE, U. R. A first insight into genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Dar es Salaam, Tanzania, assessed by Spoligotyping. **BMC Microbiol**, v. 6, n. 76, 2006.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature.** Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire – France. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr>>. Acesso em: 03 jan 2010.

FANDINHO, F. C. O.; KRITSKI, A. L.; HOFER, C.; CONDE JÚNIOR, H.; FERREIRA, R. M. C.; SILVA, M. G.; FONSECA, L. S. Drug Resistance Patterns among Hospitalized Tuberculous Patients in Rio de Janeiro, Brazil, 1993-1994, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 543-547, jul – Ago, 1999.

FANDINHO, F. C. O.; KRITSKI, A. L.; HOFER, C.; CONDE JÚNIOR, H.; FERREIRA, R. M. C.; SAAD, M. H. F.; SILVA, M. G.; RILEY, L. W.; FONSECA, L. S. RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Trans Royal Trop Med Hyg**, v. 94, p. 271-275, 2000.

FANG, Z., C. DOIG, D. T. KENNA, N. SMITTIPAT, P. PALITTAPONGARNPIM, B. WATT, AND K. J. FORBES. IS6110-mediated deletions of wild-type chromosomes of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Bacteriol**, **181**:1014–1020. 1999.

FARNIA, P.; MASJEDI, M. R.; MIRSAEIDI, M.; MOHAMMADI, F.; JALLALEDIN-GHANA VI; VINCENT, V.; BAHADORI, M.; VELAYATI, A. A. Prevalence of Haarlem I and Beijing types of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Iranian and Afghan MDR-TB patients. **J Infect**, v. 53, n. 5, p. 331-62, nov 2006

FERDINAND, S.; SOLA, C.; VERDOL, B.; LEGRAND, E.; GOH, K. S.; BERCHEL, M.; AUBÉRY, A.; TIMOTHÉE, M.; JOSEPH, P.; PAPE, J. W.; RASTOGI, N. Molecular characterization and drug resistance patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in an AIDS Counseling Center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-Year Study. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 694-702, fev 2003.

FIGUEIREDO, D. L.; HAZEU, M. **Migração e tráfico de seres humanos para Suriname e Holanda**. Relatórios. 18 p., 2006. Disponível em: <http://www.faor.org.br/CD/download/4_trafico_seres_humanos.pdf>. Acesso em 05 fev 2010.

FILLIOL, I.; MOTIWALA, A. S.; CAVATORE, M.; QI, W.; HAZBÓN, M. H.; DEL VALLE, M. B.; FYFE, J.; GARCÍA-GARCÍA, L.; RASTOGI, N.; SOLA, C.; ZOZIO, T.; GUERRERO, M. I.; LEÓN, C. I.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S.; EISENACH, K. D.; DURMAZ, R.; JOLOBA, M. L.; RENDÓN, A.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; PONCE DE LEÓN, A.; CAVE, M. D.; FLEISCHMANN, R.; WHITTAM, T. S.; ALLAND, D. Global Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis: Insights into Tuberculosis Evolution, Phylogenetic Accuracy of Other DNA Fingerprinting Systems, and Recommendations for a Minimal Standard SNP Set. **J Bacteriol**, v. 188, n. 2, p. 759-772, jan 2006.

FILLIOL, I.; SOLA, C.; RASTOGI, N. Detection of a previously unamplified spacer within the DR locus of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiological implication. **J Clin Microbiol**, 38:1231-1234. 2000.

FLETCHER, H. A.; DONOGHUE, H. D.; TAYLOR, G. M.; van der ZANDEN, A. G. M.; SPIGELMAN, M. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from a family of 18th century Hungarians. **Microbiology**, v. 149, p. 143-151, 2003.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **Am J Epidemiol**, v. 153, n. 12, p. 1135-1141, jun. 2001.

FRIEDMAN, C. R.; STOECKLE, M. Y.; JOHNSON, W. D.; RILEY, L. W. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *M. tuberculosis* clinical isolates. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 1383-1384, 1995.

FURLANETO I. P.; SOUSA, E. B.; BRITO, M. L.; LIMA, G. L. F.; LOPES, M. L.; SILVA, S. H. M.; LIMA, K. V. B. Avaliação de diferentes procedimentos para extração de DNA a partir de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen. **Cad Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 401-414, 2007.

GAZOULI, M.; IKONOMOPOULOS, J.; KOUNDOURAKIS, A.; BARTOS, M.; PAVLIK, I.; OVERDUIN, P.; KREMER, K.; GORGOLIS, V.; KITTAS, C. Characterization of

Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates from Greek Patients with Sarcoidosis by Spoligotyping. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 9, p. 4858-4861, set 2005.

GOH, K. S.; RASTOGI, N.; BERCHEL, M.; HUARD, R. C.; SOLA, C. Molecular Evolutionary History of Tubercle Bacilli Assessed by Study of the Polymorphic Nucleotide within the Nitrate Reductase (*narGHJI*) Operon Promoter. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, p. 4010–4014, ago 2005.

GOMES, H. M. **Identificação molecular de cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e detecção de resistência a antibióticos.** Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006. 176 p.

GORI, A.; ESPOSTI, A. D.; BANDERA, A.; MEZZETTI, M.; SOLA, C.; MARCHETTI, G.; FERRARIO, G.; SALERNO, F.; GOYAL, M.; DIAZ, R.; GAZZOLA, L.; CODECASA, L.; PENATI, V.; RASTOGI, N.; MORONI, M.; FRANZETTI, F. Comparison between *Spoligotyping* and IS6110 restriction fragment length polymorphisms in molecular genotyping analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Mol and Cell Prob**, v. 19, n. 4, p. 236-44, 2005a.

GORI, A.; BANDERA, A.; MARCHETTI, J.; ESPOSTI, A. D.; CATOZZI, L.; NARDI, G. P.; GAZZOLA, L.; FERRARIO, G.; van EMBDEN, J. D. A.; van SOOLINGEN, D.; MORONI, M.; FRANZETTI, F. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 8, p. 1242-1248, ago 2005b.

