

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE
RESISTENTE A MÚLTIPLOS FÁRMACOS NO RIO GRANDE
DO SUL**

ANDRÉIA ROSANE DE MOURA VALIM

Porto Alegre – Brasil
Janeiro de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Andréia Rosane de Moura Valim

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE
RESISTENTE A MÚLTIPLOS FÁRMACOS NO RIO GRANDE
DO SUL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador: Dr. Arnaldo Zaha
Co-Orientador: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti**

Porto Alegre – Brasil
Janeiro de 2006

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN) e no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) com apoio financeiro da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo a Pesquisa à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradecimentos

Ao Arnaldo Zaha, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pelo contínuo exemplo de conduta pessoal, profissional e científica. Obrigada por poder compartilhar por tanto tempo a tua sabedoria.

À Maria Lúcia Rossetti, por ter aberto as portas do saber científico ao me envolver em seus projetos, por me receber tão calorosamente no seu grupo de pesquisa. Obrigada pelo apoio eterno, pelo carinho e pela amizade.

Ao grupo de pesquisa em Epidemiologia Molecular de TB do CDCT, Lia, Patrícia e Michele. A contribuição de vocês neste trabalho é imensurável. Lia, obrigada pela disponibilidade, paciência e amizade, por acolher sempre as minhas angústias e auxiliar na busca de soluções. Paty, obrigada pelas conversas extremamente instigantes, pelas críticas, por estar sempre disponível na busca de explicações plausíveis para os eventos observados, pelo incentivo e amizade. Michele, sinto saudades da tua eficiência e do teu astral.

À equipe do Laboratório de Tuberculose, em especial à Marta O. Ribeiro. Martinha, pela disponibilidade, pela paciência em nos emprestar o laboratório e informações. Foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Às minhas grandes colegas de LACEN/CDCT Vivian, Ludi, Camile, Dea e Márcia. Convivemos por tanto tempo que cada uma de vocês desperta bons sentimentos e boas lembranças. Obrigada pelo apoio e incentivo, foram fundamentais. A equipe de apoio do CDCT, Cida e Linda, obrigada pelo precioso auxílio de vocês.

Aos Professores Henrique B. Ferreira e Philip Suffys, membros da comissão de acompanhamento, pela disponibilidade e pelas contribuições no desenvolvimento desta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por oferecer excelentes condições de crescimento científico.

À Sílvia e Luciano, pelo valioso auxílio, disponibilidade e acolhimento.

À equipe da Seção de Pneumologia Sanitária, em especial ao Dr. Cesar Augusto Avelaneda Espina, pelas informações disponibilizadas e pelas sugestões.

À Profª Sídia Jacques Callegari, pelo seu valioso auxílio nas análises estatísticas.

À Universidade de Santa Cruz do Sul, pelo excelente ambiente de trabalho. Lisianne B. Benitez, obrigada pelo teu apoio, incentivo e pela paciência em ouvir minhas frustrações.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida, pela sabedoria e amor transmitido. Aos meus irmãos e famílias, pelo carinho e apoio. Jaque e Sandra, pelo valioso incentivo e pelo acolhimento nesta grande casa. Amo todos vocês.

E, finalmente, aos grandes amores da minha vida, Marco e Júlia, pelo amor, paciência, incentivo e apoio incondicional. Ao nosso bebê por ser o estímulo final necessário para a conclusão desta tese.

À todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho. Obrigada!

"When a thing is new, people say: 'It is not true.'
Later, when its truth becomes obvious, they say: 'It
is not important.' Finally, when its importance
cannot be denied, they say: 'Anyway, it is not
new.'"

- William James, 1896

Dedico esta tese aos meus pais,
Dirceu e Dinorá, pelos ensinamentos
e exemplo de vida. Ao Marco e a
Júlia, pelo amor que compartilhamos.

Índice

Lista de abreviaturasxi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xiv
Resumo	xvi
Abstract.....	xvii
1. Apresentação.....	18
2. Revisão bibliográfica.....	21
2.1 Tuberculose - Magnitude da Doença.....	21
2.2 Agente Etiológico	23
2.3 Histórico da Tuberculose	25
2.4 Genética de <i>M. tuberculosis</i>	27
2.5 Controle Mundial da Tuberculose	30
2.6 Políticas de Controle da Tuberculose no Brasil	31
2.7 Tratamento da Tuberculose	32
2.8 O Controle da Tuberculose Ameaçado pela Resistência aos Fármacos.....	33
2.8 Tuberculose Resistente a Múltiplos Fármacos - TB MDR	35
2.9 Significado da TB MDR.....	36
2.10 Gênese da Tuberculose Resistente a Múltiplos Fármacos.....	40
2.11 Tratamento Diretamente Supervisionado	41
2.11.1 DOTS-Plus.....	43
2.12 Distribuição Global da Tuberculose Resistente a Múltiplos Fármacos	43
2.13 Projeto Global de Vigilância à Resistência aos Fármacos Anti-Tuberculose	44
2.14 Opções terapêuticas na Resistência a Múltiplos Fármacos	50
2.15 Aplicação de Técnicas de Biologia Molecular na Epidemiologia	52
2.15.1 Técnicas de Diferenciação de Linhagens de <i>M. tuberculosis</i>	53
2.15.2 Validação das Técnicas de Genotipagem em Estudos Epidemiológicos	57
2.16 Epidemiologia Molecular das Doenças Infecciosas Suscetíveis e Resistentes aos Fármacos	59
3. Objetivos.....	67

3.1 Geral	67
3.2 Específicos.....	67
4. Materiais e métodos	68
4.1. Tipo e Local do Estudo	68
4.2. Amostragem.....	68
4.2.1 Período do Estudo	68
4.2.2 Número Amostral.....	68
4.2.3 Critérios de Inclusão	69
4.2.4 Critérios de Exclusão.....	69
4.2.5 Manutenção das Linhagens de <i>M. tuberculosis</i>	70
4.3 Cultura do Microrganismo.....	70
4.4 Método das Proporções em Meio Löwestein-Jensen - MPLJ.....	70
4.5 Extração do DNA Cromossomal	71
4.6 Técnica de RFLP	72
4.6.1 Clivagem.....	72
4.6.2 Eletroforese em Gel de Agarose	72
4.6.3 <i>Southern Blotting</i>	72
4.6.4 Hibridização e Detecção	73
4.7 <i>Spoligotyping</i>	74
4.7.1 Primers	74
4.7.2 Reação de Amplificação.....	74
4.7.3 Hibridização dos Produtos da PCR e Detecção.....	74
4.8 Análise dos Resultados de Genotipagem.....	75
4.8 Dados Clínicos e Epidemiológicos.....	76
4.9 Considerações Éticas	76
4.10. Fluxograma do Estudo.....	77
5. Resultados.....	78
5.1. Caracterização do Período do Estudo	78
5.2. Teste de Suscetibilidade.....	78
5.3 Cultivo, Extração de DNA e Manutenção dos Isolados MDR.....	80
5.4 Seleção de Isolados Controles	81
5.5 Origem dos Isolados de <i>M. tuberculosis</i>	81
5.5 Resultados da Genotipagem por IS6110 - RFLP.....	83

5.5.1 Número de Cópias do <i>IS6110</i>	83
5.5.2 Análise dos Isolados de <i>M. tuberculosis</i> em <i>Cluster</i>	84
5.6 Análise dos Padrões Gerados pela Genotipagem por <i>Spoligotyping</i>	92
4.7. Análise dos Dados Clínicos e Epidemiológicos	94
4.7.1 Análise Geral dos Dados Clínicos e Epidemiológicos	95
4.7.2 Classificação dos Pacientes Incluídos no Estudo.....	97
4.7.3 Descrição das Variáveis Analisadas entre os Grupos	98
4.8 Análise dos Pacientes Pertencentes aos Clusters mais Frequentes.....	111
6. Discussão	114
7. Conclusão.....	128
8. Glossário ¹	130
9. Referências bibliográficas.....	132
Apêndices	153

Lista de abreviaturas

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)	HSP	Hospital Sanatório Partenon
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente	IS	<i>Insertion sequence</i>
BCG	Bacilo de Calmette Guérin	INH	Isoniazida
BK	Bacilo de Koch	IUATLD	<i>International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases</i>
CTAB	Brometo de cetil-trimetil-amônio	Kb	Quilobase
cm	Centímetros	LACEN	Laboratório Central
°C	Graus Celsius	LJ	Löwenstein-Jensen
CDC	<i>Centers of Disease Control</i>	M	Molar
DATASUS	Dados epidemiológicos do Sistema Único de Saúde	MDR	<i>Multi-Drug Resistant</i> (Resistência a Múltiplos Fármacos)
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Mg	Miligrama
dntp	Desoxinucleosídeo trifosfato	MgC ₂	Cloreto de Magnésio
DNPS/ MS	Divisão Nacional de Programa de Saúde/ Ministério da Saúde	Min	Minuto
DOTS	<i>Direct Observed Therapy –Short-Course</i> (Tratamento Diretamente Supervisionado)	MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed repetitive units</i> (Unidades Micobacterianas Repetitivas Interespaçadas)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal sódico	mL	Mililitro
EMB	Etambutol	MM	Milimolar
ETH	Etionamida	mg	Miligrama
EtBr	Brometo de etídio	MS	Ministério da Saúde
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	NaCl	Cloreto de sódio
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde	NaOH	Hidróxido de Sódio
H	Horas	nm	Nanômetro
HCl	Ácido Clorídrico	OMS	Organização Mundial da Saúde

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)	pb	Pares de base
HRP	Horseradisch peroxidase (Peroxidase de raiz-forte)	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCT	Programa de Controle da Tuberculose	SM	Estreptomicina
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (Eletroforese de Campo Pulsado)	TB	Tuberculose
PGRS	<i>Polymorphic GC-Rich Sequence</i> (Seqüência Polimórfica Rica em GC)	TB-MDR	Tuberculose resistente a múltiplos fármacos
PNB	Ácido paranitrobenzóico	TCH	Hidrazida de ácido tiofeno
PPD	<i>Purified Protein Derived</i> (Derivado Protéico Purificado)	TE	Tris-EDTA
PZA	Pirazinamida	Tris	Tris (hidroxi-metil) aminometano
REDE-TB	Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose	U	Unidade (atividade enzimática)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição)	UPMGA	Unweighted pair group method with arithmetic averages (Análise de agrupamentos pelo método de médias aritméticas não-ponderadas)
RMP	Rifampicina	UV	Ultravioleta
Rpm	Rotações por minuto	V	Volts
RS	Rio Grande do Sul	VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (Número Variável de Repetições em Tandem)
Seg	Segundos	µg	Micrograma
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio	µL	Microlitros
SINAN	Sistema Nacional de Agravos Notificados	ZN	Ziehl- Neelsen
sSNP	<i>Synonymous Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo sinônimo de um único nucleotídeo)		

Índice de Figuras

Figura 1. Taxa de incidência da tuberculose estimada em 2002	22
Figura 2. Incidência da tuberculose por 100.000 habitantes no RS	23
Figura 3. Mapa circular do cromossomo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	29
Figura 4. Mapa da prevalência da tuberculose resistente primária.	46
Figura 5. Mapa físico da seqüência de inserção IS6110 de <i>M. tuberculosis</i>	55
Figura 6. Possíveis desfechos da infecção por <i>M. tuberculosis</i>	61
Figura 7. Mapa do Rio Grande do Sul com a distribuição dos casos e controles	83
Figura 8. Número de cópias de IS6110 observado em isolados casos e controles.	84
Figura 9. Dendrograma dos padrões dos isolados casos e controles em <i>cluster</i>	86
Figura 10. Dendrograma dos <i>clusters</i> formados entre os isolados controles.	88
Figura 11. Dendrograma composto por todos os isolados MDR.	90
Figura 12. Distribuição dos casos e controles em <i>cluster</i> no Rio Grande do Sul	93
Figura 13. Distribuição dos pacientes por grupo segundo gênero.	99
Figura 14. Distribuição dos pacientes nos grupos de acordo com a etnia	100
Figura 15. Distribuição segundo estado civil entre os grupos	101
Figura 16. Distribuição dos pacientes de acordo com tratamento prévio	103
Figura 17. Classificação dos pacientes de acordo com a falência	104
Figura 18. Distribuição dos pacientes de acordo com a presença de alcoolismo	106
Figura 19. Histórico de encarceramento entre os grupos	107
Figura 20. Resultado da baciloscopia distribuídos entre os grupos	109

Índice de Tabelas

Tabela 1. Micobactérias que causam doença em humanos.	24
Tabela 2. Hierarquia das classes de agentes antituberculose e evidências para o uso.	39
Tabela 3. Inquérito de Prevalência de Resistência no Brasil entre 1995 e 1997.	48
Tabela 4. Número de casos de tuberculose no Rio Grande do Sul e dados sobre o cultivo de <i>M. tuberculosis</i>	78
Tabela 5. Perfil de resistência aos fármacos apresentados pelos isolados	79
Tabela 6. Perfil de resistência dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> analisados	80
Tabela 7. Dados sobre as Coordenadorias Regionais de Saúde do Rio Grande do Sul.	82
Tabela 8. Comparação dos resultados de RFLP baseado no <i>IS6110</i>	85
Tabela 9. Análise dos <i>Clusters</i> Encontrados nos Isolados Controles	87
Tabela 10. Análise dos <i>Clusters</i> Encontrados nos Isolados Casos	89
Tabela 11. Análise dos <i>Clusters</i> Encontrados entre os Isolados casos e controles	92
Tabela 12. <i>Clusters</i> observados no estudo através de RFLP e <i>Spoligotyping</i>	94
Tabela 13. Variáveis analisadas no estudo e o número de respostas	95
Tabela 14. Classificação de acordo com o resultado de genotipagem	98
Tabela 15. Distribuição dos grupos por faixa etária de 20 anos.....	100
Tabela 16. Classificação dos pacientes nos grupos quanto a origem.....	102
Tabela 17. Distribuição dos pacientes que apresentaram recidiva entre os grupos.	104
Tabela 18. Classificação dos grupos quanto ao abandono de tratamento.....	105
Tabela 19. Distribuição dos grupos segundo a presença de BCG.	105
Tabela 20. Distribuição de acordo com a presença ou ausência de diabetes.	108

Tabela 21. Distribuição dos pacientes pelo resultado do teste para o HIV.	108
Tabela 22. Características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos pacientes com tuberculose	110
Tabela 23. Características dos pacientes pertencentes aos <i>clusters</i> observados	113

Resumo

A tuberculose resistente a múltiplos fármacos (TB MDR) é definida como uma forma de tuberculose (TB) causada por *Mycobacterium tuberculosis* resistente a pelo menos isoniazida e rifampicina. A TB MDR é um problema mundial crescente resultante da não adesão dos pacientes ao tratamento e pelo gerenciamento ineficaz da doença pelos sistemas de saúde. Este estudo foi realizado com o objetivo de identificar os fatores de risco e os padrões de transmissão da TB MDR no Estado do Rio Grande do Sul, comparando os resultados obtidos com aqueles casos de TB suscetíveis aos fármacos. Durante os anos de 1999 e 2000 foram identificados 60 isolados MDR no Laboratório Central do RS (LACEN) e 202 isolados suscetíveis aos fármacos anti-TB. Estes isolados foram analisados utilizando a técnica de Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) baseado no IS6110. Os dados clínicos e demográficos dos pacientes portadores destas linhagens também foram analisados. Nos isolados que apresentaram seis ou menos cópias de IS6110 foi realizada uma segunda técnica de genotipagem, o *Spoligotyping*. Os pacientes portadores de linhagens de *M. tuberculosis* com padrões idênticos foram considerados *clusters*. Foi observado que entre os 262 isolados, 94 (36%) pertenciam a 20 distintos *clusters*, e após a análise por *Spoligotyping*, 89 destes isolados (34%) permaneceram em *cluster*. Os isolados MDR não diferiram estatisticamente dos isolados suscetíveis na proporção de formação de *cluster*. Foi observada associação significativa entre a ocorrência de TB MDR e tratamento prévio ($p < 0,001$) e falência no tratamento ($p < 0,001$). No entanto, os pacientes HIV positivos foram associados com TB suscetível ($p = 0,024$). Também foi identificado que pacientes não casados desenvolveram mais TB devida à transmissão recente ($p < 0,005$). A introdução da terapia supervisionada de curta duração (DOTS) no RS será importante, pois auxiliará na diminuição das taxas de falência e abandono de tratamento, evitando o desenvolvimento de novas linhagens MDR.

Abstract

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is defined as a form of tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* resistant at least to isoniazida and rifampicina, the two most powerful anti-TB drugs. MDR-TB is an increasing global problem arising from a patient non-compliance and bad management of the disease by health care systems. This study was conducted to identify risk factors and transmission patterns of MDR-TB in Rio Grande do Sul State, comparing results with data obtained for susceptible TB cases. Sixty isolates of *M. tuberculosis* identified as MDR at a reference laboratory in Rio Grande do Sul State during years 1999 and 2000 were analyzed using *IS6110*-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique. The RFLP patterns of 202 susceptible strains were also analysed and genotyping results compared, as well as the clinical and demographic data. Spoligotyping analysis was performed for isolates presenting low *IS6110* copy number. Patients with identical DNA pattern strains were considered clustered. From 262 isolates, ninety-four (36%) belonged to 20 distinct RFLP clusters, and after spoligotyping analysis, 89 of the isolates (34%) remained in cluster. MDR isolates did not differ statistically in clustering proportion from susceptible strains. A significant association between the occurrence of MDR and previous TB treatment was observed ($p < 0.001$), as well as failure on TB treatment ($p < 0.001$). HIV positive patients were associated to susceptible tuberculosis ($p = 0.024$). We also identified that unmarried patients were more likely to develop TB due to recent transmission than married patients ($p < 0.005$). The introduction of directly observed short-course therapy strategy (DOTS) will be important to decrease default and failure rates, avoiding the development of new MDR strains.

1. Apresentação

O complexo *Mycobacterium tuberculosis*, incluindo as formas resistentes, é um grupo de patógenos com baixa taxa reprodutiva e longo tempo de geração. A tuberculose (TB) é uma das doenças mais importantes que afeta a saúde humana, não apenas porque o número total de casos é especialmente alto (em torno de 9 milhões/ano mundialmente), mas porque aproximadamente um quarto dos doentes morre, a maioria deles adultos jovens (Dye *et al.*, 2002). Globalmente, o número de casos de TB está aumentando 2% por ano, e, o receio é que o número de casos resistentes aos antibióticos possa aumentar de maneira mais rápida (WHO, 2004b).

Essencialmente, os casos nos países em desenvolvimento refletem a pobreza, a falta de condições de vida e ausência de cuidados médicos (Waalder, 2002). A crise global é composta ainda pelo surgimento de linhagens resistentes a múltiplos fármacos na grande maioria dos países, onde alguns dos antibióticos disponíveis são de qualidade inferior ou não são usados por tempo suficiente para o controle da doença, de acordo com os regimes recomendados (Iseman, 1994; Smith, 2003; Omerod, 2005).

A ameaça causada pela TB surge de duas principais maneiras. Primeiro, a percentagem de pacientes contaminados por linhagens resistentes aumentou a ponto de por em risco o controle da TB. Aproximadamente 10% dos novos casos testados na Estônia e Letônia são resistentes a múltiplos fármacos (MDR) e excedem a 25% entre os casos já tratados anteriormente. O gerenciamento da situação é um problema, pois o tratamento é mais tóxico e muito mais caro. A segunda razão é que pessoas com doença pulmonar ativa, incluindo a TB resistente aos antibióticos, apresentam maior mobilidade geográfica. A globalização apresenta conseqüências na transmissão de doenças infecciosas, e as linhagens resistentes podem surgir em qualquer local (Dye *et al.*, 2002). A TB deve ser abordada como uma doença social e não apenas pelo ponto de vista clínico do indivíduo.

Os fatores que atualmente impedem o controle da TB incluem diagnóstico e tratamento inadequados, a necessidade de expansão do programa de terapia diretamente supervisionada (DOTS), a co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a resistência a múltiplos fármacos (Murray, 2006). As linhagens resistentes a múltiplos fármacos simultaneamente, denominadas MDR, apresentam resistência a pelo menos dois dos mais importantes fármacos usados no tratamento da TB, a isoniazida (INH) e a rifampicina (RMP). A transmissão de linhagens resistentes pode ter repercussões na epidemiologia e controle da TB.

Os pacientes infectados com linhagens resistentes apresentam menor chance de cura, pois usualmente o diagnóstico é tardio e, portanto permanecem por períodos maiores transmitindo tuberculose MDR para seus familiares, através de contatos sociais ou em ambientes fechados, como descrito nos EUA e no Leste Europeu (WHO, 1997; Espinal & Dye, 2005).

Até pouco tempo atrás, era quase impossível identificar linhagens individuais de *M. tuberculosis* e, em consequência, acompanhar a transmissão de uma determinada linhagem numa certa região e/ou instituição. Na última década, com o desenvolvimento de metodologias de genotipagem de *M. tuberculosis*, baseadas em reconhecimento de seqüências ou padrões genéticos do microrganismo, foi possível, além de identificar as linhagens, monitorar surtos de TB através da determinação do nível de *clusters* de padrões idênticos ou parecidos, definindo dessa forma fatores de risco para a transmissão da TB.

Entre os vários sistemas de genotipagem descritos, a sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, poder discriminatório e, em consequência, a aplicabilidade, varia de um sistema para outro. Além de diferenças na aplicabilidade dos métodos, causadas por fatores inerentes à técnica, em países como o Brasil, torna-se imperioso avaliar a influência de fatores tais como incidência da TB, predominância de linhagens virulentas, estabilidade genômica das linhagens e fatores sócio-demográficos culturais.

É importante considerar se a doença resulta de reativação de uma infecção prévia ou de transmissão ativa e entender os fatores de risco associados com a transmissão da TB, sendo possível otimizar as ações de saúde e selecionar as prioridades para o controle da TB (Alland *et al.*, 1994; Small, 1994a). Foi estimado, por métodos epidemiológicos convencionais, que 90% dos casos de TB em países em desenvolvimento resultam de reativação de uma infecção adquirida anos antes, enquanto a doença recentemente transmitida tem um papel menor. Os métodos bacteriológicos clássicos têm limitado valor prático por distinguir relativamente pouco as linhagens (Hermans *et al.*, 1990).

Na última década foram descritos vários elementos genéticos repetitivos que contribuem com o polimorfismo do DNA de *M. tuberculosis*, entre estes inclui-se a seqüência de inserção 6110 (IS6110) (Thierry *et al.*, 1990). As análises baseadas no IS6110 por polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) têm sido o método mais freqüentemente usado para distinguir linhagens de *M. tuberculosis* (Otal *et al.*, 1991; van Soolingen *et al.*, 1991; Sahadevan *et al.*, 1995; van Soolingen *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995; Torrea *et al.*, 1996; Kremer *et al.*, 1999; Cave *et al.*, 2005; Ocepek *et al.*, 2005, Samper *et al.*, 2005).

O propósito deste estudo foi realizar epidemiologia molecular descritiva dos casos de TB MDR no Estado do Rio Grande do Sul nos anos de 1999 e 2000 e identificar as linhagens MDR predominantes durante estes anos, bem como a extensão e os fatores de risco para a formação de *cluster* entre estes casos. A informação obtida para os casos MDR foi comparada com resultados de casos de TB suscetível aos fármacos usados no tratamento da tuberculose.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Tuberculose - Magnitude da Doença

A tuberculose (TB), conhecida há milhares de anos, continua sendo um relevante problema de saúde pública (Dye et al, 1999). Apesar dos procedimentos para seu controle (Programas de Controle da Tuberculose) e dos regimes terapêuticos usados, existem problemas inerentes à doença que incluem o surgimento de linhagens resistentes aos fármacos usados no tratamento, a alta correlação da incidência da doença em populações pobres e, mais recentemente, à imunodepressão causada pelo vírus HIV que cria as condições ideais para a transformação da TB em uma doença oportunista (Kaufmann & Van Embden, 1993; Brasil, 1995; Brasil, 1999).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1997 foram estimados oito milhões de novos casos de TB no mundo. Já em 1999, foram 8,4 milhões e a estimativa é que sejam 10,2 milhões, em 2005. A Figura 1 apresenta as taxas de TB estimadas mundialmente em 2002. No Brasil, onde a tuberculose é endêmica, foi estimada no ano de 2002, a ocorrência de 110.083 casos, dos quais foram notificados 81.436 casos (WHO, 2004b). Em 1998, o coeficiente de mortalidade foi de 3,5 por 100.000 habitantes. Porém, estes números não representam a realidade do país, pois parte dos doentes não são diagnosticados nem registrados oficialmente (Brasil, 2002). O Ministério da Saúde considera a tuberculose um problema prioritário no Brasil, pois o país ocupa o 15º lugar entre os 22 países em desenvolvimento responsáveis por 80% dos casos mundiais da doença (Brasil, 2004).

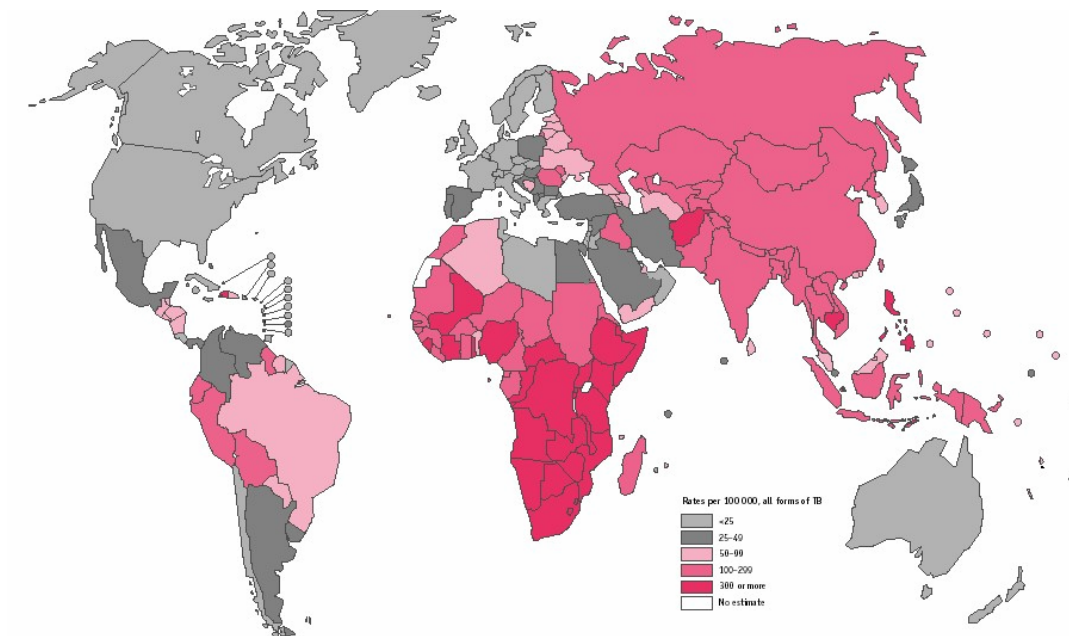


Figura 1. Incidência mundial da tuberculose estimada em 2002 (WHO, 2004b).

No Rio Grande do Sul (RS) a incidência de tuberculose varia conforme a região geográfica. As taxas de TB registradas nas regiões norte e sul do estado são muito diferentes e estão, provavelmente, correlacionadas com a situação sócio-econômica da população (Figura 2) (Ott & Gutierrez, 1993). No ano de 2000, a taxa de incidência da TB no RS foi de 55,7/100.000, e foram notificados 5.610 casos da doença. Mais de 65% dos casos de TB ocorreram na região metropolitana de Porto Alegre (SES-RS, 2003).

Os fatores que determinam a probabilidade de transmissão da doença estão relacionados com (i) as características dos focos, que são os doentes pulmonares bacilíferos e dos contatos, que são as pessoas que coabitam com o doente, levando-se em consideração que o número de bacilos eliminada por uma pessoa é estimada em 102 a 104 nas lesões sólidas, podendo chegar a 107 a 108 em lesões cavitárias (Canetti, 1965); (ii) o ambiente e a maneira como ocorrem suas relações, ou seja, a concentração de bacilos no ar, determinada pelo volume do espaço e sua ventilação;

(iii) o tempo de exposição e (iv) a condição imune da pessoa exposta (Smith & Moss, 1994; ATS, 2000; Trujillo & Kritski, 2000).

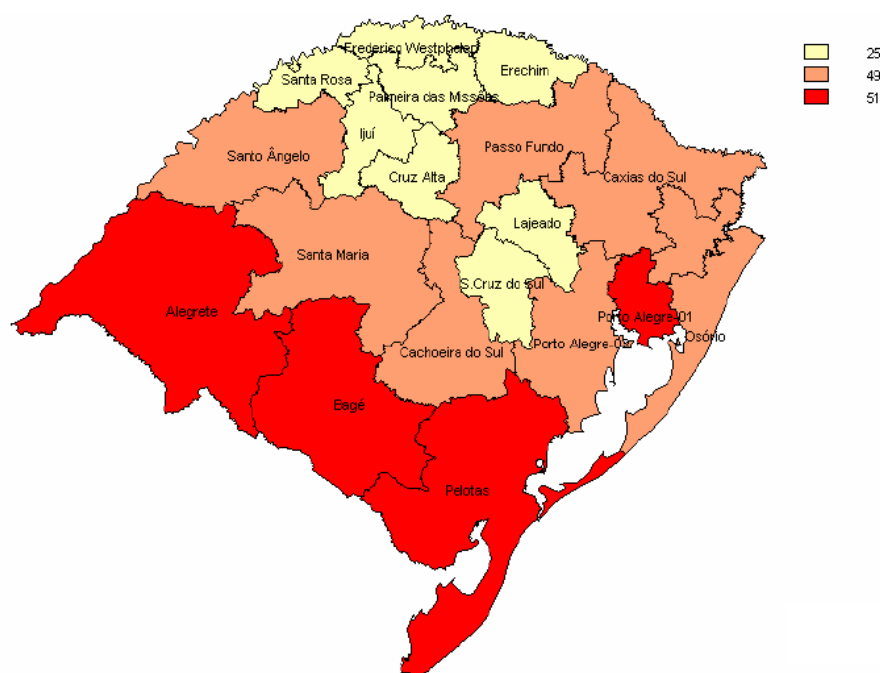


Figura 2. Incidência da Tuberculose por 100.000 habitantes, no Estado do Rio Grande do Sul descrita pela Coordenadoria Regional de Saúde em 2003. Fonte: PCT-RS - <http://www.saude.rs.gov.br/das>

2.2 Agente Etiológico

Os agentes etiológicos da TB são membros do gênero *Mycobacterium*, com o *M. tuberculosis* causando a grande maioria dos casos (Tabela 1). O *M. tuberculosis* foi descoberto por Robert Koch em 1882, quando a doença era chamada de “peste branca” da Europa. Alguns outros agentes, denominados micobactérias atípicas, também causam TB, especialmente o complexo *Mycobacterium avium intracellulare* em pacientes com AIDS (Black, 2002).

Tabela 1. Micobactérias que causam doença em humanos.

Espécies	Doença
<i>M. tuberculosis</i>	Tuberculose
<i>M. avium intracellulare</i>	Doença semelhante à TB em seres humanos, transmitida por aves e suínos
<i>Mycobacterium bovis</i>	TB transmitida pelo gado; poderia ser transmitida por primatas não-humanos
Complexo <i>Mycobacterium fortuitum</i>	Infecções de ferimentos
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Doença semelhante à TB
<i>Mycobacterium leprae</i>	Doença de Hansen (lepra)
<i>Mycobacterium marinum</i>	Lesões cutâneas em seres humanos, tuberculose em peixes
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	Lesões ulcerativas

Fonte: Black, 2002.

Essas bactérias apresentam ácidos micólicos de alto peso molecular (60 a 90 carbonos) em sua parede celular. Este alto conteúdo lipídico serve de proteção à ação de agentes químicos, embora seja facilmente destruído por agentes físicos como calor e radiação ultravioleta. O conteúdo de guanina (G) e citosina (C) no DNA varia de 62 a 70 mol% (Henry, 2001). Os lipídios e ácidos micólicos de cadeia longa nas paredes das células micobacterianas tornam as micobactérias difíceis de serem coradas pelo método de Gram, contribuem para a sobrevivência ambiental destes microrganismos e os protegem de algumas defesas do hospedeiro (Black, 2002).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* inclui as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Mycobacterium bovis-BCG*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canetti*, que são identificadas com base em características fisiológicas e bioquímicas. Apresenta-se como um grupo de bactérias geneticamente muito relacionadas, o que dificulta a sua diferenciação por métodos convencionais (Pfyffer et al., 2003). Esta relação taxonômica muito próxima também é refletida no

seu alto grau de conservação evolutiva, sendo que a homologia em suas seqüências de DNA é de quase 100% (van Embden et al., 1992, Kremer et al., 1999, Henry, 2001, Pfyffer et al., 2003).

M. tuberculosis, a espécie-tipo do gênero, apresenta bacilos curvos ou retos com 0,2 a 0,7 µm de largura por 1,0 a 10 µm de comprimento e possui a propriedade de álcool-ácido resistência, devido à grande quantidade de lipídios presentes em sua parede celular (Brooks et al., 1999, 1995). Permanecem no interior do macrófago em atividade metabólica muito reduzida e sobrevivendo por anos no organismo, caracterizando a dormência metabólica (Cole et al., 1998). Seu tempo de geração é em torno de 18 horas, dependendo da oferta de oxigênio, do pH do meio e de nutrientes. Este crescimento lento do bacilo condiciona a evolução crônica da doença (Kritski et al., 2000).

