



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

ALYNE MELO PEREIRA

Georreferenciamento e Genotipagem de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia – GO pelo método de MIRU-VNTR

**Goiânia
2012**



**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE)
na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Alyne Melo Pereira		
CPF:	005.953.881-32	E-mail:	alynemelo09@hotmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		☒ Sim	☐ Não
Vínculo Empregatício do autor	Bolsista		
Agência de fomento:	CNPq	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	
CNPJ:			
Título:	Georreferenciamento e Genotipagem de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia-GO pelo método de MIRU-VNTR.		
Palavras-chave:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , MIRU-VNTR, Georreferenciamento, Genotipagem, RFLP-IS6110.		
Título em outra língua:	Georeferencing and genotyping of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains isolated from patients from Goiânia – GO by MIRU-VNTR method		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , MIRU-VNTR, Georeferencing, Genotyping, RFLP-IS6110.		
Área de concentração:	Microbiologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	07/03/2012		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública		
Orientador(a):	Prof. Dr. André Kipnis		
CPF:	075.965.498-02	E-mail:	andre.kipnis@gmail.com
Co-orientador(a):	Ana Paula Junqueira Kipnis		
CPF:	370.146.921-00	E-mail:	apkipnis@gmail.com

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

ALYNE MELO PEREIRA

Georreferenciamento e Genotipagem de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia – GO pelo método de MIRU-VNTR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: André Kipnis

Co-orientadora: Ana Paula Junqueira-Kipnis

**Goiânia
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

P436g Pereira, Alyne Melo.
Georreferenciamento e Genotipagem de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia – GO pelo método de MIRU-VNTR [manuscrito] / Alyne Melo Pereira. - 2012.
xv, 110 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis; Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Anexos.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Genotipagem. 3. Georreferenciamento. 4. Tuberculose – Goiânia (GO). I. Título.

CDU: 616.24-002.5(817.3)

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Alyne Melo Pereira

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis

Membros:

1. André Kipnis

2. Maria Cláudia Dantas P. B. André

3. André Corrêa Amaral

Data:07/03/12

DEDICATÓRIA

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por estar sempre à frente de tudo que sou e tudo que tenho. A Ele dedico todas as minhas conquistas, alegrias, planos e agradecimentos por me amparar nos momentos de fraqueza e de derrotas, não me deixando jamais desistir.

À Nossa Senhora das Graças por interceder por mim em todos os dias de minha vida.

Aos meus amados familiares, meus pais Wellington e Deusdete e meus irmãos, Marcelle, Wellington Filho e Gabriel. O apoio, a compreensão e a torcida de vocês foram fundamentais pra a conclusão desse trabalho. Muito obrigada de coração.

Aos demais familiares, entre eles, avós, primos e tios.

Ao Professor Doutor André Kipnis meu Muito Obrigada especial, pela oportunidade de realização desse estudo, pelas suas orientações, sua paciência, confiança e apoio oferecidos tanto antes desse estudo (como estagiária), quanto durante a realização deste. Também estendo meu agradecimento a Professora Doutora Ana Paula Junqueira Kipnis pelas orientações e correções sempre que precisei.

Ao meu noivo, André Luiz Fonseca Brasil pela cumplicidade, força e amor dedicados a mim com tanto carinho e atenção.

Às minhas amigas e demais colegas do Laboratório de Bacteriologia Molecular e do Laboratório de Imunologia, em especial, Viviane Lopes Rocha, Suellen Rocha Araújo Castilho, Mariana David, Camila Xavier, Hesther Bousquet de Macedo, Amanda Dominience, Dellys Leonora Lago, Fábio Muniz e Lázaro Neto. A amizade, companhia e os momentos de descontração dentro e fora do laboratório com vocês tornaram minha jornada muito mais leve e divertida.

A minha amiga, prima e grande incentivadora Lorena Cristina dos Santos, muitíssimo obrigada por tudo desde o meu início no laboratório e a amiga Maysa Paula da Costa, um obrigada carinhoso pela amizade sincera.

Aos professores da banca de qualificação e defesa Prof. Dr. Divino Aparecido da Cruz, Prof. Dr. Pedro Cravo, querida Profa. Dra. Maria Cláudia D. B. P. André, Prof. André Corrêa Amaral, pelas sugestões, críticas construtivas e conhecimentos que me transmitiram com muita atenção.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	ix
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MICOBACTÉRIAS	1
1.2 TUBERCULOSE	2
1.3 TRANSMISSÃO	4
1.4 SINTOMATOLOGIA	4
1.5 DIAGNÓSTICO	5
1.6 TRATAMENTO	7
1.7 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	8
1.8 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	10
1.9 GEORREFERENCIAMENTO E EPIDEMIOLOGIA	16
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 GERAL	21
3.2 ESPECÍFICOS	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS	22
4.2 RECRUTAMENTO DOS CASOS E COLETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS	22
4.3 BACILOSCOPIA E CULTURA	22
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA	23
4.5 ANÁLISE DE MIRU-VNTR	23
4.6 GEORREFERENCIAMENTO DOS CASOS DE TB DIAGNOSTICADOS EM 2007	27
4.6.1 População de estudo de Georreferenciamento e casuística	27
4.6.2 Área de estudo	27
4.6.3 Georreferenciamento dos casos	29
5 RESULTADOS	31
5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES CUJAS AMOSTRAS FO-	

	RAM GENOTIPADAS	31
5.2	GENOTIPAGEM PELA TÉCNICA DE MIRU-VNTR	32
5.3	COMPARAÇÃO ENTRE A TÉCNICA DE 15 <i>loci</i> MIRU-VNTR COM A TÉCNICA PADRÃO RFLP-IS6110	37
5.4	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTU- DO DE GEORREFERENCIAMENTO	40
5.5	GEORREFERENCIAMENTO DOS CASOS DE TB DIAGNOSTICADOS EM 2007 E RESIDENTES EM GOIÂNIA	40
5.6	CORRELAÇÕES ENTRE O GEORREFERENCIAMENTO E GENOTIPA- GEM DOS CASOS DIAGNOSTICADOS EM 2007 NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA	41
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXOS	67

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

	PG
Figura 1. Os 22 países apresentados no mapa são responsáveis por 80% dos casos de tuberculose no mundo.	3
Figura 2. Padrão socioeconômico por distrito de acordo com a renda por chefe de família. Município de Goiânia. Estado de Goiás. Brasil. Adaptado de Andrade et al. (2004).	29
Figura 3. Distribuição da frequência dos pacientes incluídos no estudo de acordo com a residência.	32
Figura 4. Gel de agarose a 1,5% discriminando os variados tamanhos de cada amostra após amplificação por PCR do <i>locus</i> Miru26.	33
Figura 5. Dendrograma produzido com os resultados do número de cópias de cada isolado pela técnica de 15 <i>loci</i> MIRU-VNTR.	35
Figura 6. Dendrograma gerado pela técnica de 15 <i>loci</i> MIRU-VNTR e pela técnica de RFLP-IS6110.	39
Figura 7. Distribuição espacial dos 241 casos de tuberculose notificados, de pacientes residentes na cidade de Goiânia, Estado de Goiás, Brasil, no ano de 2007.	41
Figura 8. Mapa de densidade de casos gerado pela técnica de Kernel com os 50 isolados genotipados pela técnica de MIRU-VNTR, demonstrando a densidade de casos identificados de TB por quilometro quadrado.	42
Figura 9. Dendrograma dos perfis genéticos das 50 amostras isoladas e analisadas pela técnica de 15 <i>loci</i> MIRU-VNTR.	43
Figura 10. Distribuição espacial das 50 amostras analisadas molecularmente pela técnica de 15 <i>loci</i> MIRU-VNTR.	45
Tabela I. Diversas denominações dos MIRU-VNTR específicos e tamanhos das repetições de cada <i>loci</i> .	13

Tabela II.	Sequência dos 15 oligonucleotídeos iniciadores usados no estudo.	24
Tabela III.	Diversidade alélica de cada <i>loci</i> e número de ocorrência de cada alelo.	36
Tabela IV.	Perfis encontrados e poder discriminatório das técnicas de 15 <i>loci</i> MIRU-VNTR e RFLP-IS6110 usados no estudo.	37
Tabela V.	Diversidade alélica de cada <i>loci</i> e número de ocorrência de cada alelo dos 50 casos genotipados.	44
Quadro I.	Condições da PCR usada nas amostras de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pela técnica de MIRU-VNTR.	25
Quadro II.	Tamanho em pares de bases referente a cada alelo (número de cópias) para cada um dos 15 <i>loci</i> MIRU-VNTR analisados.	26
Quadro III.	Definição do número de cópias após corrida em gel referente ao <i>locus</i> Miru 26 conforme Figura 4	33
Anexo I	Parecer do Cômite de Ética, TCLE	67
Anexo II	Questionário da história epidemiológica de cada paciente	70
Anexo III	Comprovante de Submissão do manuscrito ao Jornal BMC Public Health	71
Anexo IV	Manuscrito Submetido ao Jornal BMC Public Health	73

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido-Resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
°C	Graus Celsius
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DMSO	Dimethyl Sufoxide
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOTS	Tratamento diretamente observado, do inglês <i>Directly Observed Treatment Short Course</i>
DR	Repetição Direta
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETR	Repetição Exata em Tandem, do inglês <i>Exact Tandem Repeat</i>
g	Aceleração da gravidade
HDT	Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Hsp	Proteína de Choque Térmico, do inglês <i>Heat Shock Protein</i>
H37Rv	Cepa padrão de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC 27294
IS	Sequência de Inserção, do inglês <i>Insertion Sequence</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros
LAM	Latino-Americana e Mediterrânea, do inglês <i>Latin-American Mediterranean</i>
LB	Lúria-Bertani
LJ	Löwenstein-Jensen
MDR-TB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> multi-droga resistente
MIRU	Unidades Repetitivas Interceptadas de Micobactérias, do inglês <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i>
MTBC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>

PNB	Ácido p-nitrobenzóico
PRA	PCR-restriction enzyme pattern analyses
QUB	Queens University of Belfast
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição, do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SIG	Sistema de Informação Geográfica, do inglês <i>Geographic Information System</i>
SLPs	Polimorfismo de Larga Sequência, do inglês <i>Large Sequence Polymorphisms</i>
SNPs	Polimorfismo de Nucleotídeo Único, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SpolDB4	Banco de Dados Internacional de <i>Spoligotyping</i>
TB	Tuberculose
TCH	Ácido tiofeno-2-carboxílico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic average
VNTR	Número Variável de Repetições em Tandem, do inglês <i>Variable Number Tandem Repeats</i>
XDR-TB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> extensivamente resistente a drogas

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana crônica infecto-contagiosa que, apesar de quase 130 anos de pesquisas desde a descoberta do bacilo, continua a ser um importante agravo à saúde global e uma das principais causas de morte, particularmente nos países em desenvolvimento. A doença tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria de fácil transmissão uma vez que os bacilos se propagam pelo ar. O controle da doença depende de vários fatores, dentre os quais, o correto diagnóstico, o tratamento completo e o manejo adequado dos pacientes com a doença ativa para evitar a transmissão são fundamentais. Neste cenário, o conhecimento dos perfis genotípicos dos microorganismos circulantes em uma região, através de técnicas moleculares apropriadas, tem contribuído com bons resultados. Além disso, a correlação entre o espaço geográfico de casos da doença é uma ferramenta útil para a definição de estratégias epidemiológicas, sobretudo quando se conhece a variabilidade genética das cepas presentes em uma determinada população associada a sua localização geográfica. Neste estudo, foi empregada a análise de MIRU-VNTR para identificar o polimorfismo de 15 *loci* em amostras de *Mycobacterium tuberculosis*. Foram analisadas 119 amostras, coletadas entre 2006 e 2007, de pacientes com TB pulmonar em dois hospitais de referência no município de Goiânia. Os resultados obtidos pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR foram posteriormente, comparados com resultados gerados pela técnica padrão ouro RFLP-IS6110. Pela análise dos padrões moleculares dos 119 isolados, foram encontrados 110 genótipos distintos. Destes, 105 continham um único isolado enquanto que 14 amostras se agruparam em cinco grupos (*cluster*) genéticos. Esta técnica apresentou um bom poder discriminatório (0,9986). Nossos resultados mostraram que a técnica de tipagem por 15 *loci* MIRU-VNTR se mostrou mais discriminatória que a técnica de RFLP-IS6110 (0,9942). Adicionalmente, foram georreferenciadas 241 amostras de pacientes diagnosticados com qualquer forma clínica de TB em 2007 de acordo com a Secretaria Municipal de Saúde e destas, 50 amostras foram genotipadas por 15 *loci* MIRU-VNTR. No georreferenciamento de 241 casos da doença, observou-se uma distribuição aleatória destes pelo município sem aglomerados significativos. A distribuição dos casos mostrou que, visualmente, não houve relação entre a doença e a situação sócio-econômica da população. O estudo genotípico de 50 isolados georreferenciados demonstrou que existe grande variabilidade genética de cepas circulantes na cidade e essas, quando agrupadas, não apresentam associação geo-espacial

que possibilite estabelecer uma ligação epidemiológica entre os casos. Podemos concluir que não existem focos recentes de transmissão da doença, podendo esta ser proveniente de reativação endógena de infecção latente adquirida anteriormente, já que a maioria dos isolados apresentaram perfis únicos.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic infectious bacterial disease, very contagious, that, despite almost 130 years of biomedical research since the discovery of the tubercle bacillus, it continues to be a major threat to global health and is one of the leading causes of death by a bacterial organism, particularly in the developing world. The etiologic agent, *Mycobacterium tuberculosis*, is a bacterium that is easily transmitted by air. The disease control depends on several factors, being the correct diagnosis; efficient treatment; and active disease patient management to avoid transmission, essential ones. In order to improve the success in diagnosis, the knowledge of genotypic profiles by molecular techniques has provided positive results. Additionally, the correlation between the geographical locations of TB cases is a useful tool to aid epidemiological control strategies, especially when it is performed together with the knowledge of genetic variability of the studied TB strains. In this study we used the 15 *loci* MIRU-VNTR technique to identify polymorphisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates. A total of 119 *M. tuberculosis* samples, isolated between 2006 and 2007 from patients attending two reference hospitals of Goiânia city, were genotyped and the results compared with the gold standard RFLP-IS6110 technique. The 15 *loci* MIRU-VNTR analysis of 119 TB isolates provided 110 distinct genotypes, 105 of which contained only one isolate while 14 isolates were grouped in five genetic groups (*clusters*). This technique showed a good discriminatory power (0.9986). The 15 *loci* MIRU-VNTR technique was more discriminatory than RFLP-IS6110 (0.9942). We also performed the georeferencing of 241 TB cases, corresponding to all clinical forms reported in Goiânia during the year 2007 by the City's Secretary of Health Department. The cases were randomly distributed throughout the city. The distribution of cases showed that, visually, there was no relationship between disease and socio-economic situation of the population. Among the georeferenced cases, we were able to genotype 50 isolates by 15 *loci* MIRU-VNTR. A great genetic variability of genotypes among the 50 isolates was observed, and the few ones that were clustered did not show epidemiological links. Based on the observed data, no transmission source the TB was identified in the city of Goiânia, and consequently we can infer that TB in the City of Goiânia could be resulted from a previously acquired infection due to the high degree of heterogeneous genetic profiles observed.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 MICOBACTÉRIAS

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae* constituída de dois gêneros, *Amycolicococcus* e *Mycobacterium*, sendo este último de maior importância clínica (Wang et al. 2010). Essas bactérias podem ser parasitas obrigatórios, saprófitas ou oportunistas. A maioria das espécies apresenta vida livre no solo ou na água, mas para muitas, o nicho ecológico preferencial são os tecidos de hospedeiros vivos (Sousa et al. 2000). Atualmente são conhecidas mais de 120 espécies dentro deste gênero, sendo a minoria patogênica em humanos (Gutierrez et al. 2005; Leite & Sato 2006). Os membros cultiváveis podem ser distinguidos em dois grupos: o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e as chamadas micobactérias atípicas ou, não pertencentes ao MTBC (Van Soolingen 2001). O MTBC é constituído pelas espécies *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* e *M. tuberculosis*. Os dois principais agentes causadores de doença em humanos são: *M. leprae*, causador da Lepra ou Hanseníase e *M. tuberculosis*, causador da tuberculose (TB) (Ducati et al. 2006).

As espécies deste gênero apresentam uma parede celular singular com um elevado teor de lipídeos complexos de alto peso molecular, denominados ácidos micólicos, que abrangem cerca da metade do peso da parede celular bacteriana tornando sua superfície hidrofóbica. Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa, contendo de 60 a 90 átomos de carbono na sua totalidade. Devido ao elevado conteúdo de ácidos micólicos, as micobactérias se beneficiam de uma parede celular espessa que lhes confere proteção tornando-as relativamente resistentes a uma grande parte dos antibióticos e outras drogas utilizadas no tratamento das doenças por elas causadas. A característica hidrofóbica faz com que a estrutura da parede celular seja impermeável a diversos compostos (Macieira 2000; Hong & Hopfinger 2004; Alves 2008; Hett & Rubin 2008).

A parede celular das micobactérias apresenta também um polímero rígido, insolúvel em água e quimicamente complexo, designado de peptideoglicano. Entre o peptideoglicano e os ácidos micólicos existe uma camada única de polissacarídeos, o arabinogalactano. Os ácidos micólicos e o arabinogalactano encontram-se covalentemente ligados um ao outro, formando um complexo, que por sua vez, se ligam ao peptideoglicano. Deste modo, a complexidade e a singularidade da parede celular das

micobactérias advêm da sua constituição de ácidos micólicos e polissacarídeos (Hong & Hopfinger 2004; Alves 2008; Hett & Rubin 2008).

1.2 TUBERCULOSE

Dentre as espécies bacterianas que infectam os seres humanos, o *M. tuberculosis* é um importante agente etiológico associado ao agravamento à saúde das populações. O bacilo foi descoberto em 1882, quando o alemão Robert Koch descreveu pela primeira vez seu isolamento e a sua forma de cultivo a partir de tubérculos macerados, identificando-o como principal causador da TB. Desde então, a bactéria passou a ser conhecida como o bacilo de Koch (Schuster 1995). Outras espécies de micobactérias também são responsáveis por causar a doença, entre elas, o *Mycobacterium africanum* e o *Mycobacterium bovis*, sendo o primeiro encontrado principalmente em território africano e o segundo, em locais de contato com animais bovinos infectados (Cole et al. 1998; Alves 2008).

A TB é uma das doenças mais antigas do mundo, com relatos médicos na Grécia e na Roma antiga, onde pesquisadores encontraram lesões características em corpos mumificados (Souza & Vasconcelos 2005). A TB é uma doença bacteriana crônica, infecto-contagiosa e de fácil proliferação. A espécie de *M. tuberculosis* apresenta-se como bacilos curvos ou retos, variando de 0,2 a 0,7 µm de largura por 1 a 10 µm de comprimento. Tem como características serem aeróbios estritos, imóveis, de crescimento lento, dividindo-se a cada 18 ou 24 horas, e possuem propriedade de álcool-ácido resistência, ou seja, quando coradas a quente com fucsina fenicada de Ziehl retêm o corante após lavagens com soluções de álcool (97%) e ácido (3%) (propriedade utilizada na coloração de Ziehl-Neelsen) (Harries et al. 2004; Leite & Sato 2006).

A doença, após uma intensa progressão mundial, começou a declinar no século XIX e XX, principalmente nos países com rápida evolução social, em grande parte devido ao desenvolvimento econômico e a melhoria nas condições de moradias e melhor nutrição. Os primeiros antibióticos e quimioterápicos começaram a surgir na década de 40 (estreptomicina, isoniazida e pirazinamida), quando se acreditou na eliminação definitiva da doença (Ruffino-Neto 1999; MS 2002). Entretanto, a partir da década de 80, a disseminação da infecção pelo HIV no mundo levou a alterações nos mecanismos de defesa que o homem dispõe contra o agente causal da TB, tornando a infecção pelo HIV o maior fator de risco para a progressão da infecção latente pelo *M.*

tuberculosis (Boffo et al. 2004). Neste contexto surgiram também estirpes clínicas resistentes a antibióticos, que aumentam a preocupação acerca da doença.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO 2010) anualmente surgem aproximadamente nove milhões de casos novos de TB em todo o mundo e cerca de dois milhões de pessoas morrem em consequência da doença. A maior taxa de casos da doença ocorre na Ásia com 55% do total e a menor nas Américas, com 3%. O Brasil ocupa a 19ª posição entre os 22 países com maior número de casos da TB no mundo (Figura 1) (Conde et al. 2009). Segundo o Ministério da Saúde (MS 2011a), o país apresentou uma incidência no ano de 2010 de 37,99 casos de TB para cada 100.000 habitantes. A distribuição dos casos está concentrada em 315 dos 5.564 municípios do país que correspondem a 70% da totalidade dos casos. O Estado de São Paulo detecta o maior número absoluto de casos novos por ano (17,7 casos) enquanto que o Estado do Rio de Janeiro apresenta o maior coeficiente de incidência (71,8/100.000 habitantes) (MS 2010a). Em Goiás, a incidência anual é de aproximadamente 14,6 casos para cada 100.000 habitantes (MS 2011a).



Figura 1. Os 22 países apresentados no mapa são responsáveis por 80% dos casos de tuberculose no mundo.

Fatores sociais têm sido o principal agravante associado à permanência da doença na população. É especialmente endêmica nos países em desenvolvimento, ligados a epidemia da AIDS cujas populações apresentam altos índices de desnutrição, com pouco acesso aos serviços de saúde, superlotação e más condições de vida nos grandes centros urbanos (Sola et al. 2003). A TB está associada a fatores sócio-econômicos ligados a comportamentos da sociedade atual, como etilismo, tabagismo,

uso de drogas, abandono do tratamento e outras doenças de base, tais como diabetes e hipertensão, sendo a AIDS a principal delas.

1.3 TRANSMISSÃO

A transmissão do bacilo de *M. tuberculosis* é feita por via aérea de um indivíduo com a doença ativa através da fala, tosse ou espirro, que por sua vez pode contaminar de 10 a 15 outras pessoas por ano (Tiwari et al. 2006). Porém, nem todos os indivíduos infectados com o bacilo irão desenvolver a doença, pois o sistema imunológico consegue impedir sua progressão, que pode ficar dormente por anos, situação esta denominada TB latente (WHO 2010). Indivíduos com infecção latente, ou seja, que não apresentam a doença em sua forma ativa, não transmitem os bacilos. A patogenicidade do *M. tuberculosis* depende de sua capacidade de sobreviver e crescer dentro das células do hospedeiro. O bacilo não produz toxinas, porém, quando envolvido pelos macrófagos, inibe a fusão das vesículas fagocíticas com os lisossomos através dos sulfolipídeos (Pandolfi et al. 2007). Em uma minoria de casos, a doença resultante da progressão da infecção se desenvolve nos primeiros dois anos após o contato e é chamada de TB primária. Existem ainda casos em que a doença se desenvolve anos após a lesão primária. A origem pode ser tanto endógena, por reativação de um foco quiescente, quanto exógena, a partir de uma nova contaminação (MS 2002).

1.4 SINTOMATOLOGIA

O fator primordial para o controle da doença é sua rápida detecção, adequada terapia e acompanhamento dos contatos desses pacientes para se prevenir transmissões (Kamerbeek et al. 1997). Os sintomas da doença, na maioria dos casos, são inespecíficos e se agravam com o passar do tempo. Os principais são: cansaço, perda de apetite, suores noturnos, fraqueza, emagrecimento e febre. Quando a doença atinge os pulmões, o indivíduo pode apresentar dor torácica e tosse produtiva, acompanhada ou não de escarros hemoptóicos. A tosse produtiva é o principal sintoma da forma pulmonar, que por sua vez é a forma mais frequente da TB. Em pacientes maiores de 15 anos, a TB atinge os pulmões em cerca de 80% dos casos, nos menores de 15 anos, este percentual é de 85%. (MS 2010b).

A doença também pode ocorrer em outros órgãos do corpo, designando-se por TB extra-pulmonar. Nestes casos, os sintomas variam de acordo com os órgãos atingidos e pode ocorrer nos rins, ossos e meninges, dentre outras, em função das quais

se expressará clinicamente. Uma das formas mais graves é a TB miliar, decorrente de disseminação hematogênica com acometimento sistêmico, quadro tóxico infeccioso importante e maior risco de meningite (Pina 2000; MS 2010b).