GOUGET de la SALMONIÈRE, Y-O.; LI, Ho M.; TORREA, G.; BUNSCHOTEN, A.; van EMBDEN, J.; GICQUEL, B. Evaluation of Spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 9, p. 2210-2214, set. 1997.

GOYAL, M.; SHAW, R. J.; BANERJEE, D. K.; COKER, R. J.; ROBERTSON, B. D.; YOUNG, D. B. Rapid detection of multidrugresistant tuberculosis. **Eur Respir J**, v. 10, n. 5, p. 1120–1124, 1997a.

GOYAL, M.; SAUNDERS, N. A.; van EMBDEN, J. D.; YOUNG, D. B.; SHAW, R. J. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism. **J Clin Microbiol**, v. 35, p. 647-651, 1997b.

GOYAL, M.; LAWN, S.; AFFUL, B.; ACHEAMPONG, J. W.; GRIFFIN, G.; SHAW, R. Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. **J Infect**, v. 38, n. 3, p. 171-175, mai 1999.

GROENEN, P. M. A.; BUNSCHOTEN, A. E.; van SOOLINGEN, D.; van EMBDEN, J. D. A. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Mol Microbiol**, v. 10, p. 1057–1065, 1993.

GROENEN, P. M. A.; BUNSCHOTEN, A. E.; van SOOLINGEN, D.; van EMBDEN, J. D. A. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Mol Microbiol**. v. 10, n. 5, p. 1057-1065, 1993.10:1057–1065. 1993.

GUERNIER, V.; SOLA, C.; BRUDEY, K.; GUÉGAN, J-F.; RASTOGI, N. Use of a cluster-graphs from Spoligotyping data to study genotype similarities and a comparison of three indices to quantify recent tuberculosis transmission among culture positive cases in French Guiana during a eight year period. **BMC Infect. Dis.**, v. 8, n. 46, abr 2008.

GUTIERREZ, M. C., J. C. GALAN, J. BLAZQUEZ, E. BOUVET, AND V. VINCENT. 1999. Molecular markers demonstrate that the first described multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* outbreak was due to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 971–975, 1999.

HAAS, W. H.; ENGELMANN, G.; AMTHOR, B.; SHYAMBA, S.; MUGALA, F.; FELTEN, M.; RABBOW, M.; LEICHSENRING, M.; OOSTHUIZEN, O. J.; BREMER, H. J.. Transmission dynamics of tuberculosis in a high-incidence country: prospective analysis by PCR DNA fingerprinting. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 3975–3979, 1999.

HAASE, I.; OLSON, S.; BEHR, M. A.; WANYEKI, I.; THIBERT, L.; SCOTT, A.; ZWERLING, A.; ROSS, N.; BRASSARD, P.; MENZIES, D.; SCHWARTZMAN, K. Use of geographic and genotyping tools to characterize tuberculosis transmission in Montreal. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 11, n. 6, p. 632–638, 2007.

HADDAD, M. B.; DIEM, L. A.; COWAN, L. S.; CAVE, M. D.; BETTRIDGE, J.; YUN, L.s; WINKLER, C. S.; INGMAN, D. D.; OELIG, T. V.; LYNCH, A.; MONTERO, J. T.; McCOMBS, S. B. Tuberculosis genotyping in six low-incidence states, 2000-2003. **Am J Prev Med**, v. 32, n. 3, p. 239-243, 2006.

HAYWARD, A. C.; WATSON, J. M. Typing mycobacteria using Spoligotyping. **Thorax**, v. 53, p. 329-330, 1998.

HERMANS, P. W. M.; van SOOLINGEN, D.; BIK, E. M.; de HASS, P. E. W.; DALE, J. W.; van EMBDEN, J. D. A. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Infect Immun**, v. 59, n. 8, p. 2695-2705, Ago. 1991.

HEYDERMAN, R. S.; GOYAL, M.; ROBERTS, P.; USHEWOKUNZE, S.; ZIZHOU, S.; MARSHALL, B. G.; MAKOMBE, R.; van EMBDEN, J. D. A.; MASON, P. R.; SHAW, R. J. Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by Spoligotyping. **Thorax**, v. 53, n. 5, p. 346-350, 1998.

HIJJAR, M. A; OLIVEIRA, M. J. P. R.; TEIXEIRA, G. M. A tuberculose no Brasil e no mundo. **Bol Pneumol Sanit**. V. 9, n. 2, p. 9-16, jul-dez, 2001.

HINO, P. **Distribuição espacial dos casos de tuberculose no município de Ribeirão Preto, nos anos de 1998 a 2002**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto. 2004. 96 p

HOLMES, C. B.; HAUSLER, H.; NUNNN, P. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 2, n. 2, p. 96-104, 1998.

HOUBEN, R. M. G. J.; GLYNN, J. R. A systematic review and meta-analysis of molecular epidemiological studies of tuberculosis: development of a new tool to AID interpretation. **Trop Med Intl Health**, v. 14, n. 8, p. 892-909, ago 2009.

HINO, P.; SANTOS, VILLA, T. C. S.; CUNHA, T. N.; C. B. dos. Distribuição espacial de doenças endêmicas no município de Ribeirão Preto, São Paulo. **Ciência & Saúde Coletiva**, 2007. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/cienciasaudecoletiva/artigos/artigo_int.php?id_artigo=1959>. Acesso em: 01 mar. 2009.

HINO, P.; VILLA, T. C. S.; SASSAKI, C. M. S.; NOGUEIRA, J. A.; SANTOS, C. B. Geoprocessing in health area. **Rev Lat Am Enferm**, Ribeirão Preto, v.14, n.6, p. 939-943, dez. 2006.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: na application of Simpson's index of diversity. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, Nov 1988.