2.3 Histórico da Tuberculose

A origem de *M. tuberculosis* tem sido objeto de muitas investigações, e acredita-se que bactérias do gênero *Mycobacterium*, semelhante a outros actinomicetos, foram inicialmente encontradas no solo e que algumas espécies evoluíram para viver nos mamíferos. A domesticação do gado, que parece ter ocorrido entre 10.000 e 25.000 anos atrás, pode ter permitido a passagem de um patógeno micobateriano das criações domésticas para os humanos. Na sua adaptação no novo hospedeiro a bactéria deve ter evoluído até o *M. tuberculosis*. Especificamente, há a hipótese de que o *M. bovis*, que causa doença semelhante à TB em gado, foi um precursor evolucionário hipotético de *M. tuberculosis* (Stead, 1997; Smith, 2003).

Dados recentes colocam em dúvida essa hipótese, uma vez que a mesma foi formulada antes das análises dos genomas do complexo *M. tuberculosis*, incluindo os patógenos de humanos e animais *M. microti*, *M. canetti*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* (Brosch et al., 2002). Estes estudos mostraram uma similaridade de 99,9% de DNA entre os membros do complexo *M. tuberculosis*. Entretanto, a existência de raros polimorfismos sinônimos de um único nucleotídeo (sSNP), permitiu a discriminação

entre micobactérias proximamente relacionadas. Estas análises de sSNP sugerem que o *M. bovis* evoluiu ao mesmo tempo que o *M. tuberculosis* (Sreevatsan *et al.*, 1997) e, um estudo de distribuição de deleções e inserções nos genomas do complexo *M. tuberculosis* fornece forte evidência de uma evolução independente para o *M. tuberculosis* e o *M. bovis* a partir de uma outra espécie precursora, possivelmente relacionada ao *M. canetti* (Brosch *et al.*, 2002).

Em termos de registro histórico, existem tabuletas de argila feitas pelos assírios descrevendo pacientes tossindo sangue no século 7 antes de Cristo (a.C.). Hipócrates (século 5 a.C.) descreveu pacientes com consumição (o termo grego é *phthisis*), isto é, emagrecimento associado com dor pulmonar e tosse, freqüentemente com sangue no escarro. Nessa época, a freqüência de descrição de pacientes com sintomas semelhantes à TB já era bem conhecida. Acredita-se que a TB pode ter sido introduzida nestas regiões pela migração de rebanhos de gado Indo-Europeus, os quais carregavam o bacilo da TB. A análise de várias características humanas fenotípicas, como tolerância a lactose, que está associada com a criação de gado, e seleção para a habilidade em utilizar leite, resultou na exposição ao *M. tuberculosis*, e, tem sugerido que os Indo-Europeus transmitiram a doença pela Europa e Ásia durante suas migrações nessas regiões (Haas & Haas, 1996; Smith, 2003).

A Europa, com sua explosão de população no segundo milênio depois de Cristo (d.C.) e o crescimento de grandes centros urbanos, tornou-se o epicentro para muitas epidemias de TB que iniciaram nos séculos 16 e 17. A doença teve um pico na Europa na primeira metade do século 19 e foi estimado que 1/4 dos europeus morreram de TB. Em estudo realizado na época num hospital de Paris, 250 dos 696 cadáveres examinados mostraram que os indivíduos morreram de TB (Dubos & Dubos, 1952 *apud* Smith, 2003). Na última metade do século 19, a mortalidade causada pela TB diminuiu, devida grandemente a melhorias sanitárias e de moradia. Também postulou-se que ocorreu uma seleção natural dos humanos resistentes à TB e que essa seleção teve uma influência importante para a diminuição da doença no século 19.

Os imigrantes europeus ao chegarem ao Novo Mundo trouxeram a doença, e apesar das taxas de mortalidade nunca terem alcançado níveis tão altos quanto na Europa, em grandes centros urbanos como Boston e Nova Iorque as taxas de mortalidade por TB foram de 6 a 7 pessoas por 1.000 habitantes em 1800, declinando para 4 por 1.000 em 1860 (Daniel, 1994). Presumivelmente as medidas de saúde pública tiveram um papel importante na redução das taxas de mortalidade (Smith, 2003).

As taxas de morbidade e mortalidade devido a TB reduziram gradativamente durante o século 20, no mundo desenvolvido, auxiliado por melhores práticas de saúde pública e pela ampla utilização da vacina BCG, bem como pelo desenvolvimento de antibióticos na década de 1950. A tendência em reduzir o número de novos casos começou a inverter-se na metade dos anos 80. As maiores causas foram o aumento do número de desabrigados, aumento da pobreza no mundo desenvolvido, o surgimento da AIDS com a destruição das células que medeiam a resposta imune em pessoas co-infectadas.

Entretanto, o mundo subdesenvolvido continuou sofrendo de TB, como demonstrado pelas estatísticas. A incidência de TB varia de menos de 10 por 100.000 habitantes na América do Norte, de 100 a 300 por 100.000 na Ásia e algumas regiões da Rússia e até acima de 300 por 100.000 no sul e centro da África. Há uma morte causada por TB a cada 15 segundos (acima de 2 milhões por ano). Sem tratamento, acima de 60% das pessoas com a doença morrerão (Kaye & Frieden, 1996; Smith, 2003).

2.4 Genética de *M. tuberculosis*

Até recentemente, a genética de *M. tuberculosis* foi deixada de lado devido às dificuldades em se trabalhar com o organismo e a falta de ferramentas convenientes. O desenvolvimento de muitos métodos genéticos, o seqüenciamento e anotação de todo o genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998; <http://www.sanger.ac.uk>, nº de acesso AL123456) e outras micobactérias relacionadas que foram ou estão

atualmente sendo seqüenciadas, apresentaram novas e importantes informações que estão sendo utilizadas para compreender melhor a tuberculose.

O genoma de *M. tuberculosis* H37Rv consiste de 4.411.532 pares de base (pb) e contém aproximadamente 4.000 genes (Figura 3). Apresenta 91% do genoma com capacidade codificante, sendo que ainda se desconhece a função de 606 genes e foram identificados 6 pseudogenes. Aparentemente, a maior parte da recombinação gênica ocorre através de transposons, que são elementos inerentemente instáveis e têm o potencial de causar muitos tipos de rearranjos tais como transposições, deleções, inversões e duplicações. Os transposons mais simples são seqüências de inserção (IS) sendo que mais de 14 tipos diferentes de IS já foram identificadas no genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998; Moström *et al.*, 2002).

A anotação do genoma de *M. tuberculosis* mostra que esta bactéria apresenta características únicas. Mais de 200 genes são anotados como codificantes para enzimas do metabolismo dos ácidos graxos, compreendendo 6% do total. Entre estes, aproximadamente 100 estão envolvidos com a β -oxidação dos ácidos graxos, enquanto em *E. coli* apenas 50 enzimas estão envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos. *Streptomyces coelicolor*, um actinomiceto distante relacionado, apresenta um total de 115 enzimas, correspondendo a um pouco mais de 1% das proteínas, das quais 59 são anotadas como estando envolvidas com a degradação dos ácidos graxos (Bentley *et al.*, 2002). Esta característica de *M. tuberculosis* pode estar relacionada com a sua habilidade de crescimento nos tecidos do hospedeiro (Smith, 2003).

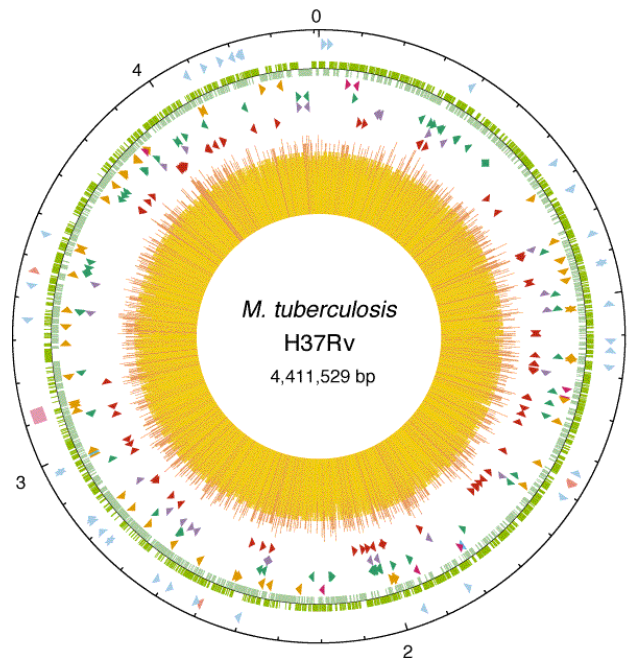


Figura 3. Mapa circular do cromossomo de *M. tuberculosis* H37Rv. O círculo externo mostra a escala em megabases, com o 0 representando a origem de replicação. O anel mais externo denota as posições dos genes de RNA estáveis (tRNAs são azuis e os outros em rosa) e uma região de repetições diretas - DRs (cubo rosa); o segundo anel demonstra a seqüência codificante por fita (sentido horário, verde escuro; sentido anti-horário, verde claro); o terceiro anel retrata seqüências de DNA repetidas (seqüências de inserção, laranja; família REP 13E12, rosa escuro; prófagos, azul); o quarto anel mostra as posições dos membros da família PPE (verde); o quinto anel mostra os membros da família PE (roxo, excluindo PGRS); e o sexto anel mostra as posições das seqüências PGRS (vermelho escuro). O histograma, no centro, representa o conteúdo de G+C, com <65% de G + C em amarelo e >65% de G + C em vermelho (Cole *et al.*, 1998).

Outra característica incomum do genoma de *M. tuberculosis* é a presença de duas grandes famílias não relacionadas, as famílias PE e PPE, constituídas de proteínas ácidas e ricas em glicina. Os nomes originam-se das seqüências Pro-Glu (PE) e Pro-Pro-Glu (PPE), encontradas nas regiões N-terminais em cada uma destas famílias de proteínas, que são compostas de aproximadamente 110 e 180 aminoácidos, respectivamente. Os 172 genes, 104 para a classe PE e 68 para PPE,

compreendem mais de 4% dos genes em *M. tuberculosis*, e níveis de abundância similares também foram observados em outros membros do complexo *M. tuberculosis* (Brosch *et al.*, 2000). Os genes PE e PPE não são exclusivos aos membros do complexo *M. tuberculosis*, uma vez que *M. leprae* apresenta 26 genes para estas 2 famílias (Smith, 2003).

2.5 Controle Mundial da Tuberculose

A OMS declarou a situação da TB como "estado de emergência" em 1993, quando observou a dificuldade de controlar a doença. Como a enfermidade já era bem conhecida (sua fisiopatologia, o diagnóstico, os esquemas terapêuticos e os medicamentos disponíveis) a maioria dos países a negligenciou. Mas o conhecimento não foi efetivamente aplicado para toda a população resultando em incremento da incidência em países desenvolvidos e manutenção das elevadas taxas nos países em desenvolvimento (Ruffino-Netto, 2002).

A identificação dos 22 países responsáveis por aproximadamente 80% da TB mundial em 2000 fez com que novas estratégias para o controle da doença fossem delineadas, além disso houve o comprometimento dos governantes destes países em considerar a TB como um alvo a ser combatido. O objetivo da OMS foi de detectar 70% dos casos de baciloscopia positiva e curar 85% destes casos detectados até o ano de 2005 (Floyd *et al.*, 2002; WHO, 2002).

Os 22 países com alta incidência foram definidos a partir do número total de casos estimados em 1998 e são: Índia, China, Indonésia, Bangladesh, Paquistão, Nigéria, Filipinas, África do Sul, Etiópia, Vietnã, Federação Russa, República Democrática do Congo, Brasil, Tanzânia, Quênia, Tailândia, Mianmar, Afeganistão, Uganda, Peru, Zimbábue e Camboja. Estes países têm 6,5 milhões dos 8,1 milhões de casos mundiais estimados em 1998 (WHO, 2000).

Foram realizadas globalmente ações mais efetivas para o controle da doença, ampliação dos recursos financeiros e, principalmente, buscado o comprometimento dos governos destes países. Estes esforços têm auxiliado, porém ainda são

necessárias mais ações como (i) análise mais específica em cada país para avaliar a necessidade de mais recursos e fortalecer os serviços de saúde e (ii) melhor definição e análise de custo para novas intervenções ou estratégias para melhorar os níveis de controle (Floyd *et al.*, 2002).

2.6 Políticas de Controle da Tuberculose no Brasil

A tuberculose, desde sua introdução no Brasil pelos portugueses e missionários jesuítas (Ruffino-Netto, 1999), foi combatida principalmente através de ações governamentais. Em 1941, foi criado o Serviço Nacional de Tuberculose (SNT) e em 1946 foi instaurada a Campanha Nacional Contra a Tuberculose, que objetivava controlar a doença através da uniformização das ações e descentralização dos serviços. Nesta década foram introduzidos os tuberculostáticos que alteraram os dados de mortalidade por TB. Na década de 60 foram padronizados os esquemas terapêuticos (isoniazida (INH), estreptomicina (SM) e ácido para-aminosalicílico (PAS)), inicialmente com duração de 18 meses e depois sendo reduzido para 12 meses (Ruffino-Netto, 2002).

Na década de 70 o Serviço Nacional de Tuberculose é substituído pela Divisão Nacional de Tuberculose (DNT), que através da Central de Medicamentos (CEME) fornece os tuberculostáticos para todos os doentes do país. Ainda nesta década ocorre a introdução da vacinação com BCG, com obrigatoriedade aos menores de um ano de idade a partir de 1976. No final da década ocorre a alteração do esquema de tratamento, passando para um esquema de curta duração com a introdução da rifampicina (RMP) (INH, RMP e pirazinamida (PZA) por seis meses) (Ruffino-Netto, 2002).

A descentralização das ações foi ocorrendo através do envolvimento das Secretarias Estaduais de Saúde e da organização dos serviços de saúde. Na década de 80 todos os estados brasileiros estavam organizados para realizar o controle da TB. Em 1990 ocorre a extinção da Coordenação Nacional para o Controle da Tuberculose (CNCT) e em consequência há a desestruturação do Programa de Controle da Tuberculose em nível federal, com enfraquecimento das coordenações

estaduais, diminuição de recursos financeiros, diminuição das supervisões do programa, disseminação da AIDS, queda da área de cobertura, diminuição da busca de casos novos, piora dos resultados de tratamento e aumento do abandono do tratamento (Ruffino-Netto, 2002; Ruffino-Netto, 1999).

A partir da declaração de "estado de emergência para a tuberculose", pela OMS, foram elaboradas ações para o controle da doença no Brasil. Estas tinham por objetivo implementar ações em 230 municípios prioritários, onde se concentravam 75% dos casos de TB do país, visando diminuir a transmissão. Buscando reforçar as ações implantadas, em 1998 o Ministério da Saúde lança o Plano Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT). O PNCT baseia suas ações através da articulação das três esferas de gestão do Sistema Único de Saúde (União, Estados e Municípios) e prevê a disponibilidade de medicamentos, tratamento supervisionado e vigilância de resistência aos fármacos (Ruffino-Netto, 2002).

2.7 Tratamento da Tuberculose

A quimioterapia é fundamental no controle da TB pois interrompe a cadeia de transmissão, que são os pacientes bacilíferos. No entanto é necessário que os fármacos sejam utilizados em esquemas terapêuticos padronizados: (i) administrados em combinação de pelo menos 3 fármacos, com ação sobre diferentes sítios de lesão e sobre diferentes fases do metabolismo bacteriano, para prevenir o desenvolvimento de resistência; (ii) prescritos corretamente e por tempo prolongado de tratamento, visando atingir os bacilos de crescimento lento e intermitente; e (iii) tomados regularmente para manter as concentrações necessárias sobre a população bacilar (Brasil, 1995; IUATLD, 2000).

Fatores como, o lento crescimento de *M. tuberculosis*, causado pelo tempo prolongado para multiplicar-se (em torno de 20 horas), sua atividade metabólica e a localização celular, determinam que o tempo necessário para a quimioterapia seja prolongado. A população micobacteriana patogênica pode ser dividida em quatro componentes: (i) com metabolismo ativo e crescimento rápido, em ambiente aeróbio; (ii) com metabolismo semidormente em ambiente intracelular ácido (lisossomo), onde

há uma baixa concentração de oxigênio; (iii) com metabolismo semidormente em ambiente intracelular não ácido (citoplasma); e (iv) com metabolismo extracelular dormente. Esta última apresenta uma propriedade única da infecção micobacteriana, onde o microorganismo é capaz de sobreviver quiescente por anos ou décadas (Mitchison, 1985; Gillespie, 2002).

Em 1979 a Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária/Ministério da Saúde (DNPS/MS) normatizou para todo o país um Programa de Controle da Tuberculose (PCT) tendo como base fundamental o tratamento quimioterápico, com um esquema de primeira linha, chamado Esquema 1 (E-1) ou RHZ de curta duração: RMP, INH e PZA por 2 meses, seguidos de RMP e INH por 4 meses. O E-1 é indicado para todas as formas de tuberculose sem uso prévio de medicação e, para o retratamento, nos casos de recidiva depois de curados, desde que estes pacientes tenham tido alta por cura há mais de cinco anos (Brasil, 2002b). Para pacientes que se tornaram positivos após abandonar o tratamento inicial com E-1 ou apresentarem recidiva após cura (período menor que 5 anos) com E-1, utiliza-se esquema 1 reforçado com etambutol (EMB) (Brasil, 2002).

Para TB extrapulmonar, na forma meningoencefálica, é recomendada uma terapia mais prolongada, esquema 2 (E-2), o qual é constituído pelo uso de RMP, INH e PZA por dois meses, seguidos de RMP e INH por sete meses (Brasil, 2002b).

2.8 O Controle da Tuberculose Ameaçado pela Resistência aos Fármacos

O surgimento de resistência aos antimicrobianos é uma ocorrência biológica natural. A introdução de cada agente antimicrobiano na prática clínica para o tratamento das doenças infecciosas em humanos e animais é seguida pela detecção laboratorial de microrganismos resistentes. A resistência laboratorial é caracterizada pela capacidade dos microrganismos em multiplicar-se na presença de concentrações de antibióticos semelhantes às doses terapêuticas alcançadas nos tecidos (WHO, 2004a).

Algumas resistências podem ser associadas às características de uma espécie, a mutações ou transferência de genes. Genes de resistência codificam informações sobre uma variedade de mecanismos usados pelos microrganismos para resistir ao efeito inibitório de antimicrobianos específicos. Estes mecanismos podem conferir resistência a outros antimicrobianos da mesma classe e algumas vezes a antimicrobianos de classes diferentes (WHO, 2001b).

Tanto o aumento do uso como o mau uso de antimicrobianos têm provocado o desenvolvimento de resistência nos microrganismos, trazendo novos desafios para a clínica e para os programas de controle (Pyle, 1947; Crofton & Mitchison, 1948; Mitchison, 1950; Canetti, 1965; Mahmoudi & Iseman, 1993).

A resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos anti-tuberculose (anti-TB) é um fenômeno desencadeado pelo homem. Os isolados selvagens de *M. tuberculosis* que nunca foram expostos aos agentes anti-TB não apresentam resistência clínica (Kochi *et al.*, 1993). Há poucas exceções, porém elas não contribuem para a explosão mundial dos níveis de resistência. Por exemplo, foram observados isolados de *M. tuberculosis* em Madras, na Índia, com um nível de resistência ao ácido para-aminosalicílico superior ao de isolados do Reino Unido. Os isolados de *M. tuberculosis* de Madras também apresentaram uma concentração inibitória maior de tioacetazona que os isolados da Inglaterra e de outras partes da Índia (Mitchison, 1968). Este tipo de resistência é chamado de resistência natural. A maioria dos isolados bovinos é naturalmente resistente ao ácido para-aminosalicílico e a pirazinamida e a maioria das micobactérias que não são *M. tuberculosis* (MOTT) apresenta resistência ao regime terapêutico padrão (Konno *et al.*, 1967).

Exposição a um único fármaco, como resultado de uma má aderência ao tratamento, prescrição inapropriada, suplemento irregular do medicamento, baixa qualidade do fármaco, impede o crescimento de microrganismos suscetíveis a este fármaco, porém permite a multiplicação de linhagens isoladas com mutações espontâneas que conferem resistência ao fármaco (Stewart *et al.*, 1962; Rossetti *et al.*, 2002). Este fenômeno é chamado de resistência adquirida.

A subsequente transmissão da linhagem resistente a um novo paciente é conhecida como resistência primária (WHO, 1998 *apud* Pablos-Mendez, 2002). Eventos cumulativos e independentes resultam na tuberculose resistente a múltiplos fármacos ou multirresistente, definida internacionalmente como resistência a pelo menos RMP e INH.

Ambos, resistência adquirida e resistência primária contribuem com a incidência da TB MDR (Pablos-Mendez, 2002). Por serem mais convenientes são utilizados na prática os conceitos "resistência entre casos novos" e "resistência entre casos previamente tratados" (Espinal *et al.*, 2001; WHO, 2003b).

O surgimento de *M. tuberculosis* resistente é associado a uma variedade de fatores relacionados ao gerenciamento, aos serviços de saúde e aos pacientes. Em alguns países os fatores relacionados ao gerenciamento podem incluir a ausência de regimes terapêuticos padronizados, uma implementação ineficaz de programas de controle, fornecimento ineficaz dos medicamentos, recursos escassos, instabilidade política e falta de comprometimento dos governantes.

O uso de medicamentos sem qualidade comprovada (Laserson *et al.*, 2001) é uma preocupação adicional. Entretanto, o gerenciamento incorreto de casos individuais, as dificuldades em selecionar o esquema terapêutico apropriado, a falta de aderência dos pacientes ao tratamento prescrito também contribuem para o desenvolvimento da resistência (Greenhalgh, 1987; Sumartojo *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Hurtig *et al.*, 2000; WHO, 2001b).

2.8 Tuberculose Resistente a Múltiplos Fármacos - TB MDR

A forma de TB com bacilos resistentes à RMP e INH foi conceitualmente denominada MDR-TB (*Multidrug Resistant Tuberculosis*) nos EUA e, universalmente aceita a partir da adoção deste conceito pelo Centers of Disease Control (CDC) em 1992. No Brasil, de acordo com o I Consenso Nacional em Tuberculose (1997) e o Manual de Normas para o Controle da Tuberculose (2000), considera-se um caso resistente a múltiplos fármacos, além do aspecto bacteriológico, o aspecto

operacional do controle da doença, pois existe um esquema de reserva para o retratamento de casos (E-1R). A variável bacteriológica consiste na resistência *in vitro* à INH e RMP e a outro fármaco, PZA, EMB e/ou SM. O aspecto operacional diz respeito aos casos de falência operacional aos esquemas padronizados, E-1 e E-3 (Dalcolmo *et al*, 1995; Fortes & Dalcolmo, 1996). Quando essa situação acontece, são indicados esquemas especiais com fármacos de segunda linha (alternativos), sob os cuidados de um sistema de Vigilância Epidemiológica da TB MDR (Brasil, 2002). A definição de resistência a múltiplos fármacos ou multirresistência adotada neste estudo foi àquela proposta pelo CDC.

A transmissão de linhagens resistentes pode ter sérias repercussões na epidemiologia e controle da TB. Para o tratamento da TB MDR, a estratégia recomendada pela OMS, é o DOTS-Plus, que, além de todos os componentes da terapia supervisionada (DOTS), inclui outros aspectos como a duração do tratamento de 18 a 24 meses, o uso de fármacos de segunda linha: kanamicina (KM), cicloserina (CS), etionamida (ETH), ácido p-aminosalicílico (PAS), tiacetazona (TZ), ofloxacina, capreomicina (CPM), disponibilidade de realização de testes de suscetibilidade, unidade de atendimento e tratamento especializado. Tanto os pacientes infectados com linhagens resistentes a múltiplos fármacos têm menos chance de cura, como sofrem com a maior toxicidade dos fármacos de segunda linha (Espinal *et al*, 1999; WHO, 2000).

O Brasil emprega o tratamento de curta duração desde 1980 e apresenta uma baixa proporção de casos de TB MDR primária, chegando ser até 10 vezes menor do que outros países que pouco ou nunca fizeram uso desta combinação de fármacos em seus programas de controle. Isto se deve não só ao uso da apresentação de INH e RMP combinados em uma única cápsula, mas principalmente à ausência de tuberculostáticos à venda em farmácias (Brasil, 2002).

2.9 Significado da TB MDR

A tuberculose resistente a múltiplos fármacos ainda apresenta baixa frequência na maioria dos países. A prevalência global em pacientes nunca tratados

permanece abaixo de 2% (Pablos-Méndez *et al.*, 1997; Espinal *et al.*, 2000), décadas após a introdução de medicamentos para tratar a TB. O aumento, embora presente em surtos como em pacientes imunocomprometidos pela AIDS ou má nutrição, tem sido gradual (Espinal, 2003; Omerode, 2005). Por outro lado, nas zonas de risco na Europa Oriental e outros lugares os níveis de TB MDR são alarmantes (Pablos-Méndez *et al.*, 1997; Espinal *et al.*, 2000; Omerode, 2005).

Enquanto algumas linhagens de *M. tuberculosis* MDR têm causado grandes epidemias, recentes análises baseadas em epidemiologia molecular sugerem que elas são, em média, menos infecciosas que os organismos suscetíveis (van Soolingen *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2000). As mutações genéticas que conferem a vantagem de sobrevivência na presença de um fator ambiental podem tornar-se um fardo na ausência de tal pressão seletiva (Cohn *et al.*, 1954 *apud* Espinal, 2003).

O fator de seleção para a TB MDR é o tratamento medicamentoso inadequado (Brudney & Dobkin, 1991), o qual pode ser evitado pela terapia supervisionada (Weis *et al.*, 1994). Assim, mesmo na ausência de um tratamento definido para a TB MDR, a prevalência não necessariamente aumenta (Kam & Yip, 2001). Vários ciclos de tratamento inadequado levam a geração de TB resistente, que posteriormente, pode ser transmitida a outras pessoas (Mukherjee *et al.*, 2004).

Globalmente, é estimado que 20% dos pacientes com TB abandonam ou têm falha terapêutica (Dye *et al.*, 1999), mas menos de 2% apresentam TB MDR (Pablos-Méndez, *et al.*, 2002). A grande maioria dos pacientes que não são tratados com sucesso não tem TB MDR (Pablos-Méndez *et al.*, 1997; Espinal *et al.*, 2000), mesmo nas áreas de risco, indicando falência devido ao uso inapropriado dos tuberculostáticos. Isto representa a implementação inadequada do programa DOTS, mais que a falência dos fármacos propriamente dita (Pablos-Méndez *et al.*, 2002).

Além disso, um programa que não funciona de modo adequado pode criar TB MDR muito mais rápido do que pode tratá-la, mesmo se recursos ilimitados forem disponibilizados. A TB MDR resulta de um gerenciamento ineficiente, isto é, tratamento farmacológico inadequado seguido de falhas no controle da infecção

(Brudney & Dobkin, 1991) e a sua prevalência é dez vezes mais alta em pacientes previamente tratados do que em pacientes novos (Pablos-Méndez *et al.*, 1997). A maior prioridade para acabar com a TB MDR deve ser a sua prevenção, sendo que o estabelecimento do programa de tratamento supervisionado (DOTS) tem reduzido o desenvolvimento de TB MDR e a mortalidade em 70% (Suarez *et al.*, 2002).

Os benefícios de um programa para tratar a TB MDR estão sendo avaliados. Os custos são substanciais, pois o tratamento requer a administração de fármacos mais tóxicos e menos efetivos, sendo prescritos por um período três vezes maior e 100 vezes mais caro que o tratamento de curta duração (Dye *et al.*, 2002). Os programas para o controle da TB devem gastar 30% do seu orçamento em menos de 3% dos seus casos. Serão necessárias análises de custo-efetividade antes de implementar programas nacionais para tratar a TB MDR (Pablos-Méndez *et al.*, 2002).

É necessário, no entanto, o desenvolvimento de protocolos para o tratamento de TB MDR para guiar os clínicos e os programas de controle de TB. Mukherjee e colaboradores (2004) apresentaram uma análise de coorte retrospectiva sobre o tratamento da TB MDR, enfatizando as diferenças praticadas na escolha do tratamento e as características dos pacientes. As taxas de cura observadas neste estudo entre os pacientes com TB MDR variaram de 38 a 100%, enquanto as taxas de falência variaram de 0 a 44%. A proporção de pacientes com história prévia de tratamento para TB variou de 32 a 100% nos relatos analisados (Mukherjee *et al.*, 2004). A Tabela 2 apresenta as classes de fármacos utilizados no tratamento da TB, a eficácia contra o *M. tuberculosis* e as evidências para a sua utilização.

Tabela 2. Hierarquia das classes de agentes antituberculose e evidências para o uso. A potência dos fármacos diminui gradativamente do topo para o fim da Tabela.

Grupo	Eficácia contra o <i>M. tuberculosis</i>
Grupo 1. Agentes orais de primeira linha Isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol.	Dados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> que sustentam o uso. Evidências histórica e clínicas sugerem que estes agentes são as mais potentes medicações orais antituberculose. Etambutol em concentrações (25 mg/kg) pode ser bactericida (Jindani <i>et al.</i> , 1980).
Grupo 2. Injetáveis Estreptomicina, canamicina, amicacina e capriomicina	São bactericidas e dados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sustentam a utilização (Sanders <i>et al.</i> , 1982; Heifets <i>et al.</i> , 1989; Peloquin, 1993; Blaser <i>et al.</i> , 1995; Rastogui <i>et al.</i> , 1996).
Grupo 3. Fluoroquinolonas Ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino*, gatifloxacino*, esparfloxacino*	Bactericidas. Dados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sustentam a utilização (Kohno <i>et al.</i> , 1992; Hong Kong Chest Service, 1992; Kennedy <i>et al.</i> , 1996). Os novos agentes apresentam concentrações inibitórias muito baixas (Rastogui & Goh, 1991; Ji <i>et al.</i> , 1998), porém a importância clínica desta característica é desconhecida.
Grupo 4. Agentes bacteriostáticos de segunda linha Etionamida, cicloserina, ácido p-aminosalicílico	Bacteriostático. Dados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sustentam a utilização (Joseph <i>et al.</i> , 1964; Anon, 1968; Gupta <i>et al.</i> , 1977; Sanders <i>et al.</i> , 1982; Jaju & Ahuja, 1983; Heifets <i>et al.</i> , 1989; Peloquin, 1993; Harding & Bailey, 1994; Rastogui <i>et al.</i> , 1996).
Grupo 5. Outros fármacos (agentes potencialmente úteis com evidências animais e clínicas em conflito ou agentes com eficácia não comprovada devida possível resistência cruzada) Clofazimina*	Bacteriostático <i>in vitro</i> (Bastian & Portales, 2000). Dados conflitantes em diferentes modelos animais.
Amoxicilina/ácido clavulânico	β -Lactâmico em combinação com inibidor de β -lactamase bactericida <i>in vitro</i> (Cynamon & Palmer, 1983). Dados clínicos conflitantes sobre a atividade bactericida inicial (Nadler <i>et al.</i> , 1991; Chambers <i>et al.</i> , 1998; Donald <i>et al.</i> , 2001).
Claritromicina	Apesar das propriedades antimicrobianas descritas (Cavalieri <i>et al.</i> , 1995; Hofner <i>et al.</i> , 1997), incluindo um aumento da habilidade quando utilizada em combinação com os fármacos antituberculose padrões em linhagens MDR, os dados de estudos <i>in vivo</i> e em animais são conflitantes (Luna-Herrera <i>et al.</i> , 1995; Truffot-Pernot <i>et al.</i> , 1995; Rastogui <i>et al.</i> , 1996; Mor & Esfandiari, 1997). A utilidade clínica ainda não está determinada.
Rifabutin*	Pode ser utilizado contra alguns isolados de TB MDR (resistente a rifampicina <i>in vitro</i> , porém sensível a rifabutin). Evidências <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de atividade bacteriostática.
Tiacetazona*	Freqüentemente é observada resistência cruzada com isoniazida e etionamida. Alta taxa de efeitos adversos em pacientes portadores de HIV-1, não sendo recomendado o uso em pacientes com suspeita desta infecção (British Medical Council, 1960; Heifets <i>et al.</i> ,

Altas doses de isoniazida	1990; Okwera <i>et al.</i> , 1994). Modelos animais sustentam o uso. Dados clínicos conflitantes. É recomendada a descontinuação do tratamento com isoniazida em casos confirmados de TB MDR, entretanto altas doses (16-20 mg/kg duas vezes por semana) podem ter alguma resposta (Moulding, 1981; Frieden <i>et al.</i> , 1996b).
---------------------------	--

* Medicamentos não registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)

Adaptado de Mukherjee *et al.*, 2004.