1.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico presuntivo da TB faz-se, principalmente, através de sintomas clínicos e achados radiológicos, sendo a confirmação do caso obtida através da baciloscopia, que identifica a presença de bacilos-álcool-ácido-resistentes (BAAR), e/ou cultura (Ferreira et al. 2005). Os achados radiográficos mais sugestivos são: adenomegalias hilares e/ou paratraqueais, pneumonias com qualquer aspecto radiológico e o infiltrado nodular difuso (padrão miliar) (MS 2010b).

A baciloscopia, pesquisa do BAAR em amostras clínicas é a técnica mais utilizada, realizada pelo método de Ziehl-Nielsen. É considerada simples, rápida e fácil de fazer sendo um exame importante do ponto de vista epidemiológico, já que os pacientes bacilíferos são os responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão (MS 2010a). Porém, a baciloscopia possui baixa sensibilidade (60 a 70%) sendo necessário de 5.000 a 10.000 bacilos por mL para a sua identificação. Assim, procedimentos baciloscópios apresentam desvantagens, podendo apresentar resultados falsos negativos em espécies paucibacilares e/ou falso positivo pela presença de bacilos mortos que são evidenciados na coloração (Almeida 2009). Além disso, requer amostras de escarro coletadas em dias consecutivos, apresentando dificuldades para manter a adesão do paciente à coleta (Kivihya-Ndugga et al. 2004).

A cultura é um método com boa especificidade e sensibilidade no diagnóstico da TB. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença. As células de *M. tuberculosis* crescem muito lentamente em laboratório e necessitam de 3 a 8 semanas de incubação em meios artificiais sólidos, sendo os mais usados aqueles a base de ovo como o Löwenstein-Jensen (LJ) e o Ogawa-Kudoh. Recentemente, foram desenvolvidos meios de cultura líquidos que favorecem o crescimento das micobactérias em pelo menos duas semanas através da utilização de indicadores de crescimento, o chamado sistema radiométrico líquido de cultura (BACTEC). Este aparelho semi-automático detecta o crescimento das micobactérias por radiometria em meio líquido de Middlebrook, contendo ácido palmítico marcado com carbono 14 (^{14}C). As micobactérias libertam $^{14}\text{CO}_2$ durante a metabolização do substrato marcado, este é

medido e transformado num valor numérico proporcional ao crescimento das bactérias presentes (Casal et al. 1997; Soini & Musser 2001).

O meio LJ é o mais usado no Brasil, porém outros meios como, Middlebrook 7H10 e 7H11, que são sólidos a base de ágar, também podem ser utilizados. O meio de Middlebrook 7H9 é um meio líquido utilizado nos métodos automatizados para cultivo e realização de testes de suscetibilidade a drogas (MS 2005; Marcondes et al. 2006; Kritski et al. 2007).

A identificação da espécie é feita por métodos bioquímicos e de inibição de crescimento. Existem três técnicas bioquímicas essenciais para detecção de *M. tuberculosis*: teste de niacina, uma vez que essas bactérias acumulam niacina posteriormente excretando-o para o meio de cultura; teste de redução dos nitratos e teste da catalase a 68°C já que a bactéria tem a particularidade de possuir uma enzima catalase estável ao calor (Pina 2000). Porém as execuções dos testes mencionados requerem tempo e grande exigência laboratorial. Os principais testes utilizados para identificação da espécie são: teste de inibição de crescimento pelo ácido p-nitrobenzóico (PNB-500µg/ml) em que apenas as micobactérias do MTBC são sensíveis; teste de inibição pela hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH-2µg/ml) que apenas o *M. tuberculosis* é resistente (MS 2004).

Nos últimos 10 anos, métodos moleculares foram desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da TB, mediante a detecção e a identificação de micobactérias. Esses testes moleculares avaliam inclusive o espectro de mutações no genoma das *M. tuberculosis* associado à resistência às drogas. Os métodos moleculares podem reduzir o tempo de espera pelo resultado de semanas para dias, além de aumentar a confiabilidade diagnóstica (Soini & Musser 2001), porém o fato de os genomas de vários isolados de *M. tuberculosis* serem muito similares (Frothingham & Meeker-O'Connell 1998) requer abordagens moleculares bem desenhadas para terem boa especificidade. A amplificação de regiões específicas dos ácidos nucleicos feita por PCR (reação em cadeia da polimerase) a partir do DNA extraído de amostras clínicas pode ajudar a acelerar as decisões envolvidas no diagnóstico de TB com sensibilidade e especificidade maiores que 95%, para que o tratamento possa ser iniciado corretamente (Cheng et al. 2004).

Isolados de *M. tuberculosis* possuem uma sequência de inserção exclusiva em seu cromossomo identificada como IS6110, de 1.355 pares de base, relacionada à família IS3 das enterobactérias (Pandolfi et al. 2007). Esta região tem sido o método de escolha na identificação molecular pela PCR (van Embden et al. 1993). Outro método

usado para identificação molecular em espécies de micobactérias foi desenvolvido por Telenti et al. (1993) e foi denominado PRA (PCR-restriction enzyme pattern analyses). Nesta técnica, parte do gene *hsp65*, que codifica uma proteína de choque térmico (*heat shock protein*) de 65-kDa, altamente conservado entre as espécies de micobactérias é alvo de amplificação por PCR. Adicionalmente, o gene *hsp65* apresenta regiões hipervariáveis que podem ser usadas para a identificação das diferentes espécies. A variabilidade genética nesta região do gene *hsp65* engloba sequências que podem ser reconhecidas por duas enzimas de restrição, *BstEII* e *HaeIII*. Consequentemente, cada espécie de micobactéria possui sequências que serão ou não reconhecidas por essas enzimas. O fragmento de 439 pares de bases (pb), correspondente a amplificação de parte do gene *hsp65*, é submetido à digestão com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*. Logo após a digestão, os produtos são separados por eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 4% e os perfis de bandas específicos para cada espécie de micobactéria são usados para determinar a espécie (Tortoli 2003; Santos 2009).

Nos últimos anos, têm sido lançados no mercado produtos que tornam ainda mais simples a execução da PCR. Em geral os kits fornecem todos os componentes necessários para o procedimento da técnica (Drosten et al. 2003). Porém, a complexidade de alguns destes testes comerciais existentes têm dificultado o seu uso e avaliação de seu desempenho em condições de rotina nos países de elevada carga de TB (MS 2010a).

1.6 TRATAMENTO

A doença é curável em praticamente 100% dos casos novos sensíveis aos medicamentos anti-TB, desde que obedecidos os princípios básicos da terapia e a adequada operacionalização do tratamento. A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos para o adequado tratamento da TB evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando assim, a cura do paciente (MS 2010a).

O tratamento adotado no Brasil em 1979 para casos novos de TB foi o composto pela associação dos antibióticos de primeira linha: rifampicina (RIF), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA) nos dois primeiros meses (fase de ataque) e nos quatro meses seguintes com RIF e INH (fase de manutenção), conhecido como Esquema I (2RHZ/4RH). Para casos de recidiva, era adotado o Esquema I reforçado que consistia em dois meses iniciais com RIF, INH, PZA e Etambutol (EMB) e quatro meses

subsequentes com RIF, INH e EMB (2RHZE/4RHE) (Kritski et al. 2000; MS 2002; MS 2010a). Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), juntamente com o seu Comitê Técnico Assessor re-analisou o sistema de tratamento da TB no Brasil com base no aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4 para 6,0%). Foi acrescentado então um quarto fármaco, o etambutol, na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema I. A apresentação farmacológica deste esquema passou a ser em comprimidos únicos contendo doses fixas combinadas dos quatro medicamentos (RHZE), nas seguintes dosagens: R 150 mg, H 75 mg, Z 400 mg e E 275 mg. Esse esquema básico é indicado para todos os casos novos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar (exceto de meningoencefalite), bem como para todos os casos de reincidência e de retratamento por abandono (Conde et al. 2009; MS 2010a).

Em caso de falência do Esquema I, o tratamento é composto por medicamentos de segunda linha, sendo cinco na primeira fase (estreptomicina, etambutol, ofloxacina, pirazinamida e terizidona) durante seis meses e três (etambutol, ofloxacina e terizidona) durante 12 meses na fase de manutenção, totalizando uma duração de 18 meses (Conde et al. 2009).

1.7 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Apesar dos esquemas multi-drogas adotados, continua cada vez mais frequente o desenvolvimento de cepas de *M. tuberculosis* multi-droga resistente (MDR) e extensivamente resistente (XDR) aos medicamentos usados para tratar a TB e, frequentemente, a co-infecção com HIV complica ainda mais o atendimento ao paciente e prognóstico (Souza et al. 2006; Lew et al. 2011).

A aquisição de resistência a antimicrobianos por micobactérias é um evento aleatório resultante de mutações espontâneas no cromossomo que podem ser resultado da terapia de droga única, má adesão ao tratamento ou diagnóstico incorreto (Valim et al. 2000; Santos et al. 2010). Ela é denominada de Resistência Natural quando independe do contato prévio do bacilo com a droga e, geralmente ocorre com menor frequência. A chamada Resistência Primária ocorre em pacientes sem tratamento anterior, porém que foram infectados com uma cepa já resistente de *M. tuberculosis*. Por fim Resistência Adquirida, Pós-primária ou Secundária advém principalmente de falhas ou abandono do tratamento que permitem o surgimento e crescimento de cepas resistentes no curso da infecção (Nachega & Chaisson 2003; Almeida 2009).

A resistência aos medicamentos de TB pode ser a um único medicamento (monoresistência), sendo o tipo mais comum. No entanto resistência a múltiplos medicamentos podem ocorrer, sendo esta menos frequente, porém de maior preocupação. Por convenção, MDR é definido como resistência a isoniazida e rifampicina, os dois principais fármacos usados no tratamento contra a doença e, XDR-TB é definida como a resistência à isoniazida, a rifampicina (MDR), a uma fluoroquinolona e, pelo menos, a um agente de segunda linha injetável (amicacina, canamicina e/ou capreomicina) (Nachega & Chaisson 2003; WHO 2010). No Brasil, a definição de MDR-TB difere da adotada pela OMS, sendo caracterizada como resistência *in vitro* à rifampicina e isoniazida e a, pelo menos um dos fármacos componentes do Esquema I (Diretrizes 2004).

Diante da necessidade de se tomar medidas objetivas para controlar a TB e a disseminação de cepas MDR e XDR, foram criadas metas e indicadores de acompanhamento cujos objetivos são deter e reverter a incidência da doença. Uma das estratégias adotadas foi o plano Stop-TB, aprovado pela OMS para controle mundial da doença no período de 2006 a 2015 nos países em desenvolvimento. Dentre as estratégias adicionais consideradas prioritárias, está previsto o aumento da detecção de casos nos diferentes cenários sócio-econômicos e clínico-epidemiológicos por meio do fortalecimento do sistema de saúde na atenção básica e em unidades de saúde de maior complexidade, públicas e privadas, associado à mobilização social. Além do acompanhamento e supervisão do doente assistido por Programas de Saúde locais (WHO 2009).

A estratégia DOTS, lançada pela OMS na metade da década de 1990 e adotada no Brasil, também auxilia contemplando medidas de compromisso político e suporte financeiro por parte dos países e regiões. Esta estratégia tem como base o abastecimento adequado e regular de medicamentos, o controle de qualidade dos fármacos, detecção precoce de casos, esquemas de tratamento padronizados e aplicados sob observação direta aos pacientes. Seu objetivo é assegurar a regularidade na ingestão dos medicamentos, monitoramento, avaliação do sistema de informação e no impacto das medidas adotadas. Na região Centro-Oeste há resultados animadores decorrentes do acompanhamento dessas medidas (Dalcolmo et al. 2007).

1.8 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia busca identificar os fatores determinantes da distribuição da doença no tempo e no espaço, bem como os fatores envolvidos em sua transmissão, manifestação e evolução, sempre motivada pela oportunidade ou possibilidade de intervir e prevenir a doença (Foxman & Riley 2001; Pandolfi et al. 2007). O desenvolvimento e aprimoramento do uso de técnicas de genotipagem têm contribuído também para os estudos epidemiológicos, sendo frequentemente aplicadas para tentar se compreender as variações genéticas e as possíveis relações filogenéticas entre várias cepas de *M. tuberculosis*, em particular as cepas responsáveis por infecções em larga escala, MDR, e também, para diferenciar uma re-infecção de uma recidiva (Choi et al. 2011).

Atualmente já se conhece a sequência completa do genoma de algumas cepas de *M. tuberculosis*, entre elas a cepa referência de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), disponível em <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/> (Cole et al. 1998) e de uma segunda cepa de *M. tuberculosis*, (CDC1551, cepa Oshkosh), isolada de um paciente nos Estados Unidos (<http://www.straininfo.net/sequences/AE000516/browser/genbank>). O genoma tem 4,4 Mb, é rico em elementos de inserção (IS), sequências repetidas e famílias conservadas de multigenes (MS 2002).

A epidemiologia molecular envolve, além do uso de técnicas moleculares para o estudo da taxonomia, filogenia ou genética de populações, a aplicação destas técnicas em problemas epidemiológicos (Foxman & Riley 2001). O método de epidemiologia genética considerado "padrão ouro" para *M. tuberculosis* é a análise do polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição seguido de hibridização com o elemento de inserção 6110 (RFLP-IS6110), obtido em um consenso internacional há mais de 10 anos (van Embden et al. 1993; Sola et al. 2003). O IS6110 é um transposon que se repete de uma a 20 vezes dentro do genoma micobacteriano. Nesta técnica as cepas são caracterizadas de acordo com o padrão de bandas gerado por diferenças na localização da sequência IS6110 no cromossomo e no número de cópias deste elemento (Kremer et al. 1999).

Apesar de ser uma técnica padronizada, ela apresenta algumas inconveniências pelo fato de ser muito onerosa, requerer o cultivo das micobactérias de crescimento lento, aumentando assim o tempo necessário para o desenvolvimento da técnica, além de sofrer com dificuldades de interpretação e comparação entre laboratórios, dos complexos padrões de bandas (Supply et al. 2006). Estudos confirmam um baixo poder

discriminatório para isolados com pouco número de cópias de IS6110 (Gutierrez et al. 1998; Kremer et al. 1999). Adicionalmente, o aumento da variabilidade genética de *M. tuberculosis* no mundo todo demonstrou que RFLP-IS6110 não pode ser aplicada universalmente como um método único. Em estudo realizado por Radhakrishnan et al. (2001), analisando por RFLP, isolados em um estado no sul da Índia onde a TB é endêmica, observou que a maioria dos isolados apresentavam poucas ou nenhuma cópia de IS6110, inviabilizando a aplicação desta técnica como método de tipagem único. Cowan et al. (2002) concluíram que deve ser adicionado um segundo ou terceiro método para avaliar e discriminar as cepas de *M. tuberculosis* com pouco número de cópias deste elemento de inserção.

Outras técnicas de tipagem molecular foram desenvolvidas e aplicadas ao MTBC. Entre algumas, a técnica de *Spoligotyping*, que tem a vantagem de ser simples e de precisar de pouca quantidade de bactérias. Além disso, pode ser usado também como um método de tipagem adicional para as linhagens com cinco ou menos cópias de IS6110 (Van Soolingen 2001; Santos et al. 2007). A técnica, descrita por Kamerbeek et al. (1997) baseia-se na amplificação por PCR de um único *locus* altamente polimórfico no genoma da bactéria contendo múltiplas repetições diretas (DR). Este *locus* contém DR de 36 pb intercaladas com sequências espaçadoras não repetitivas de 34-41 pb bem conservadas. Posteriormente à PCR, é feita a hibridização em uma membrana que contenha oligonucleotídeos, previamente ligados covalentemente, e específicos para cada uma das 43 diferentes sequências espaçadoras. O resultado é obtido mediante a hibridização ou não de cada sequência espaçadora, resultando em um padrão de hibridização que é comparado entre as diferentes amostras (Groenen et al. 1993; Goyal et al. 1997). Um Banco de Dados Internacional de *Spoligotyping* (SpolDB4) armazena atualmente 1.939 perfis compartilhados (*shared-types* - STs), representando um total de 39.295 isolados clínicos originários de 141 países. Através deste banco é possível fazer análises e comparações genéticas e epidemiológicas dos diferentes perfis gerados por *Spoligotyping* ao MTBC (Brudey et al. 2006; Malaspina 2009).

Algumas técnicas baseiam-se em análise das sequências de nucleotídeos. Estas fornecem dados particulares, fáceis de serem trocados entre laboratórios, e comparáveis para o estudo da variação populacional bacteriana dando acesso completo a todo genoma. Mutações que geram alguma variação são compreendidas, e os dados de sequência têm sido utilizados com sucesso no estudo da epidemiologia de bactérias, biologia populacional e evolução (Baker et al. 2004). Para tal, marcadores genéticos têm

permitido uma visão abrangente da estrutura genômica de *M. tuberculosis*, denominados LSPs (Polimorfismos de Grande Sequência) ou RD (Região de Diferença) e SNPs (Polimorfismo de Único Nucleotídeo). Ambas, marcam polimorfismos nas sequências de bases do DNA, LSPs investiga variação de grandes sequências e SNPs apenas uma mudança de uma única base na sequência de DNA, com uma alternativa usual de dois nucleotídeos possíveis em uma determinada posição. Ambos, LSPs e SNPs, permitem a definição das principais linhagens dentro do MTBC, uma classificação filogenética mais específica parece ser difícil devido à baixa variabilidade desses marcadores nos clones do MTBC (Weniger et al. 2007).

Atualmente a técnica de genotipagem visando à análise do número variável de repetições em tandem (VNTR) tem sido a mais promissora (Supply et al. 2006). A técnica baseada em amplificação por PCR é aplicada ao DNA diretamente extraído da colônia requerendo menores quantidades e, conseqüentemente, menos manipulações de cultivo. Foi inicialmente desenvolvida para ser aplicada em outras bactérias, como *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* (Higgins et al. 1988; Lupski & Weinstock 1992) e posteriormente foi aplicada em micobactérias por Supply et al. (1997).

As regiões de VNTR dentro do genoma micobacteriano são compostas de cerca de 40 a 100 pb de sequências repetitivas, chamadas unidades repetitivas intercaladas de micobactérias (MIRUs) (Supply et al. 2000). De acordo com o momento e finalidade de sua descoberta e/ou caracterização as repetições receberam nomes característicos e, portanto, existe uma grande variabilidade na nomenclatura dos VNTRs. Assim, cinco repetições exatas em tandem (ETR) foram identificadas pelas letras de A a E, e contém repetições em tandem de sequências de DNA idênticos (Frothingham & Meeker-O'Connell 1998). Outro conjunto de *loci* foram denominados QUB (Queens University of Belfast), mesmo nome do local de descoberta (Skuce et al. 2002). Estes contêm sequências de repetições perfeitas, ou quase perfeitas, seguido por repetições parciais de diferentes comprimentos. Os *loci* VNTR deste último conjunto atualmente são QUB 11a, 11b, 26, 1895, 3336, 3232, 18, 5 e 4156 (Supply et al. 2006). Além de alguns nomes específicos, todos os MIRU-VNTR também podem ser denominados de acordo com sua localização no genoma bacteriano. A Tabela I apresenta as nomeações de 24 regiões MIRU-VNTR mais usadas em estudos moleculares conforme publicado em artigo de Supply et al. (2006).

Tabela I. Diferentes denominações dos *loci* MIRU-VNTR e tamanhos das repetições de cada *loci*.

<i>Locus</i> (VNTR) ^a	Nomes dos Alelos ^b	Comprimento de uma cópia (pb) ^c
580	MIRU 4; ETR D	77
2996	MIRU 26	51
802	MIRU 40	54
960	MIRU 10	53
1644	MIRU 16	53
3192	MIRU 31; ETR E	53
424	Mtub04	51
577	ETR C	58
2165	ETR A	75
2401	Mtub30	58
3690	Mtub39	58
4156	QUB-4156	59
2163b	QUB-11b	69
1955	Mtub21	57
4052	QUB-26	111
154	MIRU 2	53
2531	MIRU23	53
4348	MIRU 39	53
2059	MIRU 20	77
2687	MIRU 24	54
3007	MIRU 27; QUB-5	53
2347	Mtub29	57
2461	ETR B	57
3171	Mtub34	54

a. *Locus* indica a localização, em kbp, do VNTR no genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. b. Nome dos alelos referente a cada *locus*. c. Comprimento de cópia única das regiões em pares de bases; obs: em alguns MIRU-VNTR as cópias podem apresentar tamanhos um pouco diferentes.

A técnica de MIRU-VNTR pode ser desenvolvida de forma manual ou de maneira automatizada. Pelo procedimento manual é feito uma amplificação por PCR usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para as regiões flangeadoras de cada um dos *loci*, e o produto é aplicado em gel de agarose para, após migração eletroforética, determinar os tamanhos dos fragmentos amplificados (*amplicons*). O tamanho do *amplicon* reflete o número de cópias que aquela amostra apresenta para aquele *locus* (Supply 2005). Na metodologia automatizada emprega-se oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluoróforos específicos produzindo assim *amplicons* fluorescentes, que por sua vez podem ser analisados em um sequenciador automático de DNA. A determinação dos *amplicons* é obtida pelo sequenciador e a

definição de qual *locus* ele representa é obtida pela cor da fluorescência detectada pelo aparelho. É importante salientar que os métodos automatizados são muito mais caros que a versão manual, sendo justificado seu uso apenas em estudos de grande número de amostras (Pandolfi et al. 2007).

Existem diversos conjuntos de *loci* MIRU-VNTR descritos para tipagem de isolados de *M. tuberculosis* (Goyal et al. 1994; Frothingham & Meeker-O'Connell 1998; Supply et al. 2000; Le Fleche et al. 2002; Surikova et al. 2005). Segundo Roring et al. (2004), a escolha de quais conjuntos aplicar em um estudo de epidemiologia molecular é importante para caracterizar cepas prevalentes em determinadas regiões, por isso é necessário determinar os *loci* mais discriminatórios e confiáveis como objeto no estudo que resultem em resultados e comparações seguras. Inicialmente, a tipagem era realizada usando uma pequena quantidade de *loci* demonstrando pouca discriminação. Frothingham e Meeker-O'Connell (1998) usando 11 *loci* MIRU-VNTRs concluíram que a técnica não possuía capacidade suficientemente discriminatória.

O sistema com base em 12 *loci* (Mazars et al. 2001; Supply et al. 2006), sendo estes, MIRUs 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40, foi primeiramente validado e integrado nos sistemas de controle da TB em escala nacional em alguns países por exibirem polimorfismos em número de cópias entre os isolados de *M. tuberculosis* não relacionados de diversas origens geográficas e serem altamente estáveis entre isolados ligados epidemiologicamente (Supply et al. 2000; Cowan et al. 2005; Supply et al. 2006; Oelemann et al. 2007). Posteriormente, diversos estudos concluíram que o poder discriminatório com essa quantidade de *loci* foi igual ou inferior a técnica de RFLP-IS6110 dependendo da amostra estudada (Blackwood et al. 2004; Narayanan 2004), sendo necessária uma maior abrangência de regiões genéticas para se obter uma resolução maior (Oelemann et al. 2007).

Um estudo desenvolvido por Supply et al. (2006) analisou isolados de várias partes do mundo. O resultado deste estudo permitiu padronizar um conjunto de 24 *loci* MIRU-VNTR, incluindo um subconjunto de 15 *loci* bastante discriminatório, para ser usado como um método de tipagem de primeira linha. Os marcadores propostos incluem: Miru 04, Miru 26, Miru 10, Miru 40, Miru 16, Miru 31, Mtub 04, ETRC, ETRA, Mtub 30, Mtub 39, QUB 4156, QUB 11b, Mtub 21, QUB 26, Miru 02, Miru 23, Miru 39, Miru 20, Miru 24, Miru 27, Mtub 29, ETRB, Mtub 34. Este conjunto de 24 *loci* demonstrou confiável melhora na discriminação de isolados de *M. tuberculosis* em relação ao conjunto de 12 *loci* originalmente sugeridos, com resultados altamente

reprodutíveis e fáceis de serem trocados entre laboratórios (Noguti et al. 2010). Alguns estudos utilizaram 15 *loci* para análises moleculares em isolados de *M. tuberculosis* encontrando resultados satisfatórios. Alonso-Rodrigues et al. (2008) compararam as técnicas de RFLP-IS6110, 12 *loci* MIRU-VNTR e 15 *loci* MIRU-VNTR em um conjunto de 116 isolados de diferentes origens geográficas. Os autores observaram que a técnica de 15-*loci* MIRU-VNTR apresentou um maior poder de discriminação dos isolados estudados e concluíram que a estratégia poderia ser utilizada para genotipagem de *M. tuberculosis*, conferindo a agilidade essencial em populações de estudo que passam por transformações epidemiológicas devido ao aumento acentuado da TB entre imigrantes. A técnica de MIRU-VNTR também tem mostrado bons resultados em estudos realizados com cepas de *M. tuberculosis*, em comparação com a técnica de *Spoligotyping*. Kwara et al. (2003) avaliaram a utilidade epidemiológica dos métodos de MIRU-VNTR e *Spoligotyping* comparado aos resultados de RFLP-IS6110 realizados anteriormente em sessenta e quatro amostras coletadas na região metropolitana de New Orleans, em Louisiana, e concluíram que a primeira técnica discriminou os isolados com maior número de perfis do que os encontrados nas outras duas.