IBGE. **Estimativas das populações residentes, em 1 de julho de 2008, segundo os municípios**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2008/estimativa.shtm>>. Acesso em 02 jan 2010. 2010a.

IBGE. Banco de Dados Agregados. SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática. Tabela 156. **Média de moradores por domicílio**. Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em 12 03 2010. 2010b.

IBGE. Banco de Dados Agregados. SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática. Tabela 202. **População Residente por sexo e situação de domicílio**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em 12 03 2010. 2010c.

IGNATOVA, A.; DUBILEY, S.; STEPANSHINA, V.; SHEMYAKIN, I. Predominance of multi-drug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. **J Med Microbiol**, v. 55, p. 1413-1418, 2006.

JIMÉNEZ-CORONA, M. E.; GARCÍA-GARCÍA, L.; DERIEMER, K.; FERREYRA-REYES, L.; BOBADILLA-DEL-VALLE, M.; CANO-ARELLANO, B.; CANIZALES-QUINTERO, S.; MARTÍNEZ-GAMBOA, A.; SMALL, P. M.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; PONCE-DE-LEÓN, A. Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. **Thorax**, v. 61, p. 348-353, 2006

JOU, Ruwen; CHEN, Huang-Yau; CHIANG, Chen-Yuan; YU, Ming-Chih; SU, Ih-Jen. Genetic diversity of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates and identification of 11 Novel *rpoB* alleles in Taiwan. **J Clin Microbiol**, p. 1390–1394, mar. 2005.

KATO-MAEDA, M.; SMALL, P. M. How molecular epidemiology has changed what we know about tuberculosis. **West J Med**, v. 172, p. 256–259, 2000.

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

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W. C.. **Diagnóstico microbiológico**: Texto e atlas colorido. 5. Ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. P. 913-916.

KREMER, K., van SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTIN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; van EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **J Clin Microbiol**, V. 37, p.2607–2618, 1999.

LAN, N. T. N.; LIEN, H. T. K.; TUNG, L. B.; BORGDORFF, M. W.; KREMER, .; van SOOLINGEN, D. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 12, p. 1633-1635, 2003.

LAPA, T. M.; ALBUQUERQUE, M. de F. P. M. de; CARVALHO, M. S.; SILVEIRA JÚNIOR, J. C. Análise da demanda de casos de hanseníase aos serviços de saúde através do uso de técnicas de análise espacial. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 12, p. 2575-2580, dez. 2006.

LAPA E SILVA, J. R.; NOBOA, R. F. B.; BARBOSA, C. B.; LAZZARINI, L. C.; BOECHAT, N. L. F.; LEUNG, J. A. M.; SUFFYS, P. N.; KRITSKI, A. L. Recidiva de tuberculose em pacientes infectados por diferentes famílias de *M. tuberculosis* e viragem tuberculínica em seus contactantes. **J Bras Pneumol**, n. 34, supl. 1R: R52, 2008. Disponível em: <http://www.jornaldepneumologia.com.br/PDF/suplemento_tuberculose.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2009.

LEÃO, S. C.; PORTAELS, F. History. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Cap. 2, p. 25-52. Disponível em: <<http://www.tuberculosistextbook.com>>. Acesso em: 28 nov. 2008.

LEGRAND, E., I. FILLIOL, C. SOLA, AND N. RASTOGI. 2001. Use of spoligotyping to study the evolution of the direct repeat locus by IS6110 transposition in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** 39:1595–1599.

LIMA, K. V. B. **Epidemiologia molecular da tuberculose resistente à rifampicina**. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Pará. Belém, 2005. 99 p.

LIMA, K. V. B.; CONCEIÇÃO, E. C.; SOUSA, M. S.; COSTA, A. R. F.; FURLANETO, I. P.; LOPES, M. L. **Caracterização genética do *Mycobacterium tuberculosis* no Pará por Spoligotyping**. In: IV Encontro Nacional de Tuberculose. I Fórum da Parceria Brasileira contra a Tuberculose, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.sbpt.org.br>>.

LIPIN, M. Y.; STEPANSHINA, V. N.; SHEMYAKIN, I. G.; SHINNICK, T. M. Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, p. 620-626; 2007.

LONGO, M. C.; BERNINGER, M. S.; HARTLEY, J. L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over conatmination in polymerase chain reactions. **Gene**, v. 93, n. 1, p. 125-128, set 1990.

MACENTE, S.; RIBEIRO, F. H. M. Diagnóstico molecular de *M. tuberculosis*: uma revisão de técnicas. **Rer Saúde e Pesq**, v. 2, n. 2, p. 225 -231, mai/ago, 2009.

MALASPINA, A. C.; CAVALCANTI, H. R.; LEITE, C. Q. F.; MACHADO, S. M. A.; VIANA, B. H. J.; SILVA, R. M. G.; HAGE, E. F.; FIGUEIREDO, W. M.; MARQUES, E.; FERRAZOLI, L.; ARBEX, M.; LESSI, M.; FONSECA, L. S.; RIGOUTS, L.; SAAD, M. H. F. Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* molecular typing in tuberculosis low-endemic agro-industrial setting of Brazil. **Jpn J Infect Dis**, v. 61, p. 231-233, 2008.

MANCILLA, E. M.; MARTÍNEZ, H. A.; PALAVECINO, B. C.; REHREN, S. G.; LUCERO, L. P.; LEÓN, R. G.; ZÁRRAGA, O. A-M. Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la Xª Región de Chile. **Rev Chil Infect**, v. 23, n. 3, p. 220-225, 2006.

MARDASSI, H.; NAMOUCHI, A.; HALTITI, R.; ZARROUK, M.; MHENNI, B.; KARBOUL, A.; KHABOUCHE, N.; GEY van PITTIUS, N. C.; STREICHER, E. M.; RAUZIER, J.; GICQUEL, B.; DELLAGI, K.. Tuberculosis due to resistant Haarlem strain, Tunisia. **Emerg Infect Dis**, v. 11, p. 957-961, 2005

MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. **Micorbiol Mol Biol Rews**, v. 62, n. 3, p.725-774, set 1998.