2.10 Gênese da Tuberculose Resistente a Múltiplos Fármacos

A resistência aos antibióticos usados no tratamento da TB surgiu logo após a sua introdução, há pouco mais de 50 anos atrás (Crofton & Mitchison, 1948 *apud* Pablos-Mendez, 2002). Um estudo realizado pela International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUALTD) em 17 países no final da década de 50 encontrou resistência primária de 3,7% para estreptomomicina, 3% para isoniazida e 1% para os dois fármacos juntos (Crofton, 1960 *apud* Pablos-Mendez, 2002). O desfecho clínico no tratamento de casos com resistência dupla era insatisfatório (análogo ao que ocorre atualmente no tratamento da TB MDR), porém o problema foi considerado pouco importante, pois apenas uma pequena proporção dos tratamentos falhava (Pablos-Mendez, 2002). Durante a década de 60 novas informações sobre a magnitude da resistência aos fármacos tornou-se disponível incluindo o método das proporções para o teste de suscetibilidade aos fármacos, desenvolvido no Instituto Pasteur (Canetti *et al.*, 1963). Nesta década, foi descrita a resistência primária a pelo menos um fármaco, com prevalência variando entre 3 e 13% na Finlândia, Itália, Grã Bretanha, Canadá, Austrália, Japão, França e Estados Unidos (Espinal, 2003). Estudos realizados em Hong Kong em 1962, Quênia em 1964 e na Índia em 1965 descreveram prevalências de resistência de 20%, 14,7% e 22%, respectivamente. Neste período já foi possível identificar que em países em desenvolvimento há uma prevalência de resistência superior àquela encontrada em países desenvolvidos (Espinal, 2003).

Além disso, os estudos clínicos demonstravam que o tratamento padronizado sem os testes de suscetibilidade de rotina produzia desfechos similares aqueles cujo

perfil de suscetibilidade eram conhecidos e o tratamento era individualizado (Hong Kong Tuberculosis Treatment Services, 1972 *apud* Espinal, 2003). A introdução da RMP no início da década de 70 permitiu a redução do tempo de tratamento (terapia de curta duração), o qual utilizava um regime de 3 ou 4 antibióticos incluindo a RMP pelo menos nos dois primeiros meses, durante 6 a 9 meses. Com o controle e declínio da doença nos países desenvolvidos, houve o desmantelamento dos programas de controle da TB. A maioria dos países deixou de monitorar o surgimento de resistência aos antibióticos, negligenciando a resistência em TB (Espinal, 2003).

No início dos anos 90, a incidência da TB aumentou nos Estados Unidos, associada ao desmantelamento dos programas de controle da doença, a epidemia de HIV, aumento da pobreza e desabrigados (Brudney & Dobkin, 1991). Epidemias de TB MDR também foram observadas com o reaparecimento da TB em países desenvolvidos (Beck-Sague *et al.*, 1992; Edlin *et al.*, 1992; Fischl *et al.*, 1992). A baixa aderência por parte dos médicos e dos pacientes ao tratamento recomendado estimulou um aumento dos níveis de TB MDR (Frieden *et al.*, 1993). Primeiramente, a TB MDR chamou atenção pela sua ocorrência nosocomial e em surtos nas prisões (CDC, 1991). A alta taxa de fatalidade (Pablos-Méndez *et al.*, 1996) e os casos de TB MDR entre os trabalhadores de saúde (Pearson *et al.*, 1992) aumentaram a preocupação das autoridades públicas (CDC, 1991). Estes fatos contribuíram para a declaração da OMS de emergência global para a tuberculose, focando principalmente os países em desenvolvimento, onde 95% dos casos estavam ocorrendo (Raviglione *et al.*, 1995).

2.11 Tratamento Diretamente Supervisionado

Apesar dos enormes esforços realizados em nível mundial ou nacional para controlar a TB na década passada, quase dois milhões de pessoas continuam morrendo anualmente. A estratégia de tratamento diretamente supervisionado (*Direct Observed Therapy/Short-Course* - DOTS) compreende cinco elementos considerados essenciais para o controle global da TB: i) comprometimento do

governo para sustentar as atividades do controle da TB; (ii) detecção de casos por meio da baciloscopia de escarro, entre os sintomáticos respiratórios; (iii) regime de tratamento de 6 a 8 meses para todos os casos confirmados de baciloscopia positiva, com tratamento diretamente observado (DOT), para, no mínimo, os dois meses iniciais; (iv) suprimento regular e ininterrupto dos fármacos anti-TB; e (v) sistema padronizado de coleta e relatórios de dados para permitir a avaliação do tratamento de cada paciente e do programa de controle da TB como um todo (WHO, 2000).

A estratégia DOTS, se implementada corretamente, é uma das intervenções com melhor custo-benefício disponível para a saúde pública (World Bank, 1993). Os dados dos dois primeiros relatórios sobre a resistência global aos fármacos usados no tratamento da TB demonstram que a resistência está presente em várias partes do mundo (WHO, 2004b).

A estratégia DOTS, desenvolvida e testada a campo entre os anos de 1970 e 1980, não foi desenhada para curar pacientes com TB MDR, mas para tratar aqueles pacientes com doença crônica (Espinal *et al.*, 2000). Entretanto, o DOTS pode prevenir que a TB MDR torne-se um sério problema na população, pois pode alcançar taxas de cura superior a 90% ou mais dos casos de TB e prevenir o surgimento de linhagens resistentes ao tratamento de primeira linha (Espinal & Dye, 2005). A OMS tem auxiliado na implementação do DOTS em mais de 180 países e, apesar disso, algumas limitações são observadas como, por exemplo, apenas 45% dos casos ativos de TB globalmente estão sendo tratados utilizando a estratégia DOTS (WHO, 2005; Murray, 2006).

Atualmente está sendo estruturado um Fundo para a Inovação e Expansão do DOTS através de Iniciativas Locais para Reduzir a TB (FIDELIS). É uma iniciativa para o controle da doença que está facilitando o acesso e implementação de estratégias para aumentar a detecção de casos (Rusen & Enarson, 2006). A iniciativa FIDELIS pode servir como modelo para descobrir as melhores estratégias para solucionar os problemas de saúde pública globais.

DeRiemer e colaboradores (2005) fornecem evidências de que o programa DOTS apenas com os fármacos do Esquema 1 ou primeira linha pode reduzir a transmissão de linhagens resistentes aos fármacos, especialmente a TB MDR. Porém, alguns autores descrevem como especialmente elevada a probabilidade de falência de tratamento de pacientes com TB MDR utilizando o Esquema 1, e ainda, alegam que pode prolongar o episódio da doença e talvez aumentar a transmissão (Espinal & Dye, 2005).

2.11.1 DOTS-Plus

Em virtude da estratégia DOTS não incluir terapia específica para pacientes com TB resistente aos fármacos (DeRiemer *et al.*, 2005) são necessárias novas estratégias para tratar os pacientes com TB MDR. Em 1999, a OMS criou um grupo de trabalho chamado "DOTS-Plus para a tuberculose resistente a múltiplos fármacos" para avaliar e gerenciar a TB MDR (Farmer & Kim, 1998, Omerode, 2005). O objetivo era buscar maneiras viáveis e custo-efetivas para tratar a TB MDR em países onde a renda é baixa ou média (WHO, 2004b). Vários projetos piloto, usando diferentes estratégias de gerenciamento e terapêutica, estão sendo desenvolvidos (Gupta *et al.*, 2001). A estratégia DOTS-Plus já alcançou uma redução de 90% com a indústria farmacêutica para alguns projetos selecionados (Gupta *et al.*, 2001).

2.12 Distribuição Global da Tuberculose Resistente a Múltiplos Fármacos

No ano de 2000, estimou-se que 273.000 (3,2%) eram MDR entre os 8,7 milhões de novos casos de TB (Dye *et al.*, 2002). Em investigação realizada em 64 países (Espinal *et al.*, 2000), observou-se que a maior proporção de casos novos foi encontrada na Estônia (14%), Província de Henan, China (11%), Letônia (9%), e as províncias russas de Ivanovo (9%) e Tomsk (7%). Variáveis independentes como sucesso de tratamento, foram utilizadas para prever os níveis de resistência em

locais não investigados, sugerindo que taxas superiores a 10% de TB MDR podem estar ocorrendo no Iêmen, Quirguistão, Sudão, Paquistão e Ucrânia.

A resistência é distribuída de forma bastante irregular pelo mundo. Estima-se que 70% dos novos casos de TB MDR estejam em apenas 10 países. Assim, MDR e a resistência de forma mais geral, são um problema mais local que global. Ainda assim, a maioria dos casos de TB permanece curável (isto é, taxa de cura superior a 85%) (WHO, 2001b) através do tratamento de curta duração, que é baseado na utilização de fármacos seguros e de baixo custo.

A melhor forma de estimar o número de casos de TB MDR é através de testes de suscetibilidade e pelo aumento da vigilância epidemiológica. Porém, poucos países apresentam condições para testar todos os casos de TB e, dessa forma, os programas nacionais para o controle da tuberculose devem examinar grupos de pacientes, obedecendo a dois objetivos conflitantes. Estimar a proporção e o número total de casos resistentes, sendo necessário um esquema de amostragem, e, por outro lado maximizar a avaliação daqueles pacientes que apresentam maior probabilidade de ser portadores de linhagens resistentes. Neste último caso não selecionando aleatoriamente, mas guiado por um grupo de fatores de risco para a resistência, como, por exemplo, história prévia de tratamento, uso de drogas ilícitas e desabrigados (Becerra *et al.*, 2000; Espinal *et al.*, 2001).

2.13 Projeto Global de Vigilância à Resistência aos Fármacos Anti-Tuberculose

Apesar da TB MDR ser uma das preocupações no controle global da TB não havia dados sobre a magnitude do problema. Por esta razão, a OMS e IUATLD iniciaram em 1994 um projeto global chamado Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Uma rede de laboratórios-referência nos países participantes garantiu a qualidade dos testes de suscetibilidade realizados pelos laboratórios regionais (Laszlo *et al.*, 1997).

Os objetivos deste projeto desde a sua criação foram sendo ampliados, através das lições aprendidas no período em que vem sendo executado, quanto ao

sistema de vigilância, aos dados epidemiológicos, laboratoriais e de resistência que foram disponibilizados através dos relatórios gerados (WHO, 1997; WHO, 2001b; WHO, 2004a). Estes dados têm auxiliado na identificação das áreas de risco com alta prevalência de resistência aos fármacos, além de fornecer informações sobre as políticas de controle da resistência no mundo.

O primeiro inquérito mundial de resistência ocorreu entre 1994 e 1997. A OMS, IUATLD e vários colaboradores em todo o mundo elaboraram o protocolo do Projeto Global para esse estudo, que abrangeu 35 países em 5 continentes. O objetivo foi medir a prevalência da resistência aos fármacos anti-TB em vários países, utilizando protocolos epidemiológicos e laboratoriais padronizados, e fazendo uma correlação entre as taxas de resistência e o controle do tratamento utilizado nestes países, cobrindo assim uma área de 16% dos casos de TB notificados, no mundo (WHO, 1997). A Figura 4 apresenta o mapa mundial, na ocasião desse estudo, salientando a prevalência da TB resistente entre os casos novos (resistência primária).

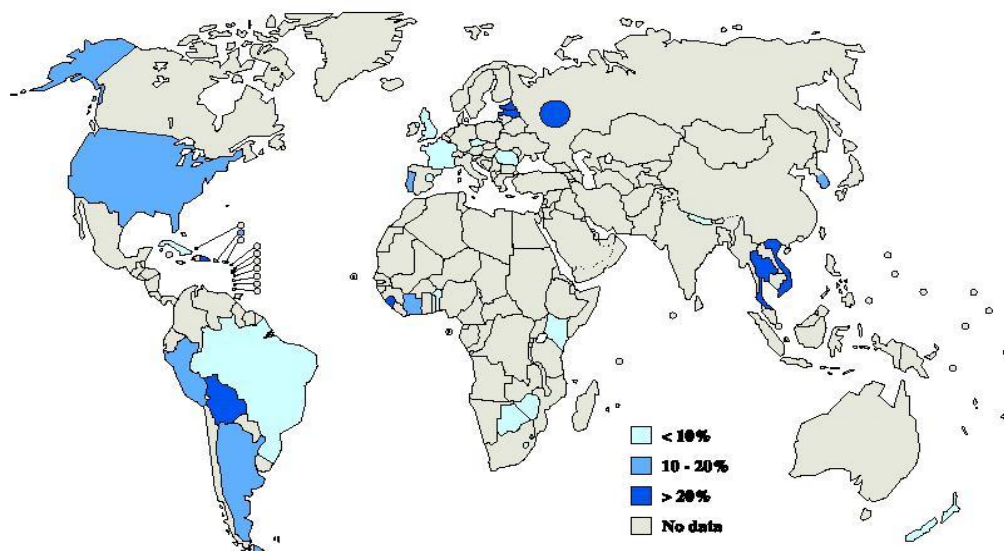


Figura 4. Mapa da prevalência da tuberculose resistente primária, nos locais de abrangência do estudo realizado entre 1994 a 1997 (WHO, 1997).

Os resultados deste estudo mostram que o *M. tuberculosis* resistente está presente em todas as áreas geográficas estudadas e também apontaram para o problema de TB MDR em regiões como: Argentina, República Dominicana, Estônia, Letônia, Costa do Marfim e Ivanovo Oblast (Rússia), onde a prevalência é maior que 3% entre os casos novos de TB (Becerra *et al*, 2000; WHO, 2000; Espinal *et al*, 2001). Nas Américas, o foco principal é a República Dominicana, onde a prevalência de resistência primária a qualquer fármaco é de 41% e de 6,6% para TB MDR.

Também foi demonstrado que a prevalência de resistência a múltiplos fármacos entre pacientes novos geralmente era baixa, sendo o valor médio em torno de 1%, especialmente na África. Entretanto, várias zonas de risco, isto é, países ou regiões onde a prevalência de resistência a múltiplos fármacos entre os pacientes novos excedia a 3%, foram identificados, particularmente na antiga União Soviética (Pablos-Méndez *et al.*, 1997). Na Argentina, a TB MDR foi detectada como um grave

problema, assim como a resistência primária, que chega a 4,6% dos casos de TB (WHO, 1997).

O Brasil participou desse inquérito mundial com uma amostra representativa, de 5.138 isolados, provindos de pacientes atendidos ambulatorialmente, sendo 866 com tratamento anterior para TB e 4.272 sem tratamento prévio. Considerando cada fármaco isoladamente, a taxa de resistência primária foi de 8,5% (INH 4,4%, RMP 1,3%, EMB 0,1% e SM 0,2%), enquanto que, para a associação INH + RMP foi de 0,7%. A taxa de resistência adquirida foi de 21,0% (INH 11,3%, RMP 6,6%, EMB 0,1% e SM 0,8%) e para a associação INH + RMP foi de 5,9% (Tabela 3).

Tabela 3. Inquérito de Prevalência de Resistência no Brasil entre 1995 e 1997.

	Resistência Primária		Resistência Adquirida		Resistência Combinada	
	nº	%	nº	%	nº	%
PACIENTES ESTUDADOS	4.272	83,1	866	16,9	5.138	100,0
PACIENTES SUSCETÍVEIS	3908	91,5	684	79,0	4592	89,4
QUALQUER RESISTÊNCIA	364	8,5	182	21,0	546	10,6
ISONIAZIDA (INH)	10	4,4	16	11,3	26	7,0
RIFAMPICINA (RMP)	3	1,3	9	6,6	12	3,3
ETAMBUTOL (EMB)	2	0,1	1	0,1	3	0,1
ESTREPTOMICINA (SM)	8	0,2	6	0,8	14	0,3
MONORESISTÊNCIA	269	6,3	93	10,7	362	7,0
ISONIAZIDA (INH)	158	3,7	57	6,6	215	4,2
RIFAMPICINA (RMP)	8	0,2	10	1,2	18	0,4
ETAMBUTOL (EMB)	3	0,1	1	0,1	4	0,1
ESTREPTOMICINA (SM)	100	2,3	25	2,9	125	2,4
MULTIRESISTÊNCIA	45	1,1	68	7,9	113	2,2
INH+RMP	31	0,7	51	5,9	82	1,6
INH+RMP+EMB	1	0,0	1	0,1	2	0,0
INH+RMP+SM	11	0,3	15	1,7	26	0,5
INH+RMP+EMB+SM	2	0,1	1	0,1	3	0,1
OUTROS PADRÕES	50	1,2	21	2,4	71	1,4
INH+EMB	3	0,1	1	0,1	4	0,1
INH+SM	45	1,1	20	2,3	65	1,3
INH+EMB+SM	1	0,0	0	0,0	1	0,0

Adaptado de Braga *et al.*, 2003.

Foi observada a diferença entre as taxas de resistência combinada (primária + adquirida) e de resistência a múltiplos fármacos (INH + RMP e/ou EMB, SM) entre os pacientes não tratados previamente (1,1%) e os já tratados (7,9%), mostrando a importância do uso prévio dos fármacos no desenvolvimento da resistência (WHO, 1997; Pablos-Mendez *et al.*, 1998). Nesse estudo, quando analisadas as regiões geográficas do Brasil, as taxas de resistência primária, foram de 10,6%, 6,3%, 9,9%,

9,3% e 9,2% para Norte, Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul, respectivamente (Braga *et al.*, 2003).

O segundo estudo global de resistência foi realizado entre 1996 e 1999, com 58 áreas geográficas, completando assim uma cobertura mundial de 33% da população e de 28% dos casos de TB (WHO, 2000). Ainda desta vez os resultados mostraram que o problema da TB MDR continua sendo de algumas áreas geográficas do mundo: Estônia (14,1%), Província de Henan, China (10,8%), Letônia (9,0%), Ivanovo Oblast, Federação Russa (9,0%), Tomsk Oblast, Federação Russa (6,5%), República Islâmica do Iran (5,0%), Província de Zhejiang, China (4,4%), Moçambique (3,5%) e Estado de Tamil Nadu, Índia (3,4%).

Isto confirma que os países que não são capazes de garantir um gerenciamento correto e econômico dos seus regimes de tratamento com os fármacos de primeira linha, não terão condições de controlar seus casos de TB MDR, usando fármacos de segunda linha, enquanto não forem implementadas as estratégias corretas de controle da TB (WHO, 2000; Espinal *et al.*, 2001). A análise dos resultados dos dois estudos indica que a taxa média de TB MDR primária, que foi de 1,4% (0% a 14,4%) no primeiro estudo e de 1,0% (0% a 14,2%) no segundo estudo, e de TB MDR adquirida, que foi de 13% (0% a 54,4%) no primeiro estudo e de 9,3% (0% a 48,2%) no segundo estudo, não modificaram significativamente, indicando que as taxas de TB MDR preocupam porque são elevadas, alertando para a necessidade de incrementar ações de prevenção e tratamento, nestas áreas (Braga *et al.*, 2003).

Outras conclusões observadas nos dois primeiros relatórios foram que a TB resistente estava presente em todos os locais investigados (países ou regiões), que a TB MDR estava presente na maioria deles e que boas práticas de controle da TB foram associadas com baixos níveis de resistência ou diminuição destes níveis.

Na terceira fase do projeto foram avaliados 77 regiões ou países, entre os anos de 1999 e 2002, representando 20% do total global de casos novos com baciloscopia positiva. Foram incluídas 39 regiões não estudadas previamente e

observou-se que a prevalência de resistência a pelo menos um antibiótico variou de 0% em alguns países da Europa Ocidental a 57,1% no Cazaquistão (média = 10,2%). A média de prevalência de resistência aos fármacos específicos foi 6,3% para SM, 5,9% para INH, 1,4% para RMP e 0,8% para EMB (WHO, 2004a).

A prevalência de MDR variou de 0% em oito países a 14,2% no Cazaquistão (51/359) e em Israel (36/253). As maiores prevalências foram observadas em Tomsk, Rússia (13,7%), Karakalpakstan, Uzbequistão (13,2%), Estônia (12,2%), Província de Liaoning, China (10,4%), Lituânia (9,4%), Letônia (9,3%), Província de Henan, China (7,8%) e Equador (6,6%) (WHO, 2004b). As causas do aumento da prevalência de resistência podem ser: (i) políticas de controle da TB inadequadas, (ii) imigração de pacientes de áreas com resistência elevada, (iii) epidemias de TB resistente.

Até o momento, os estudos globais de resistência (de 1994 a 2002), abrangeram cerca de um terço dos casos notificados de TB, no mundo. Entretanto, grandes lacunas ainda são encontradas em áreas cruciais, que necessitam ser estudadas, como China, Índia e países da antiga União Soviética. Em vários locais, novos estudos estão sendo realizados. O Brasil, que participou do primeiro inquérito, brevemente repetirá a pesquisa, com amostragem de casos novos e de retratamento, sendo que, pacientes com TB e HIV também serão incluídos (WHO, 2004a).

2.14 Opções terapêuticas na Resistência a Múltiplos Fármacos

Devido à baixa prevalência da resistência a múltiplos fármacos na maioria dos países, a OMS enfatizou o controle básico da TB como prioridade para prevenir a TB MDR em países de baixa renda (Pablos-Méndez *et al.*, 1997). Não foi preconizado tratamento específico para TB MDR em larga escala, mas que pacientes com este tipo de TB sejam encaminhados a especialistas. As razões para esta recomendação incluem: i) as incertezas sobre o risco apresentado pela TB MDR e sobre sua transmissão; ii) os altos custos e as baixas taxas de cura apresentadas pelos pacientes com TB MDR crônica antes de 1990 (Globe *et al.*, 1993); iii) o potencial desvio de recursos para a TB MDR ao invés da expansão da estratégia DOTS.

Na segunda metade dos anos 90, foi observado em Nova Iorque que a terapia individualizada para pacientes com TB MDR baseada no teste de suscetibilidade torna-se tão efetiva quanto para TB suscetível (Telzak *et al.*, 1995) e o número de casos de TB MDR diminuiu mais de 90% durante esta década (Fujiwara *et al.*, 1997). O relativo grande número de casos de TB MDR nos países desenvolvidos fez com que fossem mais utilizados os fármacos de segunda linha (amicacina, kanamicina, capreomicina, cicloserina ácido para-aminosalicílico, etionamida e fluoroquinolonas). No entanto, permanecem questões se essas intervenções, que logram sucesso em Nova Iorque, são necessárias, viáveis e se o custo-efetividade da estratégia seria aplicável em países com recursos limitados.

Um projeto piloto envolvendo pacientes com TB MDR na cidade de Lima, Peru demonstrou que é possível curar estes pacientes ambulatorialmente em um país onde a TB é endêmica (Farmer *et al.*, 1998). Os autores do estudo ainda defendem o tratamento individualizado para a TB MDR, pois o tratamento de curta duração pode amplificar o problema da resistência em situações onde os pacientes já estão infectados com linhagens resistentes a um ou mais fármacos (WHO, 1997; Pablos-Méndez *et al.*, 1998; WHO, 2000; Espinal *et al.*, 2001). Diversos estudos demonstram que a TB resistente é mais difícil de curar e que as taxas de cura variam de 6 a 59% (Espinal *et al.*, 2000).

O gerenciamento e o controle da resistência aos fármacos requerem o delineamento de estratégias específicas. Os países devem determinar a magnitude do problema através de vigilância contínua ou avaliação periódica, desenvolvendo intervenções de acordo com os resultados. As avaliações necessitam de condições mínimas e critérios. Entre os critérios lista-se a presença de um sistema de notificação e de relatório, uma rede de laboratórios capazes de realizar uma boa microscopia do escarro, um laboratório de referência que realize cultura e teste de suscetibilidade com alta qualidade e que possa conduzir a avaliação. Muitos países que possivelmente têm índices elevados de resistência não apresentam infraestrutura ou vontade política para monitorar a situação. Os dados do projeto

global refletem a situação apenas dos países com capacidade de realizar a avaliação (WHO, 2004b).

Os pacientes com TB MDR deveriam ser identificados através de teste de suscetibilidade e como tratamento receber uma combinação dos fármacos do Esquema 1 com os demais Esquemas, que deveriam ser individualmente avaliados em função do perfil de suscetibilidade e de acordo com a tolerância do paciente (Espinal & Dye, 2005).

2.15 Aplicação de Técnicas de Biologia Molecular na Epidemiologia

A epidemiologia é freqüentemente definida como o estudo da distribuição e determinantes das doenças na população humana (Mausner & Bahn 1974). Uma extensão desta definição para epidemiologia molecular das doenças infecciosas é o estudo da distribuição e determinantes das doenças infecciosas que utiliza métodos de biologia molecular. Outra definição apresentada por Higginson em 1977 para epidemiologia molecular é a aplicação de técnicas sofisticadas para o estudo epidemiológico de material biológico. Mais recentemente, Levin e colaboradores (1999) definiram que os objetivos práticos da epidemiologia molecular são identificar os microparasitas responsáveis pelas doenças infecciosas e determinar as fontes físicas, as relações biológicas, as rotas de transmissão e os genes responsáveis pela virulência, pelos antígenos relevantes para vacinas e pela resistência aos fármacos.

Epidemiologia molecular também pode ser definida como a integração de técnicas baseadas na caracterização de ácidos nucleicos ou de aminoácidos de um patógeno, com abordagens epidemiológicas convencionais, para identificar os determinantes da distribuição, transmissão e manifestação da doença na população, visando à possibilidade de intervenção e prevenção (Small & van Embden, 1994, Foxman & Riley, 2001).

Atualmente é reconhecido que a distribuição das doenças infecciosas e os determinantes desta distribuição podem ser identificados através das técnicas de biologia molecular, e também tem se tornado evidente que a distribuição das

doenças infecciosas na comunidade de hospedeiros pode ser determinada ou "programada" pelo próprio material genético do patógeno que envolve resposta ao hospedeiro, maquinaria antimicrobiana, bem como o ambiente em que o patógeno se instala (Riley, 2004).

Até pouco tempo atrás, era quase impossível identificar linhagens individuais de *M. tuberculosis* e, em consequência, acompanhar a transmissão de uma determinada linhagem numa certa região e/ou instituição. Nos últimos anos, com o desenvolvimento de metodologias de genotipagem de *M. tuberculosis*, baseadas em reconhecimento de seqüências ou padrões genéticos do microrganismo, tem-se conseguido identificar as linhagens, monitorar surtos de TB através da determinação do nível de *clusters* de padrões idênticos ou parecidos, definindo dessa forma fatores de risco para a transmissão da TB.

Os estudos epidemiológicos moleculares da TB estão primariamente enfocados na análise da disseminação da doença em pequenas áreas, onde dados moleculares são utilizados para confirmar a ligação epidemiológica ou para testar hipóteses (Alland *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1995; Frieden *et al.*, 1996a). Porém, alguns centros de saúde pública têm feito análises moleculares como rotina combinando-as com dados da vigilância epidemiológica, tendo como objetivo principal desenvolver estratégias de saúde pública e protocolos de controle da TB, que integrem informações moleculares e dados de vigilância na população em observação.

2.15.1 Técnicas de Diferenciação de Linhagens de *M. tuberculosis*

Diversas metodologias podem ser utilizadas para verificar polimorfismos no DNA de *M. tuberculosis*. Estes métodos incluem o polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), hibridização de DNA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e combinações deles (Kremer *et al.*, 1999). Entre as metodologias de RFLP, as principais são baseadas no IS6110, *Direct Repeat* (DR) e no PGRS. O RFLP do IS6110 é realizado pela digestão do DNA cromossomal de *M. tuberculosis*

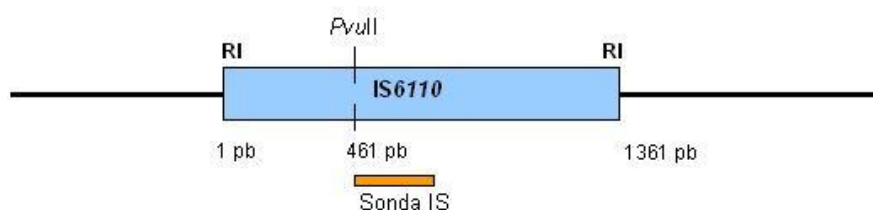
com a enzima de restrição PvuII, enquanto os RFLPs das regiões DR e PGRS são realizados pela digestão do DNA cromossomal com a enzima de restrição AluI (Ross *et al.*, 1992, van Soolingen *et al.*, 1993).

Algumas metodologias que utilizam a PCR são o *mixed-linker* PCR, IS6110 *ampliprinting*, VNTR-PCR e *double-repetitive-element* PCR (DRE-PCR) (Frothingham & Meeker-o'Connell, 1998; Kremer *et al.*, 1999, Moström *et al.*, 2002). O DRE-PCR é um método baseado na amplificação de fragmentos de DNA de *M. tuberculosis* entre cópias de IS6110 e PGRS. As variações nas distâncias destas seqüências e seu número de cópias permitem a amplificação de fragmentos de DNA de tamanho e número diferentes, gerando padrões únicos para diferentes linhagens de *M. tuberculosis* (Friedman *et al.*, 1995).

Spacer Oligotyping ou *spolygotyping* é uma estratégia que utiliza a combinação das metodologias de PCR e hibridização, na qual as regiões DR são utilizadas como alvo para amplificação de DNA. Explora a variação nos espaçadores (*spacers*), que são seqüências não repetitivas de 36 a 41 pb, para obter diferentes padrões de hibridização do DNA amplificado com múltiplos oligonucleotídeos, que estão covalentemente ligados a uma membrana (Kamerbeek *et al.*, 1997).

2.15.1.1 RFLP da Seqüência de Inserção 6110

Em 1993, um protocolo para a padronização da técnica de RFLP baseado na seqüência de inserção IS6110 foi proposto por van Embden e colaboradores. A metodologia inclui extração do DNA cromossomal, digestão com a enzima PvuII, e hibridização por *Southern blotting*, utilizando como sonda um fragmento de 245 pb contido no IS6110, situado à direita do sítio de clivagem da enzima (Figura 5).



Excluído: <sp>

Figura 5. Mapa físico da seqüência de inserção *IS6110* de *M. tuberculosis*. Sonda IS de 245 pb, à direita do sítio de clivagem da enzima *PvuII*. As linhas à direita e à esquerda representam o DNA cromossomal. RI, repetições invertidas de 28 pb (van Embden *et al.*, 1993).

O *IS6110* é encontrado no complexo *M. tuberculosis* em um número variável de cópias inseridas aleatoriamente no cromossomo, e o RFLP explora a variabilidade em número e posição genômica deste elemento para gerar padrões específicos de cada linhagem (van Embden *et al.*, 1993, van Soolingen *et al.*, 1994a). O polimorfismo gerado pelo *IS6110* ocorre devido à sua capacidade de transposição (Mendiola *et al.*, 1992), entretanto, estudos demonstraram que este é um evento raro (Hermans *et al.*, 1991). Uma prova da estabilidade do *IS6110* é fornecida pela análise do DNA de *M. bovis* BCG. Esta linhagem de vacina tem sido propagada separadamente em diferentes laboratórios por mais de 6 décadas e a maioria das linhagens testadas mostrou apenas um elemento *IS6110* em uma mesma posição. Poucas linhagens apresentaram um elemento adicional, todos em uma posição comum (Small & van Embden, 1994).

Os resultados obtidos em um estudo realizado com linhagens de *M. tuberculosis* resistentes, reforçaram o conceito de que a alteração no padrão de resistência aos fármacos não está ligada a mudanças no padrão de RFLP do *IS6110*. Através da análise de diversos isolados de um mesmo paciente foi demonstrado que os padrões de RFLP observados permaneceram os mesmos por um período de mais de um ano, apesar do seu perfil de resistência aos fármacos ter se alterado. Apenas um paciente apresentou uma cópia adicional de *IS6110*, 7 meses após a obtenção do primeiro isolado (Niemann *et al.*, 1997).

Por outro lado, as linhagens que possuem um número pequeno de cópias de *IS6110*, geralmente inferior a 6, podem apresentar padrões idênticos, mesmo não sendo epidemiologicamente relacionadas (van Soolingen *et al.*, 1993, Yang *et al.*, 1996, Goulding *et al.*, 2000). Isto ocorre devido à existência de pontos preferenciais de integração do *IS6110* no genoma de *M. tuberculosis*, sendo um destes pontos na região DR, na posição da DR 30 (Fomukong *et al.*, 1998, Fang *et al.*, 1998, Filliol *et al.*, 2000). Também foram identificadas linhagens que não possuem nenhuma cópia de *IS6110* em algumas regiões geográficas, principalmente no sul da Ásia, tornando estas linhagens não tipáveis pelo *IS6110*-RFLP (Narayanan *et al.*, 2002). Dessa forma, estas linhagens requerem a utilização de um outro marcador genético para a sua diferenciação (Yang *et al.*, 1996, Gillespie *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2000).

2.15.1.2 Spoligotyping

O *Spacer Oligotyping* ou *spoligotyping* é uma técnica baseada no polimorfismo existente na região DR (Direct Repeat). A região DR consiste de um número variável de cópias de uma repetição direta de 36 pb, intercalada com seqüências específicas de espaçadores de 35 a 41 pb (Kamerbeek *et al.*, 1997). Através da utilização de *primers* que tem como alvo a seqüência DR na reação da PCR, os espaçadores entre as DRs são amplificados. Os produtos da PCR são hibridizados com uma membrana que contém 43 oligonucleotídeos fixados, correspondentes a 43 espaçadores. Os resultados podem ser apresentados como um código binário, positivo quando determinado espaçador está presente e negativo quando está ausente (Moström *et al.*, 2002).

Esta metodologia é rápida, de simples realização e produz padrões de fácil análise através de programas de computador (Goyal *et al.*, 1997). Apesar de apresentar um poder discriminatório menor do que o *IS6110*-RFLP, pois quando utilizado como única técnica de genotipagem tende a superestimar o número de isolados incluídos em *clusters* (Kamerbeek *et al.*, 1997, Goguet de la Salmoniere *et al.*, 1997, Sola *et al.*, 1998, Kremer *et al.*, 1999), tem apresentado boa eficiência na diferenciação de linhagens com 6 ou menos cópias de *IS6110* (Goyal *et al.*, 1997,

Bonora *et al.*, 1999, Bauer *et al.*, 1999, Soini *et al.*, 2001). Além disso, sua reprodutibilidade é bastante elevada entre as técnicas rápidas, baseadas na PCR, característica que permite a realização de estudos com grande número de amostras (Kremer *et al.*, 1999).