Para facilitar a análise dos resultados apresentados pela técnica, com ferramentas úteis para trabalhar com genótipos, calcular dados estatísticos, bem como comparar os perfis encontrados com cepas já caracterizadas e armazenadas em um banco de dados de referência, foi criada uma plataforma na internet, denominada MIRU-VNTR*plus*. Essa plataforma permite a inclusão de dados dos pesquisadores do mundo inteiro e, portanto, é constantemente alimentada com características de novos isolados do gênero *Mycobacterium sp.* Este sistema permite livre acesso ao banco de dados que combina tipagem MIRU-VNTR, *Spoligotyping*, SNP e LSP, além de padrões de RFLP-IS6110 para a identificação de linhagens do MTBC assim como outras ferramentas úteis para comparação segura e fácil entre resultados (Allix-Beguec et al. 2008a; Weniger et al. 2010).

Além de sua ampla utilização para estudos epidemiológicos, a associação de técnicas moleculares também tem se mostrado bastante informativa em estudos filogenéticos realizados no Brasil e no mundo (Wirth et al. 2008; Oelemann et al. 2011). Entre as linhagens conhecidas e estudadas da espécie de *M. tuberculosis*, as cepas da linhagem *W/Beijing* pertencente à família Leste-Asiática, possuem características específicas que conferem maior capacidade para causar doença e facilidade de transmissão dentro de certos espaços geográficos, além de ser caracterizada pela

resistência a múltiplas drogas quando comparada às outras famílias (Reed et al. 2009). Entre outras principais famílias, estão a indiana ancestral Leste-Africano (EAI), composta por pelo menos cinco principais subfamílias, a família Haarlem (H) constituída de três grandes subfamílias e a família LAM (Latino-Americana e Mediterrânea), que pertence a Super-linhagem Euro-Americana e é dividida em subfamílias de LAM1 a LAM10 (Mendes 2010). A Super-linhagem Euro-Americana possui outras famílias menores, como as famílias S, T e X identificadas por *Spoligotyping*. Deste modo, a utilização individual e, principalmente, associada entre técnicas moleculares em pesquisa epidemiológica e filogenética constitui uma ferramenta poderosa e primordial porque traçam perfis exclusivos das cepas sobre a identidade da linhagem e suas características, sendo possível aprofundar informações como, local de origem, virulência da linhagem, além de serem extremamente importantes para controle de transmissões, sendo muitas dessas técnicas rápidas, fáceis de executar e pouco onerosas.

1.9 GEORREFERENCIAMENTO E EPIDEMIOLOGIA

O conhecimento da distribuição espacial dos casos de TB torna-se um apoio adicional de fundamental importância para a elucidação de questões centrais em diversas áreas do conhecimento, especialmente na área da Saúde (Santos et al. 2004). Com a globalização, as populações adquiriram uma dinâmica de migração de intensidade sem precedentes, o que contribuiu para a disseminação da TB tanto globalmente como regionalmente, dificultando a contenção da doença.

Informações espaciais são usadas desde as civilizações antigas para auxiliar a navegação e também para fins militares, como no século XVIII em que governos Europeus planejavam o uso de suas terras construindo mapas cartográficos (Aronoff 1989). Ferreira (1991), relatou que os primeiros contatos entre a epidemiologia e a geografia, ambas preocupadas em estudar as relações entre o homem e o meio, resultaram em intercâmbios de análises sem, contudo, resultar numa real descrição da distribuição regional das doenças. Porém, a continuidade dessa aproximação inicial permitiu o surgimento de trabalhos de caráter descritivo sobre os padrões de distribuição regional das doenças.

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar se agrupamentos ocorrem em áreas geográficas predefinidas. Moonan et al. (2004), buscaram determinar se é possível relacionar áreas geográficas com transmissão da TB usando o Sistema de Informação

Geográfica (SIG) com a tecnologia de vigilância molecular em amostras coletadas de pacientes diagnosticados com TB na área metropolitana de Dallas-USA, entre Janeiro de 1993 a Dezembro de 2000. O estudo demonstrou que as áreas com maior incidência da doença também tem a maior proporção de pessoas com isolados genotipicamente similares. Concluíram assim, que o uso de análises do SIG combinado com a vigilância epidemiológica molecular pode ser um método eficaz para identificar a transmissão da TB.

Tanser e Le Sueur (2002), em um artigo de revisão, discutiram análises do SIG com algumas das doenças endêmicas na África, como TB, HIV e malária, verificando que para algumas doenças a relação entre o componente ambiental e a determinação da intensidade de transmissão é alta, como doenças transmitidas por vetores. Já para doenças não transmissíveis essa associação é muito pequena. Em doenças infecciosas transmissíveis, como HIV e TB, existe uma relação moderadamente forte entre espaço e transmissão e, conseqüentemente, são importantes campos para se associar o uso do SIG.

No Brasil, alguns estudos também associaram o georreferenciamento com doenças como dengue, HIV, pneumonia e TB em várias cidades (Andrade et al. 2004; Barcellos et al. 2005; Souza et al. 2005; Barcellos et al. 2006). Santos et al. (2004) analisaram o SIG para descrever a distribuição espacial dos casos notificados de TB no município de Ribeirão Preto para o período 1990 a 2000, observando que a doença esteve concentrada nas regiões de baixa renda, o estudo também permitiu visualizar graficamente a evolução da epidemia da TB na cidade contribuindo para o conhecimento da distribuição da doença.

A análise espacial dos eventos, segundo Câmara e Carvalho (2002), pode ser expressa através de ocorrências pontuais ou em áreas, cujas localizações são expressas em um SIG por meio de pontos, linhas e polígonos. A representação pontual relaciona-se a fenômenos expressos através de ocorrências identificadas como pontos localizados no espaço, tais como a ocorrência de doenças. O objetivo destas análises foi estudar a distribuição destes pontos, testando hipóteses sobre o padrão observado: se é aleatório, se apresenta em aglomerados ou se os pontos estão regularmente distribuídos, sendo o objeto de estudo a própria localização dos eventos (Hino 2004). Portanto, o georreferenciamento juntamente com o estudo da variabilidade genética das cepas de *M. tuberculosis*, realizada por técnicas moleculares, possibilita detectar áreas vulneráveis, nas quais os problemas de saúde ocorrem com maior frequência e gravidade,

compreendendo os fluxos de disseminação dos agentes e auxiliando a propor estratégias de vigilância e controle da doença.

2 JUSTIFICATIVA

Identificar e acompanhar rotas das transmissões de doenças causadas por micobactérias é de fundamental importância para o monitoramento e estabelecimento de estratégias de controle das doenças causadas por bactérias deste grupo.

A técnica de RFLP-IS6110 foi implantada no Laboratório de Bacteriologia Molecular do IPTSP-UFG por Santos (2008) para analisar isolados de *M. tuberculosis* coletados de pacientes com TB pulmonar atendidos na cidade de Goiânia entre os anos de 2006 e 2007. Foram analisadas amostras isoladas de 126 pacientes, e observou-se que 43% das amostras foram agrupadas em 24 *clusters* por esta técnica, 18 *clusters* com dois isolados cada um, e seis com três isolados cada. Supõe-se, geralmente, que o nível de agrupamento entre isolados de *M. tuberculosis* a partir de uma determinada região está diretamente associado ao nível de transmissão recente (Dale et al. 1999; Vukovic et al. 2003). Desta forma, quanto mais agrupadas estiverem as amostras de *M. tuberculosis* geneticamente idênticas, maior a probabilidade de este agrupamento genético ser decorrente de uma transmissão recente. A transmissão recente impede que haja introdução de variabilidade genética suficientes a ponto de os isolados serem diferenciados em grupos distintos. A predominância de *clusters* contendo número pequeno de isolados naquele estudo sugeriu que a transmissão da TB nos pacientes atendidos na cidade de Goiânia se tratava, possivelmente, de pequenos surtos envolvendo diferentes linhagens de *M. tuberculosis*. Aqueles dados refletiam a importância de se continuar o estudo, a fim de aprofundar informações epidemiológicas das cepas circulantes com uso de técnicas mais discriminatórias e eficazes.

Apesar de a técnica de RFLP-IS6110 ser adotada como padrão mundial, muitos trabalhos já estão abordando outras estratégias para contornar os problemas encontrados como a dificuldade de se executar a técnica, e os casos de isolados com baixo número de cópias. Assim, a proposta do presente estudo foi introduzir a técnica de tipagem molecular por MIRU-VNTR que tem se mostrado tão discriminatória, ou mais que RFLP-IS6110, sendo um método de fácil execução no cenário laboratorial.

Com a implementação de MIRU-VNTR, espera-se observar focos de TB e estabelecer possíveis ligações epidemiológicas entre os casos da doença, identificando cadeias de transmissão e discriminando os isolados. Também poderemos comparar os resultados encontrados pelas duas técnicas em isolados de pacientes atendidos no município de Goiânia, uma vez que este estudo é pioneiro nesta área, podendo assim

traçar um perfil específico das cepas circulantes no Estado de Goiás e na cidade de Goiânia e estudar métodos mais adequados e com bons resultados para se interromper focos de transmissão da doença.

Adicionalmente, o estudo do georreferenciamento resultará em um melhor entendimento da TB em Goiás, analisando a distribuição espacial dos casos por distrito administrativo, relacionando com variáveis sócio-epidemiológicas e sócio-econômicas. Avaliaremos também, possíveis agrupamentos de casos geneticamente idênticos buscando identificar vínculos de transmissão da TB no município de Goiânia-GO.

Com essas análises, pretendemos contribuir para o entendimento da situação atual das doenças causadas por micobactérias, em Goiás, por meio da análise espacial e epidemiológica. Esses dados são de vital importância para alimentar os programas de controle da TB tanto regional quanto nacional para que se possam estabelecer estratégias e ações de controle assim como nos programas de vigilância de infecções por micobactérias atípicas.

A abordagem por epidemiologia molecular da TB, realizada neste estudo, é de grande interesse para Saúde Pública, pois traz informações úteis e benéficas para que sejam tomadas atitudes práticas e imediatas, facilitando a comparação dos resultados obtidos com outros estudos de forma confiável e segura.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar a diversidade genética dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* coletados de pacientes atendidos em dois Hospitais de Referência no município de Goiânia-GO, no período de janeiro de 2006 a junho de 2007 e avaliar a distribuição geo-espacial dos casos de TB de pacientes residentes na cidade de Goiânia-GO no ano de 2007.

3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar análise de polimorfismo de 15 *loci* através de MIRU-VNTR de cepas de *M. tuberculosis* isolados de pacientes atendidos em Goiânia;
- Identificar possíveis *clusters* de transmissão;
- Determinar a diversidade alélica de cada um dos 15 *loci* analisados;
- Determinar a relação genética entre os isolados de *M. tuberculosis*;
- Comparar os resultados de MIRU-VNTR obtidos com os resultados determinados por RFLP-IS6110 (Santos 2008), e o poder discriminatório de cada uma das técnicas;
- Avaliar pelo georreferenciamento a distribuição espacial dos casos de TB diagnosticados em pacientes residentes na cidade de Goiânia no ano de 2007, a fim de pesquisar possíveis vínculos epidemiológicos;
- Analisar os perfis genotípicos pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR das cepas circulantes dos pacientes residentes na cidade de Goiânia-GO, portadores de TB pulmonar e analisar associação geo-espacial dos *clusters*;
- Avaliar a associação entre as variáveis sócio-econômicas e a distribuição espacial de casos de TB em Goiânia-GO.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

Trata-se de um estudo transversal de genotipagem molecular de isolados clínicos de *M. tuberculosis* e georreferenciamento dos casos de TB.

As coletas das amostras usadas para genotipagem foram realizadas de acordo com as normas de conduta da ética médica, após assinatura dos termos de consentimento, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (UFG N° 006/2005) (Anexo I), pelos pacientes e/ou seus responsáveis, nos quais estavam claros os procedimentos e objetivos do projeto, bem como anexado um questionário da história epidemiológica de cada paciente (Anexo II).

4.2 RECRUTAMENTO DOS CASOS E COLETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS

Para o estudo de genotipagem foram usados os DNAs provenientes de um estudo anterior (Santos 2008), onde foram coletados 175 amostras de escarro de pacientes atendidos no Hospital de Doenças Tropicais (HDT) Anuar Auad e no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica de Goiânia, de acordo com suspeita clínica de TB pulmonar, no período de janeiro de 2006 a junho de 2007. Não houve discriminação quanto à raça, sexo, idade, nem quanto ao tipo de TB (primária ou recorrente). Todos os participantes foram entrevistados e as variáveis investigadas foram idade, sexo, cicatriz vacinal de BCG e fatores predisponentes para TB.

4.3 BACILOSCOPIA E CULTURA

Foi realizado baciloscopia pela técnica de Ziehl-Neelsen nos respectivos locais de coleta (HDT e/ou Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica de Goiânia). As amostras que apresentaram baciloscopia positiva foram encaminhadas para o Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN-GO) para posterior semeadura em meio de cultura e testes de identificação de espécie. Os espécimes encaminhados ao LACEN foram processados para cultura após descontaminação prévia pela técnica de Petroff (1915) e, em seguida, semeados em tubos de ensaio contendo meio de cultura sólido Löwenstein-Jensen (L-J) adicionados de ovo, glicerol e asparagina. O crescimento foi acompanhado por um período de até oito semanas em estufa a 37°C, e confirmada pelas características fenotípicas de cada cultura, como cor creme e rugosa na superfície do meio. As provas realizadas para identificação da

espécie foram as provas bioquímicas de niacina, redução dos nitratos e catalase termoresistente associado aos testes de inibição de crescimento pelo ácido p-nitrobenzóico (PNB-500 µg/ml) e pela hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH-2 µg/ml) (MS 2004; Santos 2008).

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

As culturas de *M. tuberculosis* foram inativadas a 80°C por 20 minutos por questão de biossegurança ainda no LACEN e transportadas para o laboratório de Bacteriologia Molecular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, onde foram feitos os procedimentos para extração do DNA segundo a técnica de van Soolingen et al. (1994). O equivalente a duas alçadas de cada cultura foram ressuspensas em 400 µL de tampão TE por agitação. À suspensão foram adicionadas 50 µL de lisozima (20 mg/mL) e incubadas por 1 hora a 37°C. Após incubação, foram acrescentados 70 µL de SDS a 10% e 12 µL de proteinase K (20 mg/mL), o sistema foi incubado a 56°C por 10 minutos. Após incubação, 100 µL de NaCl a 5 M foram adicionados seguidos de 80 µL de solução CTAB/NaCl (10% CTAB 0,73 NaCl), o tubo foi agitado até a solução se tornar leitosa e então incubado por mais 10 minutos a 65°C. Adicionou-se um volume de 650 µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1, v/v) seguido de agitação por 30 segundos e centrifugação por 5 minutos a 12000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo identificado e precipitado através da adição de 400 µL de isopropanol gelado e incubado a uma temperatura de -20°C por 24 horas. O ácido nucléico foi coletado por centrifugação a 12000 g por 20 minutos, lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. Após secagem, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de Água MiliQ e armazenado a -20°C.

4.5 ANÁLISE DE MIRU-VNTR

Os DNAs extraídos foram quantificados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, através da apreciação visual. Foram analisados 15 *loci* MIRU-VNTR que possuem um bom poder discriminatório, segundo Supply et al. (2006). Foram realizadas PCR para cada *locus* específico.

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados no estudo e apresentados na Tabela II foram definidos de acordo com Alonso-Rodrigues et al. (2008) para os seguintes *loci*: 580 (Miru 4), 2996 (Miru 26), 802 (Miru 40), 960 (Miru 10), 1644 (Miru

16), 3192 (Miru 31), 424 (Mtub 04), 577 (ETRC), 2165 (ETRA), 2401 (Mtub 30), 3690 (Mtub 39), 4156 (QUB 4156), 2163b (QUB 11b), 1995 (Mtub 21) e 4052 (QUB 26). Este tipo de abordagem torna possível um maior número de análises e identificação de mais focos de contágio na população, podendo assim estudar métodos mais adequados para interromper a transmissão da doença (Supply et al. 2001).

Tabela II. Sequência dos 15 oligonucleotídeos iniciadores usados no estudo.

<i>Locus</i>	Alelo	Tamanho da unidade repetitiva em pb	Sequência do oligonucleotídeos no sentido 5' - 3'.	Temperatura de anelamento
580kpb	Miru04	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC	58°C
			GCGCAGCAGAAACGTCAGC	
2996kpb	Miru26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	53°C
			CATAGGCGACCAGGCGAATAG	
802kpb	Miru40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT	53°C
			GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	
960kpb	Miru10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	58°C
			GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	
1644kpb	Miru16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA	58°C
			CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	
3192kpb	Miru31	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	53°C
			GTGCCGACGTGGTCTTGAT	
424kpb	Mtub04	51	CTTGCCCGGCATCAAGCGCATTATT	58°C
			GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC	
577kpb	ETRC	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT	53°C
			AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA	
2165kpb	ETRA	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	58°C
			CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	
2401kpb	Mtub30	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT	58°C
			ACTTGAACCCCCACGCCCATTAGTA	
3690kpb	Mtub39	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC	58°C
			TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	
4156kpb	QUB-4156	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT	53°C
			GCCGGCGTCCATGTT	
2163bkpb	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG	53°C
			CGAAGTGAATGGTGGCAT	
1955kpb	Mtub21	57	AGATCCCAAGTTGTCGTCGTC	53°C
			CAACATCGCCTGGTTCTGTA	
4052kpb	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT	53°C
			CGGCCGTGCCGCCAGGTCCTTCCCGAT	

Os sistemas de PCR foram preparados para um volume final de 30µL, onde, em tubos de 0,2 mL foram acrescentados 20 µg de DNA, Tampão Green GoTaq (Promega), 0,47 µM de cada oligonucleotídeo iniciador específico, 250 µM de cada dNTPs, e 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). O termociclador modelo MJ96G (Biocycler) ou Multigene (Labnet) foi programado segundo protocolo de Supply (2005), com algumas modificações (Quadro I). A temperatura de anelamento programada foi de 53°C ou 58°C de acordo com o valor da temperatura de anelamento (T_m) de cada par de

oligonucleotídeos iniciadores, indicado pelo fabricante, descrito na Tabela II. O DNA extraído da cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv foi incluído em todas as reações de amplificação como controle positivo enquanto que o controle negativo da reação consistiu de água ultra-pura no lugar do DNA.

Quadro I. Condições da PCR usada nas amostras de *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica de MIRU-VNTR.

PASSO	TEMPO	TEMPERATURA	NÚMERO DE CICLOS
Desnaturação inicial	4 minutos	95°C	1
Desnaturação	50 segundos	92°C	35
Anelamento	1 minuto	53 / 58 °C*	
Extensão	1 minuto	72°C	
Extensão final	4 minutos	72°C	1
Estoque/Armazenamento	Ininterrupto	10°C	-

*Depende do par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado, ver tabela II.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, submetido à eletroforese com 4V por cm durante um período de 7 horas em cuba de 24 cm. Em cada gel foi aplicado um marcador de 100 pb (Invitrogen) assim como o produto da PCR da cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv para auxiliar na determinação dos alelos gerados. Os géis de agarose contendo os produtos das PCRs foram visualizados e a imagem digitalizada no aparelho Gel Doc System (BioRad). O tamanho dos produtos de cada amostra foi determinado com auxílio do software Quantity One 4.6.7 (BioRad). Para tanto, as imagens digitalizadas dos géis foram primeiro processadas para que o software Quantity One reconhecesse as faixas presentes em cada gel. Em seguida definiu-se as bandas de tamanhos conhecidos do marcador de 100 pb e, posteriormente, a posição exata de cada banda aplicada no gel para que o software determinasse então, o tamanho da banda correspondente a amplificação para cada amostra com base no marcador. Foi usado o modelo de Regressão Point-to-Point Semi-Log, apropriado para a descrição do tamanho da banda correspondente à migração no gel. Baseado no tamanho do produto da amostra para cada *locus* e consultando tabela específica (Quadro II) (Supply 2005), que mostra o valor do alelo correspondente ao tamanho da banda observada no gel, os resultados foram expressos em códigos numéricos.

Quadro II. Tamanho em pares de bases referente a cada alelo (número de cópias) para cada um dos 15 *loci* analisados segundo Supply (2005).

Alelo	Mtub 04	ETRC	Miru 04	Miru 40	Miru 10	Miru 16	Mtub 21	QUB 11b	ETRA	Mtub 30	Miru 26	Miru 31	Mtub 39	QUB 26	QUB 4156
0	537	171	175	354	482	565	92	77	195	247	285	492	272	187	563
1	588	208	252	408	537	618	149	146	270	305	336	545	330	298	622
2	639	266	329	462	590	671	206	215	345	363	387	598	388	409	681
3	690	324	406	516	643	724	263	284	420	421	438	651	446	520	740
4	741	382	483	570	696	777	320	353	495	479	489	704	504	631	799
5	792	440	560	624	749	830	377	422	570	537	540	757	562	742	858
6	843	498	637	678	802	883	434	491	645	595	591	810	620	853	917
7	894	556	714	732	855	936	491	560	720	653	642	863	678	964	976
8	945	614	791	786	908	989	548	629	795	711	693	916	736	1075	1035
9	996	672	868	840	961	1042	605	698	870	769	744	969	794	1186	1094
10	1047	730	945	894	1014	1095	662	767	945	827	795	1022	852	1297	1153
11	1098	788	1022	948	1067	1148	719	836	1020	885	846	1075	910	1408	1212
12	1149	846	1099	1002	1120	1201	776	905	1095	943	897	1128	968	1519	1271
13	1200	904	1176	1056	1173	1254	833	974	1170	1001	948	1181	1026	1630	1330
14	1251	962	1253	1110	1226	1307	890	1043	1245	1059	999	1234	1084	1741	1389
15	1302	1020	1330	1164	1279	1360	947	1112	1320	1117	1050	1287	1142	1852	1448

Uma vez definidos todos os alelos para os 15 *loci* analisados de todas as amostras, uma planilha foi confeccionada em Excel (Microsoft) com os valores correspondentes ao número de repetições para submeter à análise na plataforma MIRU-VNTRplus (www.miru-vntrplus.org) (Weniger et al. 2007). O dendrograma foi gerado, usando algoritmo de *clustering* UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic average). Isolados que apresentaram perfis genéticos idênticos foram considerados como pertencentes ao mesmo grupo (*clusters*) (Asgharzadeh et al. 2006).

Na plataforma MIRU-VNTRplus pode-se comparar as estirpes em estudo com outras 186 estirpes de referência, presentes na base de dados. Para essa comparação, estão disponíveis vários coeficientes de similaridade, sendo o coeficiente de diferença entre *loci* o padrão adotado para a análise. Este coeficiente de diferença divide o número de marcadores com um alelo diferente, pelo total de marcadores usados. Para o presente estudo foi usado o limite máximo de 0,17, o mesmo proposto pelo site, o que corresponde a uma tolerância de dois *loci* de diferença entre as estirpes.

O poder discriminatório da técnica e de cada alelo encontrado foi calculado usando a fórmula descrita por Hunter e Gaston (1988) (disponível no endereço eletrônico: http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/):

$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S x_j(x_j - 1)$ onde D é o índice do poder discriminatório, N o número de linhagens testadas não relacionadas, S o número de tipos diferentes, e x_j o número de cepas pertencentes ao tipo j, assumindo que os agrupamentos serão classificados em categorias exclusivas (Hunter & Gaston 1988).