MARAIS, B. J.; VICTOR, T. C.; HESSELING, A. C.; BARNARD, M.; JORDAAN, A.; BRITTLE, W.; REUTER, H.; BEYERS, N.; van HELDEN, P.; WARREN, R. M.; SCHAAF, H. S. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the western Cape Province of South Africa. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 10, p. 3539-3543, out 2006.

MARCHETTI, G.; GORI, A.; Catozzi, L.; VAGO, L.; NEBULONI, M.; ROSSI, M. C.; ESPOSTI, A. D.; BANDERA, A.; FRANZETTI, F. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assays. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 6, p. 1512-1517, jun. 1998.

MATHEMA, B.; KUREPINA, N. E.; BIFANI, P. J.; KREISWIRTH, B. N. Molecular epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 4, p. 658-685, out. 2006.

MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A-L.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYRENC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **PNAS**, v. 98, n. 4, p. 1901-1906, fev. 2001.

McEVOY, C. R.; FALMER, A. A.; GEY van PITTIUS, N. C.; VICTOR, T. C.; van HELDEN, P. D.; WARREN, R. M. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 87, n. 5, p. 393-404, set 2007.

MENDES, J. M.; FONSECA, L. S.; LOURENÇO, M. C.; FERREIRA, R. M. C.; SAAD, M. H. F. Um estudo retrospectivo dos aspectos epidemiológicos da tuberculose na comunidade do Complexo de Manguinhos localizado em área urbana do Rio de Janeiro, Brasil, 2000-2002. **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 4, p. 443-447, 2007a.

MENDES, J.; LOURENÇO, M. C.; FERREIRA, R. M. C.; FONSECA, L. de S.; SAAD, M. H. F. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from sputum samples from symptomatic outpatients: Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 5, p. 579-82, 2007b.

MENDES, J. M.; MACHADO, S. M. A.; LOURENÇO, M. C.; FERREIRA, R. M. C.; FONSECA, L. S.; SAAD, M. H. F. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in a slum area of Rio de Janeiro, Brazil. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 12, p. 1063-1068, dez 2008.

MENEZES, E. A.; ALVES, T. S.; NASCIMENTO, K. M.; SOARES, K. P.; AMORIM, L. N.; MELO, T. S.; RIBEIRO, S. R. L.; CUNHA, F. A. Incidência de tuberculose pulmonary bacilífera no município de Umirim – Ceará, no ano de 2001. **NewsLab**, ed. 74, p. 82-90, 2006. Disponível em: < http://www.newslab.com.br/newslab/ed_antteriores/74/art04.pdf >

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.15, n. 4, out./dez. 2001.

Migration Policy Institute. MPI Data Hub. **Migration facts, stats and maps. Brazil**. Disponível em: < <http://www.migrationinformation.org/datahub/countrydata.cfm?ID=427> >. Acesso em 01 mar 2010.

MILLER, A. C.; SHARNPRAPAI, S.; SURUKI, R.; CORKREN, E; NARDELL, E. A.; DRISCOLL, J. R.; McGARRY, M.; TABER, H.; ETKIND, S. Impact f genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* on Public Health practice in Massachusetts. **Emerg Infect Dis** v. 8, n. 11, p. 1285-1289, nov. 2002.

MOSTRÖM, P.; GORDON, M.; SOLA, C.; RIDELL, M.; RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. **Clin Microbiol and Infect**, v. 8, n. 11, p. 694-704, nov. 2002.

MOURA, R.; HAZEU, M. Exclusão empurra mulheres e jovens para a prostituição e fomenta o trabalho doméstico infantil. In: **Observatório da cidadania – Pará. 2 – Políticas públicas e controle social**. Belém: Fórum da Amazônia Oriental, 2003. Cap. 5 (Da infância à juventude – a negação dos direitos atravessando a vida), p. 107-120. Disponível em: < <http://www.fao.org/obs0102.html> >. Acesso em 15 fev 2010.

MURRAY, M. Sampling bias in the molecular epidemiology of tuberculosis. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 4, p. 363-369, abr 2002a.

MURRAY, M. Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis. **PNAS**, v. 99, n. 3, p. 1538-1543, 2002b.

MURRAY, M.; NARDELL, E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 80, n. 6, p. 477-482, 2002.

NAMOUCHE, A.; KARBOUL, A.; MHENNI, B.; KHABOUCHE, N.; HALTITI, R.; BEN HASSINE, R.; LOUZIR, B.; CHABBOU, A.; MARDASSI, H. Genetic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* in Tunisia: predominance and evidence for the establishment of a few genotypes. **J Med Microbiol**, v. 57, p. 864-872, 2008.

NARAYANAN, S. Molecular epidemiology of tuberculosis. **Indian J Med Res**, v. 120, p. 233-247, out. 2004.

NATAL, S. A retomada da importância da tuberculose como prioridade para ações de saúde pública. **Bol Pneumol Sanit**, n. 6, p. 35-52, 1998.

NICOL, M. P.; WILKINSON, R. J.; The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Transac Royal Soc Trop Med Hyg**, v. 102, p. 955-965, mar 2008.

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 2, p. 409-412, 1999.

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S.; SCHLAAK, M.; GREINERT, U. Double infection with a resistant and a multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Em Infect Dis*, v. 6, n. 5, p.548-551, set/out 2000.

OIM. Organização Internacional para Migração. **The migration agency. Brazil. Facts and figures**. Migration issues. Disponível em: < <http://www.iom.int/jahia/Jahia/activities/americas/southern-cone/brazil>>. Acesso em 01 mar 2010.