2.15.2 Validação das Técnicas de Genotipagem em Estudos Epidemiológicos

A premissa básica de um sistema de genotipagem é de que isolados epidemiologicamente relacionados são derivados de expansão clonal de um único precursor, logo possuem características comuns que diferem daqueles isolados que não estão epidemiologicamente relacionados (Tenover *et al.*, 1997). Estudos que utilizam o *IS6110*, para investigar surtos de TB em hospitais ou na comunidade, têm demonstrado que linhagens de *M. tuberculosis* epidemiologicamente relacionadas apresentam padrões de RFLP idênticos, enquanto linhagens não relacionadas apresentam padrões diferentes (Daley, 1992).

A prevalência na comunidade de casos novos de TB que resultam de uma transmissão recente é reflexo da qualidade dos programas de controle da TB nesta comunidade. Há uma alta proporção de casos novos de TB rapidamente progressivos em comunidades onde o controle da TB é realizado de forma ineficiente, e, menor quantidade de casos resultantes de uma transmissão de 20-40 anos atrás, que contribuem com a reativação da doença.

A discriminação de linhagens de *M. tuberculosis* de acordo com o número de cópias e posição no cromossomo do *IS6110* fornece uma convincente e presuntiva caracterização do tempo de infecção dos novos pacientes de TB. Esse procedimento fornece um padrão de *fingerprinting* para cada linhagem. Usando esses marcadores moleculares como metodologia, muitos investigadores estão conduzindo estudos em várias partes do mundo para determinar a proporção de casos novos de TB que podem ser atribuídos como novas infecções e avaliados os fatores de risco para essas infecções. Estudos realizados nas cidades de São Francisco e Nova Iorque

(EUA), no início dos anos 90, mostraram que 30% dos casos novos de TB, entre pacientes HIV negativos foram devido à infecções recentes (Alland, 1994; Small, 1994).

Outro estudo realizado na cidade de Nova Iorque demonstrou que entre os casos de TB suscetíveis aos fármacos usados no tratamento, 10% foram causados por um único clone de *M. tuberculosis* denominado "linhagem C" (Friedman, 1997). A linhagem C foi isolada em pacientes HIV positivos e negativos, e causou mais de 400 casos de TB, permanecendo desconhecida como uma epidemia por mais de 3 anos. Esta linhagem também foi associada aos usuários de drogas. A prevenção da transmissão deste clone poderia ter surtido efeito no controle da TB daquela cidade.

Os isolados de *M. tuberculosis* com padrões idênticos de IS6110, como os 350 isolados W responsáveis por um surto na cidade de Nova Iorque, são clonais e indicativos de uma transmissão recente, enquanto, os isolados com um padrão único representam casos de reativação e não são relacionados (Alland *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1994). Entretanto, o uso de múltiplas técnicas de tipificação tem fornecido um maior entendimento na relação das linhagens com padrão similar de IS6110, mas não idêntico (Riley, 2004).

O uso de múltiplas ferramentas moleculares em conjunto tem demonstrado a relação filogenética das linhagens de diversas épocas e áreas geográficas que possuem marcadores genéticos similares ao das linhagens MDR W. Estas linhagens, que são agrupadas à linhagem da família W, tem um genótipo comum como descrito para clones como o Beijing, que são linhagens predominantes na China e são freqüentes na Ásia (Torrea, 1995). Estas linhagens são agora vistas como membros da mesma linhagem filogenética e como recentes ancestrais da linhagem MDR W. Juntas, as famílias Beijing e W compartilham distintos marcadores cromossomais, e pertencem ao grupo genético 1, que tem padrão o de *Spoligotyping* S00034 e tem em comum uma única inserção cromossomal do IS6110 (Plikaytis *et al.*, 1994; Kurepina, 1998).

Diversos estudos epidemiológicos em populações específicas combinados com técnicas de biologia molecular têm sugerido que pacientes, em países desenvolvidos, onde a TB é epidêmica, que apresentam padrões idênticos de RFLP podem ser classificados como relacionados epidemiologicamente (Alland, 1994; Small, 1994; Barnes, 1996; Frieden, 1996a). A formação de *cluster* reflete transmissão recente ou uma fonte comum de infecção.

A transmissão recente contribui substancialmente para aumentar a incidência da TB em algumas áreas (Barnes, 1996). As investigações microbiológicas, clínicas, sociais e fatores demográficos associados com os casos relacionados epidemiologicamente são de grande importância para definir os fatores de risco que contribuem para os pacientes tornarem-se parte da cadeia de transmissão da TB.

É importante considerar se a doença resulta de reativação de uma infecção prévia ou de transmissão ativa e entender os fatores de risco associados com a transmissão da TB, sendo possível otimizar as ações de saúde e selecionar as prioridades para o controle da TB (Allan, 1994; Small, 1994).

2.16 Epidemiologia Molecular das Doenças Infecciosas Suscetíveis e Resistentes aos Fármacos

A propensão dos agentes antimicrobianos em selecionar microrganismos resistentes aos fármacos faz com que a aplicação de métodos de tipificação de linhagens seja uma estratégia importante. Porém, as conclusões sobre a dinâmica das infecções resistentes aos fármacos podem ser estendidas aos patógenos não resistentes. Os estudos publicados sobre epidemiologia molecular são, na sua grande maioria, voltados para as doenças infecciosas resistentes aos fármacos, devido à repercussão na saúde pública. Este tipo de infecção é mais fácil de ser estudado que as infecções suscetíveis porque os organismos já são diferenciados com base nos marcadores de resistência, que podem ser detectados por métodos laboratoriais convencionais (Riley, 2004).

A tuberculose suscetível aos fármacos foi bem caracterizada através da identificação da linhagem C, por genotipagem em epidemia na cidade de Nova Iorque (Friedman *et al.*, 1995). Através dos estudos moleculares foi possível comprovar que os organismos suscetíveis aos fármacos comportam-se de maneira semelhante aos organismos resistentes, onde o que parece ser infecções esporádicas pode ser na verdade parte de surtos não identificados. A alteração na prevalência ou incidência de infecções causadas por bactérias suscetíveis aos fármacos, assim como para as resistentes, é enormemente influenciada pela introdução na comunidade ou instituição de clones que se tornam predominantes. Sem a utilização de métodos de tipificação de linhagens os surtos de linhagens passam despercebidos, especialmente aquelas infecções causadas por microrganismos suscetíveis (Riley, 2004).

Para compreender a epidemiologia da tuberculose é necessário considerar como a doença se manifesta clinicamente. A infecção humana com o *M. tuberculosis* resulta em um dos 4 possíveis desfechos: eliminação imediata sem evidência de infecção (teste com PPD negativo), estabelecimento de infecção latente (conversão do teste com PPD, sem doença ativa), doença ativa logo após a infecção (doença primária ou rapidamente progressiva), ou doença muitos anos após a infecção (reativação da doença). A Figura 6 apresenta os possíveis desfechos para as situações em que não há cura espontânea.

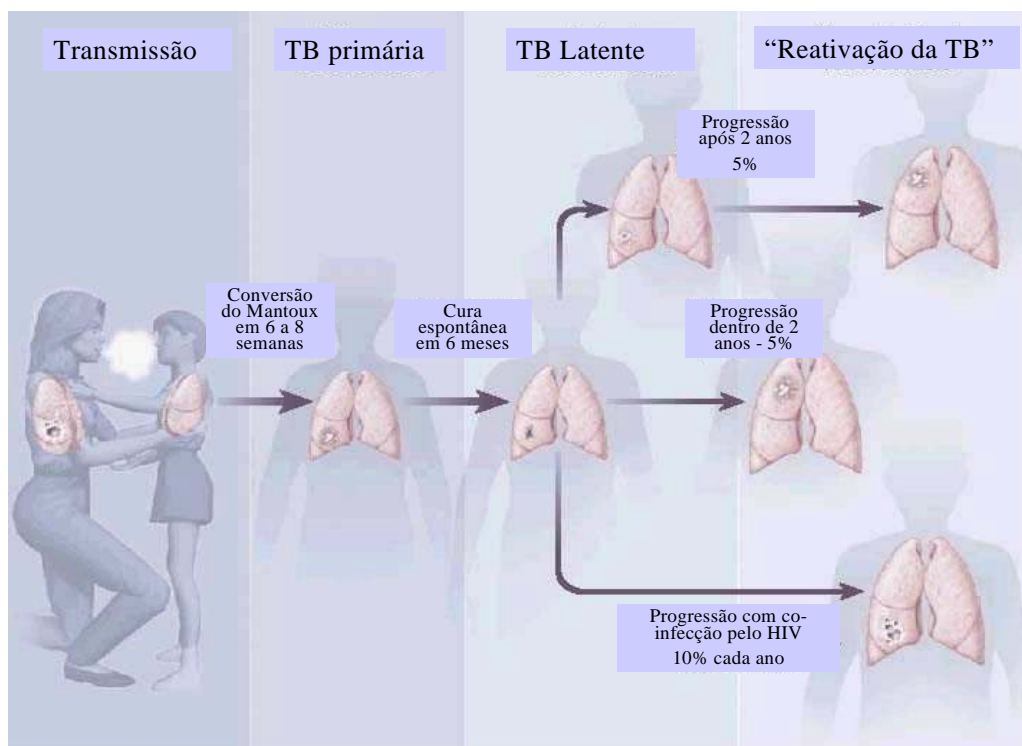


Figura 6. Possíveis desfechos da infecção por *M. tuberculosis*. Fonte: Lucilaine Ferrazoli.

A tuberculose MDR pode ser decorrente de uma infecção recente ou de uma infecção adquirida no passado. Geralmente não se sabe qual proporção dos casos de TB MDR é devida à reativação ou infecção recente. Esta diferenciação é um fato importante em saúde pública, pois uma alta prevalência de TB MDR devida à infecção recente sugere que o programa de controle da tuberculose pode não estar sendo adequado. Por outro lado, nas comunidades em que a maioria dos casos novos de TB é devida à reativação da doença reflete um programa inadequado de controle no passado, e estas comunidades devem enfatizar um programa de controle adequado a esta situação (Riley, 2004).

Os fatores de risco para a TB MDR tradicionalmente incluem os seguintes itens já abordados anteriormente: baixa aderência ao tratamento farmacológico, terapia farmacológica inadequada ou intermitente, doença cavitária e tratamento prévio para a tuberculose. Os fatores de risco relacionados com o hospedeiro certamente contribuem para a prevalência de TB MDR na comunidade. Portanto, a identificação dos fatores de risco relacionados com o hospedeiro e a caracterização da dinâmica de transmissão das linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplos fármacos em comunidades específicas pode também identificar fatores que contribuem para a prevalência e incidência da TB MDR. Uma questão específica que precisa ser avaliada é qual proporção de novos casos de TB MDR na comunidade é devida à infecção e transmissão recente (Riley, 2004).

A diferenciação entre TB causada por reativação e TB resultante de infecção exógena recente deve ser bem esclarecida. A doença primária é freqüentemente definida como uma doença ativa que ocorre dentro de 5 anos após uma nova infecção exógena (Holm, 1969; Sutherland *et al.*, 1982). A reativação da doença ou doença endógena, então, ocorre num período maior que 5 anos após a infecção exógena.

Nos Estados Unidos antes da epidemia da AIDS, 90% dos casos de TB eram decorrentes de reativação de infecção prévia (Farer, 1986). Recentemente, a aplicação de métodos de tipificação de linhagens baseados no conteúdo de *IS6110* de *M. tuberculosis* sugere que este dado pode ter sido superestimado. Os novos casos de TB decorrentes de infecção exógena recente (dentro de 5 anos antes de desenvolver a doença) podem ser mais comuns do que se acreditava anteriormente, mesmo entre aqueles não infectados com HIV (Riley, 2004).

Esta idéia é baseada na suposição de que padrões eletroforéticos idênticos (chamados de padrões *cluster*), observados em duas ou mais pessoas em uma determinada comunidade, representam casos de doença decorrente de infecção exógena recente, e que isolados com padrões únicos (padrões não *cluster*), não observados em isolados de outras pessoas naquela comunidade, representam

reativação da doença (Alland *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1994; Glynn *et al.*, 1999). Esta suposição é baseada no conhecimento da relativa estabilidade do elemento *IS6110* em *M. tuberculosis* (van Soolingen *et al.*, 1991; Cave *et al.*, 1994). As chances de duas pessoas não relacionadas desenvolverem doença ativa com linhagens idênticas de *M. tuberculosis* no mesmo período e na mesma comunidade, a partir de infecção adquirida muitos anos atrás, são remotas. É mais provável que estes dois indivíduos tenham adquirido a infecção recentemente a partir de uma linhagem circulante no local (Riley, 2004).

Esta suposição deve ser realizada com várias considerações: algumas linhagens de *M. tuberculosis* parecem apresentar trocas mais rápidas no padrão eletroforético de *IS6110* assim como o conteúdo, e, em algumas áreas rurais, onde a população permanece estável por anos, os padrões em *cluster* não representam necessariamente infecção recente (Braden *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1998). Um estudo recente comparou o padrão de RFLP de 203 isolados de *M. tuberculosis* coletados em 1960 e 4102 isolados coletados na década de 90. Entre estes isolados, 14 padrões de *IS6110* de 1960 foram indistinguíveis dos padrões dos isolados de 1990. Este estudo sugere que a taxa de troca dos padrões de *IS6110* durante o período de latência é muito maior do que durante a doença ativa (Lillebaek *et al.*, 2003).

Fatores adicionais devem ser considerados ao atribuir o tempo da infecção dos novos casos de tuberculose. Estes fatores incluem informações como a mobilidade da população em estudo, tempo de residência daqueles que desenvolvem tuberculose no local geográfico do estudo, isolados provindos de crianças com menos de 5 anos de idade e outras características epidemiologicamente plausíveis que suportam esta suposição (Riley, 2004). Vynnycky e colaboradores (2003) sugeriram que em locais ou países onde o risco anual para a infecção com o *M. tuberculosis* é relativamente baixo, como nos países desenvolvidos, o uso de RFLP baseado no *IS6110* como uma medida de doença resultante de infecção recente pode subestimar a proporção da doença em pessoas jovens e superestimar essa proporção nos pacientes idosos. No entanto, em locais ou países com alta incidência de TB, a proporção da doença devida à transmissão

recente em ambos os grupos de idade pode ter sido subestimada, por causa dessa maneira de medir a forma de transmissão.

Entretanto, em grandes centros urbanos cuja população apresente alta mobilidade, a premissa que padrões de *fingerprinting* do IS6110 em *cluster* representam novos casos de TB surge para sustentar e produzir observações epidemiologicamente e biologicamente plausíveis. Foi encontrado que a incidência de novos casos de TB resultantes de infecções recentes são maiores do que pensado previamente. No início dos anos 90 na cidade de Nova Iorque, entre as pessoas não infectadas pelo HIV, acreditava-se que 22 a 30% dos casos novos de TB eram devidos à infecção recente (Alland *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1995). Entre a população de desabrigados de Los Angeles no início de 1990, supunha-se que acima de 60% dos casos de TB em pacientes não infectados pelo HIV, eram devidos à infecção recente (Barnes *et al.*, 1996). Observações similares foram realizadas na Europa e na América do Sul (Genewein *et al.*, 1993; van Deutekom *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1998; Ferrazoli *et al.*, 2000). Contudo, um estudo mais recente em Londres sugere uma baixa taxa de transmissão recente estimada em torno de 14,4% (Maguire *et al.*, 2002).

Em estudo realizado na cidade de Nova Iorque sobre a TB MDR, os pesquisadores encontraram uma grande proporção de novos casos de TB MDR em pessoas infectadas pelo HIV que não tinham sido tratadas previamente para TB (Frieden *et al.*, 1993). Quando os isolados foram analisados através de RFLP baseado no IS6110, encontrou-se que aproximadamente 80% dos casos novos de TB MDR entre as pessoas infectadas pelo HIV apresentavam padrão eletroforético em *cluster*, sugerindo o desenvolvimento de doença devido à infecção recente (Friedman *et al.*, 1995). Entre as pessoas não infectadas pelo HIV, 28% dos novos casos estavam em *cluster*, indicando que as linhagens já estavam resistentes no período da transmissão. Uma alta taxa de transmissão recente (70%) das linhagens MDR foi recentemente observada em Belgrado, na Sérvia (Vukovic *et al.*, 2003).

Assim, nos casos acima, o problema não foi a baixa aderência ao tratamento, terapia intermitente, história de tratamento prévio para TB ou doença cavitária, mas a aquisição de linhagem de *M. tuberculosis* resistente a múltiplos fármacos. A questão é onde e por que esta transmissão de novo está acontecendo. Estas observações sugerem que a população esteve em contato com ambientes onde novas transmissões exógenas aconteceram. Naturalmente, na cidade de Nova Iorque, a imunossupressão causada pelo HIV contribuiu para o desenvolvimento rápido de doença ativa após a infecção. Entretanto, isto não explica por que a maioria dos pacientes foi infectada com um limitado grupo clonal de linhagens de *M. tuberculosis*.

Para avaliar este dado foram realizados vários estudos em Nova Iorque em ambientes institucionais como prisões e hospitais (CDC, 1991; Coronado *et al.*, 1993; Valway *et al.*, 1994). Friedman e colaboradores (1995) identificaram uma única linhagem de *M. tuberculosis* MDR responsável por 37% de todos os isolados MDR estudados, designada como linhagem W. Este clone foi responsável por mais de 25% de todos os casos de TB MDR vistos nos Estados Unidos no início dos anos 90 (Frieden *et al.*, 1996b; Argeton *et al.*, 1999; Bifani *et al.*, 1999). Através do reconhecimento de que a maioria dos novos casos de TB MDR na cidade de Nova Iorque era devida à transmissão recente causada por um número limitado de clones de *M. tuberculosis* MDR, os investigadores foram capazes de instituir medidas de controle apropriadas (Frieden *et al.*, 1995). O esforço para controlar a incidência da TB MDR apresentou um efeito mais significativo nos casos MDR que na TB em geral. Enquanto a incidência da TB diminuía 22% entre 1992 e 1994, a incidência da TB MDR diminuía em 44% no mesmo período (Frieden *et al.*, 1995).

O desfecho esperado das intervenções validadas pelas conclusões epidemiológicas obtidas por estudos de epidemiologia molecular era que os ambientes institucionais são os maiores locais de transmissão de TB MDR e que a grande proporção de TB MDR era causada por um número limitado de clones relacionados. Naturalmente, as medidas de intervenção instituídas levariam a diminuição da incidência de qualquer forma, porém a aplicação de métodos de genotipagem para caracterizar a epidemiologia da tuberculose na cidade de Nova

lorque contribuiu para entender de modo mais preciso a dinâmica da transmissão da TB MDR (Riley, 2004).

3. Objetivos

3.1 Geral

O objetivo deste estudo foi ampliar o conhecimento sobre a epidemiologia da tuberculose resistente a múltiplos fármacos, bem como as bases biológicas da transmissão da TB MDR no estado do Rio Grande do Sul, visando contribuir na proposição de novas estratégias de intervenção para o controle da tuberculose.

3.2 Específicos

- Caracterizar genotípicamente dos isolados de *M. tuberculosis* MDR e suscetíveis que foram identificados no Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN) entre 1999 e 2000, utilizando os métodos de RFLP baseado no *IS6110* e *Spoligotyping*.

- Identificar, a partir dos dados clínico-epidemiológicos, dos fatores de risco para a TB MDR e comparar com os fatores de risco para o desenvolvimento de TB suscetível aos fármacos.

- Avaliar a associação entre as variáveis demográficas, clínicas e sociais e formação de *cluster* entre os isolados obtidos dos pacientes estudados.

- Identificar os fatores associados com a transmissão recente da tuberculose no Estado do Rio Grande do Sul.

4. Materiais e métodos

4.1. Tipo e Local do Estudo

A epidemiologia da tuberculose resistente a múltiplos fármacos no período do estudo foi avaliada através de um estudo de caso-controle. Os casos foram considerados todos os isolados de *M. tuberculosis* identificados como resistentes a RMP e INH através do teste de suscetibilidade. Foram considerados controles os isolados que após teste de suscetibilidade foram identificados como suscetíveis a INH, RMP, SM, PZA e EMB.

A primeira fase do estudo, que consistiu em identificar os isolados submetidos ao teste de suscetibilidade aos fármacos e obter o isolado primário, foi realizada no Laboratório de Tuberculose do LACEN, da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde/RS (FEPPS/RS). A segunda fase, que consistiu na extração do DNA dos isolados micobacterianos, na realização e análise do RFLP baseado no *IS6110* e do spoligotyping, foi realizada no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da FEPPS/RS.

4.2. Amostragem

4.2.1 Período do Estudo

O estudo foi composto por uma amostragem retrospectiva de conveniência não mascarada, em que os isolados de *M. tuberculosis* foram coletados entre 1999 e 2000, constantes do banco de isolados, já existente no laboratório onde foi realizado o estudo.

4.2.2 Número Amostral

Foram analisados no estudo 262 isolados de *M. tuberculosis* provenientes de 262 pacientes atendidos no Estado do Rio Grande do Sul. Entre os isolados foram

identificados 60 resistentes a múltiplos fármacos e 202 suscetíveis a todos os fármacos testados. As amostras clínicas ou isolados bacterianos foram provenientes dos Laboratórios Regionais de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul (LRSP), Hospital Sanatório Partenon (HSP), Fundação Universidade do Rio Grande (FURG), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e dos Centros de Saúde da região Metropolitana de Porto Alegre, entre outros. Os isolados obtidos foram identificados com base nas suas características bioquímicas e após é realizado o teste de suscetibilidade aos fármacos, conforme protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde (Brasil, 1994).

4.2.3 Critérios de Inclusão

Para inclusão no estudo, os isolados foram identificados como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* através de métodos bioquímicos: crescimento em presença de hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) e de ácido p-nitrobenzóico (PNB); acumulação de niacina; redução do nitrato, termoinativação da catalase (Kent & Kubica, 1985; Brasil, 1994). Todos os isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade pelo Método das Proporções, segundo o Manual de Bacteriologia da Tuberculose (Brasil, 1994). O resultado do teste de suscetibilidade serviu como base para a inclusão dos isolados MDR e dos isolados suscetíveis. Os isolados foram incluídos no estudo quando apresentaram crescimento visível para a extração de DNA.

4.2.4 Critérios de Exclusão

Foram excluídas do estudo todas as linhagens de *M. tuberculosis* isoladas sem a identificação pelas provas bioquímicas e sem o resultado do teste de suscetibilidade pelo Método das Proporções. Também foram excluídas aquelas linhagens que apresentaram resistência a um único fármaco ou quando resistente a fármacos distintos de INH e RMP. Os isolados que não apresentaram crescimento

visível não foram incluídos no estudo pela impossibilidade de obtenção de quantidade suficiente de DNA.

4.2.5 Manutenção das Linhagens de *M. tuberculosis*

A partir do crescimento de *M. tuberculosis* em meio Löwestein-Jensen (LJ), foram preparadas suspensões, com turvação equivalente ao tubo 3 da Escala McFarland, em tampão fosfato pH 7,0 de acordo com Sorensen (Brasil, 1984), e foram transferidas para criotubos com capacidade de 2 mL, onde foram armazenadas a - 20°C.

4.3 Cultura do Microrganismo

As amostras clínicas foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e examinadas por microscopia (Brasil, 2004). Após descontaminação com NaOH 4%, foram cultivadas em meio de cultura pelo método Ogawa-Kudoh (Kudoh & Kudoh, 1974) e incubadas em uma estufa a 37° C, onde se multiplicaram por um período de 4 a 8 semanas, para a obtenção do isolamento primário.

4.4 Método das Proporções em Meio Löwestein-Jensen - MPLJ

O MPLJ foi realizado segundo *Canetti et al.* (1969) e recomendações do Manual de Bacteriologia da Tuberculose (Brasil, 1994). Este método consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes, presentes em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente à concentração do fármaco que é capaz de inibir o desenvolvimento dos bacilos suscetíveis, mas não daqueles resistentes. Para cada fármaco foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual o isolado é considerado resistente (proporção crítica). Para este teste foram utilizados os seguintes fármacos: rifampicina (40 µg/ml), isoniazida (0,2 µg/ml), estreptomicina (4 µg/ml), etambutol (2 µg/ml), pirazinamida (100 µg/ml) e etionamida (20 µg/ml).

4.5 Extração do DNA Cromossomal

Os isolados de *M. tuberculosis* foram submetidos à extração do DNA conforme técnica descrita por Van Soolingen *et al.* (1993). Neste processo uma massa bacteriana (uma alçada) foi transferida para um tubo de microcentrífuga com 400 µL de tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8,0]) e em seguida colocada em banho-maria a 80°C por 20 minutos para inativar todas as células.

A lise bacteriana foi realizada através da adição de 50 µL de lisozima (10 mg/mL) seguida da agitação em agitador automático e incubação durante a noite a 37°C. Após, foram adicionados 75 µL de uma solução de SDS10%/Proteinase K (10 mg/mL) e incubado no banho-maria a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl (0,1 g/mL e 0,04 g/mL) para a complexação de proteínas e lipídeos e então, a mistura foi agitada novamente e incubada em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Nesta etapa a mistura assumiu um aspecto leitoso, onde foram adicionados 750 µL da solução de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1) seguido de homogeneização e centrifugação por 5 minutos a 12.000 rpm.

Depois da centrifugação o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 450 µL (0,6 volume) de isopropanol gelado para precipitação dos ácidos nucléicos, e incubado a -20°C por 30 minutos. Após a incubação houve nova centrifugação de 15 minutos a 12.000 rpm, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 1mL de etanol 70% gelado, para lavagem do DNA precipitado. Então, novamente, houve outra centrifugação de 5 minutos a 12.000 rpm e o etanol foi removido.

O DNA precipitado foi secado por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois do precipitado já seco, foram adicionados 30 µL de TE 1X. O DNA extraído ficou a 4°C pelo menos dois dias para completa ressuspensão do precipitado e foi estocado a -20°C. O produto da extração foi analisado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (EtBr) e visualizado em transluminador ultravioleta. Após, as amostras de DNA foram utilizadas na realização da técnica de RFLP e *Spoligotyping*.

4.6 Técnica de RFLP

A técnica de RFLP foi realizada conforme protocolo elaborado por van Soolingen *et al.* (1994) cujas etapas estão descritas nos itens a seguir.

4.6.1 Clivagem

O DNA extraído de *M. tuberculosis* foi quantificado no espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia Biotech) através da medida de absorbância a 260 nm. Aproximadamente 4,5 µg de DNA foram clivados com 10 U da endonuclease de restrição PvuII, a 37° C por 1 h. Cerca de 20% do volume de cada amostra de DNA clivada foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a eletroforese o DNA foi corado com EtBr e visualizado sob iluminação ultravioleta para se verificar a clivagem e estimar visualmente a quantidade de DNA.

4.6.2 Eletroforese em Gel de Agarose

As amostras de DNA clivadas foram aplicadas em um gel de agarose 0,8%, medindo 20X25 cm, e submetidas a uma corrente inicial de 100 V (10 mim), seguido de uma corrente de 25V durante um período de 16 a 18 horas para a separação dos fragmentos de DNA. O DNA de lambda clivado com a enzima HindIII foi utilizado como referência para monitoramento da migração dos fragmentos desde o ponto de aplicação, visando uma padronização entre os diferentes géis.

4.6.3 Southern Blotting

Os fragmentos de DNA, contidos no gel de agarose, foram transferidos para uma membrana de náilon (Hybond N, Amersham), pelo sistema de transferência a vácuo VacuGeneTMXL (Pharmacia Biotech), conforme as instruções do fabricante. O sistema foi estabilizado em uma pressão de 50 mBar, enquanto o gel sofria despurinação com HCl 0,25 M, por 7 min. Depois foi desnaturado com NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M, por 7 min e neutralizado com Tris 1,0 M e NaCl 1,5 M (pH 7,5), por

mais 7 min. A transferência foi realizada com SSC 20X (NaCl 3M, Na-citrato 0,3M - pH 7,0), durante 40 min. Após a transferência os fragmentos de DNA foram fixados à membrana em forno a 80° C durante 2 horas.

4.6.4 Hibridização e Detecção

A membrana contendo os fragmentos de DNA foi hibridizada com 600 ng da sonda específica em forno giratório (Hybaid Instruments, Holbrook, NY) a 42°C por um período de 16 a 18 h. A sonda foi obtida pela amplificação pela PCR de um fragmento de 245 pb, situado à montante do sítio de clivagem da enzima PvuII, presente no *IS6110*, utilizando os seguintes *primers*:

INS-1	5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC	Hermans <i>et al.</i> , 1990
INS-2	5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA	Hermans <i>et al.</i> , 1990

As amplificações pela PCR foram realizadas em um termociclador (Mini Cycler - MJ Research) sob as seguintes condições: 30 ciclos de 2 min a 94°C, 2 min a 68°C, e 2 min a 72°C. O fragmento foi purificado em colunas MicroSpin™ S-300 (Pharmacia Biotech) e marcado enzimaticamente utilizando o kit ECL™ (Amersham).

O sistema envolve a marcação direta da sonda de DNA com a enzima peroxidase de raiz-forte (HRP-*Horseradish Peroxidase*). A sonda é desnaturada completamente de forma que o DNA fique fita simples. A HRP, que foi complexada com um polímero carregado positivamente, é adicionada e forma uma fraca ligação com o DNA por atração de cargas. A adição do glutaraldeído causa a formação de ligações químicas de forma que a sonda é covalentemente marcada com a enzima. Uma vez marcada, a sonda é utilizada na hibridização com o DNA-alvo imobilizado na membrana.

A detecção foi realizada pela sensibilização de um filme autoradiográfico através de uma reação de quimioluminescência. A HRP catalisa a oxidação do substrato luminol, o qual, na presença de um estimulador (*enhancer*) químico, resulta

em uma grande emissão de luz, que é prontamente detectada em um filme autoradiográfico.

4.7 Spoligotyping

A técnica foi realizada conforme padronizado por Kamerbeek *et al.* (1997) e está descrita nas etapas a seguir:

4.7.1 Primers

Os *primers* DRa e DRb anelam nas extremidades da seqüência DR visando amplificar as seqüências espaçadoras entre duas DRs.

DRa (5' biotilado)	GGT TTT GGG TCT GAC GAC	KAMERBEEK <i>et al.</i> , (1997)
DRB	CCG AGA GGG GAC GGA AAC	KAMERBEEK <i>et al.</i> , (1997)

4.7.2 Reação de Amplificação

As reações foram realizadas com 50 a 100 ng de DNA, 20 pmoles de cada um dos *primers*, 200 µM de desoxiribonucleosídeos trifosfato (Invitrogentm Life Technologies), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogentm Life Technologies). As amplificações pela PCR foram realizadas em um termociclador (Mini Cyclor - MJ Reasearch) sob as seguintes condições: 1 ciclo a 96°C por 3 min, 20 ciclos a 96°C por 1 min 55°C por 1 min, 72°C por 30 seg e 1 ciclo a 72°C por 5 min.

4.7.3 Hibridização dos Produtos da PCR e Detecção

Os produtos amplificados foram hibridizados com um conjunto de 43 oligonucleotídeos imobilizados em uma membrana comercial previamente preparada, cada um correspondendo a uma das seqüências únicas dos espaçadores dentro do locus DR (Isogen, Bioscience BV, Holanda).

Para a hibridização, 20 µL dos produtos da PCR foram diluídos em 150 (L de SSPE 2X (0,02 M Na₂HPO₄ * 2 H₂O, 0,36 M NaCl, 2mM EDTA - pH 7,4)- SDS 0,1%

e desnaturados. As amostras diluídas foram aplicadas em canais paralelos de um miniblatter (Isogen, Bioscience BV, Holanda), de modo que ficassem perpendiculares às linhas de oligonucleotídeos previamente imobilizados. A hibridização foi realizada por 60 min a 60°C em forno giratório (Hybaid Instruments, Holbrook, NY), após a membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2X- SDS 0,5% por 10 min a 60°C. Em seguida foi incubada com um conjugado de estreptavidina-peroxidase diluído (1:4.000) por 50 min a 42°C. A membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2X- SDS 0,5% por 10 min a 42°C e 2 vezes com 250 mL de SSPE 2X por 5 min à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela sensibilização de um filme autoradiográfico através de uma reação de quimioluminescência, utilizando o kit ECLTM (Amersham Biosciences, Inglaterra).

4.8 Análise dos Resultados de Genotipagem

Os resultados obtidos foram analisados visualmente e pelo software GelCompar, versão 4.2. Este programa fornece uma análise dos *clusters* utilizando a análise de agrupamentos pelo método de médias aritméticas não-ponderadas (UPGMA) baseado no coeficiente de Dice para o pareamento (Dice, 1945), com uma tolerância de posição selecionada de 1,5% e a otimização de 1,0%.

Para análise dos resultados foram seguidas as recomendações de Tenover *et al.*, (1997) e Heersma *et al.*, (1998). Dois ou mais isolados foram considerados pertencentes a um *cluster* quando seus padrões de RFLP eram indistinguíveis, isto é, apresentaram o mesmo número e posição de bandas. Aqueles isolados ou *clusters* que apresentaram diferenças de uma até três bandas foram considerados membros de uma mesma família. Os isolados que tiveram padrões de RFLP totalmente distintos dos demais isolados foram considerados não *cluster*. As imagens digitalizadas foram analisadas pelo programa de computador GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Foi utilizado o coeficiente de Dice para o cálculo de similaridade. Para a técnica de *Spoligotyping* foi utilizada uma tolerância de posição de 1,0% .