4.6 GEORREFERENCIAMENTO DOS CASOS DE TUBERCULOSE DIAGNOSTICADOS EM 2007

4.6.1 População de estudo de georreferenciamento e casuística

Para o estudo de georreferenciamento, foram adotados como critério de inclusão todos os pacientes com TB (qualquer forma clínica), notificados à Secretaria Municipal de Saúde (SMS) durante todo o ano de 2007, residentes com endereço fixo no município de Goiânia. Os critérios de exclusão foram indivíduos provenientes de outras cidades, moradores de rua ou em regime prisional. As características epidemiológicas destes indivíduos foram obtidas no banco de dados da SMS. As variáveis sócio-demográficas e clínicas selecionadas foram: sexo, endereço de residência e forma clínica da TB.

Das amostras coletadas para o estudo molecular descrita acima (item 4.2), 50 eram de indivíduos que atendiam os critérios para inclusão no estudo de georreferenciamento. Estas 50 amostras foram renumeradas em ordem crescente para facilitar a análise de comparação no mapa. Todos os participantes deste estudo foram entrevistados para se obter as seguintes variáveis: idade, sexo, cicatriz vacinal de BCG e fatores predisponentes para o desenvolvimento da TB.

Foram realizadas análises estatísticas buscando avaliar possíveis correlações entre o agrupamento dessas 50 amostras com os fatores sócio-epidemiológicos, os resultados foram gerados usando análise univariada, utilizando a versão EpiInfo software 6,03 (CDC, Atlanta, GA, E.U.A; domínio público).

4.6.2 Área de estudo

O estudo foi realizado no Município de Goiânia, capital do Estado de Goiás, localizado na Região Centro-Oeste do Brasil. A cidade está localizada nas coordenadas geográficas 49° 00' – 49° 45' W e 16° 30' – 17° 00'S, possui uma área de 741 quilômetros quadrados e uma população total de 1.302.001 habitantes. Uma cidade

altamente urbanizada com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 0,832, superior à média nacional de 0,8 (IBGE 2010).

Seus limites geográficos são: ao norte, o município de Nerópolis e Goianópolis; ao sul, Aparecida de Goiânia; a leste, Bela Vista; e, a oeste Goianira e Trindade. Apresenta 270 dias de sol durante o ano e seu clima é ameno, com temperaturas variando entre 22° C e 33° C, na maior parte do ano.

O Instituto Nacional de Geografia e Estatística (IBGE) define um setor censitário como a menor unidade geográfica para a qual o censo e os dados econômicos estão disponíveis. Portanto unidades territoriais são definidas para orientar a distribuição espacial da população, existindo mais de 200.000 em todo o Brasil. As unidades territoriais em Goiânia são agrupadas em 63 divisões administrativas, chamadas distritos, que compreendem as áreas do município que são relativamente homogêneas quanto às características da população, condições de vida e situação econômica. O IBGE e a Divisão de Processamento de Dados do Município de Goiânia (Comdata) classificam os 63 distritos urbanos em nível socioeconômico, assumindo o dobro do salário mínimo vigente (aproximadamente 108 dólares/mês) para chefes de família como o ponto de corte para a definição da linha de pobreza (Figura 2) (Municipal 1992; Andrade et al. 2004). Segundo o IBGE (2008), o município de Goiânia não participou da contagem do número de habitantes por distritos administrativos referentes ao ano de 2007, período em que este estudo foi realizado.

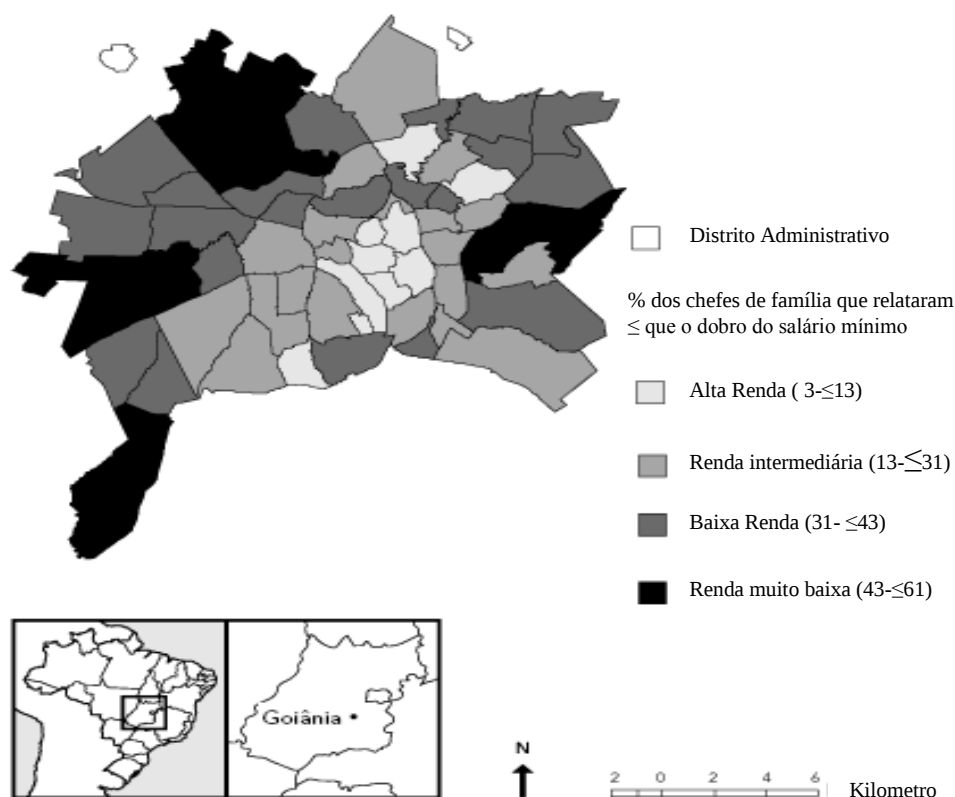


Figura 2. Padrão socioeconômico por distrito de acordo com a renda por chefe de família. Município de Goiânia. Estado de Goiás. Brasil. Adaptado de Andrade et al. (2004).

4.6.3 Georreferenciamento dos casos

O mapa digital de Goiânia, exibindo ruas e lotes, foi utilizado para a localização das residências dos pacientes de acordo com dados do IBGE (2002). Os endereços das casas foram manualmente geocodificados a partir de pontos individuais, utilizando o software de informações geográficas ArcView 3.2 (Environmental Systems Research Institute, Inc., Redlands, U.S.A.), gerando um mapa dos casos, que foi incorporado à camada dos distritos. O aglomeramento de casos foi avaliado pela técnica de Kernel, disponível também pelo software ArcView 3.2, usando densidade de pontos por quilômetro quadrado.

O estudo sobre o georreferenciamento gerou um manuscrito submetido ao Jornal BMC Public Health, intitulado: “A pilot study on georeferencing and genotyping of

Mycobacterium tuberculosis isolates in Goiânia, Goiás”, conforme Anexo III. O manuscrito está apresentado no Anexo IV.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES CUJAS AMOSTRAS FORAM GENOTIPADAS

Este estudo é complementar ao trabalho de Santos (2008) onde, no período de janeiro de 2006 a junho de 2007, foram coletadas 175 amostras de escarro de pacientes com suspeita de TB pulmonar, atendidos em dois centros de saúde de referência em TB na cidade de Goiânia. Vinte e sete amostras (15%) foram descartadas por apresentarem cultura negativa para *M. tuberculosis* e seis amostras (3%) por serem identificadas como micobactérias atípicas, resultando em um total de 142 isolados de *M. tuberculosis* viáveis para a extração de DNA (Santos 2008). Para nosso estudo, o DNA de 119 isolados de *M. tuberculosis* estavam disponíveis para realizar os ensaios de tipagem molecular pela técnica de MIRU-VNTR. Os isolados eram oriundos de uma população com predominância do sexo masculino (78,1%), economicamente ativa e com uma média de idade de 33 anos. Desses pacientes, 102 (85,7%) portavam tuberculose primária e 17 (14,3%) tratavam de tuberculose recorrente. Setenta e quatro pacientes (62,1%) tinham fatores predisponentes ao desenvolvimento da TB sendo os mais frequentes nestes casos, o tabagismo, alcoolismo e co-infecção com HIV.

A maioria dos pacientes (47%) residia na cidade de Goiânia, capital do estado, enquanto que 10,9% dos casos eram de pacientes residentes na cidade de Aparecida de Goiânia, que faz divisa com a capital. Pacientes de outros municípios goianos somaram 31%, enquanto que 10,9% dos pacientes residiam em outros sete Estados brasileiros: Bahia, Tocantis, Piauí, Minas Gerais, São Paulo, Maranhão e Mato Grosso (Figura 3).

Procedência dos Pacientes Incluídos no Estudo

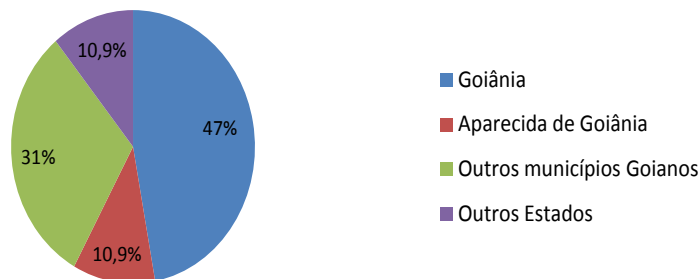


Figura 3: Distribuição da frequência dos pacientes incluídos no estudo de acordo com a residência.

5.2 GENOTIPAGEM PELA TÉCNICA DE MIRU-VNTR

Foi realizada uma PCR individual para cada um dos 15 loci analisados usando o DNA genômico extraído das 119 amostras isoladas e os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose. A Figura 4 representa um resultado típico da amplificação do *locus* Miru 26 e sua análise em um gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. Neste exemplo, o tamanho das bandas foi calculado após digitalização do gel e identificação das bandas do marcador de 100pb, aplicado no gel em duas posições para minimizar o efeito da distorção da corrida de eletroforese. A imagem digitalizada do gel foi analisada no software Quantity One (BioRad), que permitiu definir com exatidão o tamanho de todas as bandas amplificadas das amostras teste. Uma vez definidos os tamanhos das bandas, estas foram então codificadas de acordo com o número de cópias (alelos) que representam para o *locus* específico através de consulta da tabela de Supply (2005), apresentada no Quadro II. Desta forma, o número de cópias correspondente ao tamanho determinado de cada amostra para o *locus* analisado, no exemplo da Figura 4, está apresentado no Quadro III.

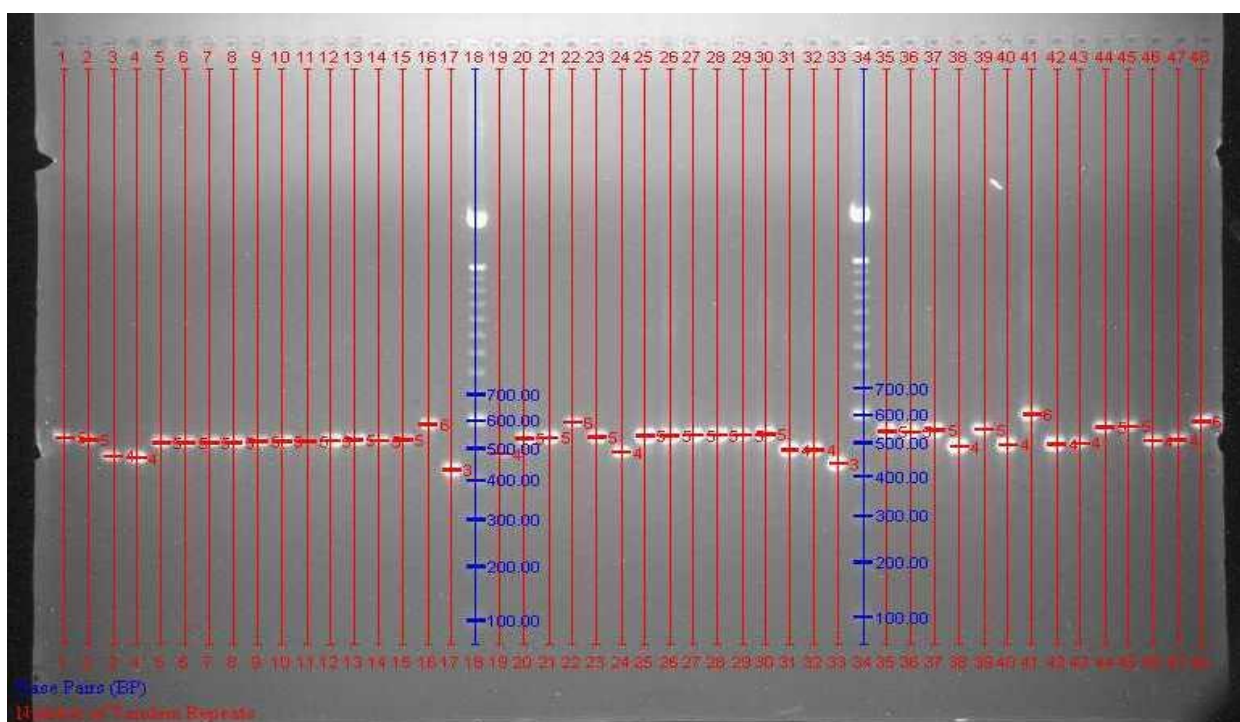


Figura 4. Imagem digitalizada do gel de agarose a 1,5% apresentando os produtos de PCR de algumas das amostras analisadas para o *locus* Miru26. Para fins de comparação foram aplicados nos poços 18 e 34 o marcador de 100pb (Invitrogen) e nos poços 17 e 33 o produto de PCR usando o DNA da cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv como controle positivo. O tamanho de cada produto foi determinado pelo software Quantity One (BioRad) e o alelo correspondente ao tamanho do produto foi anotado ao lado de cada produto no gel.

Quadro III. Definição do número de cópias após corrida em gel referente ao *locus* Miru 26 da Figura 4.

Poços no gel/amostras	Tamanho encontrado	Tamanho esperado (Supply 2005)	Número de cópias/alelos
1, 2, 5 a 15, 20, 21, 23, 25 a 30, 35 a 37, 39, 44, 45 e 48	537	540	5
3, 4, 19, 24, 31, 32, 38, 40, 42, 43, 46, 47	480	489	4
16, 22 e 41	584	591	6
17 e 33 (padrão H37Rv)	430	438	3

Após a definição dos alelos correspondentes para os 15 *loci* de todas as amostras, um dendrograma foi gerado no site MIRU-VNTRplus. Foram encontrados 110 genótipos distintos, destes 105 apresentaram perfis únicos e catorze amostras agruparam em cinco grupos (*cluster*) genéticos com 100% de similaridade. Dois

agrupamentos com duas amostras cada, denominados G2 e G3; dois agrupamentos com três amostras cada, denominados G1 e G5 e um agrupamento com quatro amostras, denominado G4 (Figura 5). Os perfis alélicos para cada *loci* de cada cepa também estão apresentados na Figura 5. Oito amostras não amplificaram em alguns *loci* mesmo após repetidas tentativas, são eles: amostra 13, *locus* QUB26; amostra 25, *locus* ETRA; amostras 38 e 84, *locus* Mtub04; amostras 89 e 154, *locus* Mtub39; amostra 150, *locus* QUB4156 e amostra 152, *locus* Miru10.

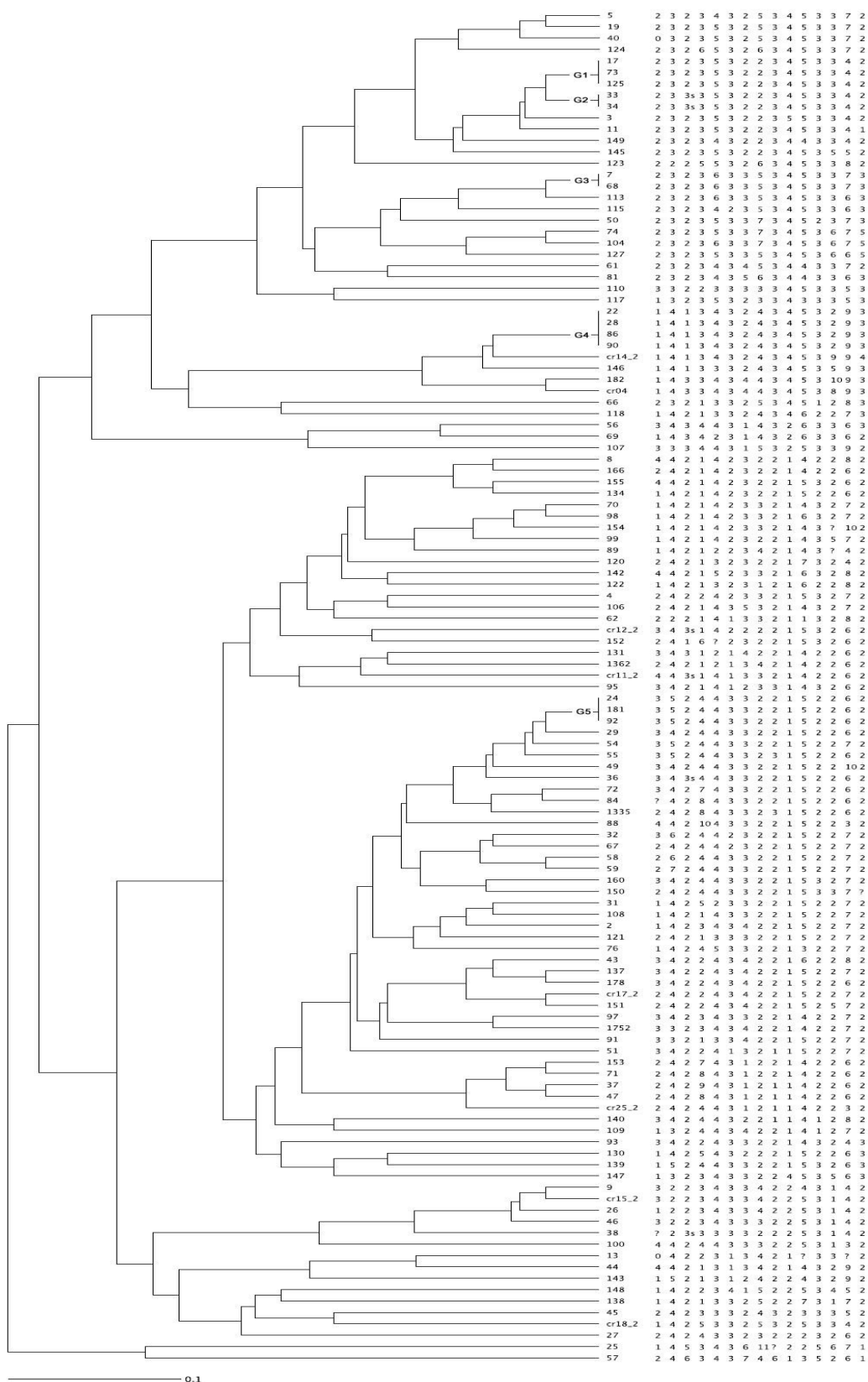


Figura 5. Dendrograma produzido com os resultados do número de cópias de cada isolado pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR. Os números de cópias (alelos) de cada *loci* estão apresentados à direita de cada isolado na seguinte ordem: Mtub 04, ETRC, Miru 04, Miru 40, Miru 10, Miru 16, Mtub 21, QUB 11b, ETRA, Mtub 30, Miru 26, Miru 31, Mtub 39, QUB 26, QUB 4156.

Dentre as catorze amostras agrupadas em *clusters*, não foi possível estabelecer algum tipo de ligação epidemiológica entre cada agrupamento. Em apenas um caso (amostra 22) tratava-se de TB anterior. Uma parte desses pacientes apresentava fatores predisponentes para o desenvolvimento da doença, como tabagismo (amostras 17, 34, 68, 28, 86, 90, 24, 181 e 92), HIV (amostras 68, 22, 86 e 181) e apenas um paciente usava drogas ilícitas (amostra 92).

Os valores da diversidade alélica nas amostras analisadas foram calculados para cada *locus* e estão apresentados na Tabela III. Os MIRU-VNTRs: QUB26, Miru 40, Mtub 04, QUB11b e Mtub 21 apresentaram alto poder discriminatório segundo Sola et al. (2003), sendo o Miru 40 o mais polimórfico com dez alelos. Todos os demais *loci* apresentaram moderado poder discriminatório. São eles: Mtub 39, Mtub 30, ETRC, Miru 10, Miru 26, ETRA, Miru 31, QUB 4156, Miru 16 e Miru 04.

Tabela III. Diversidade alélica de cada *loci* e número de ocorrência de cada alelo.

<i>Loci</i>	Diversidade Alélica (h)	Número de Alelos	Número de Repetições	Discriminação ^a
QUB 26	0,78	8	3-10	Alta
Miru 40	0,77	10	1-10	Alta
Mtub 04	0,70	5	0-4	Alta
QUB 11b	0,67	8	1-7;11	Alta
Mtub 21	0,65	7	1-7	Alta
Mtub 39	0,59	9	1-6;8-10	Moderada
Mtub 30	0,58	4	1-2;4-5	Moderada
ETRC	0,57	6	2-7	Moderada
Miru 10	0,56	5	2-6	Moderada
Miru 26	0,54	7	1-7	Moderada
ETRA	0,53	4	1-3;6	Moderada
Miru 31	0,52	4	1-3;5	Moderada
QUB4156	0,39	5	1-5	Moderada
Miru 16	0,38	4	1-4	Moderada
Miru 04	0,31	6	1-3;3s;5-6	Moderada

a. A discriminação é definida de acordo com a diversidade alélica (h) como: Alta ($h > 0,6$), Moderada ($0,3 \leq h \leq 0,6$) e Baixa ($h < 0,3$) (Sola et al. 2003).

Foi realizada uma comparação do perfil das 119 amostras estudadas com o banco de dados do site www.miru-vntrplus.org que contém 186 isolados de vários países já caracterizados. Foi usado o limite padrão de distância proposto pelo site de 0,17 que corresponde a uma tolerância de até dois *loci* de diferença para serem considerados um mesmo *cluster*. A maioria de nossos isolados (82,3%) possuíam perfis de MIRU-VNTR sem semelhança aos isolados presentes no banco de dados, enquanto que 12,6% dos genótipos analisados em nosso estudo foram similares ao de cepas LAM (amostras 9; 24; 26; 29; 54; 55; 72; 142; 181; 36; cr15_2; 46; 49; 84; 92). Seis isolados (5,0%) apresentaram similaridade a cepas Haarlem (amostras 7, 19, 68, 50, 113 e 117).

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE A TÉCNICA 15 *loci* MIRU-VNTR COM A TÉCNICA PADRÃO RFLP-IS6110

Cento e sete dos 119 isolados analisados pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR também haviam sido genotipados pela técnica de RFLP-IS6110 em estudo anterior (Santos 2008) e, portanto, permitiram que as duas técnicas fossem comparadas. A análise molecular das 107 amostras pelas duas técnicas demonstrou que a técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR discriminou mais os isolados que a técnica de RFLP-IS6110, agrupando apenas 9,34% das amostras e, portanto apresentou maior poder discriminatório (Tabela IV).

Tabela IV. Número de perfis encontrados, agrupamentos e poder discriminatório dos métodos usados no estudo.

Método	Número total de perfis	Perfis contendo uma única amostra	Perfis contendo mais de uma amostra agrupada	Poder Discriminatório
15 <i>loci</i> MIRU-VNTR	101	97	4	0,9986
RFLP-IS6110	80	58	22	0,9942

A técnica 15 *loci* MIRU-VNTR permitiu discriminar 44 isolados agrupados pela técnica de RFLP-IS6110 (designados por números precedidos da letra R na Figura 6). As amostras agrupadas por RFLP-IS6110 de R2 a R9; R12 e R13; R15, R16 e R19 a R22; apresentaram perfis únicos pelo método de 15 *loci* MIRU-VNTR (amostras 142, 89, 106, 120, 04, 107, 76, 40, 74, 118, 123, 100, 91, 47, 72, 9, 1335, 130, 145, 1752, 56,

08, 121, 137, 55, 153, 71, 37, 49, 122, 131, 151 e 155). Igualmente, uma amostra do agrupamento R1 (Cr14), uma do agrupamento R10 (amostra 139), duas amostras do agrupamento R11 (108 e 97), uma do agrupamento R14 (152) e uma amostra do agrupamento R18 (03) pelo método de RFLP-IS6110 não se apresentaram agrupadas pelas análises de 15 *loci* MIRU-VNTR. Quatro amostras (amostras 92, 24, 34 e 33) foram agrupadas em dois grupos distintos pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR (G2 e G4; isolados semelhantes foram designados com números precedido da letra G na técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR), porém nas análises pela técnica de RFLP-IS6110 foram considerados distintos, mas agrupados com outras amostras (grupos R10, R11, R14 e R18, respectivamente). As amostras 22, 28 e 90 se apresentaram igualmente agrupadas por ambas as técnicas (agrupamentos R1 e G3). Da mesma forma, as amostras 73 e 125 permaneceram igualmente agrupadas nas análises por ambas as técnicas (grupos R17 e G1). A amostra 17 apresentou perfil idêntico às amostras 125 e 73 pela análise de 15 *loci* MIRU-VNTR (G1), enquanto que a mesma foi bastante diferenciada pelo método de RFLP-IS6110, se agrupando com as amostras do grupo R14 por esta técnica (Figura 6).