OMS. WHO Report 2008. **Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing**. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/ver/poli.html>. Acesso em: 02 fev. 2010. WHO/HTM/TB/2008.393

OMS. **Tuberculosis**: the global burden. 2009a. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/tb_global_facts_sep05.en.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2009.

OMS. WHO Report 2009. 2009b. **Global Tuberculosis Control. A short update to the 2009 report**. Disponível em: < http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/ver/poli.html>. Acesso em: 01 fev. 2010. WHO/HTM/TB/2009.426.

OMS. Division of Communicable Disease Control. Regional Office of Eastern Mediterranean. **TB anywhere is TB everywhere**. A world free of tuberculosis is a everybody's responsibility. World TB Day 2007. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/stb/media/pdf/wtbd07brochure.pdf>>. Acesso em 15 fev 2010.

PANDOLFI, J. R.; MALASPINA, A. C.; SANTOS, A. C. B.; SUFFYS, P. N.; OELLEMANN, M. A. C.; VALENTINI, S. R.; LEITE, C. Q. F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Rev de Ciência Farm Bas e Aplic**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2007.

PARWATI, I.; van CREVEL, R.; van SOOLINGEN, D.; van der ZANDEN. Application of *Spoligotyping* to noncultured *Mycobacterium tuberculosis* bacteria requires an optimized approach. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 5350-51, set 2003.

PAVLIC, M.; ALLERBERGER, F.; DIERICH, M. P.; PRODINGER, W. M.; Simultaneous infection with two drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains in a immunocompetent host. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 4156-4157, 1999.

PINHO, M. S. L. Pesquisa em biologia molecular: como fazer? **Rev Bras. Coloproct**, v. 26, n. 3, p. 331-336, 2006.

POLJAK, M.; SEME, K.; GALE, N. Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences. **Pflügers Arch Eur J Physiol**, v. 439, n. 7, p. R042-R044, jan. 2000.

POSSUELO, L. G.; ZAHA, A.; CAFRONE, P. I.; RIBEIRO, A. W.; RIBEIRO, M. O.; JARCZEWSKI, C. A.; ROSSETTI, M. L. R. Estudo prospectivo da aplicação da técnica de *Spoligotyping* diretamente em amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose. **J Bras. Pneumol.**, n. 34, supl. 1R: R49, 2008. Disponível em: <http://www.jornaldepneumologia.com.br/PDF/suplemento_tuberculose.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2009.

POULET, S.; COLE, S. T. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. **Arch of Microbiol.**, v. 163, n. 2, p. 87-95, fev. 1995.

QIAN, L.; van EMBDEN, J. D. A.; van DER ZANDEN, A. G. M.; WELTEVREDEN, E. F.; DUANMU, H.; DOUGLAS, J. T. Retrospective Analysis of the Beijing Family of *Mycobacterium tuberculosis* in Preserved Lung Tissues. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 2, p. 471-474, fev 1999.

RADHAKRISHNAN, I.; K, M. Y.; KUMAR, R. A.; MUNDAYOOR, S. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 1683, 2001.

RAHIM, Z.; ZAMAN, K.; van DER ZANDEN, A. G. M.; MÖLLERS, M. J.; van SOOLINGEN, D.; RAQIB, R.; ZAMAN, K.; BEGUM, V.; RIGOUTS, L.; PORTAELS, F.; RASTOGI, N.; SOLA, C. Assessment of Population Structure and Major Circulating Phylogeographical Clades of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Bangladesh Suggests a High Prevalence of a Specific Subclade of Ancient *M. tuberculosis* Genotypes. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 11, p. 3791-3794, Nov 2007.

RASTOGI, N.; SOLA, C. Molecular evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007** – From basic science to patient care. Cap. 2, p. 53-91. Disponível em: <<http://www.tuberculosis-textbook.com>>. Acesso em: 2 fev 2009.

REDE TB. **A história da tuberculose**. Disponível em:<<http://www.redetb.org/a-historia-da-tuberculose>>.

RICHARDSON, M.; CARROLL, N. M.; ENGELKE, E.; van der SPUIY, G. D.; SALKER, F.; MUNCH, Z.; GIE, R. P.; WARREN, R. M.; BEYERS, N.; van HELDEN, P. D. Multiple *Mycobacterium tuberculosis* strains in early cultures from patients in a high-incidence community setting. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 8, p. 2750-2754, ago 2002.

RITACCO, V.; DI LONARDO, M.; RENIERO, A.; AMBROGGI, M.; BARRERA, L.; DAMBROSI, A.; LOPEZ, B.; ISOLA, N.; DE KANTOR I. N. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. **J Infect Dis**, v. 176, p. 637-642, 1997.

RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; CAFRUNE, P. I.; FERRAZOLI, L.; SUFFYS, P. N.; CANDIA, N.; VÁSQUEZ, L.; REALPE, T.; FERNÁNDEZ, J.; LIMA, K. V.; ZURITA, J.; ROBLEDO, J.; ROSSETTI, M. L.; KRITSKI, A. L.; TELLES, M. A.; PALOMINO, J. C.; HEERSMA, H.; van SOOLINGEN, D.; KREMER, K.; BARRERA, L. *Mycobacterium tuberculosis* strains

of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 489-492, ago 2008.

RODRIGUES, A. G.; FONSECA, L. A.; AGUIAR, G. **Caracterização da população portadora de tuberculose na unidade de saúde do Jurunas (Belém-Pa) no período de janeiro a dezembro de 2006**. Disponível em: <http://www.wgate.com.br/conteudo/medicinaesaude/fisioterapia/spoligo/tuberculose_leticia.htm>.

RODRIGUES, L.; BARRETO, M.; KRAMER, M.; BARATA, R. de C. B.. Resposta brasileira à tuberculose: contexto, desafios e perspectivas. Editorial. **Rev Saúde Pública**, v. 41, n. 1, p. 1-2, 2007.

ROSS, B. C.; RAIOS, K.; JACKSON, K.; DWYER, B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 942-946, 1992.