4.9 Dados Clínicos e Epidemiológicos

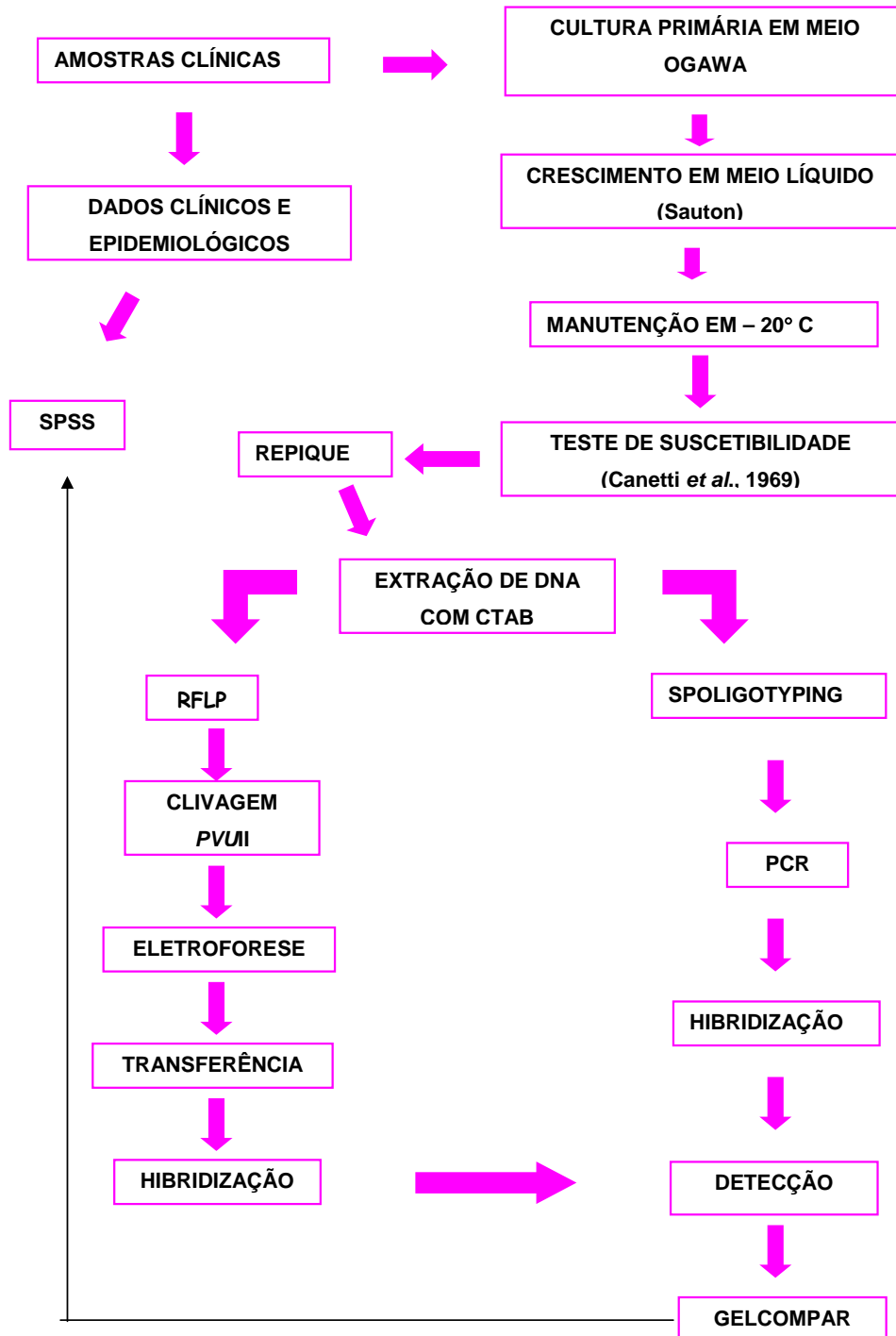
Os dados clínico-demográficos foram obtidos através das fichas clínicas fornecidas ao LACEN, da análise dos prontuários médicos e do banco de dados digitalizado do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) disponibilizado pelo Programa Estadual de Controle da Tuberculose. Foram utilizados para as análises estatísticas os programas EpiInfo (versão 6.04d, Centers for Disease Control & Prevention, USA) e SPSS para Windows, versão 8.0 (SPSS Inc., Chicago, III). As associações entre as variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste de χ^2 ou teste exato de Fischer. A diferença entre os grupos foi testada através de análise univariada e expressa pela razão de chance (*odds ratio* - OR) com intervalo de confiança de 95% (CI 95%). Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

Foram analisados dados como idade, gênero, etnia, profissão, escolaridade, estado civil, informações laboratoriais (provas bioquímicas de identificação, perfil de suscetibilidade, resultados de baciloscopia) e possíveis fatores de risco como HIV, uso de drogas lícitas ou ilícitas.

4.10 Considerações Éticas

Este estudo foi elaborado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde). Foi aprovado pelos Comitês de Ética da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde e do Hospital Sanatório Partenon.

4.11 Fluxograma do Estudo



5. Resultados

5.1. Caracterização do Período do Estudo

No ano de 1999 foram notificados 4.816 casos de tuberculose e em 2000 foram notificados 5.610 casos novos, perfazendo um total de 10.426 novos casos de TB no período do estudo (Tabela 4). No mesmo período foram realizadas no LACEN 1.994 culturas para a identificação micobacteriana. Em 1999 foram cultivados 913 isolados e no ano seguinte, 1.081 isolados. A conservação dos isolados micobacterianos foi realizada em freezer -20°C por períodos que variaram de 6 meses a 3 anos.

Tabela 4. Número de casos de tuberculose no Rio Grande do Sul e dados sobre o cultivo de *M. tuberculosis* realizados no LACEN.

Ano	Nº de casos de TB notificados pelo SINAN	Nº de culturas realizadas no LACEN (%)	Nº de culturas positivas (%)	Nº de isolados com teste de suscetibilidade (%)	Nº de isolados MDR (%)
1999	4.816	913 (19)	337 (7)	182 (3,8)	45 (0,89)
2000	5.610	1.081 (19,2)	483 (8,6)	211 (3,8)	42 (0,75)
2004	4.924	NT	NT	486 (9,9)	70 (1,4)

NT. Dado não tabulado.

Em comparação, no ano de 2004 foram notificados 4.924 casos novos de TB e o resultado do teste de suscetibilidade permitiu identificar 70 casos de TB MDR. A comparação dos dois anos do estudo com o ano de 2004 permitiu observar um aumento no número de testes de suscetibilidade realizado e conseqüentemente a identificação de um número maior de isolados MDR (1,4%).

5.2. Teste de Suscetibilidade

O teste de suscetibilidade foi realizado em 393 isolados de *M. tuberculosis*, cujos resultados foram: 210 (53,4%) isolados suscetíveis a todos os fármacos

testados, 81 (20,6%) resistentes a apenas um fármaco, 76 (19,3%) resistentes a dois fármacos e 19 (4,8%) resistentes a três fármacos e 7 (1,8%) resistentes a quatro fármacos. Foram também identificados 85 (22,4%) isolados MDR. A Tabela 5 apresenta o perfil de resistência aos fármacos dos isolados testados classificados quanto ao número de fármacos anti-TB que os isolados demonstraram ser resistentes.

Tabela 5. Perfil de resistência aos fármacos apresentados pelos isolados de *M. tuberculosis* (n = 393).

Perfil de Suscetibilidade	N de isolados/perfil	Porcentagem
Resistência a um fármaco	81 isolados: 76 INH ^R 03 SM ^R 02 RMP ^R	20,6%
Resistência a dois fármacos	76 isolados: 61 INH ^R + RMP ^R 08 INH ^R + SM ^R 05 INH ^R + EMB ^R 01 INH ^R + PZA ^R 01 INH ^R + ETH ^R	19,3%
Resistência a três fármacos	19 isolados 09 INH ^R + RMP ^R + SM ^R 05 INH ^R + RMP ^R + PZA ^R 03 INH ^R + RMP ^R + EMB ^R 01 INH ^R + EMB ^R + SM ^R 01 INH ^R + PZA ^R + SM ^R	4,8%
Resistência a quatro fármacos	07 isolados 04 INH ^R + RMP ^R + SM ^R + PZA ^R 02 INH ^R + RMP ^R + EMB ^R + PZA ^R 01 INH ^R + RMP ^R + EMB ^R + SM ^R	1,8%

A Tabela 6 mostra o número de isolados resistentes a cada um dos fármacos testados. É possível observar que a resistência a INH é bastante prevalente na amostra estudada (45,3%). Devidos problemas relacionados com o teste de suscetibilidade frente aos fármacos PZA e ETH os resultados disponíveis ficaram bastante limitados.

Tabela 6. Perfil de resistência dos isolados de *M. tuberculosis* analisados, descritos por fármaco (n = 393).

Fármaco	Nº de isolados	Percentual
INH		
Resistente	178	45,3%
Suscetível	215	54,7%
RMP		
Resistente	91	23,1%
Suscetível	300	76,3%
Desconhecido	02	0,5%
EMB		
Resistente	10	2,5%
Suscetível	378	96,2%
Desconhecido	5	1,3%
SM		
Resistente	34	8,6%
Suscetível	358	91%
Desconhecido	1	0,25%
PZA		
Resistente	15	3,8%
Suscetível	277	70,5%
Desconhecido	101	25,7%
ETH		
Resistente	2	0,5%
Suscetível	268	68,2%
Desconhecido	123	31,3%

5.3 Cultivo, Extração de DNA e Manutenção dos Isolados MDR

Os isolados identificados como MDR foram localizados na coleção de isolados de *M. tuberculosis* do LACEN. Foram identificados 87 isolados MDR, isto é, resistentes a INH e RMP (Tabela 4), dos quais 65 foram repicados em meio de cultura Ogawa e incubados por pelo menos 30 dias até a obtenção de um crescimento visível, indicando a viabilidade da micobactéria.

Entre os isolados com teste de suscetibilidade frente aos fármacos no ano de 1999, foram identificados 45 MDR. Desses, foi possível manter cultivo e obter DNA de 35 isolados. Dos 42 isolados MDR testados no ano 2000, foram obtidos cultivos e extraído DNA de 25 deles. Considerando a importância de manter essas culturas para outras análises do estudo e outros fins, buscou-se manter essas culturas viáveis. Para tanto, foi necessário crescer as micobactérias em meio líquido Sauton e após mantê-las a -20° C.

5.4 Seleção de Isolados Controles

O grupo controle utilizado no estudo foi selecionado com base no resultado do teste de suscetibilidade, na origem geográfica e temporal, correspondente aos casos. Os isolados suscetíveis a todos os fármacos testados foram selecionados da coleção, cultivados em meio de cultura Ogawa e após crescimento visível foi realizada a extração de DNA de 202 isolados.

5.5 Origem dos Isolados de *M. tuberculosis*

Os isolados incluídos no estudo foram provenientes de diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul. Foram encaminhados pelos Laboratórios Regionais localizados junto as Coordenadorias Regionais de Saúde (CRS). A Tabela 7 apresenta algumas características das Coordenadorias de origem dos isolados de *M. tuberculosis* incluídos no estudo. O maior número de notificações de TB no período do estudo foi a 1ª CRS, que atende a população da região metropolitana de Porto Alegre, responsável por 40,8% dos pacientes/isolados analisados, seguida pela 3ª CRS que contribuiu com 19,1% dos pacientes do estudo.

A Figura 7 apresenta o mapa do Estado com a distribuição dos isolados de *M. tuberculosis* casos e controles analisados no estudo. Entre os isolados casos, 27 (45%) foram provenientes da Região Metropolitana. A região de Caxias do Sul foi responsável por 10% dos isolados casos. As regiões de Bagé, Pelotas e Santa Maria foram responsáveis individualmente por 3% dos casos identificados no período. Foi identificado um caso (1,7%) em cada uma das seguintes regiões: Alegrete, Erechim, Rio Grande e Santa Cruz do Sul.

O Hospital Sanatório Partenon, localizado na Região Metropolitana de Porto Alegre, é especializado no atendimento de pacientes com TB de todo o Estado do RS e foi responsável por 17 isolados casos (28%).

Tabela 7. Dados sobre as Coordenadorias Regionais de Saúde do Rio Grande do Sul.

CRS	Município Sede	População por CRS*	Nº de casos de TB notificados em 1999 / 2000 / 2003**	Nº de Isolados incluídos no estudo
1ª	Porto Alegre	3.381.940	2.516 / 3.512 / 2.707	107***
2ª	Porto Alegre	710.977	281 / 264 / 327	-
3ª	Pelotas	836.864	467 / 443 / 379	50
4ª	Santa Maria	532.018	179 / 140 / 134	22
5ª	Caxias do Sul	951.362	208 / 245 / 239	17
6ª	Passo Fundo	564.352	101 / 102 / 106	01
7ª	Bagé	216.592	128 / 76 / 81	20
8ª	Cachoeira do Sul	193.337	115 / 64 / 72	-
9ª	Cruz Alta	136.012	22 / 29 / 21	07
10ª	Alegrete	558.460	234 / 304 / 228	16
11ª	Erechim	217.714	30 / 20 / 24	05
12ª	Santo Ângelo	236.018	105 / 46 / 43	03
13ª	Santa Cruz do Sul	308.348	69 / 77 / 70	06
14ª	Santa Rosa	235.846	23 / 42 / 21	05
15ª	Palmeira das Missões	162.668	22 / 28 / 17	01
16ª	Lajeado	338.193	60 / 60 / 83	02
17ª	Ijuí	221.314	38 / 32 / 33	-
18ª	Osório	293.115	92 / 92 / 152	-
19ª	Frederico Westphalen	212.056	30 / 34 / 17	-
Total		10.307.186	4.816 / 5.610 / 4.754	262

* Estimativa de 2001

** O ano de 2003 foi adicionado para fins comparativos.

*** 67 pacientes provindos da 1ª CRS e 40 provindos do Hospital Sanatório Partenon.



Figura 7. Mapa do Estado do Rio Grande do Sul com a distribuição dos casos e controles analisados no estudo. Não foram adicionados no mapa os 17 casos e os 28 controles do Hospital Sanatório Partenon.

5.5 Resultados da Genotipagem por *IS6110* - RFLP

5.5.1 Número de Cópias do *IS6110*

Sessenta isolados MDR (casos) foram genotipados pela técnica de RFLP baseada no *IS6110*. Entre os controles foram analisados 202 isolados. Apenas um isolado por paciente foi analisado no estudo. Em ambos os grupos o número de cópias de *IS6110* variou de 2 a 18, a média e a moda foram 10. Vinte e seis isolados

(10%) apresentaram 6 cópias ou menos do *IS6110* e 15 isolados apresentaram 16 ou mais cópias (5,7%). A Figura 8 apresenta o gráfico com o número de isolados por número de cópias de *IS6110* dos isolados casos e controles, obtido através da análise *in silico*.

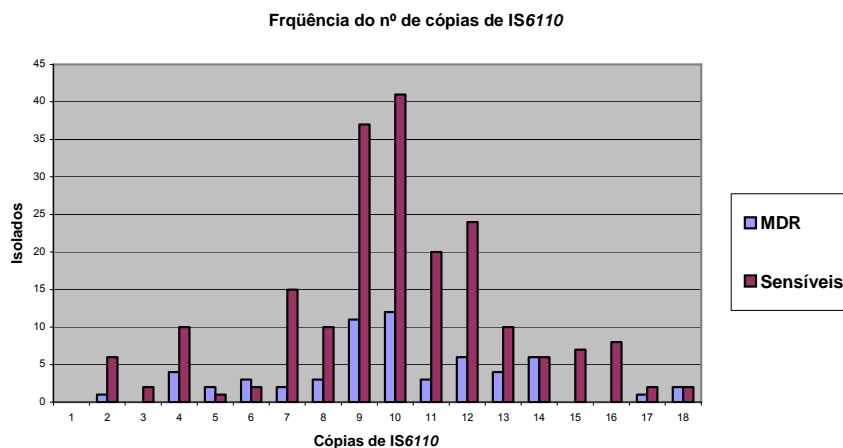


Figura 8. Número de cópias de *IS6110* observado em isolados casos e controles.

5.5.2 Análise dos Isolados de *M. tuberculosis* em Cluster

A genotipagem baseada no *IS6110* dos isolados de *M. tuberculosis* permitiu identificar 94 pacientes (36%) que apresentavam linhagens agrupadas em *cluster*, indicando a existência de uma possível transmissão recente da tuberculose. Os outros 168 pacientes apresentaram perfis distintos, isto é, não *cluster* (64,12%). Entre os isolados MDR, 40% estavam em clusters, enquanto entre os isolados suscetíveis esta proporção foi de 34,7%.

A Tabela 8 apresenta os resultados observados nos isolados classificados como casos, controles e quando avaliados juntos. São apresentadas informações sobre o número mínimo e máximo de cópias do *IS6110*, o número médio de cópias, número de *clusters* e número de isolados em *clusters*. O número de isolados em *cluster* nos casos (MDR) não foi estatisticamente significativo quando comparado com os controles.

Tabela 8. Comparação dos resultados de RFLP baseado no *IS6110* observado entre os casos, controles e o total de isolados analisados.

Características	MDR	Suscetíveis	Total
Nº de isolados	60	202	262
Varição no nº de cópias do <i>IS6110</i>	2 a 18	2 a 18	2 a 18
Nº médio de cópias do <i>IS6110</i>	10	10	10
Nº distintos de padrões de RFLP	52	157	187
Nº de <i>cluster</i>	11	19	20
Nº de isolados em <i>cluster</i>	24	70	94
Percentagem de isolados em <i>cluster</i>	40%	34,7%	35,9%

A análise do resultado de genotipagem de todos os isolados do estudo demonstrou a existência de 187 padrões distintos de bandas, sendo que 168 foram únicos, isto é, apresentado por apenas um isolado. Foi possível observar que 20 padrões de *IS6110* - RFLP apresentavam-se repetidos, em grupos que variavam de 2 a 13 isolados. Os *clusters*, identificados por letras, foram avaliados quanto à presença de isolados casos ou controles. O *cluster* J, composto por dois isolados, foi o único a apresentar apenas isolados casos. Os demais isolados casos participaram de *clusters* onde também constavam alguns isolados controles.

O maior *cluster*, denominado *cluster* B, foi composto por 3 isolados casos e 10 isolados controles. No *cluster* A, composto por 10 isolados, foi observado que 50% destes eram casos. Outro *cluster* importante observado foi o D, pois foi composto por 7 isolados, sendo 5 casos. Os demais *clusters* foram compostos na sua maioria por isolados suscetíveis, provavelmente, por terem sido selecionados em maior número para o estudo. Na Figura 9 é possível observar o dendrograma dos padrões em *cluster* identificados no estudo.

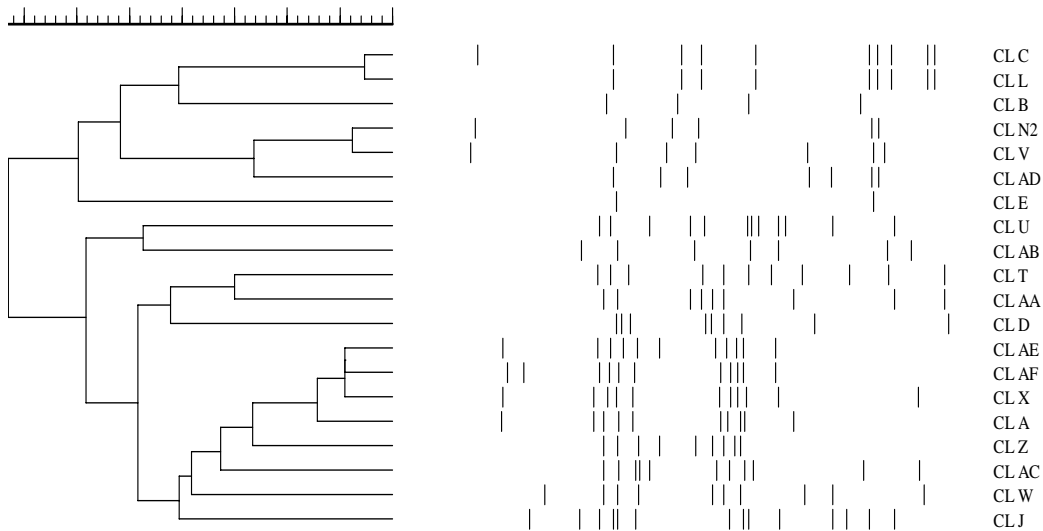


Figura 9. Dendrograma apresentando os padrões dos isolados casos e controles em *cluster*.

5.5.2.1 Padrões de *IS6110* Observados entre os Isolados de *M. tuberculosis* Controles

A análise dos padrões gerados por RFLP baseado no *IS6110* entre os isolados controles demonstra que entre os 202, 70 deles (34,7%) foram agrupados em 19 *clusters*. Os *clusters* formados entre os controles apresentam isolados obtidos de pacientes de vários locais do Estado, conforme demonstra a Tabela 9. Os *clusters* mais representativos foram o C com 12 isolados (17,1%), o B com 10 isolados (14,3%) e o Z com 8 isolados (11,4%). Os demais *clusters* foram compostos por 2 a 6 isolados de *M. tuberculosis*. Os *clusters* L, T, U, W, X, AB, AC, AD e AF foram formados somente por isolados controles e representam 27,1% dos isolados controles em *cluster*.

Tabela 9. Análise dos *Clusters* Encontrados nos Isolados Controles (n = 70 isolados).

Nome do <i>Cluster</i>	Nº de Bandas	Nº de isolados	Origem dos isolados*	%
A	10	5**	2 B, 1 MET, 1 P, 1 RG	7,1
B***	4	10**	2 MET, 1 HSP, 2 SM, 2 A, 1 SA	14,3
C***	10	12**	3 MET, 1 SM, 2 P, 2 B, 1 E, 1 RG, 1 C e 1 CA	17,1
D	9	2**	1 MET, 1 SM	2,9
E	2	6**	2 B, 1 SM, 1 RG	8,6
L	9	2	1 MET, 1 HSP	2,9
N2	6	1**	1 P	1,4
T	11	2	1 SC, 1 E	2,9
U	12	2	2 RG	2,9
V	7	5**	1 SA, 1 HSP, 1 SM	7,1
W	10	2	2 SM	2,9
X	11	2	1 HSP, 1 P	2,9
Z***	9	8**	3 RG, 4 P, 1 C	11,4
AA	9	1**	1 B	1,4
AB	7	3	2 SM, 1 RG	4,3
AC	11	2	2 B	2,9
AD	7	2	1 MET, 1 HSP	2,9
AE	11	1**	1 A	1,4
AF	11	2	2 P	2,9

* A = Região de Alegrete; B = Região de Bagé; C = Região de Caxias do Sul; CA = Região de Cruz Alta; E = Região de Erechim, L = Região de Lajeado; MET = Região Metropolitana de Porto Alegre; P = Região de Pelotas; PF = Região de Passo Fundo; PM = Região de Palmeira das Missões; RG = Região de Rio Grande; SA = Região de Santo Ângelo; SC = Região de Santa Cruz do Sul; SM = Região de Santa Maria; SR = Região de Santa Rosa; HSP = Hospital Sanatório Partenon.

** *Cluster* também formado por isolados casos.

*** *Cluster* com representatividade superior a 10% na amostra de conveniência analisada.

A Figura 10 apresenta o padrão de bandas do IS6110 dos isolados controles em *cluster*. O *cluster* C composto por 12 isolados apresentou 10 cópias do IS6110. A origem dos isolados deste *cluster*, assim como no *cluster* B (que apresentou 10 isolados), foi bastante diversa, não sendo possível caracterizar apenas uma região de origem. Em ambos os *clusters* a região metropolitana foi a mais representativa, dos quais 30% do isolados do *cluster* B e 25% do *cluster* C eram provenientes. No entanto, *cluster* Z apresentou 9 cópias do IS6110 e foi composto por 8 isolados, dos quais 50% eram provenientes da regional de Pelotas.

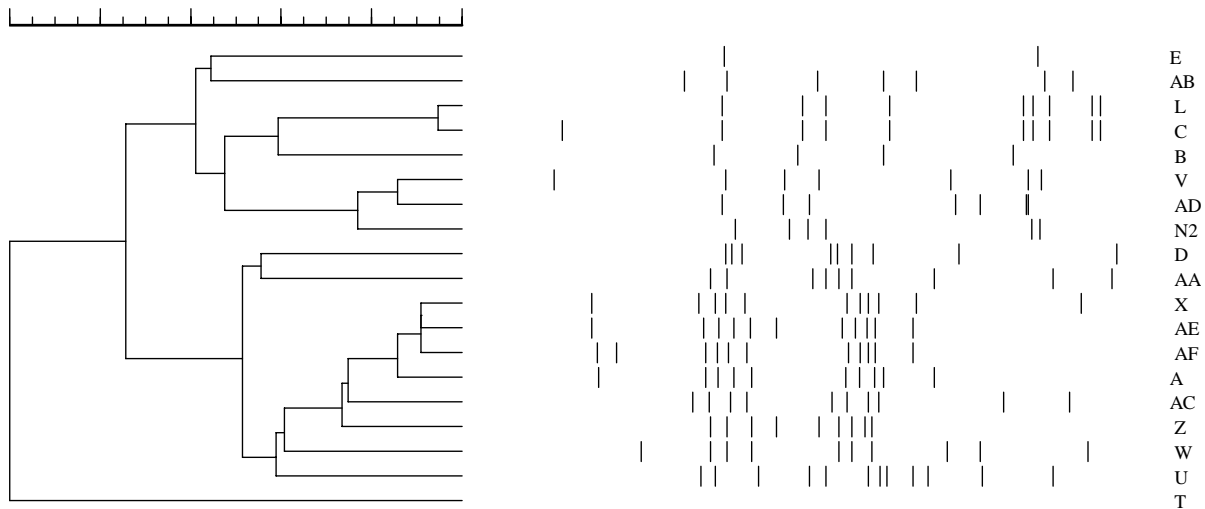


Figura 10. Dendrograma dos *clusters* formados entre os isolados controles. O número mínimo de isolados por *cluster* foi 2 e o máximo 12.

5.5.2.2 Padrões de IS6110 Observados entre os Casos

Entre os 60 isolados casos analisados foram observados 11 distintos *clusters*, nos quais 24 (40%) isolados de *M. tuberculosis* MDR se distribuíram (Tabela 9). Apenas um *cluster*, o J, foi composto por apenas isolados MDR. Os *clusters* A e D, ambos compostos por 5 isolados de *M. tuberculosis* MDR cada, foram os mais representativos na amostra analisada (16,6%). Os *clusters* B e N2, ambos compostos por 3 isolados cada, também representaram mais de 13% dos isolados MDR circulantes. Os *clusters*, denominados como C, E, V, Z, AA e AE, foram agrupados com os isolados de *M. tuberculosis* controles.

Tabela 10. Análise dos *Clusters* Encontrados nos Isolados Casos (n = 24 isolados).

Nome do <i>Cluster</i>	Nº de Bandas	Nº de isolados	Origem dos isolados*	%
A***	10	5	3 MET, 1 SC, 1 C	20,8
B***	4	3	1 MET, 1 C	12,5
C	10	1	1 MET	4,2
D***	9	5	4 HSP, 1 MET	20,8
E	2	1	1 MET	4,2
J**	14	2	1 HSP, 1 MET	8,3
N2***	6	3	3 C	12,5
V	7	1	1 P	4,2
Z	9	1	1 HSP	4,2
AA	9	1	1 P	4,2
AE	11	1	1 MET	4,2

* B = Região de Bagé; C = Região de Caxias do Sul; E = Região de Erechim; MET = Região Metropolitana de Porto Alegre; P = Região de Pelotas; RG = Região de Rio Grande; SC = Região de Santa Cruz do Sul; SM = Região de Santa Maria; HSP = Hospital Sanatório Partenon.

** *Cluster* formado apenas por isolados casos.

*** *Cluster* com representatividade superior a 12% na amostra de conveniência analisada.

A Figura 11 apresenta o dendrograma com os isolados casos que formaram *cluster*. Os dois maiores *clusters*, A e D (ambos com 5 isolados), foram compostos principalmente por isolados provenientes da região metropolitana de Porto Alegre. O número de cópias do IS6110 no *cluster* A foi 10, enquanto no *cluster* D foram observadas 9 cópias. Os *clusters* B e N2 apresentaram 4 e 6 cópias, respectivamente.

Resultados

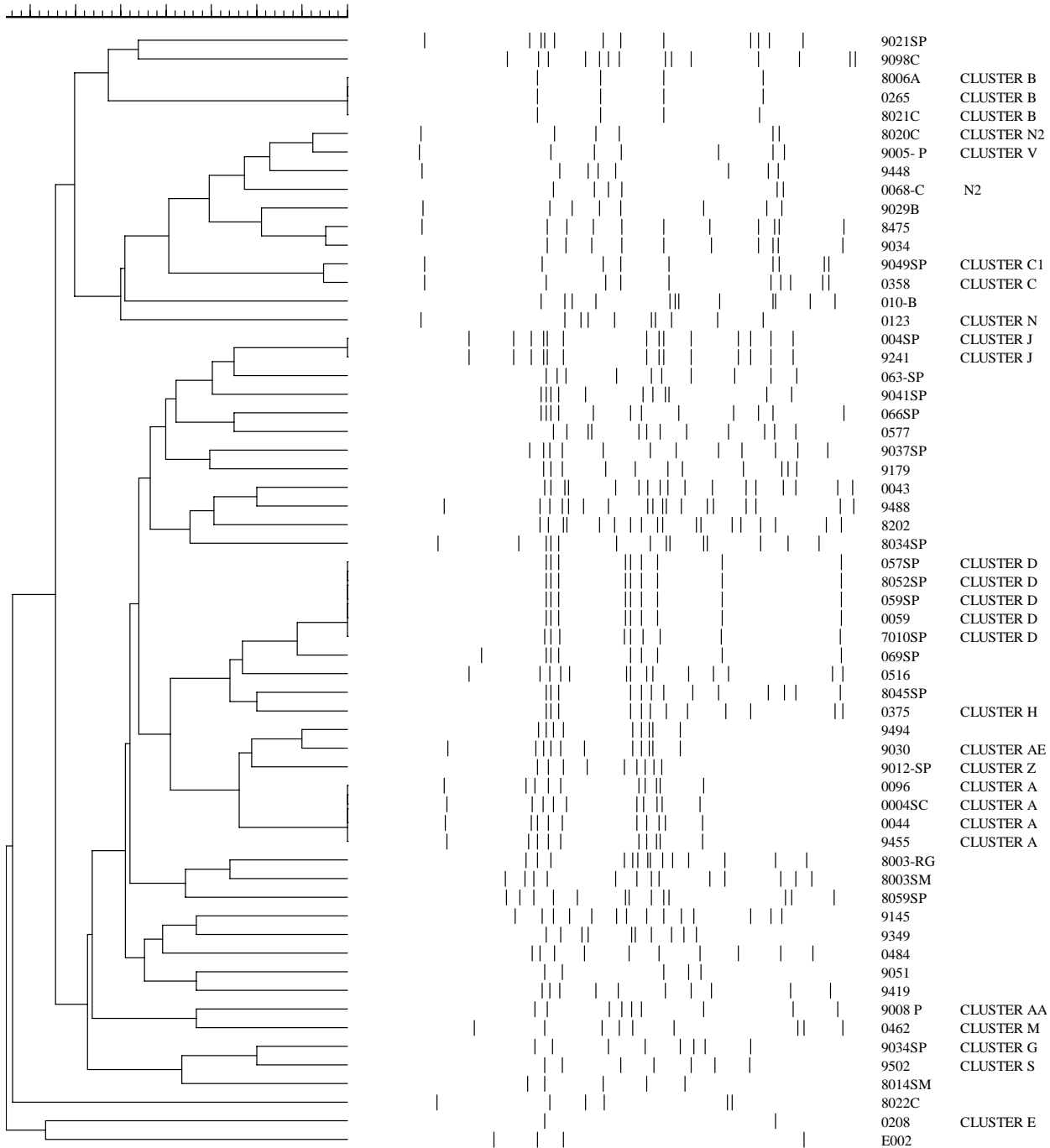


Figura 11. Dendrograma composto por todos os isolados MDR (casos). O número de cópias do IS6110 variou de 2 a 14.

5.5.2.2 Análise dos Padrões de IS6110 Observados entre todos os Isolados de *M. tuberculosis* Analisados

A análise dos padrões gerados por RFLP baseado no IS6110 permitiu identificar aqueles que estão mais envolvidos com a transmissão recente no RS. Os *clusters* que estão mais envolvidos com transmissão recente são os que, na análise por grupo caso ou controle, já demonstraram uma maior prevalência na amostra de isolados de *M. tuberculosis* analisada. Os *clusters* A, B, C e Z representaram mais de 10% dos isolados analisados na amostra de conveniência.

Os *clusters* identificados como os mais representativos na amostra foram compostos por isolados provindos de diversas regiões do Estado, não sendo possível associar um determinado *cluster* com uma única região (Tabela 11). Porém, foi possível observar que nos *clusters* A, B, C e D há uma predominância de origem dos isolados da região metropolitana de Porto Alegre considerando o Hospital Sanatório Partenon (40%, 30%, 30% e 57%, respectivamente). Por outro lado, o *cluster* Z, composto por 9 isolados, apresentou 44% deles da região de Pelotas e 33% da região de Rio Grande.

Tabela 11. Análise dos *Clusters* Encontrados entre os Isolados Casos e Controles (n = 94 isolados).