5.4 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO DE GEORREFERENCIAMENTO

De acordo com dados do Sinan Net (MS 2011b), no município de Goiânia foram diagnosticados durante todo o ano de 2007, 426 casos de TB qualquer forma clínica proveniente de pacientes residentes tanto no Estado de Goiás como também de pacientes que residem em outros Estados brasileiros. Após análise individual de cada caso em relação ao endereço dos pacientes, foram excluídos 185 casos (43%) por não atenderem aos critérios de inclusão do estudo, resultando em 241 casos de pacientes portadores de qualquer forma clínica de TB, durante o ano de 2007 e que eram residentes na cidade de Goiânia. Considerando-se a população da cidade na época, este número de casos representa um índice de 19,4/100.000 habitantes. Entre esses casos, houve predominância do sexo masculino (63%), e com idade economicamente ativa. A forma clínica predominante foi a TB pulmonar, responsável por 84,2% dos casos. Os principais fatores predisponentes ao desenvolvimento da TB foram uso do tabaco e álcool.

Do total de 241 indivíduos diagnosticados com TB em Goiânia no ano de 2007 conseguimos obter isolados de 50 casos de TB pulmonar e, estas amostras, foram caracterizadas geneticamente pelo método de MIRU-VNTR. Entre os casos, houve predominância do sexo masculino (82%) com idade entre 30 e 60 anos e essa população apresentava características sócio-epidemiológicas semelhantes ao universo de casos de TB diagnosticados em 2007. Oitenta e dois por cento dos pacientes investigados eram vacinados com BCG e 78% apresentavam algum tipo de predisposição conhecida para o desenvolvimento da TB, como o uso de tabaco (38%) ou álcool (20%), TB anterior (14%), outras doenças como hanseníase e diabetes (38%) ou co- infecção pelo HIV (16%).

5.5 GEORREFERENCIAMENTO DOS CASOS DE TB DIAGNOSTICADOS EM 2007 E RESIDENTES EM GOIÂNIA

Pela análise espacial da distribuição dos casos de TB diagnosticados no ano de 2007 em indivíduos residentes no município de Goiânia, segundo pesquisa pelo SIG, nota-se que a doença está distribuída em todas as regiões do município, predominando nos distritos das regiões do Centro, Noroeste e Leste. Os locais de maior densidade de casos correspondem a distritos urbanos com maior concentração comercial e regiões de baixa renda. Visualmente observam-se distritos que não apresentaram casos de TB,

como alguns distritos da região do Mandanã/Meia Ponte, região Norte, região Sudeste e Oeste (Figura 7).

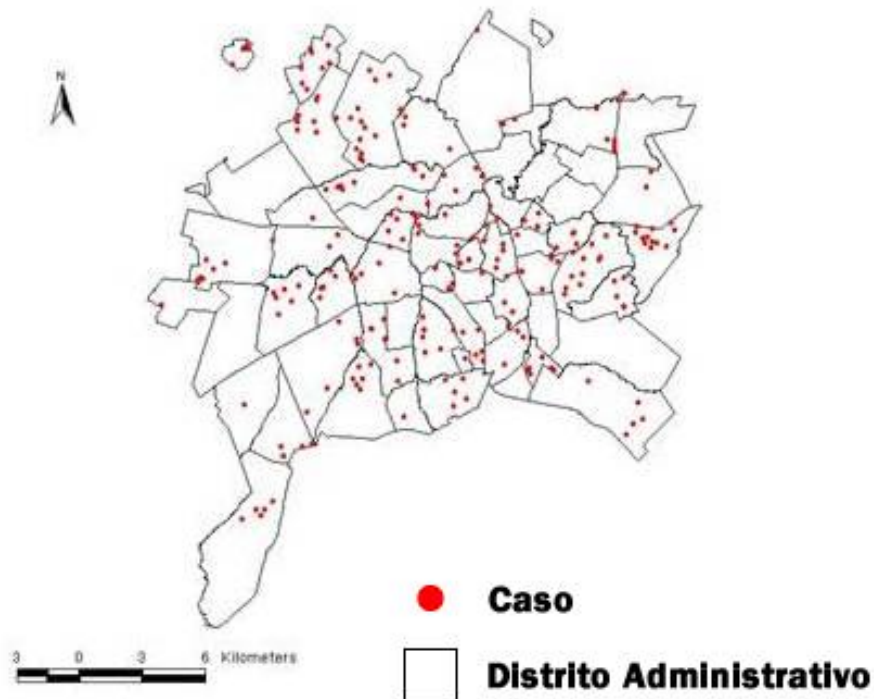


Figura 7. Distribuição espacial dos 241 casos de tuberculose diagnosticados em 2007, de pacientes residentes no município de Goiânia, Estado de Goiás, Brasil, segundo a Secretaria Municipal de Saúde (SMS).

5.6 CORRELAÇÕES ENTRE O GEORREFERENCIAMENTO E GENOTIPAGEM DOS CASOS DIAGNOSTICADOS EM 2007 NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA

Foi realizada uma análise exploratória da localização geográfica de 50 casos de pacientes com TB pulmonar que eram residentes de Goiânia e foram diagnosticados em 2007, utilizando a técnica de Kernel. Por esta técnica foi analisado a densidade de pontos por quilômetro quadrado, conforme demonstrado na Figura 8. De acordo com o mapa pode-se observar uma concentração maior de casos em distritos Centrais (região de Campinas e Centro) e da região Noroeste, assim como uma concentração moderada predominando em distritos das regiões Nordeste, Leste e Sul/Sudeste.

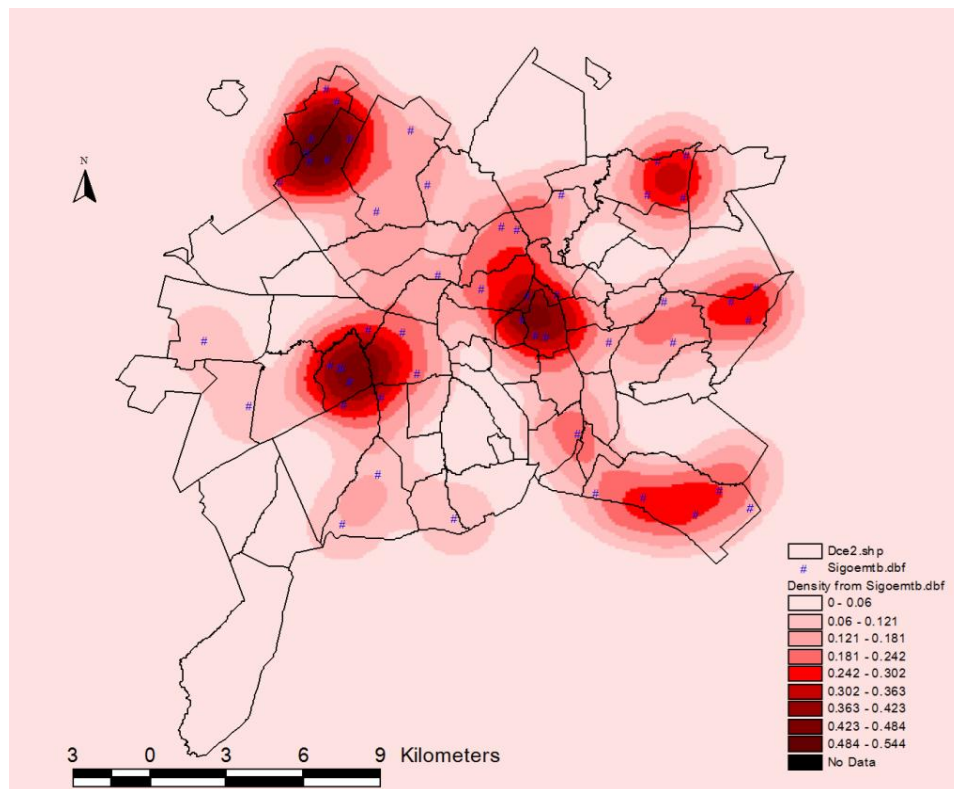


Figura 8. Mapa de densidade de casos, gerado pela técnica de Kernel de 50 isolados genotipados pela técnica de MIRU-VNTR, demonstrando a densidade de casos identificados de TB por quilometro quadrado.

De acordo com as características genéticas obtidas pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR, 43 (86%) isolados tiveram perfis únicos, enquanto sete isolados (14%) se agruparam em três *clusters* distintos, sendo duas amostras em dois *clusters*, e três amostras em um único *cluster* (Figura 9).

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [15]: Categorical

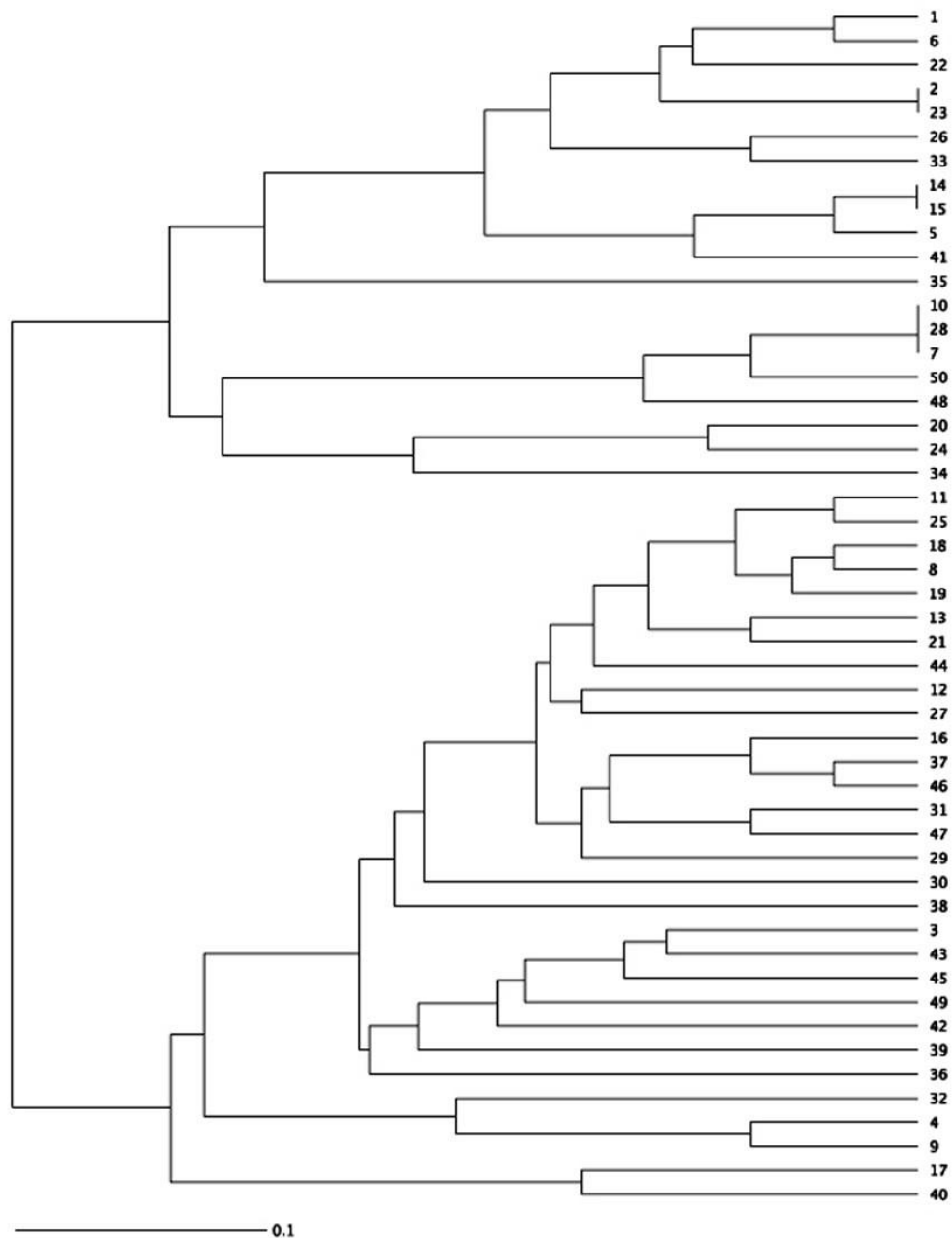


Figura 9. Dendrograma dos perfis genéticos das 50 amostras isoladas de pacientes diagnosticados com TB pulmonar em 2007 e residentes em Goiânia analisadas pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR.

O cálculo da diversidade alélica nesta população permitiu observar que o *locus* mais discriminatório foi o QUB26 com uma diversidade alélica de 0,8, outros sete *loci* apresentaram também alto poder discriminatório, são eles, Miru 40, Mtub 04, QUB 11b, Mtub 21, Mtub 39, ETRC e Mtub 30, sendo o mais polimórfico o Mtub 39 com até 9 alelos. Os demais *loci* apresentaram moderado poder de discriminação. Os valores calculados para cada *loci* estão especificados na Tabela V.

Tabela V. Diversidade alélica de cada *loci* e número de ocorrência de cada alelo dos 50 casos genotipados.

<i>Loci</i>	Diversidade Alélica (h)	Número de alelos	Número de repetições	Discriminação ^a
QUB 26	0,8	7	3-9	Alta
Miru 40	0,73	6	1-5,7	Alta
Mtub04	0,72	4	1-4	Alta
QUB 11b	0,65	5	2-5,7	Alta
Mtub 21	0,64	4	1-4	Alta
Mtub 39	0,63	9	1-4,6-8,10,11	Alta
ETRC	0,62	5	2-6	Alta
Mtub 30	0,6	3	1,2,4	Moderada
ETRA	0,52	3	1-3	Moderada
Miru 10	0,52	5	2-6	Moderada
Miru 26	0,51	3	4-6	Moderada
Miru 31	0,51	3	1-3	Moderada
Miru 04	0,41	4	1-3,3s	Moderada
QUB 4156	0,39	4	2-5	Moderada
Miru 16	0,31	3	1-3	Moderada

a. A discriminação é definida de acordo com a diversidade alélica (h) como: Alta ($h > 0,6$), Moderada ($0,3 \leq h \leq 0,6$) e Baixa ($h < 0,3$) (Sola et al. 2003).

A distribuição espacial dos 50 casos de TB genotipados, ressaltando aqueles que foram geneticamente idênticos é apresentada na Figura 10. Devido ao número reduzido de casos não foi possível realizar uma análise estatística da distribuição geo-espacial dos casos de TB isolados. No entanto pode-se observar que indivíduos infectados por isolados de *M. tuberculosis* geneticamente idênticos, residem em distritos administrativos distintos (Figura 10).

De acordo com o perfil genotípico e a formação de *clusters* encontrados, os pacientes foram avaliados quanto à idade, sexo, vacinação com BCG, e algum tipo de predisposição para o desenvolvimento da TB a fim de identificar possíveis fatores de risco associados à capacidade de agrupamento. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

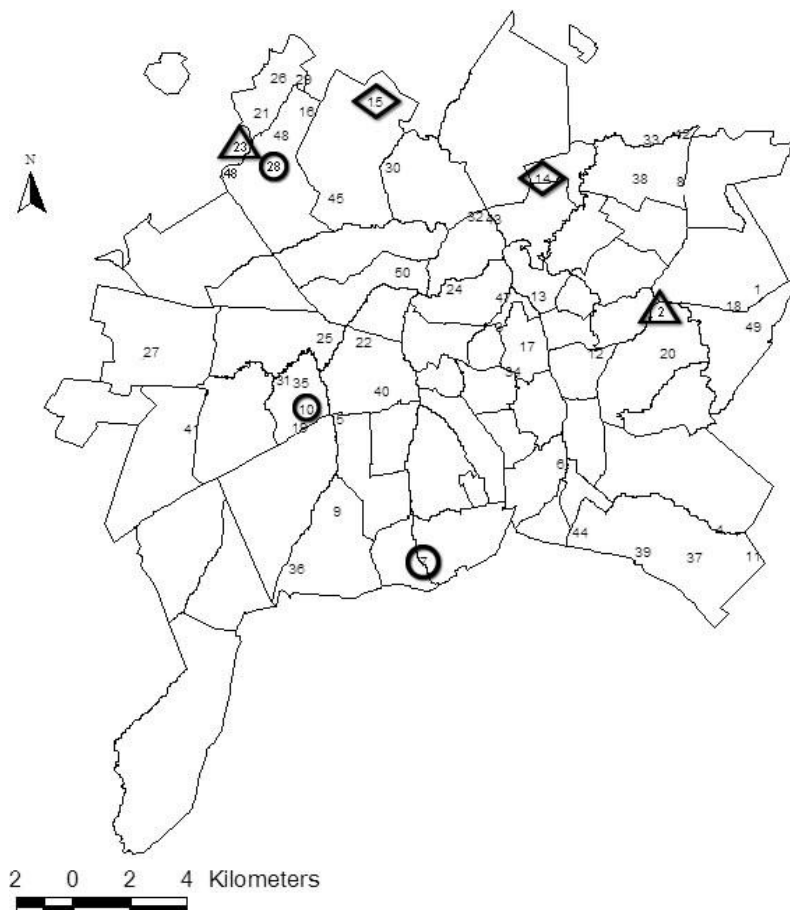


Figura 10. Distribuição espacial das 50 amostras provenientes de indivíduos residentes em Goiânia e diagnosticados em 2007, analisadas molecularmente pela técnica de MIRU-VNTR. As localizações geográficas da residência de cada um dos 50 pacientes, cujas amostras foram analisadas, estão identificadas no mapa com a distribuição distrital de Goiânia. Isolados pertencentes a um mesmo *cluster* estão identificados com um mesmo símbolo geométrico.

6 DISCUSSÃO

O controle da tuberculose necessita da eficiente implantação de diversas abordagens táticas, dentre elas melhor diagnóstico, acompanhamento de casos e tratamento. Adicionalmente os estudos usando métodos moleculares têm sido descritos em algumas cidades brasileiras (Scholante Silva et al. 2009; Noguti et al. 2010; Oelemann et al. 2011) com bons resultados discriminatórios. A importância de se definir métodos efetivos, mais ágeis, com menor custo e bons resultados aumentam as chances de cura, melhorias no controle, e vigilância da doença. O presente estudo com *M. tuberculosis* usando 15 *loci* MIRU-VNTR em isolados de Goiás é pioneiro, e neste, foi observado que essa técnica é mais discriminatória que a técnica de RFLP-IS6110, semelhante ao encontrado em outros estudos que também compararam ambas as técnicas (Mazars et al. 2001; Alonso-Rodriguez et al. 2008).

Para o desenvolvimento deste estudo foram realizadas pesquisas com três grupos de pacientes com TB. Primeiro, foi realizada análise de genotipagem pela técnica de MIRU-VNTR, de 119 pacientes portadores de TB pulmonar, diagnosticados na cidade de Goiânia-GO entre janeiro de 2006 a julho de 2007 e posterior comparação dos genótipos encontrados com a técnica de RFLP-IS6110. Outra análise foi realizada para se conhecer a distribuição geo-espacial dos casos de tuberculose no município de Goiânia. Para tanto foi realizado o georreferenciamento de 241 pacientes diagnosticados em 2007, com qualquer forma clínica de TB e que eram residentes na cidade de Goiânia-GO. Por último realizamos uma análise de genotipagem pela técnica de MIRU-VNTR em um grupo de 50 pacientes incluídos no estudo do georreferenciamento, portadores de TB pulmonar, para identificar possíveis associações entre *cluster* genético e *cluster* geo-espacial dos casos de TB no município.

Dentre as características dos três grupos de pacientes, houve maior número de casos da doença em homens com idade economicamente ativa entre 30 e 50 anos e portadores de TB primária. A maioria apresentava fatores predisponentes ao desenvolvimento da TB sendo os mais frequentes nestes casos, o tabagismo, alcoolismo e co-infecção com HIV. Conforme relato do Ministério da Saúde, no Brasil os homens adoecem duas vezes mais do que as mulheres (MS 2010b), possivelmente devido a diferentes condições de trabalho que favorecem a exposição a pacientes bacilíferos (Severo & Leite 2005). Também devem ser considerados hábitos de vida, o etilismo, tabagismo, uso de drogas, moradores de rua e outros fatores como co-infecção com HIV

e diabetes, considerados fatores imunodebilitantes e associados ao desenvolvimento de TB (MS 2010a).

Segundo dados do Ministério da Saúde (2010b), o estado de Goiás apresentou nos anos de 2006 e 2007 uma taxa de incidência de TB para todas as formas clínicas de 15,2 e 14,7 casos para cada 100.000 habitantes, respectivamente. No ano de 2010, essa taxa diminuiu para 14,6 casos por 100.000 habitantes em todo o Estado. Já no município de Goiânia-GO, a taxa de incidência no ano de 2007 para todas as formas de TB foi de 19,4/100.000 habitantes. Enquanto que em 2010, segundo dados do Sinan Net, pôde-se calcular que esta taxa elevou-se para 22,7/100.000 habitantes (MS 2011b). Este aumento da incidência pode ser devido a diversos fatores, dentre eles: a) aumento do número de casos da TB maior do que o aumento populacional, b) melhora nos serviços de diagnóstico ou, c) aprimoramento na notificação e atualização dos sistemas informacionais, e, portanto, esses fatores devem ser melhor investigados.

Segundo Yokoyama et al. (2007) o método de genotipagem usado para análise molecular constitui um fator crítico para a exata estimativa de transmissão da TB, uma vez que, analisa a epidemiologia das infecções referentes à doença, sendo necessário para implementação de medidas de prevenção. Pela análise molecular dos 119 pacientes incluídos em nosso estudo, foram agrupados pelo método de 15 *loci* MIRU-VNTR, 11,7% das amostras estudadas, as demais apresentaram perfis únicos. Baseado nas análises, o poder discriminatório da técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR foi de 0,9986, que é considerado satisfatório, demonstrando que a técnica possui boa capacidade para discriminar isolados, distinguindo os agrupamentos de cepas mais semelhantes. Corroborando assim, com conclusões de outros estudos, que observaram que as análises baseadas em 15 *loci* resultam em boa eficiência para estudos epidemiológicos, representando 96% dos resultados gerados quando se usa todos os 24 *loci* (Supply et al. 2006; Alonso-Rodriguez et al. 2008; Oelemann et al. 2011).

Segundo alguns estudos (van Embden et al. 1993; Tenover et al. 1997; Dale et al. 1999; Ferrazoli et al. 2000; Van Soolingen 2001), o aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* pertencentes a um grupo genético idêntico, sugere transmissão recente da doença. Já os isolados de pacientes pertencentes a grupos genéticos únicos, sugerem doença proveniente de reativação de uma infecção latente adquirida no passado, em uma mesma cidade ou não. De acordo com resultados obtidos neste estudo entre os 119 pacientes, pode-se observar que não existem focos recentes de transmissão da doença, uma vez que, a maioria dos isolados apresentaram perfis genotípicos únicos,

discordando em parte com o resultado anterior apresentado pela técnica de RFLP-IS6110, que sugeriu pequenos surtos entre os pacientes envolvendo diferentes cepas de *M. tuberculosis* devido à existência de pequenos agrupamentos (Santos 2008). A inexistência de associação encontrada no estudo de Santos (2008), para explicar os agrupamentos observados, pôde agora ser esclarecida com a análise pela técnica de MIRU-VNTR, que mostrou que os agrupamentos feitos pela técnica RFLP-IS6110 não persistiram após análise com uma técnica mais discriminatória.