SANTO, H. M. S.; BASAGNI, N. S.; CANETTIERI, A. C. V.; KHOURI, S. **Pesquisa do gênero *Mycobacterium* em amostras de secreções de vias aéreas de origem hospitalar**. In: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2009.

SANTOS, A. C. B.; CUNHA, E. A. T.; MENDES, N. H.; MAIS, R.; MALASPINA, A. C.; PANDOLFI, J. R. C.; LEITE, C. Q. F. **Avaliação epidemiológica molecular utilizando a técnica de spoligotyping em isolados de pacientes provenientes estado do Mato Grosso do Sul (MS)**. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. Caderno de Resumos. Resumo ID:1148-1. Disponível em:< <http://sbmicrobiologia.org.br/PDF/cdsbm/resumos/R1148-1.html>>. Acesso em: 10 fev 2010.

SANTOS, L. C.; KIPNIS, A. P. J.; KIPNIS, A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev Patol Trop**, v. 36, n. 1, p. 1-15, jan/abr 2007.

SCHOLANTE SILVA, A. B.; VON GROLL, A.; FÉLIX, C.; CONCEIÇÃO, F. R.; SPIES, F. S.; SCAINI, C. J.; ROSSETTI, M. L.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; DA SILVA, P. E. A. Clonal diversity of *M. tuberculosis* isolated in a sea port city in Brazil. **Tuberculosis**, v. 89, n. 6, p. 443-447, mai 2009.

SCOTT, A. N.; MENZIES, D.; TANNENBAUM, T. N.; THIBERT, L.; KOZAK, R.; JOSEPH, L.; SCHWARTZMAN, K.; BEHR, M. A. Sensitivities and specificities of Spoligotyping and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 89-94, jan. 2005.

SEQUERA, C. M.; DELGADO, S. V.; ARAQUE, M. W.; TORREALBA, O. M.; NÚÑEZ, M. R.; DA MATA, J. O.; ABADIA, P. E.; TAKIFF, H.; DE WAARD, J. *Mycobacterium tuberculosis*: Espoligotipos en el Estado Carabobo, Venezuela. **Rev Chil Infect**, v. 25, n. 5, p. 362-367, 2008.

SEVERO, N.P.F.; LEITE, C.Q.F. Caracterização da população portadora de tuberculose do município de Américo Brasiliense/SP, no período de 1992 a 2002. **Rev Ciência Farm Bas Apl**, v. 26, n. 1, p. 83-86, 2005.

SHAMPUTA, I. C.; JUGHELI, L.; SADRADZE, N.; WILLERY, E.; PORTAELS, F.; SUPPLY, P.; RIGOUTS, L. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. **Resp Res**, v. 7, n. 99, jul 2006.

SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K. E.; CONNELL, N. D.; KREISWIRTH, B. N.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, p. 9869–9874, set 1997

SINGH, U. B.; SURESH, N.; BHANU, N. V.; ARORA, J.; PANT, H.; SINHA, S.; AGGARWAL, R. C.; SINGH, S.; PANDE, J. N.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; SETH, P. Predominant Tuberculosis Spoligotypes, Delhi, India. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 6, p. 1138-1142, jun 2004

SINGH, U. B.; ARORA, J.; SURESH, N.; PANT, H.; RANA, T.; SOLA, C.; RASTOGI, N., PANDE, J. N. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in India. **Infect Genet Evol**, v. 7, p. 441-448, 2007.

SITVIT. **The SIVIT Database**. Disponível em: < <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>. Acesso em 30 abr 2010.

SKABA, D. A.; CARVALHO, M. S.; BARCELLOS, C.; MARTINS, P. C.; TERRON, S. L. Geoprocessamento dos dados da saúde: o tratamento dos endereços. **Cad Saúde Pública**, v. 20, n.6, dez 2004.

SMALL, P. M.; MCCLENNY, N. B.; SINGH, S. P.; SCHOOLNIK, G. K.; TOMPKINS, L. S.; MICKELSEN, P. A. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 7, p. 1677-1682, jul. 1993.

SMALL, P. M.; HOPEWELL, P. C.; PAZ, A.; PARSONNET, J.; RUSTON, D. C.; SCHECTER, G. F.; DALEY, C. L.; SCHOOLNIK, G. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco – A population-based study using conventional and molecular methods. **N Engl J Med**, v. 333, n. 24, p. 1703-1709, jun 1994.

SMALL, P.; BEHR, M. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: how can it help the clinician? **Clin Infect Dis**, v. 25, p. 806-810, 1997.

SOLA, C.; DEVALLOIS, A.; HORGEN, L.; MAISETTI, J.; FILLIOL, I.; LEGRAND, E.; RASTOGI, N. Tuberculosis in the Caribbean: using spacer nucleotide typing to understand strain origin and transmission. **Emerg Infect Dis**, v. 5, p. 404-414, 1999.

SOLA, C.; FILLIOL, I.; LEGRAND, E.; MOKROUSOV, I.; RASTOGI, N. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. **J Mol Evol**, v. 53, n. 6, p. 680-689, dez 2001.

SOUSA, E. B.; FURLANETO, I. P.; SANTANA, Z. H. D.; LIMA, G. L. F.; LIMA, K. V. B. Qualidade das baciloscopias de escarro realizadas em oito unidades de saúde no estado do Pará. **Cad Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2007. V. 15, n. 3, p. 417-424.

STAVRUM, R.; MPHAAHLELE, M.; ØVREAS, K; MUTHIVHI, T.; FOURIE, P. B.; WEYER, K.; GREWAL, H. M. S. High diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in South Africa and preponderance of mixed infections among ST53 isolates. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 1848-1856, jun 2009.

STREICHER, E. M.; VICTOR, T. C.; van der SPUY, G.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; van HELDEN, P. D.; WARREN, R. M. Spoligotype Signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 237-240, jan 2007.