Nome do <i>Cluster</i>	Nº de isolados	Origem dos isolados*	%
A**	10	2 B, 1 C, 4 MET, 1 P, 1 RG, 1 SC	10,6
B**	13	3 A, 1 C, 2 HSP, 4 MET, 1 SA, 2 SM	13,8
C**	13	2 B, 1 C, 1 CA, 1 E, 4 MET, 2 P, 1 RG, 1 SM	13,8
D	7	4 HSP, 2 MET, 1 SM	7,4
E	7	3 B, 2 MET, 1 RG, 1 SM	7,4
J	2	1 HSP, 1 MET	2,1
L	2	1 HSP, 1 MET	2,1
N2	4	3 C, 1 P	4,2
T	2	1 E, 1 SC	2,1
U	2	2 RG	2,1
V	6	1 C, 1 P, 1 SA, 2 SM, 1 HSP	6,4
W	2	2 SM	2,1
X	2	1 HSP, 1 P	2,1
Z**	9	4 P, 1 C, 3 RG, 1 HSP	9,6
AA	2	1 B, 1 P	2,1
AB	3	2 SM, 1 RG	3,2
AC	2	2 B	2,1
AD	2	1 HSP, 1 MET	2,1
AE	2**	1 A, 1 MET	2,1
AF	2	2 P	2,1

* A = Região de Alegrete; B = Região de Bagé; C = Região de Caxias do Sul; CA = Região de Cruz Alta; E = Região de Erechim, L = Região de Lajeado; MET = Região Metropolitana de Porto Alegre; P = Região de Pelotas; PF = Região de Passo Fundo; PM = Região de Palmeira das Missões; RG = Região de Rio Grande; SA = Região de Santo Ângelo; SC = Região de Santa Cruz do Sul; SM = Região de Santa Maria; SR = Região de Santa Rosa; HSP = Hospital Sanatório Partenon.

** *Clusters* predominantes na amostra de isolados de *M. tuberculosis* analisada.

A Figura 12 mostra a distribuição dos *clusters* observados no estudo nas CRS. É possível observar que os pontos vermelhos, representando os casos em *cluster*, estão mais concentrados na região Metropolitana de Porto Alegre. Enquanto, os pontos verdes, representando os controles em *cluster*, estão distribuídos em diversas regiões do Estado.

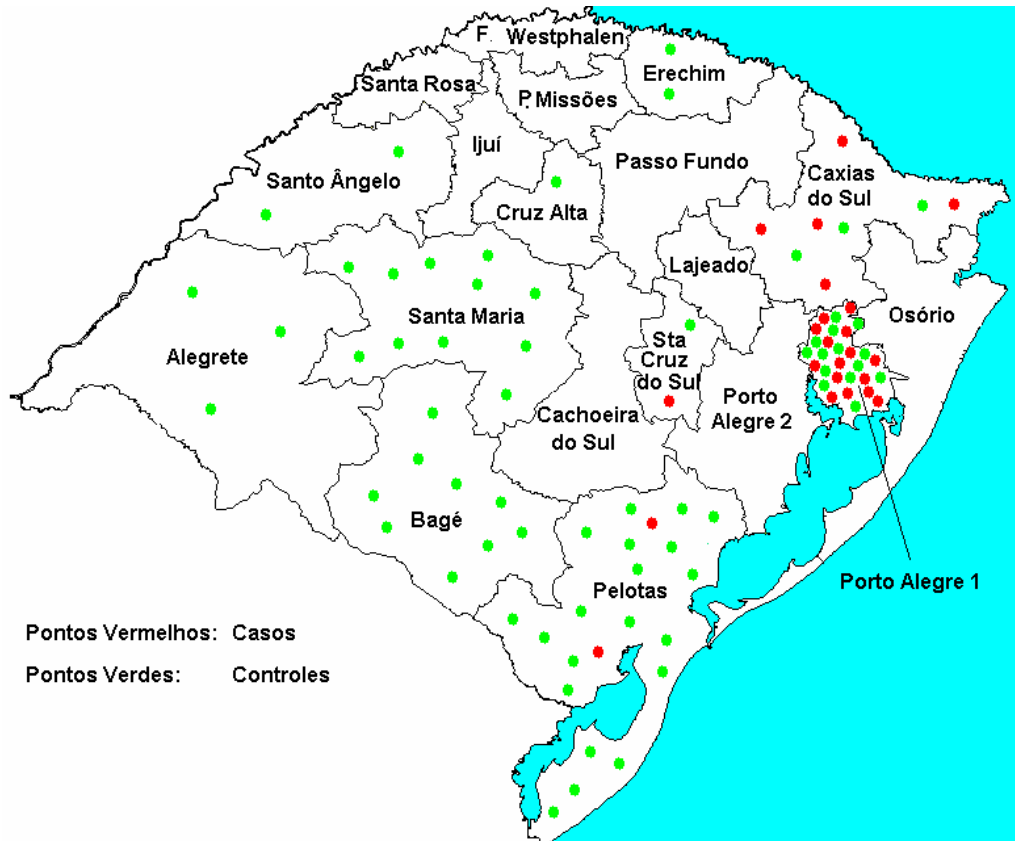


Figura 12. Distribuição dos casos e controles em *cluster* no Rio Grande do Sul (n=89).

5.6 Análise dos Padrões Gerados pela Genotipagem por *Spoligotyping*

Os 94 isolados identificados como *clusters* pelo IS6110 - RFLP que apresentaram seis cópias de IS6110 ou menos foram novamente genotipados através de um segundo método de genotipagem, o *Spoligotyping*. Através desse método, foi possível observar que 5 isolados de *M. tuberculosis* deixaram de fazer parte dos *clusters*, permanecendo 34% dos isolados em *cluster*. Um isolado caso que pertencia ao *cluster* B (4 bandas) deixou de se agrupar, caracterizando outra linhagem. Entre os 70 isolados suscetíveis que formaram *cluster* pelo RFLP, 4 deles deixaram de ser considerados *clusters* após o *Spoligotyping*.

O *cluster* B (4 cópias de *IS6110*), que pelo resultado de *IS6110* RFLP era composto por 13 isolados, após o *Spoligotyping* passou a ser composto por 10 isolados. Entre os 3 isolados que deixaram de participar do *cluster* B estão 2 controles provindos da região metropolitana de Porto Alegre e do HSP, e, 1 caso provindo de Alegrete.

Os *clusters* descritos como A e D representam 43,5% dos *clusters* MDR encontrados nesse estudo. A Tabela 12 apresenta os *clusters* e sua composição após análise de RFLP e *Spoligotyping*.

Tabela 12. *Clusters* observados no estudo através de RFLP e confirmados por *Spoligotyping* (n = 89). Os *clusters* A, B, C e Z permaneceram os mais representativos após segundo método de genotipagem.

Nome do <i>cluster</i> (n = 20)	Nº de bandas por RFLP	Nº de isolados (n = 89)	Grupo Caso (n = 23)	Grupo Controle (n = 66)	Percentagens
A	10	10	5	5	11,2%
B*	4	10	2	8	11,2%
C	10	13	1	12	14,6%
D	9	7	5	2	7,8%
E	2	5	1	4	5,6%
J	14	2	2		2,2%
L	9	2		2	2,2%
N2	6	4	3	1	4,5%
T	11	2		2	2,2%
U	12	2		2	2,2%
V	7	6	1	5	6,7%
W	10	2		2	2,2%
X	11	2		2	2,2%
Z	9	9	1	8	10,1%
AA	9	2	1	1	2,2%
AB	7	3		3	3,4%
AC	11	2		2	2,2%
AD	7	2		2	2,2%
AE	11	2	1	1	2,2%
AF	11	2		2	2,2%

* *Cluster* que teve sua composição alterada após genotipagem por *Spoligotyping*.

4.7. Análise dos Dados Clínicos e Epidemiológicos

Os dados epidemiológicos dos pacientes foram analisados e comparados, buscando verificar a presença de fatores de risco para o desenvolvimento de TB MDR nos pacientes. É importante salientar que devido ao caráter retrospectivo do estudo os dados clínicos e epidemiológicos não foram obtidos para todos os

pacientes do estudo, sendo a análise realizada a partir dos pacientes que apresentavam os dados disponíveis.

Para a análise das características dos pacientes foi construído um banco de dados composto por 262 pacientes, dos quais foram obtidos dados a respeito de 25 variáveis distintas. As variáveis com menos de 50% de dados foram excluídas, com exceção do *status* para HIV (48,5%) e alcoolismo (49,2%). Variáveis como diabetes, estado civil, prisão, BCG, cura, baciloscopia, falência, recidiva e abandono apresentaram uma abrangência de informações que variou de 53,8% a 85%. Entre as demais variáveis foi possível obter informações superiores a 90% (Tabela 13).

Tabela 13. Variáveis analisadas no estudo e o número de respostas válidas para cada uma delas.

Variáveis	Respostas Presentes (%)	Status
Óbito	12 (4,6)	Excluída
Homossexual	34 (13)	Excluída
Hepatite	50 (19,1)	Excluída
Imunodepressão	69 (26,3)	Excluída
Escolaridade	96 (36,6)	Excluída
Uso de drogas	98 (37,4)	Excluída
Desnutrição	116 (44,3)	Excluída
HIV	127 (48,5)	Mantida
Alcoolismo	129 (49,2)	Mantida
Diabetes	140 (53,8)	Mantida
Estado Civil	157 (59,9)	Mantida
Prisão	170 (64,9)	Mantida
BCG	190 (72,5)	Mantida
PPD	203 (77,5)	Mantida
Cura	215 (82,1)	Mantida
Baciloscopia	217 (82,8)	Mantida
Falência no tratamento	220 (84)	Mantida
Recidiva	220 (84)	Mantida
Abandono de tratamento	221 (84,4)	Mantida
Etnia	243 (93,7)	Mantida
Tratamento prévio	255 (97,3)	Mantida
Idade	260 (99,2)	Mantida
Gênero	262 (100)	Mantida
Profissão	262 (100)	Mantida

4.7.1 Análise Geral dos Dados Clínicos e Epidemiológicos

A análise global foi realizada incluindo os dados de todos os pacientes do estudo, independente de pertencer ao grupo de casos ou controles. As variáveis

descritas a seguir apresentaram um número de respostas válidas já descritas na Tabela 13. Observou-se que entre os 262 pacientes estudados 186 (71%) eram do gênero masculino e 76 (29%) do gênero feminino. A média de idade e a mediana foram de 39,2 anos, sendo que 48,5% dos pacientes estavam na faixa etária entre 20 e 40 anos de idade (distribuição igualitária de 20 a 29 e de 30 a 40 anos). Cento e oitenta e dois pacientes (74,8%) eram de etnia branca, 31 (12,8%) de etnia negra e 30 (12,3%) de etnia mulata.

Quanto ao estado civil, observou-se uma predominância de pacientes não casados com 54,8% (86), seguidos pelos casados com 40,8% (64). Os pacientes foram classificados de acordo com a origem, sendo que 108 pacientes (41,2%) eram provindos da região metropolitana de Porto Alegre e 154 pacientes (58,8%) do interior do Estado. Cento e trinta e quatro pacientes (52,5%) não haviam realizado tratamento prévio e 121 (47,5%) já haviam sido tratados para TB anteriormente. Em 45 pacientes (20,5%) ocorreu falência no tratamento, isto é, a persistência de baciloscopia positiva até o 6º mês de tratamento ou o aparecimento de bacilos no escarro por dois meses consecutivos após negativação inicial. Enquanto que em 175 pacientes (79,5%) não ocorreu falência. A recidiva, que significa o reaparecimento da doença algum tempo depois de haver convalidado de um primeiro acometimento, ocorreu em 19 pacientes (8,6%), enquanto 201 (90,4%) não apresentaram recidiva.

Trinta e cinco (15,8%) pacientes apresentavam história prévia de abandono de tratamento para a TB. A alta por cura foi observada em 173 dos pacientes (80,5%) e ausência de cura foi descrita para 42 pacientes (19,5%). A cicatriz vacinal, resultante da vacina BCG, estava presente em 81 pacientes (42,6%). O alcoolismo foi observado em 58 pacientes (45%) e em 71 (55%) não havia histórico de alcoolismo. O número de respostas válidas para a diabetes foi 141 (53,8), dos quais 16 pacientes (12%) apresentavam a patologia e 124 (88%) não.

A permanência em prisões foi descrita para 5 pacientes (2,9%) e a ausência para 165 (97,1%). Quarenta e um pacientes (32,3%) eram HIV positivos e 86 (67,7%) eram negativos. Os resultados de baciloscopia revelaram que 14 pacientes (6,5%)

tinham resultados negativos para BAAR, 56 (25,8%) apresentavam uma cruz, isto é, menos de um bacilo por campo entre os 100 campos observados, 67 (31%) apresentavam duas cruces, isto é, de um 1 a 10 bacilos por campo entre 50 campos observados e 80 (37%) apresentavam três cruces indicando que havia mais de 10 bacilos por campo entre os 20 campos observados. As profissões mais freqüentes foram: do lar (34 - 13%), empregado doméstico (24 - 9,2%), pedreiro (20 - 7,6%), autônomo (19 - 7,3%), aposentado (12 - 4,6%), estudante (11 - 4,2%), e vendedor (7 - 2,7%).

4.7.2 Classificação dos Pacientes Incluídos no Estudo

Os pacientes foram classificados de acordo com o resultado de genotipagem (*IS6110* - RFLP e *Spoligotyping*) para verificar a existência de associação das variáveis com transmissão recente *versus* reativação e, considerando-os como casos ou controles. Conforme já descrito anteriormente, os pacientes cujos isolados de *M. tuberculosis* foram resistentes à pelo menos rifampicina e isoniazida foram considerados casos. Os pacientes suscetíveis a todos os fármacos testados foram considerados controles. Para fins de análise pacientes foram classificados em 4 grupos descritos na Tabela 14 e as diferentes variáveis do estudo foram comparadas entre os grupos.

Tabela 14. Classificação dos pacientes de acordo com o resultado de genotipagem e como casos ou controles

Nome do Grupo	Característica do grupo	Nº de pacientes	Porcentagem (n = 262)
Grupo 1 Caso <i>Cluster</i>	Pacientes portadores de linhagens MDR que estavam em <i>cluster</i>	23	9%
Grupo 2 Controle <i>Cluster</i>	Pacientes portadores de linhagens suscetíveis que estavam em <i>cluster</i>	66	25%
Grupo 3 Caso não- <i>cluster</i>	Pacientes portadores de linhagens MDR que não estavam em <i>cluster</i>	37	14%
Grupo 4 Controle não <i>cluster</i>	Pacientes portadores de linhagens suscetíveis que não estavam em <i>cluster</i>	136	52%

4.7.3 Descrição das Variáveis Analisadas entre os Grupos

4.7.3.1 Gênero dos Pacientes

A abrangência desta variável foi de 100%, isto é, foram analisados os dados de 262 pacientes. Cento e oitanta e seis pacientes (71%) eram do gênero masculino. As pacientes do gênero feminino apresentaram uma tendência de estarem mais envolvidas com reativação da doença ($p = 0,138$). A Figura 13 apresenta a distribuição dos pacientes nos grupos classificados de acordo com o gênero.

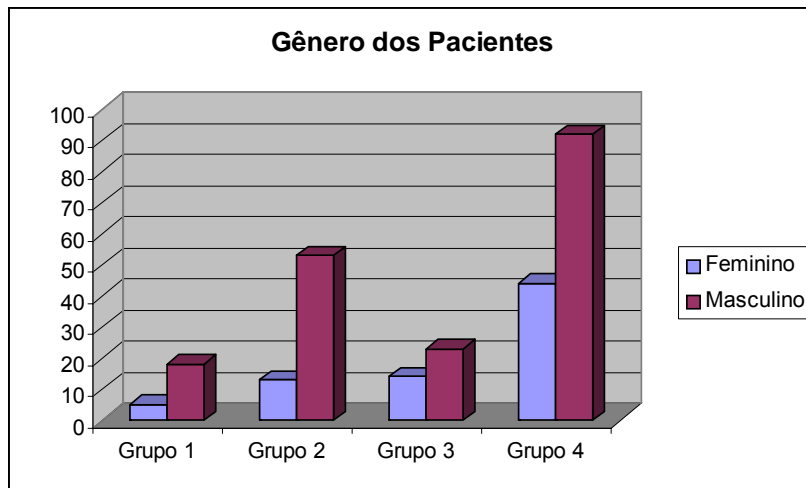


Figura 13. Distribuição dos pacientes por grupo segundo gênero. Grupo 1: Casos em *cluster*, Grupo 2: Controles em *cluster*, Grupo 3: Casos não *cluster*, Grupo 4: Controles não *cluster*.

4.7.3.2 Idade dos Pacientes

Não houve diferença entre *cluster* e não *cluster* com relação à idade quando foram comparadas as médias ($x \pm DP$: *cluster* = $32,3 \pm 11,6$; não *cluster* = $34,5 \pm 10,4$; $p = 0,374$) e a distribuição por faixa etária (10 e 20 anos). A média de idade dos pacientes foi de 39,2 anos. Quase metade da amostra (casos e controles) apresentou entre 20 e 39 anos. Conforme demonstra a Tabela 15 os grupos divergentes foram: (i) o grupo 3, composto por pacientes casos não *cluster*, apresentou bem menos pacientes com até vinte anos (12 pontos percentuais abaixo do observado nos outros grupos); (ii) o grupo 2, composto por pacientes controles em *cluster*, apresentou menor proporção de pacientes com idade entre 20 a 39 anos (18 pontos percentuais abaixo do observado nos outros grupos); (iii) o grupo 1, composto por pacientes casos em *cluster*, apresentou poucos pacientes entre 40 a 59 anos (13%, sendo que o esperado era 26%). Apesar destas observações, não houve uma diferença significativa entre os grupos.

Tabela 15. Distribuição dos grupos por faixa etária de 20 anos.

Idade	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total
0 a 19	06 (26%)	20 (30%)	07 (19%)	40 (30%)	73 (28%)
20 a 39	14 (61%)	26 (40%)	19 (51%)	67 (50%)	126 (48%)
40 a 59	03 (13%)	20 (30%)	11 (30%)	25 (19%)	59 (23%)
> 60				02 (1%)	02 (1%)
Total	23 (100%)	66 (100%)	37 (100%)	134 (100%)	260 (100%)

4.7.3.3 Etnia

Não foi observada nenhuma correlação relevante entre os grupos ($p = 0,835$), sendo que 75% dos pacientes eram brancos e os 25% restantes dividiram-se entre negros e mulatos. A Figura 14 apresenta a distribuição dos pacientes nos grupos classificados de acordo com a etnia.

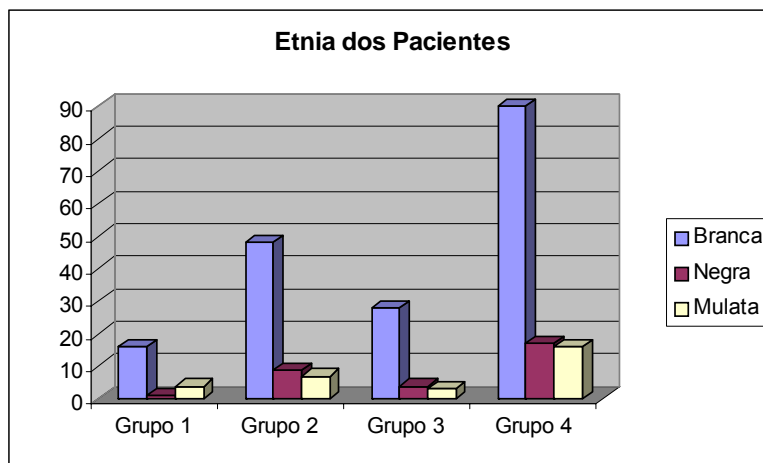


Figura 14. Distribuição dos pacientes nos grupos de acordo com a etnia (n=243).

4.7.3.4 Estado Civil

Observou-se que os grupos em *cluster* (1 e 2, respectivamente, caso e controle) apresentaram predominância de pacientes não casados (75% não casados versus 22% casados), indicando que este grupo pode estar mais envolvido com transmissão recente da tuberculose (Figura 15). Os grupos considerados não *cluster*

(3 e 4) foram igualmente divididos entre não casados e casados. Esta diferença foi significativa pelo teste exato de Fisher, cujo valor de p foi igual a 0,002 (0,001-0,004).

A idade média dos pacientes não casados em *cluster* foi 32,3 anos e entre os pacientes que não estão em *cluster* a média foi de 34,5. Entre os pacientes casados não houve diferença na idade média entre os que estão em *cluster* e os que não estão em *cluster*.

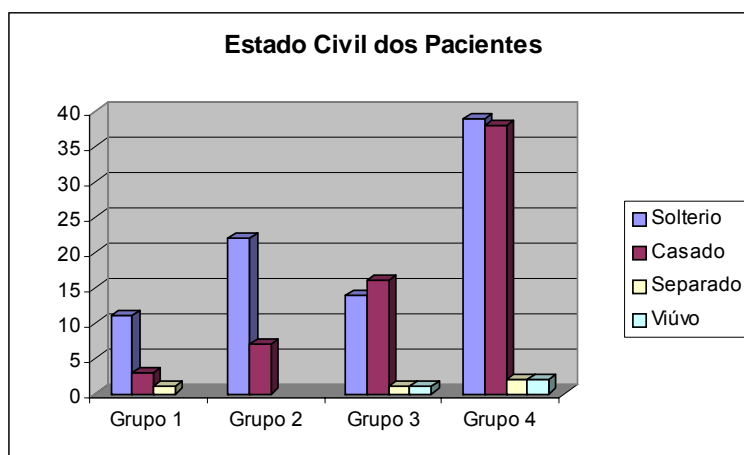


Figura 15. Distribuição segundo estado civil entre os grupos (n=157).

4.7.3.5 Região de Origem

Os pacientes classificados como caso (grupos 1 e 3) foram provenientes principalmente da região metropolitana de Porto Alegre, conforme mostra a Tabela 16. Enquanto os pacientes controles (grupos 2 e 4) foram provenientes, em sua maioria, das Coordenadorias Regionais de Saúde localizadas no interior do RS ($p < 0,01$). Apesar de significativo, este dado deve ser analisado com cautela, uma vez que a cultura e o teste de suscetibilidade dos microrganismos frente aos fármacos foram realizados com maior frequência nos isolados de *M. tuberculosis* provindos da região metropolitana, pela facilidade de acesso para a realização do exame.

Também foi observada uma tendência de maior número de pacientes em *cluster*, principalmente do grupo 2, serem provindos do interior do Estado (38%)

quando comparados com a região metropolitana (28%). Este dado pode estar indicando a ocorrência de uma transmissão recente um pouco superior no interior.

Tabela 16. Classificação dos pacientes nos grupos quanto a origem.

Região de Origem	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total
Metropolitana	16 (70%)	14 (21%)	29 (78%)	49 (36%)	108 (41%)
Interior	7 (30%)	52 (79%)	8 (22%)	87 (64%)	154 (59%)
Total	23 (100%)	66 (100%)	37 (100%)	136 (100%)	262 (100%)

4.7.3.6 Tratamento Prévio

Foi observado que entre 255 pacientes do estudo 122 deles (48%) já haviam realizado tratamento anterior para a TB, sendo que percentagens superiores a 89% foram observadas entre os isolados MDR (grupos 1 e 3). Conforme apresentado na Figura 16, os pacientes que não realizaram tratamento prévio são, na sua maioria, controles ($p < 0,001$). Não houve relação significativa entre *cluster* e tratamento anterior. Este dado confirma que o desenvolvimento de linhagens MDR é decorrente das múltiplas exposições aos antibióticos (resistência adquirida), sendo que tratamentos anteriores predispõem ao desenvolvimento de resistência.

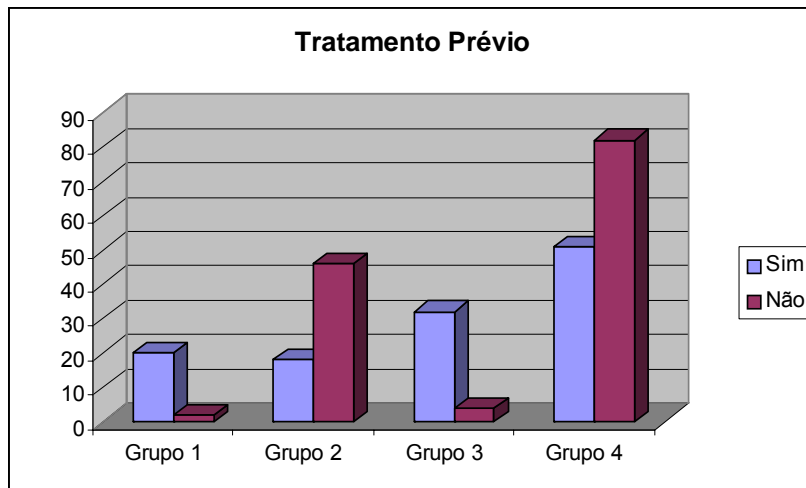


Figura 16. Distribuição dos pacientes nos grupos de acordo com a existência de tratamento prévio (n=255).

Foi realizada uma análise das características clínicas e demográficas dos pacientes, estratificada por presença ou ausência de tratamento prévio, independentemente dos grupos. Foi possível observar que os pacientes com tratamento prévio eram mais frequentemente provenientes da região Metropolitana ($p < 0,001$), apresentaram elevadas proporções de falência no tratamento ($p < 0,001$) e recidiva ($p < 0,001$). Estes pacientes também apresentaram diferença significativa na ocorrência de abandono de tratamento ($p < 0,001$), baixíssima proporção de cura da TB ($p < 0,001$), uma proporção maior era alcoolista ($p < 0,001$) e pertenciam mais aos casos ($p < 0,001$). Os pacientes com tratamento prévio apresentavam menos frequentemente cicatriz vacinal ($p = 0,019$) que os pacientes sem tratamento anterior e os pacientes HIV positivos apresentaram taxas de tratamento prévio inferiores quando comparados com os HIV negativos ($p = 0,008$).

4.7.3.7 Falência

Foi observada uma percentagem de falência de tratamento para TB superior a 20%, sendo que a maior taxa de falência ocorreu entre os pacientes pertencentes aos grupos 1 e 3, isto é, os pacientes classificados como casos ($p < 0,01$), conforme

apresenta a Figura 17. Ainda foi possível observar que o grupo 3, composto por pacientes casos não *cluster*, apresentou maior falência do que os outros grupos.

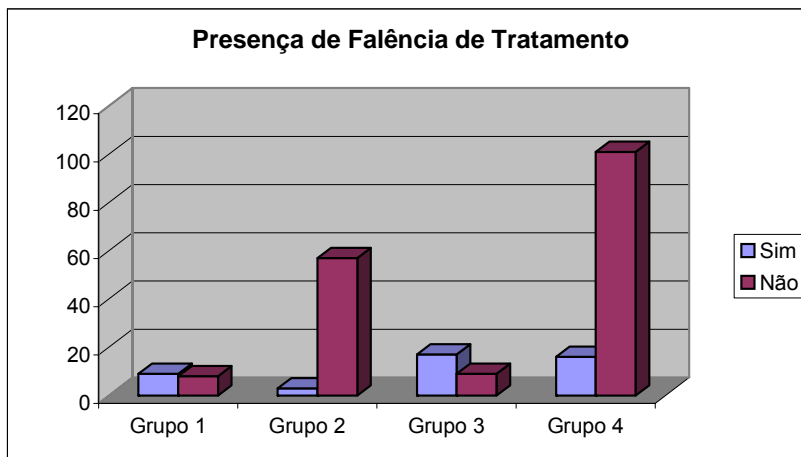


Figura 17. Classificação dos pacientes nos grupos de acordo com a presença de falência para o tratamento de TB (n=220).

4.7.3.8 Recidiva

No presente estudo observou-se que entre 220 pacientes estudados 19 (9%) voltaram a desenvolver TB após tratamento anterior com alta por cura. A recidiva ocorreu 2 vezes mais nos pacientes do grupo 1, que são os pacientes casos em *cluster* (18%) do que nos pacientes dos demais grupos, conforme mostra a Tabela 17.

Tabela 17. Distribuição dos pacientes que apresentaram recidiva entre os grupos.

Recidiva	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total
Sim	3 (18%)	4 (7%)	1 (4%)	11 (9%)	19 (9%)
Não	14 (82%)	56 (93%)	24 (96%)	107 (91%)	201 (91%)
Total	17 (100%)	60 (100%)	25 (100%)	118 (100%)	220 (100%)

4.7.3.9 Abandono

Dos 221 pacientes avaliados no estudo quanto a variável abandono de tratamento, observou-se que 35 deles (16%) abandonaram o tratamento. Conforme mostra a Tabela 18, o número de pacientes que abandonou o tratamento nos grupos 1 e 3 (pacientes casos) foi 2 ou 3 vezes superior ao dos grupos 2 e 4 (pacientes controles) ($p = 0,053$).

Tabela 18. Classificação dos grupos quanto ao abandono de tratamento.

Abandono	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total
Sim	5 (29%)	5 (8%)	7 (28%)	18 (15%)	35 (16%)
Não	12 (71%)	55 (92%)	18 (72%)	101 (85%)	186 (84%)
Total	17 (100%)	60 (100%)	25 (100%)	119 (100%)	221 (100%)

4.7.3.10 Vacinação com BCG

Dos 190 pacientes analisados, a vacinação com BCG foi descrita nos prontuários de 81 deles (43%). Entre os grupos houve baixíssima peculiaridade ($p = 0,893$), sendo a percentagem média entre os vacinados muito semelhante nos 4 grupos e, conseqüentemente, semelhante nos não vacinados (Tabela 19).

Tabela 19. Distribuição dos pacientes nos grupos segundo a presença de descrição no prontuário de vacina com BCG.

BCG	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total
Sim	4 (36%)	22 (40%)	6 (40%)	49 (45%)	81 (43%)
Não	7 (64%)	33 (60%)	9 (60%)	60 (55%)	109 (57%)
Total	11 (100%)	55 (100%)	15 (100%)	109 (100%)	190 (100%)

4.7.3.11 Alcoolismo

Entre os prontuários dos 129 pacientes com respostas válidas, em 58 deles (45%) havia histórico de alcoolismo. Também foi observado que os pacientes casos (grupos 1 e 3) tendem a serem mais alcoolistas (50%) que os pacientes controles

(grupos 2 e 4) (39,5%), conforme apresenta Figura 18. Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,860$).

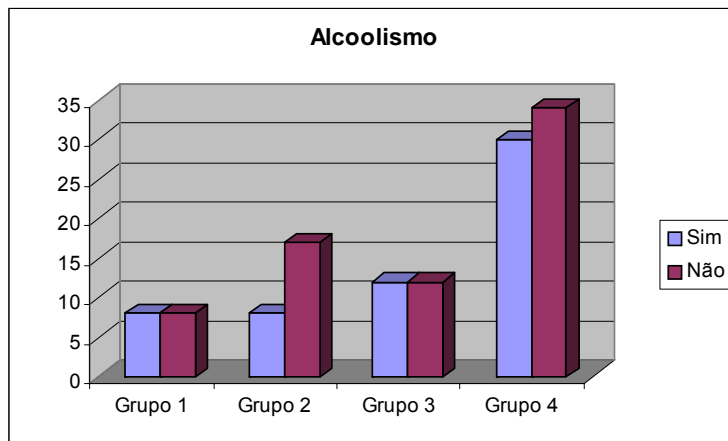


Figura 18. Distribuição dos pacientes nos grupos de acordo com a presença de alcoolismo (n=129).

4.7.3.12 Diabetes

Esta variável foi analisada em 140 pacientes e observou-se que 11,3% dos pacientes com TB são também portadores de diabetes. Conforme apresenta a Tabela 20, no grupo 1 (casos em *cluster*) houve uma maior percentagem (20%) de pacientes com diabetes que a média (11%), porém sem uma diferença significativa.

Tabela 20. Distribuição dos pacientes nos grupos de acordo com a presença ou ausência de diabetes.

Diabetes	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total
Sim	3 (20%)	4 (11%)	2 (8%)	7 (11%)	16 (13%)
Não	12 (80%)	34 (89%)	22 (92%)	56 (89%)	124 (89%)
Total	15 (100%)	38 (100%)	24 (100%)	63 (100%)	140 (100%)

4.7.3.13 Encarceramento

Foram obtidas 170 respostas válidas para esta variável, sendo que em 3% dos pacientes havia histórico de encarceramento. Os pacientes dos grupos 1 e 4 apresentam percentagens superiores de prisão (5,6 e 3,5%), porém a análise ficou prejudicada pelo baixo número de pacientes analisados (Figura 19).

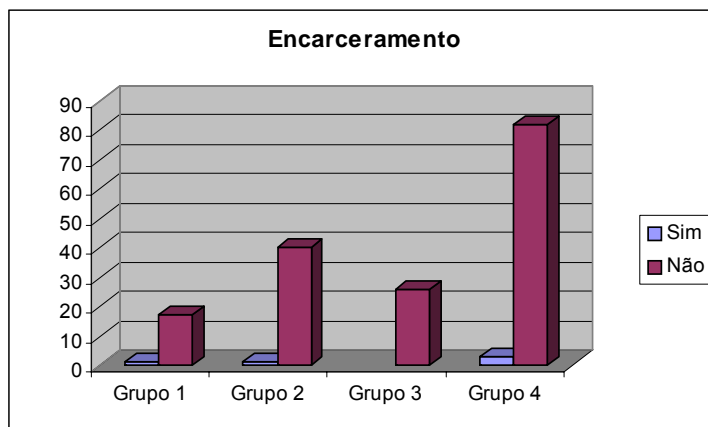


Figura 19. Histórico de encarceramento entre os grupos (n=170).