As dificuldades encontradas durante a realização da técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR foram mínimas, como por exemplo, amostras que apresentaram diversas bandas de amplificação para um mesmo *locus*. Nesses casos, o problema pôde ser minimizado repetindo o PCR com o acréscimo de 5% (1,5µL) de dimethyl sulfoxide (DMSO) à quantidade final da reação para aumentar a especificidade, rendimento e consistência. Os produtos da nova amplificação apresentaram bandas únicas para o *locus* específico em todos esses casos. Oito amostras não produziram nenhuma amplificação em alguns *loci*, são elas: amostra 13, *locus* QUB 26; amostra 25, *locus* ETRA; amostras 38 e 84, *locus* Mtub 04; amostras 89 e 154, *locus* Mtub 39; amostra 150, *locus* QUB 4156 e amostra 152, *locus* Miru 10. Pelo fato de ter acontecido com diferentes amostras e diferentes *loci*, achamos que esses resultados podem ter ocorridos devido a mutações específicas no local de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores nos respectivos *loci*, dentro do genoma dessas amostras impedindo as amplificações dessas regiões. Segundo Supply et al. (2006), nestes casos os genótipos ainda podem ser comparados de forma confiável com base na caracterização dos 14 *loci* restantes.

A diversidade alélica é um bom índice representativo da variabilidade genética de cepas de *M. tuberculosis* existente em uma determinada população. Neste estudo o valor apresentado pelas amostras isoladas variou consideravelmente entre alguns *loci*. O *locus* com maior poder discriminatório das amostras analisadas foi o QUB26, que apresentou uma diversidade alélica de 0,78. Outros quatro *loci* também apresentaram alto poder discriminatório (>0.6): Miru 40 (0,77), Mtub 04 (0,70), QUB 11b (0,67) e Mtub 21 (0,65). Esses *loci* também apresentaram alto poder discriminatório em estudo de Supply et al (2006), que analisaram 824 isolados de *M. tuberculosis* de várias regiões do mundo, incluindo as principais linhagens existentes de *M. tuberculosis*. Outro estudo, realizado por Bidovec-Stojkovic et al (2011), na Eslovênia, analisou 196 isolados de *M. tuberculosis* de pacientes diagnosticados com TB pulmonar em 2008 e também encontrou o *locus* QUB26 como o mais discriminatório seguido dos *loci*

QUB11b, Miru 40 e Mtub 21. Em alguns estudos realizados no Brasil (Scholante Silva et al. 2009; Noguti et al. 2010; Lazzarini et al. 2007), o *locus* encontrado com maior poder discriminatório foi o Miru 40, porém esses estudos só analisaram 12 *loci* MIRU-VNTR, não sendo incluídos portanto, os *loci* QUB 26, Mtub 04, Mtub 21 e QUB 11b, que em nosso estudo foram altamente discriminatórios. Os dez *loci* restantes foram considerados moderadamente discriminatórios ($0.3 \leq h \leq 0.6$): Mtub 39, Mtub 30, ETRC, Miru 10, Miru 26, ETRA, Miru 31, QUB 4156, Miru 16 e Miru 04. Nenhum dos 15 *loci* investigados apresentou baixo poder discriminatório (≤ 0.3).

O processo de migração frequente é um grande desafio para o controle da proliferação da doença, aumentando as chances de infecção entre um maior número de pessoas, além de permitir a entrada de linhagens geneticamente distintas, podendo ser mais virulentas e/ou resistentes aos principais fármacos em regiões onde antes esses problemas não existiam. A mobilidade populacional acentuada nos últimos anos contribui significativamente para o aumento da diversidade genética de cepas bacterianas presentes em uma determinada região. Este fator é evidenciado quando a procedência geográfica dos 119 indivíduos investigados neste estudo foi analisada em conjunto com os perfis genéticos dos isolados bacterianos. Observou-se que todos os isolados de *M. tuberculosis* de pacientes provenientes de outros Estados apresentaram perfis genotípicos distintos.

Dos 14 isolados agrupados pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR em cinco grupos distintos (G1 a G5, Figura 5), todos os pacientes eram residentes no Estado de Goiás e, em todos os cinco grupos haviam pacientes que residiam na cidade de Goiânia. Baseado nas localidades de moradia dos pacientes, cujas amostras foram agrupadas, pode-se afirmar que não foram observados vínculos epidemiológicos. No agrupamento G1, de três isolados, os pacientes residiam em cidades diferentes: um paciente residia em Goiânia, um em Quirinópolis e, o outro paciente já estava há nove meses preso no Centro Penitenciário de Atividades Industriais do Estado de Goiás – CEPAIGO, localizado em Aparecida de Goiânia. No *cluster* G2 não foi possível relacionar os dois pacientes, pois um deles não se lembrava do endereço residencial completo e nem o Setor. No *cluster* G3, entre os dois pacientes residentes na cidade de Goiânia, um residia no Jardim Novo Mundo, região Leste da capital, e o outro no Jardim Curitiba IV, região Noroeste, sendo a distância média entre os dois setores de 20,7 Km (Dados cartográficos ©2011 MapLink. Google Mapas). No *cluster* G4, contendo quatro isolados: um paciente residia na cidade de Santa Fé, interior do Estado, outro paciente

do sexo feminino não possuía residência fixa, e entre os demais, um paciente possuía residência no Bairro Goiá, região Oeste da cidade, e o outro no Jardim Curitiba IV, região Noroeste, tendo entre um bairro e o outro a distância de aproximadamente 12,7 Km (Dados cartográficos ©2011 MapLink. Google Mapas). No agrupamento G5, um dos três pacientes era residente na cidade de Aparecida de Goiânia, os outros dois na cidade de Goiânia, sendo, um na Vila FinSocial, região Noroeste, e o outro no Jardim Guanabara, região Norte. A distância aproximada entre os dois setores é de 12,5 Km (Dados cartográficos ©2011 MapLink. Google Mapas). Não existe nenhum grau de parentesco entre os pacientes em *clusters*. A ausência de proximidade geográfica do local de residência dentre os indivíduos com TB, cujas amostras se apresentaram agrupadas, leva a suposição de que a transmissão destes isolados tenha ocorrido em outros locais que não tivemos como analisar neste estudo, como por exemplo, locais públicos (trabalho, igreja, comércio, etc.) (Vicentin & Carvalho 2002).

Além de ser uma ferramenta significativa para estudos moleculares, Gibson et al. (2005) concluíram que 15 *loci* MIRU-VNTR também pode ser útil para estudos filogenéticos das cepas de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Desta forma, através da comparação dos perfis dos MIRU-VNTR existentes no banco de dados do site MIRU-VNTRplus com os perfis das 119 amostras estudadas no primeiro grupo deste estudo, observou-se que a maioria dos isolados (82,3%) apresentaram perfis desconhecidos, não se identificando com nenhuma linhagem depositada naquele banco de dados. Alguns isolados se mostraram próximos às famílias LAM e Haarlem (12,6% e 5,0% dos isolados, respectivamente). A predominância de cepas de *M. tuberculosis* pertencentes à linhagem LAM, também foram encontradas em diversos estudos realizados no Brasil com cepas circulantes no país, como estudo de Oelemann et al. (2011) que encontrou cepas da linhagem LAM em 66,7% do total de 361 amostras de *M. tuberculosis* coletadas de pacientes do Rio de Janeiro, Belém e Porto Alegre. Também, em estudo realizado em Maringá-PR por Noguti et al. (2010), 25 isolados (26,8%) dos 93 estudados, foram classificadas como a linhagem LAM. Outros estudos, que analisaram isolados de São Paulo e Rio Grande do Sul, encontraram frequências maiores de isolados da família LAM em 40% e 38%, respectivamente, sendo que, as demais linhagens identificadas se dividiram em porcentagens menores (Malaspina 2009; Scholante Silva et al. 2009).

A predominância da linhagem LAM no Brasil pode ser explicada pela influência da imigração, principalmente vinda do Sul da Europa e África, onde estas cepas se

apresentam com disseminação generalizada (Brudey et al. 2006; Allix-Beguec et al. 2008b; Oelemann et al. 2011). A frequência da linhagem LAM encontrada em nosso estudo é bem menor do que a descrita pelos outros autores, porém, nenhum desses estudos incluíram isolados da Região Centro-Oeste, sendo escassas no Brasil, publicações que avaliam a frequência de linhagens existentes nessa região do país. Apesar da linhagem LAM predominar entre as cepas identificadas dentro de linhagens conhecidas, a maioria dos nossos isolados (82,3%) apresentaram perfis desconhecidos, indicando a grande diversidade genética dos isolados de *M. tuberculosis* existente na região Central do país, que pode ser resultado de uma grande mistura étnica entre os habitantes. Dois *clusters*: G4 e G3, continham, três amostras identificadas como sendo da linhagem LAM (amostras 24, 92 e 181) e duas amostras identificadas como sendo da linhagem Haarlem (7 e 68), respectivamente. Inferindo que houve transmissão recente entre isolados destas linhagens. Este dado reforça a importância de se identificar, de maneira correta e rápida, o perfil de linhagens, para apoiar o controle da transmissão de cepas com potencial de virulência.

Além do conhecimento dos perfis genéticos dos *M. tuberculosis* causando TB na região de Goiás, realizamos uma análise da distribuição espacial dos casos de TB no município de Goiânia e correlacionamos os mesmos com seus respectivos perfis genéticos. Neste segundo grupo de estudo, o de pacientes georreferenciados, a distribuição dos casos de TB diagnosticados no ano de 2007 em pacientes residentes no município de Goiânia, mostrou que não houve relação entre a doença e a situação sócio-econômica da população. Pôde-se observar que o local de maior concentração dos casos de TB deu-se em uma das quatro regiões de baixa renda, a região Noroeste, uma das últimas expansões do município, e também, percebeu-se uma alta concentração em distritos de renda intermediária a alta. O que contrasta com outros municípios brasileiros, como Ribeirão Preto (Hino et al. 2006) onde a doença foi mais prevalente em regiões de renda baixa e menos frequente em regiões com melhor qualidade de vida. A observação de maior concentração da TB em locais de maior renda na cidade de Goiânia coincide com grande aglomeração comercial, o que favorece a transmissão do *M. tuberculosis* de maneira aleatória dificultando a formação de focos de disseminação.

O estudo genotípico mais aprofundado dos *M. tuberculosis* coletados de 50 indivíduos com TB pulmonar residentes em Goiânia no ano de 2007, permitiu demonstrar que existe grande variabilidade genética dos isolados circulantes na cidade de Goiânia. Observou-se que esses isolados quando agrupados, não apresentaram uma

associação geo-espacial e, portanto não estabelecem uma ligação epidemiológica entre os mesmos. Nossas análises não permitiram estabelecer qualquer vínculo de transmissão da doença entre pacientes com cepas de um mesmo *cluster*. A análise estatística do presente estudo não evidenciou agrupamento das amostras a nenhum dado epidemiológico considerado.

A principal limitação da genotipagem dos casos georreferenciados foi o pequeno número de isolados avaliados (21% dos casos notificados de TB pela SMS em Goiânia no ano de 2007), no entanto, vale a pena notar que, na maioria dos casos de TB, as culturas não foram realizadas ou solicitadas, o que dificulta o acesso a todos os isolados. O PNCTB (MS 2010a) orienta que a solicitação e realização de cultura para *M. tuberculosis* seja feita somente em casos de falha de tratamento, pacientes com HIV e recidivas da doença. Assim, consideramos que, para aprofundarmos este estudo precisamos ter apoio de órgãos governamentais para termos acesso a uma amostragem mais representativa das culturas de *M. tuberculosis* circulantes em Goiânia. Adicionalmente, os distritos administrativos podem não distribuir de forma homogênea a cidade Goiânia, com o mesmo tamanho de área e de população, dessa forma, um melhor perfil de aglomeração seria a da utilização de setores censitários para definir melhor um microambiente. Infelizmente os dados de distribuição censitária de Goiânia, relativo ao ano de 2007, não foram registrados pela prefeitura de Goiânia e/ou IBGE.

Assim, este trabalho buscou contribuir com o sistema de saúde, apontando áreas de maior concentração da doença, identificando grupos e regiões consideradas prioritárias, além de estabelecer os perfis genéticos dos isolados e traçar possíveis cadeias de transmissão entre cepas.

7 CONCLUSÕES

A técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR demonstrou boa eficiência para caracterizar geneticamente os *M. tuberculosis* isolados em Goiânia, Goiás com facilidade para identificação dos perfis encontrados e comparação dos resultados.

Os isolados analisados sugerem ausência de transmissão recente da TB em Goiás e também na cidade de Goiânia, capital do Estado, uma vez que a maioria dos isolados apresentaram perfis únicos, demonstrando alta diversidade genética de cepas circulantes.

Os *loci* QUB 26, Miru 40, Mtub 04, QUB11b e Mtub 21 foram os mais discriminatórios, sendo que o Miru 40 apresentou maior diversidade alélica e maior números de alelos e os demais *loci* apresentaram poder discriminatório moderado.

A técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR apresentou maior poder discriminatório que a técnica de RFLP-IS6110 podendo ser um método usado em estudo epidemiológico sozinho ou em conjunto com outras técnicas, tornando possível comparar os resultados de maneira mais segura com outros estudos do Brasil e de outros países.

No ano de 2007, os casos de TB diagnosticados em pacientes residentes em Goiânia mostraram que a doença se apresentou distribuída por todo o município de Goiânia, sem discriminação de renda, concentrando-se principalmente nas regiões Central e Noroeste.

Os perfis genéticos dos casos diagnosticados em 2007 dos pacientes residentes em Goiânia, encontrados pela técnica de 15 *loci* MIRU-VNTR, identificaram que a maioria dos isolados apresentaram perfis únicos, não estabelecendo vínculos epidemiológicos entre as cepas agrupadas.

REFERÊNCIAS

- Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S 2008a. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 46: 2692-2699.
- Allix-Beguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P 2008b. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 46: 1398-1406.
- Almeida EA 2009. *Sensibilidade de bactérias do complexo Mycobacterium tuberculosis as drogas anti tuberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial*, Tese de Doutorado, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, 78 pp.
- Alonso-Rodriguez N, Martinez-Lirola M, Herranz M, Sanchez-Benitez M, Barroso P, Bouza E, Garcia de Viedma D 2008. Evaluation of the new advanced 15-*loci* MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol* 8: 34.
- Alves AJR 2008. *Estudo molecular de casos de tuberculose recorrente*, Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, 76 pp.
- Andrade AL, Silva SA, Martelli CM, Oliveira RM, Morais Neto OL, Siqueira Junior JB, Melo LK, Di Fabio JL 2004. Population-based surveillance of pediatric pneumonia: use of spatial analysis in an urban area of Central Brazil. *Cad Saude Publica* 20: 411-421.
- Aronoff S 1989. *Geographic information system: A management perspective*, Vol. IV, WDL Publications, Ottawa, 294pp.
- Asgharzadeh M, Shahbadian K, Majidi J, Aghazadeh AM, Amini C, Jahantabi AR, Rafi A 2006. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East Azerbaijan province of Iran. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 517-521.
- Baker L, Brown T, Maiden MC, Drobniewski F 2004. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* 10: 1568-1577.

- Barcellos C, Pustai AK, Weber MA, Brito MRV 2005. Identificação de locais com potencial de transmissão de dengue em Porto Alegre através de técnicas de geoprocessamento. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 246-250.
- Barcellos C, Acosta LMW, Lisboa EP, Brito MRV, Flores R 2006. Estimativa da prevalência de HIV em gestantes por análise espacial, Porto Alegre, RS. *Revista de Saúde Pública* 40: 928-930.
- Bidovec-Stojkovic U, Zolnir-Dovca M, Supply P 2011. One year nationwide evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping on Slovenian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Respiratory Medicine* 105 S1: S67-S73.
- Blackwood KS, Wolfe JN, Kabani AM 2004. Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? *J Clin Microbiol* 42: 5001-5006.
- Boffo MMS, Mattos IG, Ribeiro MO, Oliveira Neto IC 2004. Tuberculose associada a AIDS: características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes atendidos em um serviço de referência do sul do Brasil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 30: 140-146.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix-Beguec C, Aristimuno L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Guttierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofo-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rusch-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6: 6-23.
- Câmara G, Carvalho MS 2002. *Análise espacial de eventos*, In: Fucks SD, Carvalho MS, Câmara G, Monteiro AMV (eds.). *Análise Espacial de Dados Geográficos*. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – Divisão de Processamento de

Imagens, São José dos Campos, São Paulo. Disponível em: <<http://www.dpi.inpe.br/gilberto/livro/analise/>>

- Casal M, Gutierrez J, Vaquero M 1997. Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 1: 81-84.
- Cheng VC, Yam WC, Hung IF, Woo PC, Lau SK, Tang BSY, Yuen KY 2004. Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Pathol* 57: 281-285.
- Choi GE, Jang MH, Cho HJ, Lee SM, Yi J, Lee EY, Chang CL, Kim YD, Kim MB 2011. Application of Single-nucleotide Polymorphism and Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats Analyses to Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Korea. *Korean J Lab Med* 31: 37-43.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaiia 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 MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
- Conde MB, Melo FAF, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin PTR, Machado Junior AR, Lemos ACM, Netto AR, Durovni B, Sant'Anna CC, Lima D, Capone D, Barreira D, Matos ED, Mello FCQ, David FC, Marsico G, Afiune JB, Silva JRL, Jamal LF, Telles MAS, Hirata MH, Rabahi MF, Cailleaux-Cesar M, Palaci M, Morrone N, Guerra RL, Dietze R, Miranda SS, Cavalcante SC, Nogueira SA, Nonato TSG, Martire T, Galesi VMN, Dettoni VV 2009. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 10: 1018-1048.
- Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT 2002. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 40: 1592-1602.

- Cowan LS, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig TV, Crawford JT 2005. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 43: 688-695.
- Dalcolmo MP, Andrade MKN, Picon PD 2007. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. *Revista de Saúde Pública* 41: 34-42.
- Dale JW, Nor RM, Ramayah S, Tang TH, Zainuddin ZF 1999. Molecular epidemiology of tuberculosis in Malaysia. *J Clin Microbiol* 37: 1265-1268.
- Diretrizes 2004. II Consenso Brasileiro de Tuberculose. Diretrizes brasileiras para tuberculose. *J. Bras. Pneumol.* 30: 6-36.
- Drosten C, Panning M, Kramme S 2003. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR using Pan-Mycobacterial Primers and a Pair of Fluorescence Resonance Energy Transfer Probes Specific for the *M. tuberculosis* Complex. *Clinical Chemistry* 49: 1659 - 1661.
- Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS 2006. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 697-714.
- Ferrazoli L, Palaci M, Marques LR, Jamal LF, Afiune JB, Chimara E, Martins MC, Silva Telles MA, Oliveira CA, Palhares MC, Spada DT, Riley LW 2000. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 4: 18-25.
- Ferreira AAA, Queiroz KCS, Torres KP, Ferreira MÂF, Accioly H, Alves MSCF 2005. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 8: 142-149.
- Ferreira MU 1991. Epidemiologia e geografia: o complexo patogênico de Max. Sorre. *Cadernos de Saúde Pública* 7: 301-309.
- Foxman B, Riley L 2001. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 153: 1135-1141.
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144 (Pt 5): 1189-1196.
- Gibson A, Brown T, Baker L, Drobniowski F 2005. Can 15-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis provide

- insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*? *Appl Environ Microbiol* 71: 8207-8213.
- Goyal M, Young D, Zhang Y, Jenkins PA, Shaw RJ 1994. PCR amplification of variable sequence upstream of *katG* gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 32: 3070-3071.
- Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, Young DB, Shaw RJ 1997. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 35: 647-651.
- Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* 10: 1057-1065.
- Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, Le Pendeven C, Le Pennec MP, Mathieu D, Offredo C, Pagon B, Pierre-Audigier C 1998. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol* 36: 486-492.
- Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 1: 5.
- Harries A, Maher D, Graham S 2004. TB/HIV: a clinical manual. World Health Organization, Geneva.
- Hett EC, Rubin EJ 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 126-156.
- Higgins CF, McLaren RS, Newbury SF 1988. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? A review. *Gene* 72: 3-14.
- Hino P 2004. *Distribuição espacial dos casos de Tuberculose no município de Ribeirão Preto, nos anos de 1998 a 2002*, Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo - SP, 125 pp.
- Hino P, Villa TC, Sassaki CM, Nogueira JA, Santos CB 2006. Geoprocessing in health area. *Rev Lat Am Enfermagem* 14: 939-943.
- Hong X, Hopfinger AJ 2004. Construction, molecular modeling, and simulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell walls. *Biomacromolecules* 5: 1052-1065.

- Hunter PR, Gaston MA 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26: 2465-2466.
- IBGE 2002. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Base de informações por setor censitário. Censo demográfico 2000. Resultados do universo, Goiás-Goiânia [CD-ROM]. Rio de Janeiro.
- IBGE 2008. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério de Planejamento, Orçamento e Gestão. Centro de Documentação e Disseminação de Informações. Contagem da População 2007, Agregado por Setores Censitários. Documentação do Arquivo. Rio de Janeiro.
- IBGE 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo Demográfico 2010. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/>.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907-914.
- Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, Schuitema A, van Soolingen D, Nganga L, Kibuga D, Odhiambo J, Klatser P 2004. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 42: 1012-1015.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakus MA, Musser JM, van Embden JD 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 37: 2607-2618.
- Kritski AL, Conde MB, Souza GRMS 2000. *Tuberculose: do ambulatório à enfermagem*. 3rd ed. Atheneu. São Paulo, 259 pp.
- Kritski AL, Villa TS, Trajman A.; Silva JRL, Medronho RA, Netto AR 2007. Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas. *Rev. Saúde Pública* 41: 9-14.
- Kwara A, Schiro R, Cowan LS, Hyslop NE, Wiser MF, Roahen Harrison S, Kissinger P, Diem L, Crawford JT 2003. Evaluation of the epidemiologic utility of

- secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 41: 2683-2685.
- Lazzarini LCO, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, Shashkina E, Mello FCQ, Gibson AL, Virginio MJ, Marsico AG, Butler WR, Kreiswirth BN, Suffys PN, Silva JRL, Ho JL 2007. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of clinical microbiology* 45: 3891-3902.
- Le Fleche P, Fabre M, Denoeud F, Koeck JL, Vergnaud G 2002. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol* 2: 37.
- Leite CQF, Sato DN 2006. *Mycobacterium* In: Silva CHPM. & Neufeld PM 2006. *Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico*. Revinter. Rio de Janeiro, p. 317-333.
- Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST 2011. TubercuList - 10 years after. *Tuberculosis (Edinb)* 91: 1-7.
- Lupski JR, Weinstock GM 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 174: 4525-4529.
- Macieira S 2000. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium lepra*. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*, Bauru, p.66-69
- Malaspina AC 2009. *Genotipagem do Mycobacterium tuberculosis utilizando RFLP e Spoligotyping em associação com MIRU para avaliar a epidemiologia molecular da tuberculose no município de Araraquara-SP*, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Araraquara, 97 pp.
- Marcondes AG, Shikama MLM, Vasconcelos AS, Benites NR, Moraes ZM, Roxo E, Dias RA, Cardoso Leão SLP, Pinheiro SR 2006. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. *Braz. J. Vet Res. Anim. Sci.* 43: 363.
- Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1901-1906.