SUFFYS P.N.; IVENS DE ARAUJO, M. E.; ROSSETTI, M. L.; ZAHAB, A.; BARROSO, E. W.; BARRETO, A. M.; CAMPOS, E.; van SOOLINGEN, D.; KREMER, K.; HEERSMA, H.; DEGRAVE, W. M Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strain of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. **Res Microbiol**, v. 151, p. 343- 351, 2000.

SURESH, N.; ARORA, N.; PANT, H.; RANA, T.; SINGH, U. B. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from archival Ziehl-Neelsen-stained sputum smears. **J Microbiol Meth**, v. 68, p. 291-295, 2007.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Mol Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 762–771, 2000.

SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; van SOOLINGER, D.; LOCHT, C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 10, p. 3563- 3571, 2001.

TABET, S. R.; GOLDBAUM, G. M.; HOOTON, T. M.; EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; NOLAN, C. M. Restriction Fragment Length Polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. **J Infect Dis**, v. 169, n. 1, p. 189-192, jan 1994.

TANVEER, M.; HASAN, Z.; SIDDIQUI, A. R.; ALI, A.; KANJI, A.; GHEBREMICHEAL, S.; HASAN, R. Genotyping and drug resistance patterns of *M. tuberculosis* strains in Pakistan. **BMC Infect Dis**, v. 8, p. 171, 2008.

THIERRY, D.; BRISSON-NOËL, A.; VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J. L.; GICQUEL, B.; Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Insertion Sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 12, p. 2668-2673, dez 1990.

TINDÓ, H.; CAVALCANTE, S. C.; WERNECK-BARROSO, E. Gender differences in tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 8, n. 3, p. 388-390, 2004.

TRINDADE, R. C. **Tipagem molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes com diagnóstico clínico de tuberculose pulmonar humana na cidade de Aracaju/SE.** Relatório de Projeto de Pesquisa. MS/CNPq/FAP-SE/SES-SE-N 04/2004. Aracaju, 2006. 31 p. Disponível em: < www.fapitec.se.gov.br/modules/wfdownloads/visit.php?cid=11&lid>. Acesso em 3 jan 2010.

van DER ZANDEN, A. G. M.; HOENTJEN, A. H.; HEILMANN, F. G.; WELTEVREDEN, E. F.; SCHOULS, L. M.; van EMBDEN, J. D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. **Mol Pathol**, v. 51, p. 209-214, 1998.

van DER ZANDEN, A. G. M.; TE KOPPELE-VIJE, E. M.; VIJAYA BHANU, N.; van SOOLINGEN, D.; SCHOULS, L. M. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-Stained slides for molecular detection of rifampin resistance and Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 3, p. 1101-1108, mar. 2003.

van EMBDEN, J. D.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENACH, K. D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICH, T. M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J Clin Microbiol**, v. 31, p. 406-409, 1993.

van EMBDEN, J. D. A.; van GORKOM, T.; KREMER, K.; JANSEN, R.; van DER ZEIJST, B. A. M.; SCHOOLS, L. M. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **J Bacteriol**, v. 182, n. 9, p. 2393-2401, mai. 2000.

van RIE, A.; WARREN, R.; RICHARDSON, M.; VICTOR, T. C.; GIE, R. P.; ENARSON, D. A.; BEYERS, N.; van HELDEN, P. D. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. **N Engl J Med**, v. 341, n. 16, p. 1174-1179, out 1999.

van RIE, A.; VICTOR, T. C.; RICHARDSON, M.; JOHNSON, R.; VAN DER spuy, g. d.; Murray, e. j.; beyers, n.; van PITTIUS, N. C. G.; van HELDEN, P.; WARREN, R. M. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 172, p. 636-642, 2005.

van SOOLINGEN, D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. **J Internal Med**, v. 249, p. 1-26, 2001.

van SOOLINGEN, D.; KREMER, K.; HERMANS, P. W. M. Molecular Epidemiology: Breakthrough Achievements and Future Prospects. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Cap. 9, p. 315-339. Disponível em: <<http://www.tuberculosis-textbook.com>>. Acesso em: 5 jan. 2009.

VASCONCELLOS, S. E.; CALDAS, P. C. S.; LEITE, M. L.; GOMES, H. M.; SANTOS, A. R.; BOECHAT, N. L. F.; SUFFYS, P. N. O uso de DNA extraído de lâminas positivas (BAAR+) para identificação molecular dos agentes etiológicos da tuberculose pulmonar. **J Bras. Pneumol.**, n. 34, supl. 1R: R55, 2008. Disponível em: <http://www.jornaldepneumologia.com.br/PDF/suplemento_tuberculose.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2009.

VENTURA, L. C.; GOMES, H. M.; SUFFYS, P. N. **Identifying *Mycobacterium tuberculosis* strain complex using SPOTCLUST based on Spoligotype**. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. Caderno de Resumos. Resumo ID:718-1. Disponível em: <<http://sbmicrobiologia.org.br/PDF/cdsbm/resumos/R718-1.html>>. Acesso em: 10 fev 2010.

VITOL, I.; DRISCOLL, J.; KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B.; BENNETT, K. SpotClust: a tool to cluster spoligotype data for tuberculosis evolution and epidemiology. **Recomb 2005**:

Cambridge, Ma, Disponível em:< <http://cgi2.cs.rpi.edu/~vitoli/Run.html>>. Acesso em 20 fev 2010.

VITOL, I.; DRISCOLL, J.; KREISWIRTH, B.; KUREPINA, N.; BENNETT, K. P. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* Complex strain families using spoligotypes. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 6, p. 491-504, nov 2006.

von GROLL, A.; PRATA, P.; FELIX, C.; HONSCHA, G.; RAMOS, D. F.; MARTIN, A.; PALOMINO, J. C.; DA SILVA, P. E. A. **Genotypic analysis of *M. tuberculosis* strains isolated in the city of Rio Grande, Brazil, performed by Spoligotyping and MIRU-VNTR**. In: 29th Annual Congress of European Society of Mycobacteriology, 2008, Plovdiv, Bulgária. Anais do 29^o Congresso Anual da Sociedade Européia de Micobacteriologia, Plovdiv, Bulgária, 2008, p. 111-112. Disponível em:< **Erro! A referência de hiperlink não é válida.**<http://www.esmycobacteriology.eu/PDF%20files/ESM08.pdf>>.