4.7.3.14 HIV

O resultado do teste de HIV estava disponível nos prontuários de 127 pacientes, dos quais 32% foram positivos. Os pacientes casos (grupos 1 e 3) apresentaram menores taxas de positividade (26,7 e 8,3%), sendo que o grupo 3

apresentou significativamente menos pacientes HIV positivos que os demais grupos ($p = 0,024$), conforme demonstra a Tabela 21.

Tabela 21. Distribuição dos pacientes entre os grupos segundo resultado do teste para o HIV.

HIV	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total
Positivo	4 (28%)	9 (41%)	2 (8%)	26 (39%)	41 (32%)
Negativo	11 (73%)	13 (59%)	22 (92%)	40 (61%)	86 (68%)
Total	15 (100%)	22 (100%)	24 (100%)	66 (100%)	127 (100%)

4.7.3.15 Baciloscopia

O resultado da baciloscopia realizada nas amostras clínicas estava disponível para 217 pacientes, sendo que em 80 deles (37%) foram observados mais de 10 bacilos por campo nos 20 campos analisados. Em todos os grupos analisados houve um número maior de pacientes com mais de 10 bacilos por campo, conforme demonstra a Figura 20. Também foi possível observar que os pacientes que apresentaram mais de 10 bacilos apresentaram maior proporção em *cluster* (grupos: 1=40% e 2=43%) quando comparados com os pacientes que não estavam em *cluster* (grupos: 3=33% e 4=35%). Porém, esta diferença não foi significativa ($p = 0,940$).

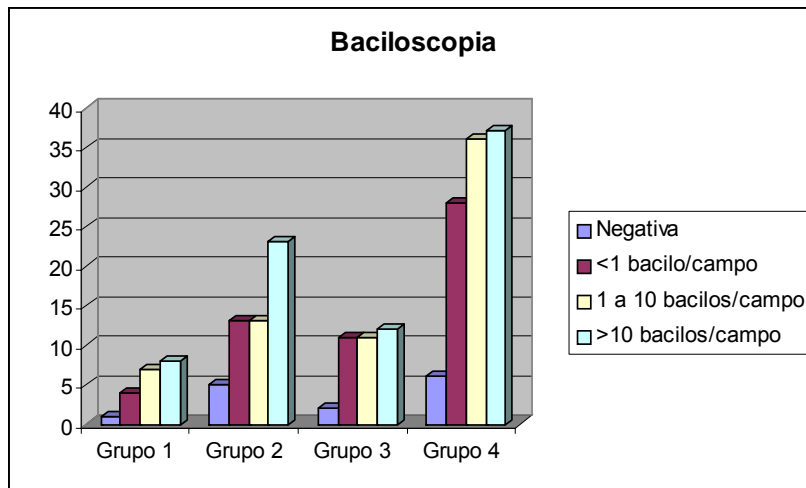


Figura 20. Resultado da baciloscopia distribuídos entre os grupos (n=217).

A Tabela 22 sumariza os dados descritos acima de acordo com os grupos e apresenta os valores de p . Entre as variáveis significativas podem ser citadas: o abandono de tratamento ($p = 0,053$), cura da TB ($p = 0,008$), estado civil ($p = 0,038$), falência para o tratamento de TB ($p < 0,001$), resultado do teste de HIV ($p = 0,032$), origem dos pacientes quanto a região ($p < 0,001$) e tratamento prévio ($p < 0,001$).

Resultados

Tabela 22. Características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos pacientes com tuberculose analisados no estudo.

Característica	Cluster		Não Cluster		Total** N = 262 (%)	Valor de P
	Caso (Grupo 1) n = 23 (%)	Controle (Grupo 2) n = 66 (%)	Caso (Grupo 3) n = 37 (%)	Controle (Grupo 4) N = 136 (%)		
Abandono						
Sim	05 (14,3)	05 (14,3)	07 (20)	18 (51,4)	35 (13)	0,053*
Não	12 (6,45)	55 (29,6)	18 (9,7)	101 (54,3)	186 (71)	
Alcoolismo						
Sim	08 (13,8)	08 (13,8)	12 (20,7)	30 (51,7)	58 (22)	0,531
Não	08 (11,3)	17 (23,9)	12 (16,9)	34 (47,9)	71 (27)	
Baciloscopia						
<1 bacilo/campo	04 (7,1)	13 (23,2)	11 (19,6)	28 (50)	56 (21)	0,940
1 a 10 bacilos/campo	07 (10,5)	13 (19,4)	11 (16,4)	36 (53,7)	67 (26)	
>10 bacilos/campo	08 (10)	23 (29,8)	12 (15)	37 (46,3)	80 (31)	
Negativo	01 (7,1)	05 (35,7)	02 (14,3)	06 (42,9)	14 (5)	
BCG						
Sim	04 (4,9)	22 (27,2)	06 (7,4)	49 (60,6)	81 (31)	0,893
Não	07 (6,4)	33 (30,3)	09 (8,3)	60 (55)	109 (42)	
Cura						
Sim	09 (5)	49 (28,3)	15 (8,7)	100 (57,7)	173 (66)	0,008*
Não	07 (16,7)	11 (26,3)	08 (19)	16 (38)	42 (16)	
Diabetes						
Sim	03 (18,8)	04 (25)	02 (12,5)	07 (43,7)	16 (6)	0,860
Não	12 (9,7)	34 (27,4)	22 (17,8)	56 (45,1)	124 (47)	
Estado Civil						
Não casado	12 (12,9)	22 (23,7)	16 (17,2)	43 (46,2)	93 (36)	0,038*
Casado	03 (4,7)	07 (11)	16 (25)	38 (59,3)	64 (24)	
Etnia						
Branca	16 (8,7)	48 (26,4)	28 (15,4)	90 (49,5)	182 (70)	0,504
Não Branca	05 (8,2)	16 (26,3)	07 (11,5)	33 (54)	61 (23)	
Falência						
Sim	09 (20)	03 (6,6)	17 (37,8)	16 (35,6)	45 (17)	<0,001*
Não	08 (4,6)	57 (32,6)	09 (5,1)	101 (57,7)	175 (67)	
Gênero						
Masculino	18 (9,7)	53 (28)	23 (12,4)	92 (49,4)	186 (71)	0,138
Feminino	05 (6,6)	13 (17,1)	14 (18,4)	44 (57,9)	76 (29)	
HIV						
Positivo	04 (9,7)	09 (22)	02 (4,9)	26 (63,4)	41 (16)	0,032*
Negativo	11 (12,8)	13 (15,1)	22 (25,6)	40 (46,5)	86 (33)	
Idade em anos						
< 19	06 (8,2)	20 (27,4)	07 (9,6)	40 (54,8)	73 (28)	0,202
20-30	14 (11)	26 (20,6)	19 (15)	67 (53,2)	126 (48)	
40-59	03 (5,1)	20 (33,9)	11 (18,6)	25 (42,4)	59 (23)	
>60	-	-	-	02 (100)	02 (0,8)	
Encarceramento						
Sim	01 (20)	01 (20)	00 (0)	03 (60)	05 (2)	0,921
Não	17 (10,3)	40 (24,2)	26 (15,8)	82 (49,7)	165 (63)	
Região						
Metropolitana	16 (14,8)	14 (13)	29 (26,8)	49 (45,4)	108 (41,2)	<0,001*
Interior	07 (4,5)	52 (34)	08 (5)	87 (56,5)	154 (58,8)	
Tratamento Prévio						
Sim	20 (16,5)	18 (14,9)	32 (26,5)	51 (42,1)	121 (46,2)	<0,001*
Não	02 (1,5)	46 (34,3)	04 (3)	82 (61,2)	134 (51,1)	

* Valores Considerados Significativos

** Percentual calculado considerando 262 pacientes.

4.8 Análise dos Pacientes Pertencentes aos *Clusters* mais Freqüentes

Os *clusters* mais freqüentes foram A (10 isolados), B (10 isolados), C (13 isolados) e Z (9 isolados), conforme pode ser observado na Tabela 23. A análise a seguir refere-se às características dos pacientes que compuseram estes *clusters* mais representativos da amostra estudada. Nos *clusters* A e B foi observado que 90% dos pacientes eram do gênero masculino, enquanto nos *clusters* C e Z houve um predomínio de pacientes do gênero feminino. O *cluster* D apresentou a menor média de idade (25 anos) quando comparado com os *clusters* A, B, C e Z. Entre estes *clusters* a etnia branca predominou, porém o *cluster* B apresentou 40% dos pacientes de etnia negra. A análise relacionada ao estado civil ficou dificultada pelo número elevado de pacientes em *cluster* em que se desconhecia a resposta, porém ainda assim foi possível observar que o *cluster* D foi composto basicamente por pacientes solteiros. O predomínio de pacientes solteiros também foi observado nos *clusters* Z e B.

Os *clusters* C e Z foram compostos principalmente por pacientes do interior do Estado, sendo que a maioria dos pacientes pertencente ao *cluster* Z (67%) foi proveniente da 3ª CRS, localizada na região sul do Estado. Apenas o *cluster* D foi composto principalmente por pacientes da região metropolitana de Porto Alegre (86%).

Todos os *clusters* mais representativos na amostra estudada (A, B, C, D e Z) foram compostos por pacientes que já haviam sido tratados anteriormente para TB, sendo que no *cluster* D foi possível observar que 86% dos pacientes já haviam recebido tratamento prévio. Também foi observado que os *clusters*, na sua maioria, exceto o *cluster* B, foram compostos por pacientes que já haviam apresentado falência no tratamento da TB. Situação semelhante ocorre quando se observa história prévia de abandono do tratamento, porém neste caso no *cluster* A não há informação afirmativa sobre abandono.

A presença ou ausência de vacinação com BCG não foi característica de nenhum dos *clusters*. O alcoolismo foi uma variável presente na maioria dos *clusters*,

mas sempre em menor proporção. A presença de pacientes com diabetes foi observada nos *clusters* B, D e Z. Alguns pacientes (pertencentes aos *clusters* A e D) apresentaram história de encarceramento, e quase todos os *clusters* foram compostos por pacientes portadores de HIV (exceto *cluster* Z). O resultado de baciloscopia revela que a maioria dos pacientes pertencentes aos *clusters* apresenta alta carga de bacilos na amostra clínica analisada. Não foi possível observar uma profissão predominante entre os pacientes pertencentes aos diferentes *clusters*.

Tabela 23. Características dos pacientes pertencentes aos principais *clusters* observados no estudo.

Variável <i>Cluster</i> (n = 49)	A (n = 10)	B (n = 10)	C (n = 13)	D (n = 7)	Z (n = 9)
Composição do <i>Cluster</i>	2 B, 1 C, 4 MET, 1P, 1 RG, 1 SC	2 A, 1 C, 1 HSP, 3 MET, 1 SA, 2 SM	2 B, 1 C, 1 CA, 1 E, 4 MET, 2 P, 1 RG, 1 SM	4 HSP, 2 MET, 1 SM	4 P, 1 C, 3 RG, 1 HSP
Gênero	9 H/1 M	9 H/1 M	3 H/10 M	3 H/4 M	3 H/6M
Idade Média (variação)	35 anos (23 a 60)	43 anos (25 a 64)	40 anos (22 a 55)	25 anos (19 a 28)	39 anos (24 a 61)
Etnia	8 bran/2 desc	6 ,b/4 n	9 b/1 n/2 m/1desc	4 b/3m	7 b /1 n /1 m
Estado Civil	2 sol/2 cas/6 desc	3 sol/2 cas/5 desc	1 sol/2cas/8 desc	6 sol/1 desc	4 sol/1 sep/4 desc
Região	5 rm/5 int	4 met/6 int	4 met/9 int	6 met/1 int	1 met/8 int
Tratamento Prévio	5 não/4 sim/1 des	5 não/5 sim	7 não/6 sim	1 não/6 sim	7 não/2 sim
Falência	5 não/2 sim/3 des	9 não/1 desc	8 não/3 sim/2 desc	4 não/3 sim	7 não/2 sim
Abandono	7 não/3 des	6 não/3 sim/1 desc	9 não/2 sim/2 desc	6 não/1 sim	6 não/1 sim/2 desc
Cura	7 sim/3 des	7 sim/1 não/2 desc	8 sim/2 não/3 desc	4 sim/3 não	7 sim/1 não/1 desc
BCG	2 não/2 sim/6 desc	5 não/3 sim/2 desc	4 não/5 sim/4 desc	3 não/3 sim/1 desc	4 não/2 sim/3 desc
Alcoolismo	1 não/2 sim/7 desc	4 não/1 sim/5 desc	2 não/3 sim/8 desc	4 não/1 sim/2 desc	5 não/4 desc
Diabetes	3 não/7 desc	6 não/2 sim/2 desc	6 não/7 desc	5 não/1 sim/1 desc	4 não/1 sim/3 desc
Prisão	2 não/1 sim/7 desc	8 não/2 desc	8 não/5 desc	6 não/1 sim	6 não/3 desc
HIV	1 não/2 sim/7 desc	4 não/2 sim/4 desc	2 não/2 sim/9 desc	5 não/2 sim	9 desc
Baciloscopia	4+/2++/2+++/2 desc	1 +/2++/6+++/ 1 desc	2neg/3 +/1++/5+++/2 desc	2+/2++/2+++/1 desc	2+/1++/3+++/3 desc
Profissão	1 desempregado 1 do lar 1 pastor evangélico 1 presidiário 6 desc	1 aposentado 2 biscateiro 2 do lar 1 marceneiro 2 pedreiro 1 serralheiro 1 serviço geral	1 aposentado 1 artesão 1 chapeador 1 cobrador 1 comerciante 1 doméstica 1 serviços gerais 1 pedreiro 1 servente 4 desconhecido	1 biscateiro 1 do lar 1 doméstica 2 estudantes 1 segurança 1 servente	1 aposentado 1 comerciante 1 estivador 1 estudante 1 fiscal de cooperativa 1 vendedora 3 desconhecidos

6. Discussão

Conhecer os indicadores epidemiológicos de resistência aos fármacos utilizados no tratamento da TB é tarefa fundamental para os Programas de Controle da Tuberculose, pois fornece dados para avaliar as estratégias empregadas no controle dessa doença que apresenta um forte impacto social. O presente estudo apresenta uma visão geral das linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplos fármacos circulantes no Estado do Rio Grande do Sul e compara as suas características com linhagens de *M. tuberculosis* suscetíveis.

No ano de 1999 foram notificados 4.816 casos novos de TB no Estado do Rio Grande do Sul, enquanto no ano de 2000 foram notificados 5.610 casos novos. O número de casos novos notificados no Estado nos anos que sucederam o estudo, por exemplo, em 2001 foram notificados 5.034 casos novos e em 2003 foram 4.754 casos novos de TB, não diferiu muito do período estudado (www.saude.rs.gov.br/das/pneumologia_sanitaria). Dados do ano de 1999 apontam o RS como o 5º Estado com maior notificação de casos novos de TB no país, considerando todas as formas da doença (Ruffino-Netto, 2002).

Assim como nos outros Estados Brasileiros, no RS o diagnóstico da TB é baseado na história clínica, nos resultados de microscopia e exames radiográficos, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2002). A cultura e o teste de suscetibilidade são realizados em situações específicas, que inclui suspeita de resistência aos fármacos (Brasil, 2004). Neste estudo foram analisados, através de métodos de genotipagem, 262 isolados, incluindo 60 MDR e 202 suscetíveis a todos os fármacos testados. Assumiu-se que todos os isolados que apresentaram o mesmo perfil de *fingerprint* representaram transmissão recente e os padrões únicos representaram reativação da doença.

O teste de susceptibilidade dos isolados analisados no presente estudo revelou que 210 (53,4%) foram sensíveis a todos os fármacos testados e, portanto que 183 (46,6%) isolados apresentaram algum tipo de resistência. Este resultado difere do observado por Telles e colaboradores (2005), cuja percentagem observada

de isolados suscetíveis aos fármacos foi 84,5% entre os 420 isolados analisados. A maior proporção de isolados resistentes observados no presente estudo pode ser justificada pela forma de obtenção dos isolados. A amostra foi obtida no LACEN/RS, que, por ser um laboratório de referência, recebe isolados de pacientes com suspeita de resistência. Diferente do estudo de Telles e colaboradores (2005) que obtiveram uma amostra seqüencial, independentemente da suspeita de resistência. Brito e colaboradores (2004) observaram em um hospital geral que 20% dos pacientes atendidos eram portadores de linhagens resistentes a pelo menos um fármaco. Barroso e colaboradores (2001), em um estudo retrospectivo realizado no LACEN do Estado do Ceará, detectaram que 27% dos isolados analisados eram resistentes a pelo menos um fármaco.

Entre os 10.426 casos notificados nos anos de 1999 e 2000, foram realizados testes de susceptibilidade em 393 isolados, dos quais foram identificados 85 como MDR (0,82%). A INH foi o fármaco cujos isolados apresentaram maior índice de resistência (20,6%) seguida pela RMP (19,3%). Observações distintas foram relatadas por Barroso e colaboradores (2001) no Ceará (INH – 5,7%; RMP - 0,9%), por Brito e colaboradores (2004) em um hospital geral no Rio de Janeiro (INH – 13,3%; RMP – 3,6%) e por Telles e colaboradores (2005) na zona norte do município de São Paulo (INH – 8,8%; RMP – 3,6%). A diferença pode ser explicada pela elevada taxa de tratamento anterior observada no presente estudo (48%) quando comparado com o descrito por Telles e colaboradores (2005) e Barroso e colaboradores (2001), que observaram 27% e com Brito e colaboradores (2004) que relataram 12,5% dos pacientes com tratamento anterior. A OMS descreveu uma taxa de resistência adquirida para o Brasil de 21%, sendo para INH 11,3%, para a RMP 6,6%, para o EMB 0,1% e SM 0,8% e para a associação INH e RMP de 5,9% (WHO, 2000).

Apesar das diferenças citadas acima, a prevalência estimada de isolados MDR nos dois anos do período do estudo (1999 – 0,89% e 2000 – 0,75%) não diferiu muito do observado por Barroso e colaboradores (2001) que foi de 0,65% e da estimada para o Brasil no primeiro inquérito mundial sobre resistência realizado pela

OMS, que foi de 0,9% (WHO, 1997). Os dados de prevalência apresentados neste estudo para a TB MDR no RS podem não representar a realidade, uma vez que foram considerados para a análise todos os resultados do teste de suscetibilidade realizados no período estudado, não apenas os isolados do ano correspondente.

A classificação dos pacientes como casos ou controles permitiu comparar as características e os fatores de risco dos pacientes para o desenvolvimento de TB MDR. Em virtude da maior densidade populacional, o maior número de notificações de TB no período do estudo foi a Região Metropolitana de Porto Alegre, responsável por 40,8% dos pacientes/isolados analisados. A Região Sul do Estado, onde estão localizadas a 3^a, 7^a e 10^a CRS, foi responsável por 32,8% dos pacientes/isolados analisados. Estas regiões apresentam maior incidência do Estado, sendo reportado no ano de 2000 para a Região Metropolitana 80/100.000 e na Região Sul a incidência média foi de $60,1 \pm 6/100.000$ (SRS/Seção de Pneumologia Sanitária, 2002). Apesar da elevada incidência nas duas regiões apenas a Região Metropolitana demonstrou uma elevada proporção de casos de TB MDR (45%) diferente da Região Sul, cujos casos representaram 8,3% do total de casos do estudo.

Cafrune e colaboradores (2006) investigaram a diferença nos padrões de transmissão de TB nas regiões Sul, Central e Norte do Estado do Rio Grande do Sul e observaram que apesar da diferença de incidência nas regiões não houve variação no grau de formação de *cluster*, nas características sócio-demográficas ou na proporção de resistência apresentada por *M. tuberculosis*.

No presente estudo as linhagens MDR estavam envolvidas em 9% dos casos de transmissão recente, caracterizado pelos 23 isolados MDR em *cluster*. A grande maioria dos isolados apresentou 6 a 16 cópias de *IS6110*, concordando com os resultados descritos em outros estudos realizados no Brasil (Ferrazoli *et al.*, 2000; Suffys *et al.*, 2000) e em outros países (Niemann *et al.*, 1997; Gledovic *et al.*, 2000; Toungousova *et al.*, 2002; Diel & Niemann, 2003; Vukovi *et al.*, 2003). Esta observação não ocorreu em alguns países da Ásia, onde Narayanan e colaboradores

(2002) observaram que 41% dos isolados analisados apresentaram apenas uma cópia de IS6110. Park e colaboradores (2000) compararam algumas regiões da Ásia e detectaram que os isolados de *M. tuberculosis* provindos de pacientes da Tailândia, Vietnã e Malásia apresentavam também um baixo número de cópias de IS6110.

A análise dos resultados da genotipagem por RFLP revelou que uma maior proporção de pacientes casos estavam em *cluster* (40%) em relação aos pacientes controles (34,7%). Telles e colaboradores (2005), utilizando a mesma metodologia de genotipagem, observaram que os isolados resistentes aos fármacos anti-TB também estavam mais em *cluster* (52,3%) que os isolados suscetíveis (49,3%), mas também sem diferença estatística significativa. A análise dos padrões de IS6110 RFLP dos casos e controles permitiu identificar que 35,9% dos isolados de *M. tuberculosis* estavam envolvidos com transmissão recente da TB. Porém, os *clusters* B e E apresentaram menos de 6 cópias de IS6110, representando 7,6% do total de isolados analisados. Borsuk e colaboradores (2005), avaliaram a transmissão da TB na região sul do RS através de genotipagem por *Spoilygotiping* e observaram que 74% dos isolados pertenciam a 66 distintos spoligotipes.

A análise dos padrões gerados pelo IS6110-RFLP entre os isolados controles revelou 3 padrões mais frequentes. Os *clusters* B, C e Z albergaram 42,8% dos isolados de *M. tuberculosis* envolvidos com transmissão recente. 66,7% dos isolados casos estavam agrupados em 4 *clusters* (A, B, D e N2). Possuelo (2004), em um estudo na Região Metropolitana de Porto Alegre, detectou que pacientes infectados com linhagens resistentes, que nunca haviam sido tratados anteriormente para TB e diabéticos apresentavam maior tendência para desenvolver TB devido a transmissão recente.

As linhagens que possuem um número pequeno de cópias de IS6110, geralmente inferior a 6, podem apresentar padrões idênticos, mesmo não sendo epidemiologicamente relacionadas (van Soolingen *et al.*, 1993, Yang *et al.*, 1996, Goulding *et al.*, 2000). Isto ocorre devido à existência de pontos preferenciais de

integração do *IS6110* no genoma de *M. tuberculosis*, sendo um destes pontos na região DR, na posição da DR 30 (Fomukong *et al.*, 1998, Fang *et al.*, 1998, Filliol *et al.*, 2000). Dessa forma, estas linhagens requerem a utilização de um outro marcador genético para a sua diferenciação (Yang *et al.*, 1996, Gillespie *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2000). Após segundo método de genotipagem nos isolados com menos de 6 cópias foi observado, no presente estudo, que entre os 94 isolados em *cluster* (35,9%) 89 deles (34%) permaneceram em *cluster*.

A percentagem de isolados em *cluster* obtido através da combinação dos resultados de RFLP e *Spoligotyping* (34%) foi similar aos descritos em outros estudos, incluindo os realizados por Suffys e colaboradores (2000) que avaliaram isolados de algumas regiões do Brasil e observaram 32% de isolados em *cluster*. Ferrazoli e colaboradores (2000) observaram na cidade de São Paulo que 33% dos isolados estavam em *cluster*. Em estudos conduzidos em outros países com alta prevalência de TB, como o Haiti, foram relatados 34% de isolados em *cluster* (Ferdinand *et al.*, 2003) ou com baixa prevalência, como nos Estados Unidos, na cidade de Nova Iorque, foram observados 37% (Frieden *et al.*, 1996a) e na França 36% dos isolados estavam em *cluster* (Gutierrez *et al.*, 1998). Estes estudos diferem dos achados de Telles e colaboradores (2005) que observaram, em um estudo prospectivo realizado na zona norte de São Paulo, 49,8% dos isolados em *cluster*.

Neste estudo foram analisados 60 isolados MDR. A combinação de duas técnicas de genotipagem revelou que entre os 60 isolados MDR, 38% deles estavam em *cluster* e, entre os 202 isolados suscetíveis aos fármacos 33% estavam em *cluster*. Estes valores indicam um nível de transmissão similar entre os isolados casos e controles. Estes achados não confirmam a menor infectividade sugerida para as linhagens MDR quando comparadas com as linhagens suscetíveis (van Soolingen *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2000).

Os dados encontrados no presente estudo diferem de outros conduzidos na Itália e nos Estados Unidos (Nova Iorque), onde a proporção de isolados MDR em *cluster* foi superior aos isolados que não eram MDR (65% e 74%, respectivamente)

(Moro *et al.*, 2002; Munsiff *et al.*, 2002). O fato pode estar relacionado com a endemicidade da TB no Rio Grande do Sul, onde o número de linhagens suscetíveis aos fármacos circulantes é bem superior.

Observou-se que 18,7% dos isolados faziam parte de 5 grandes *clusters*, mas nenhum destes *clusters* foi composto exclusivamente por linhagens MDR ou suscetíveis aos fármacos. Os maiores *clusters* foram compostos por uma mistura de linhagens MDR e suscetíveis. Telles e colaboradores (2005) também não observaram *clusters* compostos exclusivamente por linhagens resistentes em seu estudo. Os resultados da genotipagem, em ambos os estudos, indicam que os casos de TB MDR foram, na sua maioria, infectados com linhagens suscetíveis e que desenvolveram resistência aos fármacos durante o tratamento. Esta observação também é consistente com o desenvolvimento de TB MDR e a elevada presença de tratamento prévio para TB observada neste estudo.

Os pacientes casos e controles foram classificados de acordo com o resultado da genotipagem em quatro distintos grupos, que permitiu comparar as características e os fatores de risco dos pacientes para o desenvolvimento de TB MDR e para a transmissão recente. O gênero masculino foi responsável por 71% do número total de casos de TB avaliados neste estudo, e, entre os grupos o gênero feminino esteve mais representado nos casos que não pertenciam a *clusters* (grupo 3). Também foi observado que o gênero feminino está mais relacionado com a reativação da doença. No Brasil, diversos estudos têm demonstrado que a TB acomete mais pacientes do gênero masculino (Oliveira & Moreira Filho, 2000; Barroso *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005b). Nos Estados Unidos (Small *et al.*, 1994) e na França (Gutierrez *et al.*, 1998) também foram reportadas taxas superiores de TB nos pacientes do gênero masculino.

Musselimi e colaboradores (2005) observaram que a maioria dos casos de TB pulmonar ocorre nos pacientes do gênero masculino (66%), diferente da TB extrapulmonar que demonstrou estar mais freqüente nos pacientes do gênero feminino

(74%). Estas observações condizem com os achados deste estudo uma vez que o escarro predominou entre amostras clínicas analisadas (dado não apresentado).

Surucuoglu e colaboradores (2005), em um estudo na Turquia, observaram que a resistência a qualquer fármaco anti-TB ou a multirresistência apresentou taxas superiores nos pacientes do gênero masculino. Esta observação difere do detectado neste estudo, uma vez que o gênero masculino esteve em maior proporção nos 4 grupos avaliados, independentemente de serem portadores de linhagens de TB suscetíveis ou MDR.

Estudos como os realizados por Small e colaboradores (1994) e por Diaz e colaboradores (2001) descreveram que pacientes jovens estavam mais envolvidos com transmissão recente de TB. No presente estudo não foi observada uma maior proporção dos pacientes jovens envolvidos com transmissão recente. Porém, foi possível observar que 48% dos pacientes estavam na faixa etária de 20 a 39 anos, concordando com as observações descritas por Brito e colaboradores (2004).

Os pacientes de etnia branca representaram 74,9% da amostra avaliada enquanto que as etnias negra e mulata representaram 12,8% e 12,3%, respectivamente. A comparação destas taxas com os dados do IBGE, que descreve que 5,2% da população no RS é negra e 7,5% é parda (IBGE, 2000), permite observar que a TB apresenta uma distribuição distinta entre as etnias e também pode estar relacionada com as condições sócio-econômicas da população.

Borges e colaboradores (2004), em estudo realizado em uma Unidade de Saúde de Porto Alegre, observaram uma maior tendência dos pacientes de etnia negra a desenvolver TB devido a transmissão recente, diferente do observado neste estudo. Estudos realizados em duas cidades americanas, São Francisco e Nova Iorque, também relataram uma distribuição distinta dos casos de TB entre as etnias e que os negros estavam mais envolvidos com transmissão recente da doença (Small *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1995).

A proporção de pacientes portadores de linhagens MDR na região Metropolitana de Porto Alegre foi significativamente superior que no interior do RS (p

< 0,01). Conforme já discutido, a região Metropolitana apresenta historicamente a maior incidência de TB no Estado, podendo, desta forma justificar a elevada taxa de TB MDR. No entanto, deve ser considerado que os pacientes e os serviços de saúde desta região podem realizar mais o teste de suscetibilidade em virtude da proximidade geográfica do LACEN.

Outra observação importante é a maior proporção dos isolados do interior do RS envolvidos com transmissão recente. No estudo realizado por Cafrune e colaboradores (2005) nas regiões Sul, Centro e Norte do RS e no realizado por Possuelo (2004) na região Metropolitana de Porto Alegre, foi observada uma proporção semelhante de isolados em cluster (34%). Porém a análise do presente estudo, que avaliou todas as regiões do RS, revelou uma proporção diferenciada de transmissão recente entre a região Metropolitana e o interior do Estado.

O tratamento prévio para TB é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de resistência em locais com alta incidência da doença (Barroso *et al.*, 2003; Ferdinand *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2004). Skenders e colaboradores (2005) descreveram entre os pacientes com TB MDR, aproximadamente, 40% apresentavam histórico de tratamento anterior para TB e 10% dos pacientes novos não haviam sido tratados anteriormente. No presente estudo foi observado que o tratamento prévio está fortemente correlacionado com o desenvolvimento de TB MDR ($P < 0,001$).

Estudos realizados por Valim e colaboradores (2000), Silva e colaboradores (2003) e por Rodrigues e colaboradores (2005) analisaram os mecanismos de aquisição de resistência aos fármacos anti-TB, em isolados obtidos no RS e outros estados, e detectaram uma diversidade de alterações cromossômicas envolvidas com o desenvolvimento de resistência. As observações obtidas no presente estudo e as dos estudos prévios confirmam que a exposição sucessiva e ineficiente aos agentes anti-TB, representado pelo elevado número de pacientes com tratamento anterior, é o principal mecanismo para o desenvolvimento da TB MDR.

Meacci e colaboradores (2005), em um estudo de longo prazo com pacientes que não aderiam a farmacoterapia, observaram que os genes relacionados com a resistência aos fármacos apresentavam discretas subpopulações que acumulavam mutações envolvidas com a resistência a RMP, INH e SM. Estas observações indicam que durante a infecção crônica várias subpopulações podem coexistir no mesmo paciente com distintos perfis de suscetibilidade.

Mukherjee e colaboradores (2004) observaram que a proporção de pacientes com TB MDR que haviam sido tratados previamente variou de 32 a 100%, em diferentes locais. Este fato indica que, provavelmente, as linhagens de *M. tuberculosis* MDR devem ser selecionadas em pacientes que realizam vários tratamentos e aparentemente sem sucesso (Weis *et al.*, 1994), confirmando que a maioria dos casos de TB MDR é devida à resistência adquirida. Os pacientes provindos da região Metropolitana apresentaram diferença significativa quanto a presença de tratamento prévio quando comparados com o interior do RS ($p < 0,001$). Outras variáveis significativamente presentes nos pacientes com tratamento prévio foram falência do tratamento, recidiva, abandono do tratamento, presença de vacinação com BCG, alcoolismo e HIV. Kritski e colaboradores (2005a) alertam que em função do potencial risco aumentado de resistência ao tratamento entre os pacientes HIV positivos com TB é imprescindível a realização do teste de suscetibilidade frente aos fármacos anti-TB e que esta indicação se reveste maior importância ainda nos pacientes com história de TB no passado.

Também foi observado neste estudo que história de falência terapêutica foi significativamente superior em pacientes portadores de linhagens MDR ($p < 0,001$), concordando com a hipótese de ter ocorrido resistência adquirida. Entretanto, em locais com baixa incidência de TB, isto pode não ser verdade, por exemplo, na cidade de Nova Iorque foi reportado que 90% dos pacientes com TB MDR não haviam sido tratados previamente para a doença (Munsiff *et al.*, 2002), demonstrando que neste local houve a transmissão de TB MDR, caracterizando a resistência primária.

O abandono do tratamento entre os pacientes portadores de linhagens MDR neste estudo foi superior quando comparado com os pacientes portadores de linhagens suscetíveis aos fármacos anti-TB ($p = 0,053$). No estudo realizado por Oliveira e Moreira-Filho (2000), em Campinas, foi observado que o índice de abandono esteve presente em 63% dos pacientes com retratamentos e 28,4% nos pacientes que apresentaram recidivas.

Em virtude do caráter retrospectivo do presente estudo, não foram avaliadas as razões envolvidadas com a presença de tratamento anterior, abandono ou falência no tratamento. Porém, é descrito que os efeitos adversos dos medicamentos exercem papel fundamental na adesão ao tratamento, associados com a falta de informações que os pacientes têm sobre a doença, duração do tratamento, suporte financeiro para ir as consultas e realizar uma alimentação adequada (Gonçalves *et al.*, 1999).