- Mendes NH 2010. *Genotipagem por Spoligotyping e MIRU de Mycobacterium tuberculosis provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar*, Dissertação de Mestrado, Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 99pp
- Moonan PK, Bayona M, Quitugua TN, Oppong J, Dunbar D, Jost KC, Jr, Burgess G, Singh KP, Weis SE 2004. Using GIS technology to identify areas of tuberculosis transmission and incidence. *Int J Health Geogr* 3: 23.
- Municipal Instituto do Planejamento 1992. *Plano de Desenvolvimento integrado de Goiânia - PDIG.*, Prefeitura de Goiânia, Goiânia.
- MS - Ministério da Saúde 2002. Fundação Nacional de Saúde. Controle de tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT: 236 pp.
- MS - Ministério da Saúde 2004. II Consenso Brasileiro de Tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 30(supl 1): 54-56.
- MS - Ministério da Saúde 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro, Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 3 ed: 47, 135, 159-163.
- MS - Ministério da Saúde 2010a. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de Recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf
- MS - Ministério da Saúde 2010b. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância epidemiológica. 7º Edição, 1º reimpressão, série A. Normas e Manuais técnicos. Brasília, 810 pp.
- MS - Ministério da Saúde 2011a. Série histórica da Taxa de Incidência de Tuberculose. Brasil, Regiões e Unidades Federadas de residência por ano de diagnóstico (1990 a 2010). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_tb_1990_2009_21_03_2011.pdf
- MS - Ministério da Saúde 2011b. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>

- Nachega JB, Chaisson RE 2003. Tuberculosis drug resistance: a global threat. *Clin Infect Dis* 36: S24-30.
- Narayanan S 2004. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120: 233-247.
- Noguti EN, Leite CQ, Malaspina AC, Santos AC, Hirata RD, Hirata MH, Mamizuka EM, Cardoso RF 2010. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Parana in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 779-785.
- Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rusch-Gerdes S, Locht C, Niemann S, Supply P 2007. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 45: 691-697.
- Oelemann MC, Gomes HM, Willery E, Possuelo L, Batista Lima KV, Allix-Beguec C, Locht C, Goguet de la Salmoniere YO, Gutierrez MC, Suffys P, Supply P 2011. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. *PLoS One* 6: e18256.
- Pandolfi JR, Malaspina AC, Santos ACB, Suffys PN, Oellemann, MAC, Valentini SR, Leite CQF 2007. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 28: 251-257.
- Petroff SA 1915. A New and Rapid Method for the Isolation and Cultivation of Tubercle Bacilli Directly from the Sputum and Feces. *J Exp Med* 21: 38-42.
- Pina J 2000. *A tuberculose na viragem do milénio*. Lidel ed. 600. Lisboa, Portugal 600 pp.
- Radhakrishnan I, Manju YK, Kumar RA, Mundayoor S 2001. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India. *J Clin Microbiol* 39: 1683.
- Reed MB, Pichler VK, McIntosh F, Mattia A, Fallow A, Masala S, Domenech P, Zwerling A, Thibert L, Menzies D, Schwartzman K, Behr MA 2009. Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. *J Clin Microbiol* 47: 1119-1128.

- Roring S, Scott AN, Glyn Hewinson R, Neill SD, Skuce RA 2004. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol* 101: 65-73.
- Ruffino-Neto A 1999. Impacto da reforma do setor saúde sobre os serviços de tuberculose no Brasil. *Boletim de Pneumologia Sanitária* 7.
- Santos ACB 2009. *Estudo da Epidemiologia Molecular da Tuberculose em pacientes de Araraquara-SP, no período de 2002 a 2006*, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Araraquara-SP, 97 pp.
- Santos CB, Hino P, Cunha TN, Villa TCS, Muniz JN 2004. Utilização de um Sistema de Informação Geográfica para descrição dos casos de tuberculose. *Bol. Pneumol. Sanit.* 12: 07-12.
- Santos LC, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A 2007. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *M tuberculosis*. *Revista de Patologia Tropical*. 36: 1-15.
- Santos LC 2008. *Caracterização molecular de Mycobacterium tuberculosis isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia-GO pela técnica do RFLP-IS6110*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, 90pp
- Santos LC, Bousquet HM, Pereira AM, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A 2010. A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of midwestern Brazil. *Infect Genet Evol* 10: 1052-1057.
- Scholante Silva AB, Von Groll A, Felix C, Conceicao FR, Spies FS, Scaini CJ, Rossetti ML, Borsuk S, Dellagostin AO, Almeida da Silva PE 2009. Clonal diversity of *M. tuberculosis* isolated in a sea port city in Brazil. *Tuberculosis (Edinb)* 89: 443-447.
- Schuster M 1995. Mycobacterial disease: a historical and epidemiologic perspective. *Clin Dermatol* 13: 191.
- Severo NPF, Leite CQF 2005. Caracterização da população portadora de tuberculose do município de Américo Brasiliense/SP, no período de 1992 a 2002. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 26: 83-86.
- Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, Hughes SL, Hewinson RG, Neill SD 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 148: 519-528.
- Soini H, Musser JM 2001. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* 47: 809-814.

- Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N 2003. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 3: 125-133.
- Sousa JPC, Rodrigues AM, Exposto F 2000. *Mycobacterium*. In *Microbiologia*, Ferreira WFC e Sousa JCF (eds.), Lisboa, Lidel - Edições Técnicas: 85-98.
- Souza MVN, Vasconcelos TRA 2005. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Quim. Nova* 28: 678-682.
- Souza WV, Albuquerque MFM, Barcellos CC, Ximenes RAA, Carvalho MS 2005. Tuberculose no Brasil: construção de um sistema de vigilância de base territorial. *Revista de Saúde Pública* 39: 82-89.
- Souza MB, Antunes CMF, Garcia GF 2006 Perfil de sensibilidade e fatores de risco associados à resistência do *Mycobacterium tuberculosis*, em centro de referência de doenças infecto-contagiosas de Minas Gerais. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 32: 430-437
- Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* 26: 991-1003.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 36: 762-771.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39: 3563-3571.
- Supply P 2005. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical Guide, Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille. Available from: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf>
- Supply P, Allix-Beguec C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-

- number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44: 4498-4510.
- Surikova OV, Voitech DS, Kuzmicheva G, Tatkov SI, Mokrousov IV, Narvskaya OV, Rot MA, van Soolingen D, Filipenko ML 2005. Efficient differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci. *Eur J Epidemiol* 20: 963-974.
- Tanser FC, Le Sueur D 2002. The application of geographical information systems to important public health problems in Africa. *Int J Health Geogr* 1: 4.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31: 175-178.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 426-439.
- Tiwari N, Adhikari CM, Tewari A, Kandpal V 2006. Investigation of geo-spatial hotspots for the occurrence of tuberculosis in Almora district, India, using GIS and spatial scan statistic. *Int J Health Geogr* 5: 33.
- Tortoli E 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16: 319-354.
- Valim AR, Rossetti ML, Ribeiro MO, Zaha A 2000. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol* 38: 3119-3122.
- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-409.
- van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 235: 196-205.
- van Soolingen D 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 249: 1-26.
- Vicentin GSAH, Carvalho MS 2002. Mortalidade por tuberculose e indicadores sociais no município do Rio de Janeiro. *Ciência & Saúde Coletiva*. 7: 253-263.

- Vukovic D, Rusch-Gerdes S, Savic B, Niemann S 2003. Molecular epidemiology of pulmonary tuberculosis in belgrade, central serbia. *J Clin Microbiol* 41: 4372-4377.
- Wang YN, Chi CQ, Cai M, Lou ZY, Tang YQ, Zhi XY, Li WJ, Wu XL, Du X 2010. *Amycolicococcus subflavus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 638-643.
- Weniger T, Harmsen D, Supply P, Niemann S 2007. Mycobacteria MIRU-VNTRplus: online database and analysis tool for MIRU, SPOLIGO, and regions of difference data. Toronto: Canada, In:107th General Meeting, American Society for Microbiology. Disponível em: <http://www.miru-vntrplus.org/>.
- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D 2010. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* 38: W326-331.
- Wirth T, Hildebrand F, Allix-Beguec C, Wolbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rusch-Gerdes S, Locht C, Brisse S, Meyer A, Supply P, Niemann S 2008. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog* 4: e1000160.
- WHO - World Health Organization 2009. Global Tuberculosis Control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report. Geneva, 314 pp.
- WHO - World Health Organization 2010. Global Tuberculosis Control. Geneva, 218 pp.
- Yokoyama E, Kishida K, Ichinohe S 2007. Improved molecular epidemiological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains using multi-locus variable number of tandem repeats typing. *Jpn J Infect Dis* 60: 235-236.

ANEXOS

Anexo I – Parecer do Comitê de Ética, TCLE

23/03/05 10:50 FROM: PAGE: 01



Protocolo
nº 006/2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
PARECER CONSUBSTANCIADO

I – IDENTIFICAÇÃO

- **Título do projeto:** ESTUDO DA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM PACIENTES DO ESTADO DE GOIÁS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ANÁLISE DE POLIMORFISMO APÓS DIGESTÃO POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO (RFLP)
- **Pesquisadora responsável:** Prof. Dr. André Kipnis.
- **Instituição de origem do pesquisador responsável:** Universidade Federal de Goiás
- **Pesquisador participante:** Luiz Artur Bataus, Ana Paula J. Kipnis – Universidade Federal de Goiás.
Marcelo Fouad Rabani – Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia.
Sueli Lemes de Ávila Alves – Laboratório Central de Goiás (LACEN-GO)
- **Instituição onde se realizará o projeto:** Hospital de Doenças Tropicais de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG) e Laboratório Central de Goiás (LACEN-GO).
- **Data de apresentação ao COEP:** 17/02/2005

II – OBJETIVOS:

OBJETIVO GERAL:

- Determinar as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que estão causando infecções nos pacientes do Estado de Goiás para comparar com as cepas presentes a nível nacional e mundial.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

- identificar “cluster” de pacientes infectados por *Mycobacterium tuberculosis*;
- determinar uma possível cadeia de transmissão em um surto específico para subsidiar o controle da transmissão da tuberculose humana;
- tornar o monitoramento das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* uma prática constante e efetiva na região de Goiás.
- capacitar os profissionais do laboratório Central de Goiás (LACEN-GO) para realizarem análises moleculares do agente causador da tuberculose e outros agentes infecciosos da região



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

III - SUMÁRIO DO PROJETO:

- **Descrição e caracterização dos sujeitos da pesquisa:** trata-se de uma pesquisa quantitativa que tem como sujeitos os indivíduos atendidos no Hospital de Doenças Tropicais de Goiás com hipótese diagnóstica de tuberculose.
- **Metodologia:** o processo metodológico da pesquisa consiste na formação de um banco de dados das amostras de espécies de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de material biológico como escarro, urina, lavados gástrico e brônquico, líquidos assépticos (líquor, pleural, ascítico, sinovial, pericárdico e peritoneal), material de ressecção, biópsia, pús, sangue e fezes de indivíduos com hipótese diagnóstica de tuberculose que realizaram consulta no HDT-GO e coleta e exame laboratorial no LACEN-GO. Posteriormente será realizada a busca ativa desses indivíduos para obter o consentimento livre e esclarecido de autorização para inclusão das amostras de espécies de *Mycobacterium tuberculosis* no banco de dados da pesquisa. As etapas da pesquisa envolvem: identificação da espécie clínica, baciloscopia, cultura e identificação das culturas de *Mycobacterium tuberculosis* no LACEN-GO e a análise molecular - extração do DNA das amostras de *Mycobacterium tuberculosis*, clonagem do fragmento de IS6110, hibridização Southern Blotting do DNA microbacteriano, marcação da sonda com peroxidase, hibridização e detecção no laboratório de pesquisa do IPTSP-UFG/GO. A pesquisa terá duração de dois anos com coleta de dados prevista entre julho de 2005 e julho de 2007.
- **Critérios de inclusão:** indivíduos com hipótese diagnóstica de tuberculose que realizaram consulta no HDT-GO e coleta e exame laboratorial no LACEN-GO.
- **Critérios de exclusão:** não apresenta.
- **Orçamento:** não foi apresentado, mas referido que os gastos da pesquisa serão financiados pelos pesquisadores.
- **Adequação das condições:** os pesquisadores dispõem de parceria com Hospital de Doenças Tropicais de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás e Laboratório Central de Goiás (LACEN-GO).

IV - COMENTÁRIOS DO RELATOR, FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E COMPLEMENTARES EM PARTICULAR SOBRE:

- **Análise de riscos:** a pesquisa não oferece riscos aos sujeitos de qualquer natureza física, psíquica ou moral. Embora os procedimentos laboratoriais de coleta e análise das amostras



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

ofereceram riscos aos profissionais de saúde que manipularão o material biológico potencialmente contaminado, este risco será amenizado através de medidas de biossegurança com a utilização de equipamentos de proteção individual.

- **Retorno de benefícios para o sujeito e/ou para a comunidade:** serão a médio e longo prazo, pois o pesquisa permitirá a determinação dos tipos de cepas existentes no estado de Goiás e a comparação com as cepas de outros estados e de outros países, como também, determinar a sua virulência e resistência a drogas e montar ações de prevenção e controle da tuberculose pela vigilância sanitária.
- **Estrutura do protocolo:** completo.
- **Estrutura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e forma de obtê-lo:** apresenta-se completo, objetiva e clara.
- **Destino dos resultados:** Os resultados da pesquisa serão publicados em revistas científicas especializadas de alcance internacional.
- **Recomendações:** apresentar orçamento detalhado e condições para realização do projeto.

VI - PARECER DO COEP:

Frente às análise apresentada, consideramos este projeto **APROVADO** com recomendação, tal e melhor juízo.

Data da reunião: 22/03/2005.

Assinatura do vice-coordenador:

Prof. Dr. Nivaldo dos Santos

Assinatura do relator

Anexo II – Questionário da história epidemiológica de cada paciente

Questionário do Projeto: Estudo da Epidemiologia Molecular da Tuberculose em Pacientes do Estado de Goiás através da Técnica de RFLP

Data: _____

Número do Prontuário: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Cor da Pele: _____ Data de admissão: _____

Residência atual: _____

Cidade _____ Estado _____ Há quanto tempo nesta _____

Residência anterior (cidade-Estado): _____

Diagnóstico clínico: _____

Escarro BAAR + ☐ - ☐
Biopsia _____ Tecido _____ Resultado _____
Cultura _____ Meio _____ Resultado _____

Mycobacterium _____

Teve contato com TB ativa

Vacinado com BCG sim ☐ não ☐ não sabe ☐ Cicatriz ☐

TB ativa no momento sim ☐ não ☐ não sabe ☐

Data de início: _____ Primária ☐

☐ Cavitária – área afetada _____

☐ Não cavitária ☐ pleural ☐ outra patologia _____

História prévia de TB

Com qual idade: _____ -

Foi uma tuberculose primária sim ☐ não ☐ não sabe ☐

Existe evidência de lesões sim ☐ não ☐ não sabe ☐

Tratamento anti-TB sim ☐ não ☐ não sabe ☐

Resultado da quimioterapia

Ainda no tratamento sim ☐ não ☐ não sabe ☐

Curado sim ☐ não ☐ não sabe ☐

Doenças concomitantes _____

Fatores predisponentes (HIV, alcoolismo, terapias imunossupressoras etc....):

Anexo III - Comprovante de submissão do manuscrito ao Jornal BMC Public Health

Article title: A pilot study on georeferencing and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Goiânia, Goiás

MS ID : 2494658206971739

Authors : Alyne M Pereira, Loanda CS Limongi, Lorena C Santos, Licia KAM Thorn, Ana Paula Junqueira-Kipnis and Andre Kipnis

Journal : BMC Public Health

Dear Dr Kipnis

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the submitting author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the submitting author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/2494658206971739_article.pdf (1204K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/8855703606971765_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to editorial@biomedcentral.com.

The submitting author can check on the status of the manuscript at any time by logging into 'My BioMed Central' (<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on

editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>

Anexo IV – Manuscrito submetido ao Jornal BMC Public Health

A pilot study on georeferencing and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Goiânia, Goiás

Alyne Melo Pereira¹; Loanda Carvalho Sant'Ana Limongi¹; Lorena Cristina Santos¹; Lícia Kamila Assis Melo Thörn² ; Ana Paula Junqueira-Kipnis¹; André Kipnis^{1*}

¹Department of Microbiology, Immunology, Parasitology, and Pathology, Institute of Tropical Pathology and Public Health. Federal University of Goiás
Address: Rua 235 esquina com a primeira avenida, s/n. Setor Universitário.
CEP: 74605-050. Goiânia-Goiás. Phone: +55 62-32096104.

²Department of Public Health, Institute of Tropical Pathology and Public Health.
Federal University of Goiás

Emails: alynemelo09@hotmail.com (Alyne Melo Pereira);
loanda9@hotmail.com (Loanda Carvalho Sant'ana Limongi);
lorenacsantos@yahoo.com.br (Lorena Cristina dos Santos);
liciakamila@gmail.com (Lícia Kamila Assis Melo Thörn); apkipnis@gmail.com
(Ana Paula Junqueira-Kipnis); akipnis@iptsp.ufg.br (André Kipnis).

*Corresponding author:

Abstract

Background: To assess the geographic distribution of tuberculosis cases in the city of Goiânia during the year 2007 and to analyze possible geographical and molecular epidemiological links using of molecular typing to VNTR.

Result: Tuberculosis was randomly distributed throughout the city without association with the population's income level. The genetic profiles found by the technique have identified most of the strains with unique profiles and did not establish epidemiological links between clustered strains.

Conclusion: Based on the observed data, no transmission source was identified in the city of Goiânia and there was no correlation between the tuberculosis geographical distribution of cases and household income.

Keywords: tuberculosis, spatial distribution, molecular typing, VNTR

Background

Tuberculosis (TB) is a chronic airborne bacterial disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* that is easily transmitted. If the disease is not properly treated, a person with active TB can infect from 10 to 15 people per year. It is estimated that 9.4 million of new TB cases occur each year worldwide, and 80% of them are concentrated in 22 countries [1]. Brazil belongs to the group in the 19th position, with a rate of 71.7 thousand new cases per year. In 2010, the State of Goiás had an incidence of 14.6 new cases per 100,000 inhabitants [2]. In the city of Goiânia, capital of the state, there were 295 new TB cases [3], representing an incidence of 22.7 cases for each 100,000 inhabitants.

The persisting high rates result from a number of factors, such as co-infection with HIV, misdiagnosis, and in recent years the emergence of multi-drug resistant strains (MDR-TB) to antimycobacterial drugs [4]. In a study conducted by the World Health Organization in 2008, a cohort analysis was held in six countries that reported more than 100 cases of MDR-TB and it was observed that the healing rate ranged from 20% to 80% [5].

Transmission control for some diseases has become even more complex due to the constant urban population growth and expansion to outlying areas with insufficient infrastructure [6]. Thus, some studies [7,8,9] correlated the geographical distribution of cases as an important tool for visualization and definition of epidemiological analysis. It is quite clear that studies on the genetic variability of strains found in a given population, associated with its geographic location, are necessary to better understand the spreading flow of the agents, and consequently support new disease control strategies.

The use of molecular techniques has been an aid to epidemiological investigations of TB cases. A previous study [10] held with *M. tuberculosis* isolates from patients in the state of Goiás, applied the IS6110-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technique for genotyping of strains, including some MDR-TB, finding no risk factor associated with isolates with genetic similarity. However, in that study, the spatial distribution of the isolates in the city of Goiânia was not carried out, as well as its association with its genetic groups.

The purpose of this study was to evaluate TB spatial distribution in the city of Goiânia in 2007, and to investigate possible epidemiological links between cases found using the VNTR technique.

Methods

Study area

Cross-sectional study held in the city of in Goiânia, capital of the state of Goiás, with area of 741 square kilometers and in 2007 had a total population of 1,239,651. Goiânia is a highly urbanized city and in 2007 had a Human Development Index (HDI) of 0.832, higher than national average (0.800) [11]. The city has 63 administrative divisions, called districts, defined by the National Institute of Geography and Statistics (IBGE) as relatively homogeneous areas concerning the population characteristics, living conditions, and economic situation. The urban districts were classified by IBGE in compliance with the percentage of householders earning twice the current minimum wage (approximately U\$ 108/month) for economic strata purposes (Figure 1) [12]. There was no data on the number of inhabitants by administrative districts for the year of the study (2007) [13].

Study Population and sample

The georeferencing study followed the inclusion criteria: all TB patients (any clinical condition) reported to the City Health Department in 2007, residents of the city of Goiânia. The exclusion criteria were the individuals from other cities, homeless, or in prison. The epidemiological characteristics of these individuals were obtained from the Secretary Municipal Health database. The selected variables were: gender, home address, and clinical condition.

The genotyping evaluation of *M. tuberculosis* isolates included patients with pulmonary TB and positive acid-fast staining attending at the Hospital for Tropical Diseases (HDT) or at the Reference Center for Diagnosis and Therapy. Fifty individuals agreed to participate in the study and signed an Informed Consent Form (ICF). These individuals were interviewed and the variables studied included age, gender, BCG vaccination scar, and predisposing factors for TB. This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Goiás (UFG # 006/2005).

Georeferencing of cases

Goiânia's digital map [14], showing streets and lots was used to locate patients' homes. The home addresses were manually geocoded from individual spots, using geographic information software ArcView 3.2 (Environmental Systems Research Institute Inc., Redlands, USA) generating a map of the cases, which was incorporated into the districts' layer. The group of cases was assessed by Kernel technique, also available through ArcView 3.2, using dot density per square kilometer.

***Mycobacterium tuberculosis* culture and identification**

Sputum samples were processed using the modified method by Corper & Stoner [15], followed by culture in Löwenstein-Jensen (LJ) at 37°C under aerobic conditions for up to eight weeks, according to the recommendations of the National Tuberculosis Control Program. The etiological agent was identified according to time of growth, colony morphology, and biochemical properties, such as production of niacin, growth inhibition by p-nitrobenzoic acid (PNB-500 g/ml) and acid hydrazide thiophene-2-carboxylic (TCH-2 mg/ml) [16].

Genotyping by VNTR:

M. tuberculosis cultures in Lowenstein Jensen medium were inactivated at 80°C for 30 minutes, and the colonies used for DNA extraction followed the van Soolingen *et al* protocol [17]. The number of tandem repetition copies of 15 *loci* MIRU-VNTR was determined by PCR and verified on 1.5% agarose gel, subjected to electrophoresis at 80V for 6 hours. The study used the primers specific for the following *loci*: Miru04, Miru26, Miru40, Miru10, Miru16, Miru31, Mtub04, ETRC, ETRA, Mtub30, Mtub39, QUB4156, QUB11b, Mtub21, QUB26. The PCR systems followed the protocol described by Supply *et al.* [18]. The sizes of the PCR products and therefore the number of alleles found in each *locus* were determined by comparison with a 100bp DNA marker (Invitrogen). The standard strain of *M. tuberculosis* H37Rv was used as positive control. The dendrogram (generated using UPGMA analysis) and the allelic diversity were analyzed through the website - www.miru-vntrplus.org [19]. Clusters were visually checked for consistency and a cluster was defined as 100% similarity.

Statistical analysis

The socio-epidemiological data were evaluated by univariate analysis, using EpiInfo version 6.03 (CDC, Atlanta, GA, U.S.; public domain). The spatial distribution of clinical patients/isolates was analyzed by software SaTScanTM using Poisson method. All analysis adopted significance level of $p < 0.05$.

Results

In 2007, 241 TB cases were diagnosed among residents in the city of Goiânia. Considering Goiânia's population at the time, the number of cases represents a rate of 19.4/100,000 inhabitants. Among the cases, there was predominance of males (63%), with a mean age of 33 years, and the predominant clinical form was pulmonary TB, which accounted for 84.2% of the cases (data not shown). The spatial analysis of TB cases in 2007 showed no significant clustering ($p > 0.05$), suggesting a homogeneous distribution of the cases (Figure 2). However, there are districts, visually observed, free from TB cases, while others concentrate more cases (Northwest and Central Regions).

In order to understand possible transmissions involving the new TB cases in Goiânia, a molecular evaluation of the *M. tuberculosis* culture from 50 patients that agreed to participate in the study was performed. Due to the low representative sampling (21%), a geographical distribution of the 50 TB cases, using Kernel's technique was done (Figure 3), where it was shown a distribution similar to the total new cases of TB (241 cases, Figure 2).

The genotyped *M. tuberculosis* isolates were mostly originated from male (82%) patients, at economically active age between 30 and 50 years (56%), presenting socio-epidemiological features similar to the entire group of TB cases diagnosed in 2007. The genotyped cases represents 21% of new TB

cases from individuals living in the city of Goiânia. Eighty-two percent of patients surveyed were vaccinated with BCG. Despite the small number of individuals evaluated, the majority (78%) showed some type of known predisposition to the development of TB, such as smoking (38%), drinking (20%), previous TB (14%), other diseases such as leprosy and diabetes (38%), or co-infection with HIV (16%) (Data not shown).

According to the genetic characteristics obtained through the VNTR technique, 43 (86%) isolates showed unique profiles, while seven (14%) were grouped into three distinct clusters, two isolates in two clusters, and three samples in a single cluster (Figure 4). According to the genotypic profile and the formation of the clusters found, the patients were evaluated according to age, sex, BCG vaccination, and some type of predisposition to the development of TB to verify for possible risk factors associated with clustering. There were no statistically significant differences (data not shown).