WARREN, R. M.; HAUMAN, J. ; BEYERS, N. ; RICHARDSON, M. ; SCHAAF, H. S. ; DONALD, P. ; van HELDEN, P. Unexpectedly high strain diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. **South Afr Med Journal**, v. 86, n. 1, p. 45-49, 1996.

WARREN, R.; RICHARDSON, M.; van der SPUY, G.; VICTOR, T.; SAMPSON, S.; BEYERS, N.; van HELDEN, P. DNA fingerprinting and molecular epidemiology of tuberculosis: use and interpretation in an epidemic setting. **Electrophoresis**, v. 20, n. 8, p. 1807–1812, jun 1999.

WARREN, R. M.; STREICHER, E. M.; SAMPSON, S. L.; van der SPUY, G. D.; RICHARDSON, M.; NGUYEN, D.; BEHR, M. A.; VICTOR, T. C.; van HELDEN, P. Microevolution of the Direct Repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of Spoligotyping data. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 12, p. 4457-4465, dez 2002.

WARREN, R. M., VICTOR, T. C.; STREICHER, E. M.; RICHARDSON, M.; BEYERS, N.; GEY van PITTIUS, N. C.; van HELDEN, P. D. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, p. 610–614, 2003.

WARREN, R. M.; VICTOR, E. M.; STREICHER, M.; RICHARDSON, G. D.; van der SPUY, R.; JOHNSON, R.; CHIHOTA, V. N.; LOCHT, C.; SUPPLY, P.; van HELDEN, P. D. Clonal expansion of a globally disseminated lineage of *Mycobacterium tuberculosis* with low IS6110 copy numbers. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 5774-5782, 2004a.

WARREN, R. M.; VICTOR, T. C.; STREICHER, E. M.; RICHARDSON, M.; BEYERS, N.; van PITTIUS, N. C. G.; van HELDEN, P. D. Patients with active tuberculosis often have

different strains in the same sputum specimen. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, p. 610-614, 2004b.

WATANABE, A.; RUFFINO- NETTO, A. O perfil epidemiológico dos casos de tuberculose notificados em hospital terciário. Ribeirão Preto – São Paulo. **Bol Pneumol Sanit**, v.9, n.1, p.19-34, jun, 2001.

YANG, Z. H.; MTONI, I.; CHONDE, M.; MWASEKAGA, M.; FUURSTED, K.; ASKGÅRD, D. S.; BENNEDSEN, J.; DE HAAS, P. E. W.; van SOOLINGEN, D.; van EMBDEN, J. D. A.; ANDERSEN, Å. B. DNA Fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 5, p. 1064-1069, mai 1995

YEH, R. W.; HOPEWELL, P. C.; DALEY, C. L. Simultaneous infection with two strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction fragment length polymorphism analysis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 3, n. 6, p. 537-539, jun 1999.

ZINK, A. R.; SOLA, C.; REISCHL, U.; GRABNER, W.; RASTOGI, N.; WOLF, H.; NERLICH, A. G. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 359-367, jan 2003.

ZINK, A. R.; NERLICH, A. G. Molecular strain identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in archival tissue samples. **J Clin Pathol**, v. 57, p. 1185-1192, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – TERMO DE DOAÇÃO DAS LÂMINAS DE BACILOSCOPIA



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA
SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE
LABORATORIO CENTRAL DO ESTADO

Belém, 14 de outubro de 2008

Ao
Instituto Evandro Chagas
Seção de Bacteriologia e Micologia
Att. Dr^a Karla Valéria Batista Lima

Declaramos para os devidos fins concordância com desenvolvimento dos projetos especificados abaixo, a serem desenvolvidos em parceria com esta renomada Instituição. Diante do exposto encaminhamos as lâminas de baciloscopias de Ziehl-Neelsen realizadas no período de outubro de 2007 a março de 2008, e submetidas ao controle de qualidade externo desenvolvido no Laboratório Central do Pará sob supervisão da Dra. Zelinda Habib Dantas Santana.

Projeto: "ANÁLISE DA QUALIDADE DAS BACILOSCOPIAS REALIZADAS NOS MUNICÍPIOS DE BELÉM E ANANINDEUA (PARÁ) E AVALIAÇÃO DOS CASOS POSITIVOS PARA CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis*".

Pesquisadores responsáveis no LACEN: Zelinda Habib Dantas Santana e Michele Lima de Brito

Pesquisador responsável no IEC: Karla Valéria Batista Lima

Projeto: "DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Mycobacterium tuberculosis* OBTIDOS A PARTIR DE PACIENTES MULTIBACILARES DIAGNOSTICADOS NOS MUNICÍPIOS DE BELÉM E ANANINDEUA, PARÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2007 A MARÇO DE 2008.

Pesquisadores responsáveis no LACEN: Zelinda Habib Dantas Santana e Michele Lima de Brito

Pesquisador responsável no IEC: Karla Valéria Batista Lima

Atenciosamente,

Dr. Kleyffson Alves de Miranda
Diretor do Lacen-Pa

ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO



Parecer de Aprovação nº 0003/2009
 Protocolo CEP/IEC - Nº 0004/2009
 CAAE: 0004.0.072.073-09

Ananindeua/PA, 06 de abril de 2009.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Diversidade genética de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos a partir de pacientes multibacilares diagnosticados nos municípios de Belém e Ananindeua, Pará, Brasil”

Pesquisador Responsável: **ISMARI PERINI FURLANETO**

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**. Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório semestral e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.


 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