The spatial distribution of genotyped TB cases, highlighting those that were genetically identical, is shown in Figure 5. Due to the limited number of cases, it was not possible to perform statistical analysis. However, the genetically identical individuals infected with *M. tuberculosis* lived in different administrative districts (Figure 5).

Discussion

This study presents, for the first time, a picture of TB molecular epidemiology in the city of Goiânia. Georeferencing 241 TB cases diagnosed in Goiânia, during the year of 2007, revealed no regions with significant clusters, even though there was a predominance of cases in some regions (Figure 2). The correlation between the number of TB cases and the

population of each administrative district is important; however, the city of Goiânia was not included in the population census made by the National Institute of Geography and Statistics in 2007, so such analysis was not carried out [13].

The incidence rate in 2007 for all forms of TB was 19.4/100,000 inhabitants in Goiânia, while in 2010 this rate jumped to 22.7/100,000 inhabitants. This increase in incidence may be a result from several factors including: a) increased number of TB cases higher than the population growth, b) improvement in diagnostic services or, c) improvement in reporting and updating of information system; and consequently these facts must be further investigated [3].

The distribution of cases showed no relationship between disease and the socioeconomic status of the population. The area with the highest concentration of TB cases was located in one of the four low-income areas, the Northwest region, one of the latest expansions of the city. Still, there was also a high concentration of TB cases in upper to intermediate class districts (Figures 1, 2 and 3). This fact contrasts with other cities, such as Ribeirão Preto [9], where the disease was more prevalent in low-income regions and less frequent in regions with higher quality of life. The fact that there was a higher concentration of TB in upper class areas in the city of Goiânia coincides with large business agglomeration, which favors the randomly transmission of *M. tuberculosis* as well as the dissemination outbreaks [20].

The genotyping method used for molecular analysis is a critical factor for the accurate estimative of TB transmission [21]. Although our study investigated only 21% of all new TB cases in the year 2007, we have shown that the

distribution of those cases matched the distribution of the total number of new cases. A homogeneous distribution of cases, without a significant agglomeration of cases was detected. Keeping that in mind, it was observed that there was great genetic variability of circulating isolates in the city of Goiânia (Figure 4) with no geospatial association and therefore an epidemiological relation between them could not be established (Figure 5).

The analysis of clusters are important for epidemiological studies, once it enables to detect the aggregation of cases related to the disease, to test the occurrence of any statistically significant group, and finally, to find evidence of etiologic transmitting factors [8]. The statistical analysis in this study showed no clustering of samples among georeferenced cases.

Studies suggest that patients with TB carrying strains with a genetic pattern, unique and distinct from each other, are considered cases of reactivation of infection acquired earlier. On the other hand, patients infected with *M. tuberculosis* strains that are grouped in clusters represent a disease resulting from a recently acquired infection [22,23,24]. This study's analysis did not establish any transmission link of the disease among patients with strains of the same cluster.

In another study held by our group, using samples of MDR-TB isolated in the state of Goiás, there was no genetic similarity among the isolates [25]. After the evaluation of the fifty isolates, we concluded that, probably, there are no outbreaks of this disease transmission in Goiânia, as it could be originated from endogenous reactivation of latent infection or random and independent transmission. These data corroborate the finding of high diversity level of *M. tuberculosis* strains in the city of Goiânia and in the state of Goiás (Figure 4).

The major limitation of this study was the small number of isolates evaluated (21% of TB cases reported by Secretary Municipal Health (SMS) in Goiânia in 2007); however, it is worth noting that for the majority of diagnosed TB cases, cultures were not carried out or requested according to the Brazilian National TB Control Program, which hindered the access to all the isolates. In addition, during the year of our investigation study, a major change occurred that resulted in the decentralization of the primary care attention and diagnostic procedures to TB patients and consequently the enrollment of TB patients for the study became very difficult.

A minor limitation of the study regards to the administrative districts of Goiânia not being distributed uniformly with the same area and population dimensions; thus, a better analysis would rely on the use of census sectors to define a microenvironment, but the Municipal health system does not adopt such analysis.

Thus, the purpose of this study was to contribute to the health system, pointing out areas with high concentration of the disease, identifying groups and areas considered priorities, and to establish the genetic profiles of the isolates, drawing possible chains of transmission among patients.

Conclusions

This study has concluded that TB appears to be spread out throughout the city of Goiânia, regardless the income of susceptible individuals, concentrating mainly in Central and Northwest regions. The genetic profiles found by the VNTR technique concluded that most of the isolates showed unique profiles, not establishing epidemiological links among the grouped strains.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AMP collaborated for the VNTR analysis technique, comparison of results and write-up of the manuscript. LCSL and LKAMT were involved in data collection and GIS part of the study. APJK and AK were involved in the supervision on the analysis, constructive suggestions, corrections and assistance throughout the development research. All authors were involved in the preparation of the manuscript.

Acknowledgements

The authors are thankful to Financial Support from CNPq (569257/2008-5) and FAPEG 001/2007. We also extend our gratitude to Dr. Ana Lúcia S. Sgambatti de Andrade for their support in the GIS analysis.

References

1. World Health Organization (WHO): **The Global Plan. To Stop TB 2011-2015. Transforming the fight. Towards elimination of Tuberculosis.** Available:
http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf
2. Ministry of Health. Series of Incidence Rate of Tuberculosis: **Brazil, Regions and Federal units of residence and year of diagnosis**, 2011. Available:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_tb_1990_2009_21_03_2011.pdf
3. Ministry of Health/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net

4. Oelemann MC, Fontes NA, Pereira MA, Bravin Y, Silva G, Degrave W, Carvalho, AC, Brito, RC, Kristki, AL, Suffys, PN: **Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Community Health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil.** *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* 2007, **102(4)**: 455-62.
5. World Health Organization. Geneva: **World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, 2008. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth global report. Available from: www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf
6. Ximenes RAA, Martelli CMT, Souza WV, Lapa TM, Albuquerque MFM, Andrade ALSS, Neto, OLM, Silva, AS, Lima,MLC, Portugal, JL: **Vigilância de doenças endêmicas em áreas urbanas: a interface entre mapas de setores censitários e indicadores de morbidade.** *Cad Saúde Pública.* 1999, **15**: 53-61.
7. Andrade ALSS, Silva AS, Martelli CMT, Oliveira RM, Moraes Neto OL, Siqueira Júnior JB, Melo LK, Di Fábio JL: **Population-based surveillance of pediatric pneumonia: use of spatial analysis in an urban area of Central Brazil.** *Cad. Saúde Pública.* 2004, **20 (2)**: 411-21.
8. Tiwari N, Adhikari CMS, Tewari A, Kandpal V: **Investigation of geo-spatial hotspots for the occurrence of tuberculosis in Almora district, India, using GIS and spatial scan statistic.** *International Journal of Health Geographics.* 2006, **5**:33.
9. Hino P, Villa TC, Sassaki CM, Nogueira J de A, Santos CB dos: **Geoprocessing in health area.** *Rev. Latino-Am. Enfermagem.* 2006, **14(6)**: 939-43.

10. Santos LC, Fernandes HB, Alves SL, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. **Epidemiologia molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes do estado de Goiás.** *Rev De Patologia Tropical*. 2006, **35(2)**:16.
11. Data from the Health City Department of Goiânia, Goiás, Brazil.
12. City Planning Institute. Development Plan held in Goiânia - PIDG. Goiânia City Hall, 1992.
13. Brazilian Institute of Geography and Statistics - IBGE. Ministry of Planning, Budget, and Management. Center for Documentation and Information Dissemination. Population Count 2007, Aggregated by Census Sectors. File Documentation. Rio de Janeiro, 2008.
14. Database by census setor. Census 2000. Resultados do universo, Goiás-Goiânia [CD-ROM]. Rio de Janeiro: Foundation Brazilian Institute of Geography and Statistics; 2002.
15. Corper HJ, Stoner RE: **An improved procedure for the diagnostic culture of mammalian tubercle bacilli.** *J Lab Clin Med*. 1946, **31(12)**: 1364-71.
16. Brazil, 2005. Tuberculosis Bacteriology Manual, 3rd ed., Ministry of Health, Funasa, Rio de Janeiro.
17. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW van Embden JD: **DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Methods Enzymol* 1994, **235**: 196-205.
18. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S; Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann

- S, Skuce R, Kremer K, Locht C and van Soolingen D: **Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis***. *J Clin Microbiol*. 2006, **44(12)**: 4498-510.
19. Weniger T, Harmsen D, Supply P, Niemann S: **Mycobacteria MIRU-VNTRplus: online database and analysis tool for MIRU, SPOLIGO, and regions of difference data**. In: 107th General Meeting, American Society for Microbiology. Canada. 2007, 21e15. <<http://www.miru-vntrplus.org/>>
20. Vicentin AH, Santo VG, Carvalho MS: **Mortalidade por tuberculose e indicadores sociais no município do Rio de Janeiro**. *Cienc Saúde Coletiva*. 2002, **7(2)**: 253-63.
21. Yokoyama E, Kishida K, Ichinohe S. **Improved molecular epidemiological of *Mycobacterium tuberculosis* strains using multi-locus variable number of tandem repeats typing**. *Jpn J Infect Dis*. 2007, **60(4)**: 235-6.
22. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. **How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists**. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997, **18(6)**:426-39.
23. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schechter GF, Daley CL, Schoolnik GK: **The epidemiology of tuberculosis in San Francisco; A population-based study using conventional and molecular methods**. *N Engl J Med*. 1994, **330**: 1703-9.

24. Borges M, Cafrune PI, Possuelo LG, Valim ARM, Ribeiro MO, Rosseti MLR: **Análise molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de um centro de saúde ambulatorial em Porto Alegre, (RS).** *J. bras. pneumol.* 2004, **30(4)**: 358-64.
25. Santos LC, Bousquet H de M, Pereira AM, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. **A high prevalence of resistance in new tuberculosis cases of Midwestern Brazil.** *Infect Genet Evol.* 2010, **10(7)**: 1052-7.

Figure Legends:

Figure 1. Socioeconomic status by district, according to head of family's income. City of Goiânia-Goiás. State of Goiás. Brazil. Adapted from Andrade *et al* [7].

Figure 2. Spatial distribution of 241 TB reported cases from patients living in the city of Goiânia, Goiás state, Brazil, 2007. Data from the City Health Department of Goiânia, GO.

Figure 3. Density map of cases generated by Kernel technique with 50 isolates genotyped by the VNTR technique, showing the density of TB cases per square kilometer.

Figure 4. Dendrogram of genetic profiles of 50 samples isolated and analyzed by the 15 *loci* MIRU-VNTR technique.

Figure 5. Spatial distribution of the 50 samples that underwent molecular analysis by the 15 *loci* MIRU-VNTR technique. The house geographic location of each of the 50 patients whose samples were analyzed is identified on the map with the district distribution of Goiânia. The isolates belonging to the same cluster are labeled with the same geometric symbol.

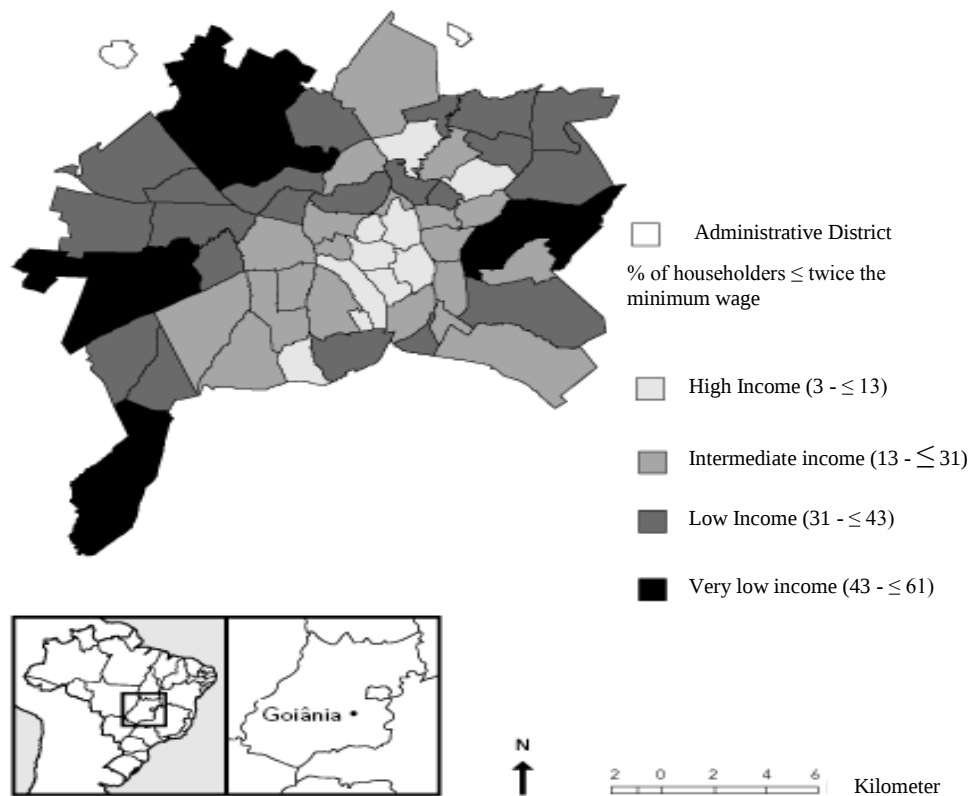


Figure 1. Socioeconomic status by district, according to head of family's income. City of Goiânia-Goiás. State of Goiás. Brazil. Adapted from Andrade et al [7]

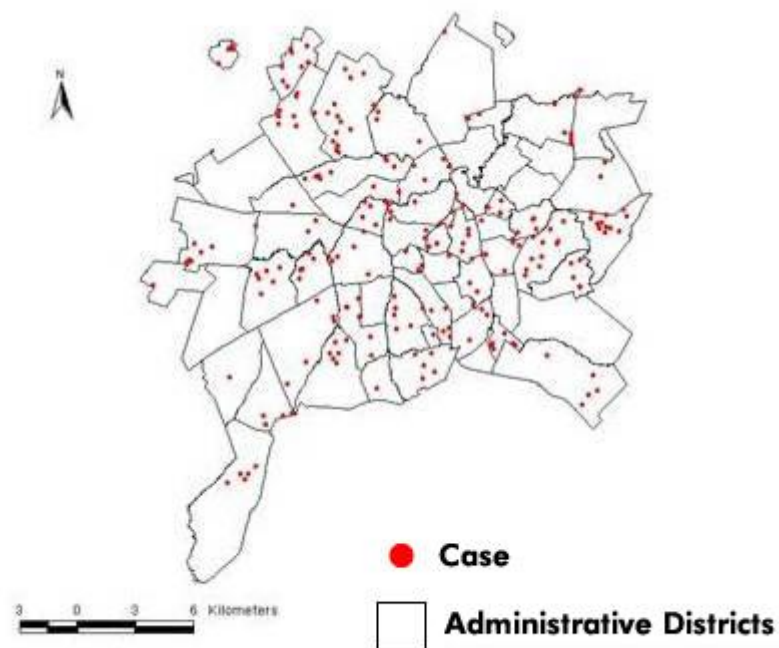


Figure 2. Spatial distribution of 241 TB reported cases in patients living in the city of Goiânia, Goiás state, Brazil, 2007. Data from the City Health Department (SMS) of Goiânia, GO.

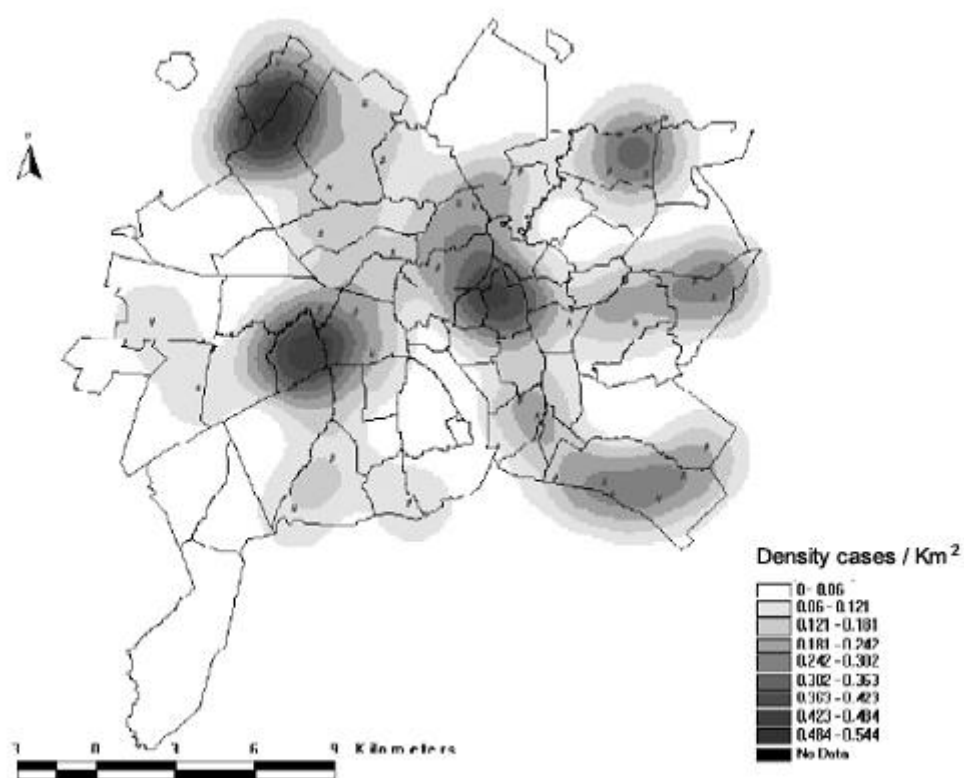


Figure 3. Density map of cases generated by Kernel technique with 50 isolates genotyped by the VNTR technique, showing the density of TB cases per square kilometer.

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR (15): Categorical

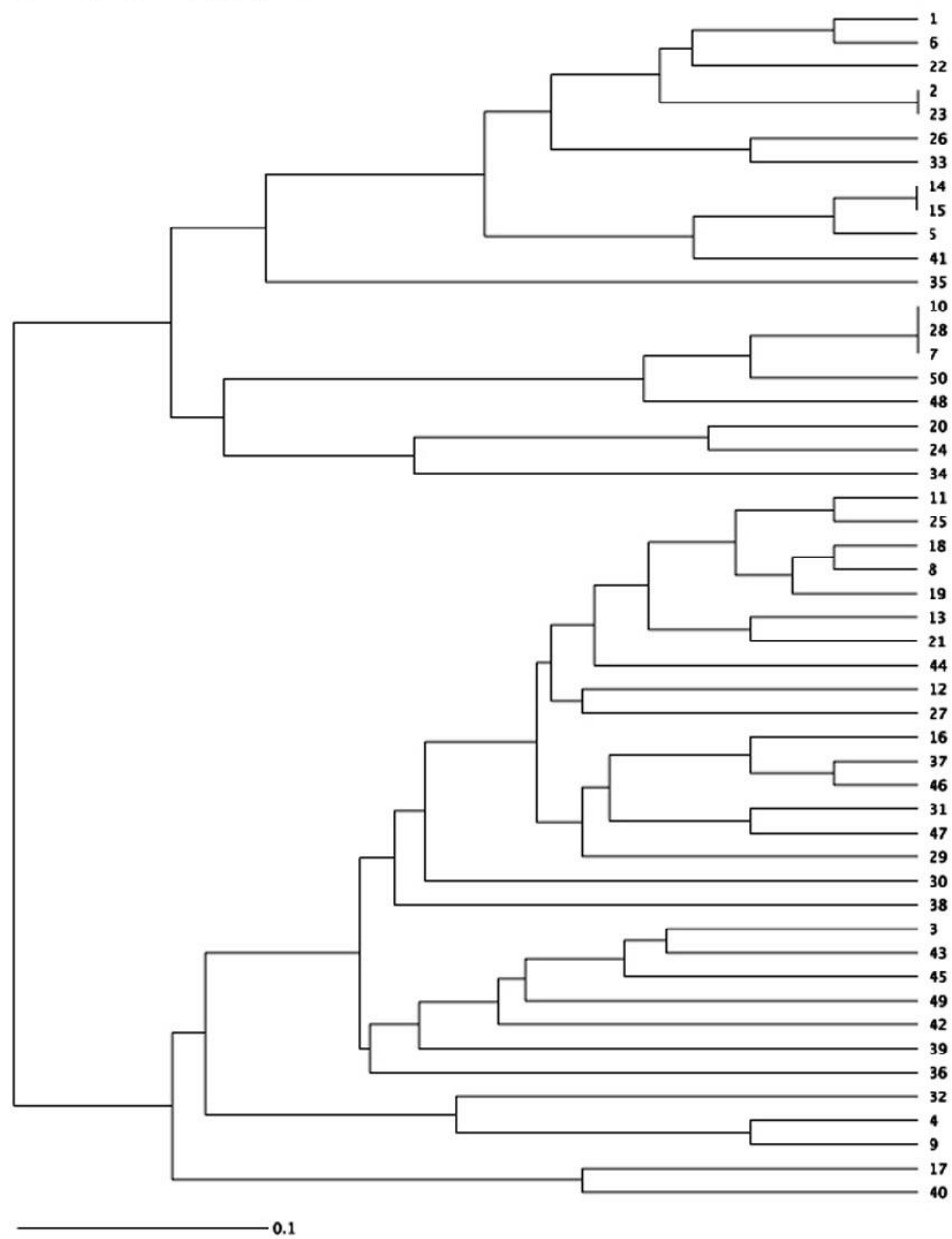


Figure 4. Dendrogram of genetic profiles of 50 samples, isolated and analyzed by the 15 *loci* MIRU- VNTR technique.

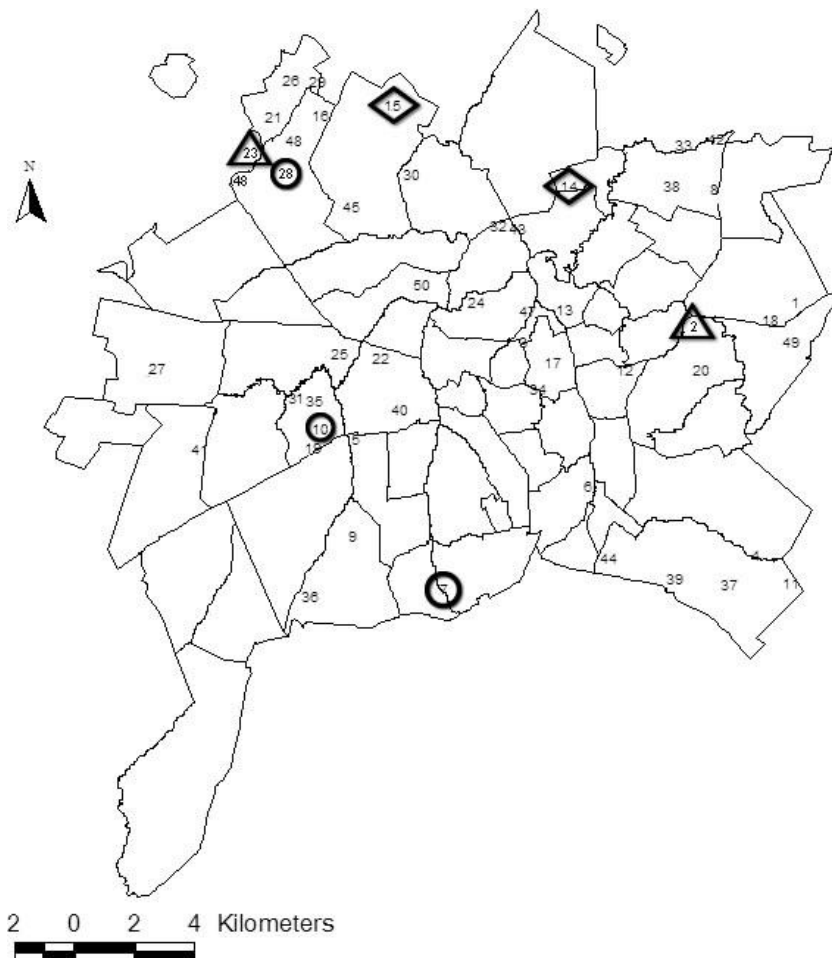


Figure 5. Spatial distribution of the 50 samples that underwent molecular analysis by the 15 *loci* MIRU-VNTR technique. The house geographic location of each of the 50 patients whose samples were analyzed is identified on the map with the district distribution of Goiânia. The isolates belonging to the same *cluster* are labeled with the same geometric symbol.