O alcoolismo crônico, em razão de estar associado à queda da imunidade, desnutrição, fragilidade social, exposição a situações de risco, entre outros, é considerado importante fator de risco para o desenvolvimento da TB, fato demonstrado quando percebe-se maior incidência e tratamentos prolongados entre estes pacientes (Brasil, 2002). Foi observado que entre os pacientes avaliados para esta variável 45% deles eram alcoolistas, confirmando a observação acima. Além do mais, o abandono do tratamento e o risco de desenvolvimento de efeitos colaterais aos medicamentos anti-TB pelos alcoolistas são maiores quando comparados aos não alcoolistas (Andrade *et al.*, 2005). Isso determina algumas ações específicas no Programa de Controle da Tuberculose, como a indicação do DOTS a esses pacientes.

A diabetes é uma doença severa, considerada fator de risco para o desenvolvimento da TB, sendo a incidência e a prevalência da TB nestes pacientes duas a quatro vezes superior que na população em geral (Opsahl *et al.*, 1961, Martins & Araújo, 1993). Os motivos para maior suscetibilidade às infecções no paciente diabético são a desnutrição, a diminuição dos neutrófilos e a insuficiência

vascular (Kritski *et al.*, 2005). Foi observado que 11,3% dos pacientes eram portadores de diabetes, sendo que os pacientes portadores de TB MDR com diabetes apresentaram uma taxa duas vezes superior de envolvimento com transmissão recente da doença. Um estudo retrospectivo evidencia uma maior prevalência de TB MDR em pacientes diabéticos (Dominguez-Castellano *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado em Madagascar foi observado que 38% dos pacientes vacinados com BCG estavam envolvidos com transmissão recente, contra 37,3% dos não vacinados (Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 2001). Neste estudo foi observado que os pacientes vacinados com BCG estavam envolvidos em 38% dos casos de transmissão recente da doença, porém entre os quatro grupos não se observou diferença. Estes dados estão de acordo com os ensaios realizados sobre a eficácia desta vacina, demonstrando que a vacina BCG realmente previne o desenvolvimento das formas severas e fatais da doença em crianças, mas não tem eficácia para reduzir o número de casos de infecções pulmonares em adultos (Stylbo & Meijer, 1976), que representam a grande maioria dos pacientes incluídos neste estudo.

Em resumo, as características clínicas e demográficas como idade, gênero, raça, BCG, resultados de baciloscopia, abandono do tratamento, abuso de álcool, diabetes e história de prisão não foram associadas com transmissão recente (*cluster*) e/ou com o desenvolvimento de TB MDR. Ferdinando e colaboradores (2003), em um estudo conduzido no Haiti, também não encontraram como fator de risco para transmissão recente gênero, idade e infecção pelo HIV. Porém, a estratificação em quatro grupos levou a um baixo número amostral, além da não totalidade de respostas para algumas destas variáveis, podem ter contribuído para a não associação significativa entre as características clínicas e demográficas com a transmissão recente e a TB MDR.

A OMS estimou que no final da década de 1990 14% dos novos casos de TB seriam atribuídos a co-infecção com o HIV, aumentando até 40% em alguns países

da África (Dye *et al.*, 1999). No presente estudo foi observado que 32,3% dos pacientes com TB eram HIV positivos (41/127), uma taxa superior quando comparada com estudo realizado por Telles e colaboradores (2005) que observaram 20% de co-infecção HIV e TB. A possibilidade de este dado estar superestimado deve ser considerada, uma vez que os resultados de HIV foram obtidos para menos de 50% dos casos analisados. Porém, Aerts & Jobim (2004) em um estudo na cidade de Porto Alegre, observaram que 47% dos casos de TB notificados no ano de 2000 apresentavam co-infecção com HIV, corroborando com os achados deste estudo, uma vez que a região Metropolitana de Porto Alegre foi responsável por quase 60% dos pacientes analisados.

Diversos trabalhos relatam uma grande associação entre pacientes HIV positivos e transmissão recente da TB (Small *et al.*, 1994, Friedman *et al.*, 1995, Ferrazoli *et al.*, 2000, Bruchfeld *et al.*, 2002). No presente estudo observou-se que uma proporção um pouco superior de pacientes HIV positivos (31,7%) estavam envolvidos com transmissão recente quando comparados com os pacientes HIV negativos (27,9%), apesar da diferença não ser estatisticamente significativa. Esta pequena diferença pode ser explicada pelo fato de pacientes HIV positivos desenvolverem TB ativa em frequências superiores a dos pacientes HIV negativos, tanto devida transmissão recente quanto a reativação (Sepkowitz *et al.*, 1995).

Estudos conduzidos no Texas e na cidade de Nova Iorque revelaram que a infecção pelo HIV é preditivo para o desenvolvimento de resistência aos fármacos (Quitugua *et al.*, 2002; Munsiff *et al.*, 2002), e que a maioria dos pacientes havia sido infectada recentemente. No presente estudo observou-se o oposto, pacientes HIV positivo foram significativamente mais encontrados no grupo controle do que no grupo caso ($p < 0,05$). Há vários fatores que podem estar relacionados com esta diferença. Primeiro, a transmissão recente da doença em nossa comunidade envolve, na maioria das vezes, linhagens suscetíveis (25%) quando comparada com as linhagens MDR (9%).

Dye e colaboradores (2002) descreveram que o HIV pode estar relacionado com a TB MDR em surtos de menor proporção, como naqueles originados em hospitais, e não há evidência que a TB MDR possa estar associada com HIV na comunidade. Outro fator é a prevalência da TB, uma vez que a infecção é um evento relativamente raro fora das áreas de risco como hospitais, albergues e prisões, locais onde a TB MDR geralmente está concentrada. No Brasil, a TB não está restrita a estes locais, mas disseminada na comunidade, onde as linhagens MDR e suscetíveis coexistem.

Os pacientes não casados apresentaram maior probabilidade de desenvolver TB devido à transmissão recente quando comparados com os pacientes casados ($P < 0,005$), independente do perfil de suscetibilidade das linhagens. Mesmo quando foram comparados por faixa etária os pacientes casados e não casados, os não casados estavam quase 3 vezes mais em *cluster* ($P < 0,05$). É descrito que pacientes não casados podem estar mais expostos a uma variedade de doenças (Schoenborn, 2004), devido ao estilo de vida desregrado, que pode incluir baixa qualidade de alimentação, sono e poucos cuidados com a saúde. Este fato pode apoiar as observações encontradas no presente estudo.

A maioria das informações sobre morbidade e mortalidade é baseada em dados oficiais de qualidade variável (Kumaresan, 2002). A descrição precisa de dados epidemiológicos por tempo, local, idade, gênero entre outras informações podem ajudar a identificar grupos especiais e segmentos da população que estejam necessitando mais atenção, além de possibilitar um planejamento estratégico das medidas de controle, priorizando os grupos com maior incidência de TB impedindo assim o desenvolvimento dos casos MDR até mesmo o aumento da incidência e prevalência da doença. Durante este estudo foi possível observar que os cadastros dos sistemas oficiais de notificação da doença apresentam algumas deficiências bastante relevantes, impedindo o acompanhamento eficiente da situação da TB resistente ou não no Estado do RS.

Apesar de no presente estudo não ter sido utilizada uma amostragem seqüencial e sim uma amostragem não-randômica de conveniência, acredita-se que uma grande parte dos casos de TB MDR foram analisados no período do estudo, trazendo informações importantes que podem auxiliar na busca de estratégias que busquem minimizar o desenvolvimento de novas linhagens resistentes.

Em conclusão, apesar da elevada incidência da TB no Estado do Rio Grande do Sul, a taxa de transmissão ativa de TB MDR parece ser baixa, uma vez que a TB MDR está essencialmente relacionada com falência terapêutica. Para evitar o aumento da TB MDR são necessárias medidas que visem diagnosticar e tratar adequadamente todos os pacientes, impedindo o desenvolvimento de resistência e a transmissão na comunidade. A implantação de DOTS pode melhorar o programa de controle da TB no Rio Grande do Sul, e em muitos aspectos, diminuir a transmissão, o risco de surgimento de resistência aos fármacos, a falência do tratamento e a morte dos pacientes.

7. Conclusão

Este trabalho buscou realizar uma epidemiologia molecular descritiva dos casos de TB MDR no Estado do Rio Grande do Sul nos anos de 1999 e 2000 e identificar as linhagens MDR predominantes durante estes anos, bem como a extensão e os fatores de risco para a formação de *cluster* entre estes casos. A informação obtida para os casos MDR foi comparada com resultados de TB sensível. Considerando os objetivos propostos é possível observar que as linhagens de *M. tuberculosis* caracterizadas neste estudo apresentaram distintos padrões de RFLP, sendo identificados cinco *clusters* predominantes, que albergaram 18,7% dos isolados analisados. Porém, não houve a identificação de *clusters* compostos exclusivamente por linhagens MDR, indicando que o desenvolvimento deste tipo de TB está mais associado com exposições sucessivas aos fármacos anti-TB.

Entre dados os clínico-epidemiológicos analisados, foram identificados como fatores de risco para o desenvolvimento de TB MDR o tratamento anterior, paciente atendido na região Metropolitana de Porto Alegre e não ser casado. As demais variáveis analisadas demonstraram relações importantes, porém não significativas, para a transmissão recente e o desenvolvimento de TB MDR. Os pacientes HIV positivos estavam significativamente mais presentes entre os isolados suscetíveis aos fármacos anti-TB.

É possível observar o empenho das esferas federais, estaduais e municipais em tratar a TB, porém acredita-se que não existe ainda o esforço necessário para comprometer-se com a saúde do paciente portador de TB. A implantação do DOTS será um grande passo na busca de erradicação da doença, pois somente através desta estratégia haverá o comprometimento das equipes de saúde em acompanhar o paciente, observando suas dificuldades em entender o tratamento, as reações adversas advindas dos medicamentos, a falta de elementos nutricionais, o alcoolismo e finalmente os seus problemas sociais.

O Sistema Único de Saúde preconiza entre outros elementos a atenção integral à saúde do cidadão. A TB é um exemplo de patologia que na grande maioria dos casos tem cura e, cujos custos com tratamento é responsabilidade do poder público. Neste caso a questão que permanece é por que foi observada uma proporção tão elevada de pacientes com tratamento anterior?

Para responder esta questão é pertinente pensar em integralidade, que conforme descreve Kell (2004), procura não reduzir o paciente ao aparelho ou sistema biológico que supostamente produz o sofrimento e, portanto a queixa do paciente. A integralidade procura romper com formas cristalizadas de se entenderem e realizarem ações técnicas e que se conformam nos padrões de intervenção médica ou em saúde já tornados tradição. A integralidade busca compreender o conjunto das necessidades de ações e serviços de saúde que um paciente apresenta para além da atenção individual curativa, incorporação de ações de promoção e prevenção na atenção à saúde e articulação com ações curativas e reabilitadoras.

Portanto, acredita-se que para a TB deixar de ser um problema social importante no RS, no Brasil e no mundo são necessárias ações mais incisivas e mais comprometidas com a saúde da população. Ainda, é necessário assumir a integralidade no atendimento do paciente portador de TB, como sendo uma ação social resultante da permanente interação dos atores na relação demanda e oferta, em planos distintos de atenção à saúde (plano individual – onde se constroem a integralidade no ato da atenção individual e o plano sistêmico – onde se garante a integralidade das ações na rede de serviços), nos quais os aspectos subjetivos e objetivos sejam considerados (Pinheiro, 2001).

8. Glossário¹

Determinação da dinâmica de transmissão de uma doença em áreas geográficas diversas: estudo da introdução e transmissão de um organismo ou linhagem dentro da comunidade; identificação das razões na troca de prevalência de infecções resistentes aos fármacos ou síndromes; estudo dos fatores que contribuem com a transmissão (hospedeiro, ambiente, organismo).

Endemia: Ocorrência em uma população ou área geográfica ou instituição (hospital, por exemplo) sem aparente desvio (aumento ou diminuição) do número esperado de casos num período de tempo para aquele local.

Epidemia: ocorrência de um *cluster* de uma doença causada por um patógeno que ocorre em número que excede o esperado para aquele período e local. Uma epidemia pode ser um surto, apesar de que o surto usualmente refere a um surgimento abrupto de uma doença num curto período de tempo em uma população, área geográfica ou instituição. Uma epidemia pode durar anos e tornar-se uma pandemia caso se espalhe globalmente (exemplo cólera e AIDS).

Estratificação de dados e refinamento dos estudos epidemiológicos: identificação dos fatores de risco nos quais os métodos convencionais não podem ser utilizados; identificação de riscos quando a amostra é muito pequena para o estudo epidemiológico convencional; cálculo de fração do risco atribuído; identificação de novas opções de intervenção.

Falência no tratamento: persistência de baciloscopia positiva até o 6^a mês de tratamento ou aparecimento de bacilos no escarro por dois meses consecutivos após negatificação inicial.

Filogenia: história evolucionária das espécies

1. Definições obtidas de Riley, 2004, Kritski *et al.*, 2005, WHO, 2003b.

Identificação e quantificação de risco atribuível, risco fracionado em ocorrência esporádica das doenças infecciosas: distinção de ocorrência epidêmica e endêmica das doenças infecciosas; identificação de novos clones de agentes infecciosos; identificação de veículos específicos e fatores de risco nas infecções esporádicas.

Isolado: Uma população de células microbianas em uma cultura pura derivada de uma única colônia em placa de isolamento e identificada em nível de espécie.

Linhagem: um isolado ou grupo de isolados que exibem características fenotípicas ou genotípicas pertencentes à mesma linhagem, distintos de outros isolados da mesma espécie.

Poder discriminatório: a habilidade de um teste para gerar distintas e discretas unidades de informação de diferentes isolados, usualmente em nível de subespécie.

Recidiva: paciente com TB que fez tratamento, foi considerado curado e se torna novamente tuberculoso (com baciloscopia positiva), independente do tempo que se seguiu após o fim do tratamento anterior (um mês ou dez anos).

Resistência adquirida: paciente diagnosticado com TB que iniciou o tratamento anti-TB e adquiriu resistência a um ou mais fármacos.

Resistência primária: paciente diagnosticada com TB portadora de linhagem resistente a um ou mais fármacos anti-TB mas que nunca foi tratada anteriormente para TB.

Surto: surgimento agudo de um *cluster* de uma doença causada por um patógeno que ocorre em número que excede o esperado para aquele período e local.

Taxonomia: classificação sistemática dos organismos. Uma unidade taxômica geral definida por um grupo de características para cada membro da unidade (isto é, família, gênero, espécie, subespécies, infraespécies).

9. Referências bibliográficas

Aerts D, Jobim R. **2004**. The epidemiological profile of tuberculosis in southern Brazil in times of AIDS. *Int J Tuberc Lung Dis.* 8(6):785-91.

Alland, D., G. E. Lakkut, A. R. Moss, R. A. MacAdam, J. A. Hahn, W. Bosworth, E. Drucker, B. R. Bloom. **1994**. Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med.* 330:1710-1716.

Andrade, RLP, Villa, TCS, Pillon, S. **2005**. A Influência do Alcoolismo no Prognóstico e Tratamento da Tuberculose. *SMAD.* 1(1):1-8. Acessado em: <http://www2.eerp.usp.br/resmad/artigos.asp>

Argeton, T. B., S. E. Valway, R. J. Blinkhorn, K. L. Shilkret, R. Reves, W. W. Schuller, B. Gore, C. J. Pozsik, B. B. Plikaytis, C. Woodley, I. M. Onorato. **1999**. Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* across United States. *Clin. Infect. Dis.* 29:85-92.

ATS. **2000**. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. The official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention (CDC) and the Council of the Infectious Disease Society of America. *Am J Respir Crit Care Med,* 161:1376-1395.

Barnes PF, el-Hajj H, Preston-Martin S, Cave MD, Jones BE, Otaya M, Pogoda J, Eisenach KD. **1996**. Transmission of tuberculosis among the urban homeless. *JAMA.* 275:305-307.

Barroso, EC, Rodrigues JLN, Pinheiro, VGF, Campelo, CL. **2001**. Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. *J Penumol* 27:310-314.

Barroso, E. C., Mota, R. M. S., Santos, R. O., Sousa, A. L. O., Barroso, J. B., Rodrigues, J. L. N. **2003**. Risk Factors for Acquired Multidrug-Resistant Tuberculosis. *J. Penumol* 29:89-97.

Bauer, J., Å. B. Andersen, K. Kremer, and H. Miørner. **1999**. Usefulness of spoligo-typing to discriminate *IS6110* low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2602-2606.

Bauer, J., Y. Zhenhua, S. Poulsen, A. B. Andersen. **1998**. Results from 5 years of nationwide DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a country with a low incidence of *M. tuberculosis* infection. *JAMA.* 275:305-307.

Becerra MC, Bayona J, Freeman J, Farmer PE, Kim JY. **2000**. Redefining MDR-TB transmission 'hot spots'. *Int J Tuberc Lung Dis.* 4(5):387-94.

Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. **2002**. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417(6885):141-147.

Bifani, P.J., B. Mathema, Z. Liu, S. L. Moghazeh, B. Shopsin, B. Tempasliki, J. Driscoll, R. Frothingham, J. M. Musser, P. Alcabes, B. N. Kreiswirth. **1999**. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 282:2321-2327.

Black, J G. **2002**. Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas. 4º ed. Rio de Janeiro: *Editora Guanabara Koogan*.

Bonora, S., M. C. Gutierrez, Di Perri, G., F. Brunello, B. Allegranzi, M. Ligozzi, R. Fontana, E. Concia, and V. Vincent. **1999**. Comparative evaluation of ligation-mediated PCR and spoligotyping as screening methods for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3118-3123.

Borges, M, Cafrune, PI, Possuelo, LG, Valim, ARM, Ribeiro, MO, Rossetti, ML. **2004**. Análise molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de um centro de saúde ambulatorial em Porto Alegre, (RS). *J. Bras. Pneumol.* 30 (4):358-364.

Borsuk S, Dellagostin MM, Madeira Sde G, Lima C, Boffo M, Mattos I, Almeida da Silva PE, Dellagostin OA. **2005**. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. *Microbes Infect.* 7(13):1338-1344

Braden, C. R., G. L. Templeton, M. D. Cave, S. Valway, I. M. Onorato, K. G. Castro, D. Moers, Z. Yang, W. W. Stead, J. H. Bates. **1997**. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from a state with a large rural population. *J. Infect. Dis.* 175:1446-1457.

Braga, J.U., Barreto, A.M.W., Hijjar, M.A. **2003**. Inquérito Epidemiológico da Resistência às Drogas usadas no Tratamento da Tuberculose no Brasil 1995 - 1997, IERDTB. Parte III: principais resultados. *Bol Pneumol Sanit.* 11(1):76-81.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **1994**. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2ª ed. Rio de Janeiro.

Brasil. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. **1995**. Manual de normas para o controle da tuberculose. 4ª Edição. Brasília: *Fundação Nacional de Saúde*.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde/FUNASA. **2002**. Guia de Vigilância Epidemiológica. 1. ed. Brasília.

Brasil. Ministério da Saúde. **2004**. II Diretrizes Brasileiras para a Tuberculose. *J Bras. Pneumol.* 30:supl 1.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **2002**. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª Edição. Rio de Janeiro, FUNASA/CRPHF/SNPT.

Brito, CR, Gounder, C, Lima, DB, Siqueira, H, Cavlacanti, HR, Pereira, MM, Kritski, AL. **2004**. Resistência aos medicamentos anti-tuberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referência para tratamento de AIDS no Rio de Janeiro. *J. Bras. Pneumol.*, 30: 335-342.

Brooks, GF, Butel, JS, Morse, SA. **1999**. Jawetz, Melnick & Adelberg: microbiologia médica. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 21ª ed.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. **2002**. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (6):3684-3689.

Bruchfeld J, Aderaye G, Palme IB, Bjorvatn B, Ghebremichael S, Hoffner S, Lindquist L. **2002**. Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopian pulmonary tuberculosis patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol.* 40(5):1636-1643.

Brudney K, Dobkin J. **1991**. A tale of two cities: tuberculosis control in Nicaragua and New York City. *Semin Respir Infect.* 6(4):261-272.

Cafrune, PI, Rilew, L W, Possuelo, LG, Valim, ARM, Borges, M, Ribeiro, MO, Rossetti, ML, Zaha, A. **2006**. Recent Transmission of Tuberculosis Involving Retired Patients. *Journal of Infection*. Aceito para publicação.

Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler Ht, Meissner G, Mitchison Da, Sula L. **1963**. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity And Resistance. *Bull World Health Organ*. 29:565-578.

Canetti, G. **1965**. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *American Review of Respiratory Diseases*, 92:687-703.

Canetti, G.; Fox, W.; Khomenko, A.; Mahler, H. T.; Menon, N. K.; Mitchison, D. A.; Rist, N., Smeley, N. A. **1969**. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. WHO*, 41:21-43.

Cave, M. D., K. D. Eisenach, G. Templeton, M. Salfinger, G. Mazurek, J. H. Bates, J. T. Crawford. **1994**. Stability of DNA fingerprinting pattern produced with *IS6110* in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*. 32:262-266.

Cave MD, Yang ZH, Stefanova R, Fomukong N, Ijaz K, Bates J, Eisenach KD. **2005**. Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. *J Clin Microbiol*. 43(3):1228-1233.

Centers of Disease Control and Prevention. **1991**. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correlational system - New York. *Morb. Mortal. Weekly. Rep*. 41:507-509.

Coker RJ. **2004**. Review: multidrug-resistant tuberculosis: public health challenges. *Trop Med Int Health*. 9:25-40.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail 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(6685):537-544.

Coronado, V. G., C. M. Beck-Sague, M. D. Hutton, B. J. Davis, P. Nicholas, C. Villareal, C. L. Woodley, J. O. Kilburn, J. T. Crawford. **1993**. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an

urban hospital: epidemiological and restriction fragment length polymorphism analysis. *Clin. Infect. Dis.* 33:511-516.

Cox HS, Orozco JD, Male R, Ruesch-Gerdes S, Falzon D, Small I, Doshetov D, Kebede Y, Aziz M. **2004**. Multidrug-resistant tuberculosis in central Asia. *Emerg Infect Dis.* 10:865-872.

Crofton, J. & Mitchison, D.A. **1948**. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *British Medical Journal*, 2:1009-1015.

Dalcolmo, M. P., A. Fortes, F. F. Melo, R. Motta, J. I. Netto, N. Cardoso, M. Andrade, A. W. Barreto, e G. Gerhardt. **1999**. Estudo da efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. *J. Pneumol.* 25:70-77.

Dalcolmo, M. P.; Melo, F. A. F.; Afiune, J. B. Ide-Neto, J.; Seiscento, M.; Noronha, A. M. L., Gerhard-Filho, G. **1995**. Esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente. *Bol Pneumol Sanit*, 3(2):26-34.

Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr, Hopewell PC. **1992**. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med.* 326(4):231-235.

Daniel, TM, Bates, JH, Downes, KA. **1994**. History of tuberculosis control. *In: Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control.* ASM, Washington, DC.

DeRiemer K, Garcia-Garcia L, Bobadilla-del-Valle M, Palacios-Martinez M, Martinez-Gamboa A, Small PM, Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-Leon A. **2005**. Does DOTS work in populations with drug-resistant tuberculosis? *Lancet.* 365(9466):1239-1245.

Diaz R, Gomez R, Restrepo E, Rumbaut R, Sevy-Court J, Valdivia JA, van Soolingen D. **2001**. Transmission of tuberculosis in Havana, Cuba: a molecular epidemiological study by IS6110 restriction fragment length polymorphism typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96: 437-443.

Diel R, Niemann S. **2003**. Outcome of tuberculosis treatment in Hamburg: a survey, 1997-2001. *Int J Tuberc Lung Dis.* 7:124-131.

Dominguez-Castellano A, Muniain MA, Rodriguez-Bano J, Garcia M, Rios MJ, Galvez J, Perez-Cano R. **2003**. Factors associated with time to sputum smear conversion in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 7(5):432-8.

Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. **1999**. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA*. 282(7):677-86.

Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG. **2002**. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis*. 15:1197-1202

Dye C, Williams BG. **2000**. Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci* 97:8180-8185.

Espinal, M. A.; Dye, C.; Raviglione, M. C., Kochi, A. **1999**. Rational "DOTS Plus" for the control of MDR-TB. *Int J Tuberc Lung Dis*, 3(7):561-563.

Espinal MA, Kim SJ, Suarez PG, Kam KM, Khomenko AG, Migliori GB, Baez J, Kochi A, Dye C, Raviglione MC. **2000**. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: Treatment Outcomes in 6 Countries. *J. Am. Med Ass*. 283:2537-2545.

Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, Hoffner S, Rieder HL, Binkin N, Dye C, Williams R, Raviglione MC. **2001**. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med*. 344:1294-1302.

Espinal MA. **2003**. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis* 83:44-51.

Espinal, M. A., Dye, C. **2005**. Can Dots control multidrug-resistant tuberculosis? *Lancet*. 365:1206-1209.

Fang, Z., N. Morrison, B. Watt, C. Doig, and K. J. Forbes. **1998**. IS6110 Transposition and evolutionary scenario of the Direct Repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Bacteriol*. 180: 2102-2109.

Farer, L. **1986**. The current status of tuberculosis control efforts. *Am. Rev. Respir. Dis*. 134:402-407.

Farmer P, Kim JY. **1998**. Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: introducing "DOTS-plus". *BMJ*. 317(7159):671-4.

Farmer P, Bayona J, Becerra M, Furin J, Henry C, Hiatt H, Kim JY, Mitnick C, Nardell E, Shin S. **1998**. The dilemma of MDR-TB in the global era. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2(11):869-76

Ferdinand S, Sola C, Verdol B, Legrand E, Goh KS, Berchel M, Aubery A, Timothee M, Joseph P, Pape JW, Rastogi N. **2003**. Molecular characterization and drug resistance

patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in an AIDS counseling center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-year study. *J Clin Microbiol.* 41:694-702.

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.

Filliol, I., S. Ferdinand, L. Negroni, C. Sola, and N. Rastogi. **2000**. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2520-2524.

Floyd K, Blanc L, Raviglione M, Lee JW. **2002**. Resources required for global tuberculosis control. *Science.* 5562:2040-2041.

Fomukong, N., M. Beggs, H. el Hajj., G. Templeton, K. Eisenach, and M. D. Cave. **1998**. Differences in the prevalence of *IS6110* insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of *IS6110*. *Tuberc. Lung Dis.* 78: 109-116.

Fortes, A.M., Dalcolmo, M.P. **1996**. Tuberculose multirresistente. *Pulmão RJ*, 6:68-80.

Foxman B, Riley L. **2001**. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol.*153(12):1135-41.

Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Dooley SW. **1993**. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med.* 328:521-526.

Frieden TR, Woodley CL, Crawford JT, Lew D, Dooley SM. **1996**. The molecular epidemiology of tuberculosis in New York City: the importance of nosocomial transmission and laboratory error. *Tuber Lung Dis.* 77:407-413.

Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, Fujiwara PI, Crawford JT, Nivin B, Sharp V, Hewlett D Jr, Brudney K, Alland D, Kreiswirth BN. **1996**. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis epidemiology and clinical isolates. *JAMA* 276:1229-1235.

Frieden, T. R., P. I. Fujiwara, R. M. Washko, M. A. Hamburg. **1995**. Tuberculosis in New York City - turning the tide. *N. Engl J. Med.* 333:229-233.

Friedman, C.R., Stoeckle, M.Y., Kreiswirth, B.N., Johnson, W.D., Manoach, S.M., Berger, K., Sathianathan, K., Hafner, A., Riley, L.W. **1995**. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a large urban setting. *Am.J. Respir. Crit. Care Med.* 152:355-359.

Friedman CR, Quinn GC, Kreiswirth BN, Perlman DC, Salomon N, Schluger N, Lutfey M, Berger J, Poltoratskaia N, Riley LW. **1997**. Widespread dissemination of a drug-susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 176(2):478-484.

Frothingham, R., and W. A. Meeker-O'Connell. **1998**. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. 144: 1189-1196.

Fujiwara PI, Cook SV, Rutherford CM, Crawford JT, Glickman SE, Kreiswirth BN, Sachdev PS, Osahan SS, Ebrahimzadeh A, Frieden TR. **1997**. A continuing survey of drug-resistant tuberculosis, New York City, April 1994. *Arch Intern Med*. 157(5):531-6.

Garcia-Garcia ML, Jimenez-Corona ME, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona A, Palacios-Martinez M, Balandrano-Campos S, Ferreyra-Reyes L, Juarez-Sandino L, Sifuentes-Osornio J, Olivera-Diaz H, Valdespino-Gomez JL, Small PM. **2000**. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in a suburban community in southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis*. 4:S168-170.

Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, Mordasini C, Weiss S, Maurer AM, Rieder HL, Schopfer K, Bodmer T. **1993**. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet*. 342:841-844.

Gillespie, S. H., A. Dickens, and T. D. McHugh. **2000**. False molecular clusters due to nonrandom association of *IS6110* with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*. 38: 2081-2086.

Gillespie, S. H. **2002**. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(2):267-274.

Gledovic Z, Jovanovic M, Pekmezovic T. **2000**. Tuberculosis trends in Central Serbia in the period 1956-1996. *Int J Tuberc Lung Dis*. 4:32-35.

Glynn, J. R., J. Bauer, A. S. de Boer, M. W. Borgodorf, P. E. M. Fine, P. Godfrey-Faussett, E. Vynnycky. **1999**. European Concerted Action on Molecular Epidemiology and Control of Tuberculosis. Interpreting DNA fingerprinting clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 3:1055-1060.

Goguet de la Salmonière Y. O., H. M. Li, G. Torrea, A. Bunschoten, J. van Embden, and B. Gicquel. **1997**. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*. 37: 1921-1926.

Goulding, J. N., J. Stanley, N. Saunders, and C. Arnold. **2000**. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1121-1126.

Goyal, M., N. A. Saunders, J. D. A. van Embden, D. B. Young, and R. J. Shaw. **1997**. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and *IS6110* restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 35: 647-651.

Greenhalgh, T. **1987**. Drug prescription and self-medication in India. *Social Science and Medicine*, 25:307-318.

Gupta R, Raviglione MC, Espinal MA. **2001**. Should tuberculosis programmes invest in second-line treatments for multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)? *Int J Tuberc Lung Dis.* 5(12):1078-1079.

Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, Le Pendeven C, Le Penne MP, Mathieu D, Offredo C, Pangon 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.

Haas, F, Haas, SS. **1996**. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness. In: Rom, WN, Garay, S. Tuberculosis. *Little, Brown and Co.*, Boston, Mass.

Heersma, H. F., K. Kremer, and J. D. A. van Embden in Parish, T. **1998**. Mycobacteria protocols. *Humana Press*. Totowa, New Jersey. 395-422.

Henry, JB. **2001**. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Pennsylvania: *W. B. Saunders Co.* 20^a ed.

Hermans, P.W.M., A.R.J. Schuitema, D. van Soolingen, C.P.H.J. Versteijnen, E.M. Bik, J.E.R. Thole, A.H.J. Kolk, and J.D.A. Van Embden. **1990**. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1204-1213.

Hermans, P. W. M., D. van Soolingen, E. M. Bik, P. E. W. de Haas, J. W. Dale, and J. D. A. Van Embden. **1991**. The insertion element IS986 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 59: 2695-2705.

Higginson, J. **1977**. The role of the pathologist in environmental medicine and public health. *Am. J. Pathol.* 86:460-484.

Holm, J. **1969**. Development from Tuberculosis Infection to Tuberculosis Disease. *Royal Dutch Tuberculosis Association*, The Hague, The Netherlands.

Hurtig, A.K., Pande, S. B., Baral, S. C., Porter, J.D.H., Bam, D.S. **2000**. Anti-tuberculosis treatment in private pharmacies, Kathmandu Valley, Nepal. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8:730-736.

IBGE. **2000**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/SIDRA>, censo 2000, tabela 136.

IUATLD - International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. **2000**. Management of Tuberculosis. A Guide for Low Income Countries. Paris, France. 5th Edition.

Kam KM, Yip CW. **2001**. Surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Hong Kong, 1986-1999, after the implementation of directly observed treatment. *Int J Tuberc Lung Dis.* 5(9):815-823.

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.

Kaufmann SH, van Embden JD. **1993**. Tuberculosis: a neglected disease strikes back. *Trends Microbiol.* 1(1):2-5.

Kaye K, Frieden TR. **1996**. Tuberculosis control: the relevance of classic principles in an era of acquired immunodeficiency syndrome and multidrug resistance. *Epidemiol Rev.* 18(1):52-63.

Kell, MCG. **2004**. Integralidade da Atenção à Saúde. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação de Gestão da Atenção Básica.

Kent, P.T, Kubbica, G.P. **1985**. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. *CDC*, Atlanta, USA.

Kochi, A., Vareldzis, B., Styblo, K. **1993**. Multi-drug resistant tuberculosis and its control. *Research in Microbiology*, 73:219-224.

Konno, K., Feldmann, F. M. & McDermott, W. **1967**. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev Res. Dis.* 95:461.

Kremer, K., D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. M. Hermans, C. Martín, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M. Musser, and J. D. A. van Embden. **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, A. L.; Conde, M. B., Muzy-Souza, G. **2000**. Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. 2ª Edição. São Paulo: *Editora Atheneu*.

Kritski, AL G, Conde, MB, Souza, M. **2005**. Tuberculose do Ambulatorio à Enfermaria. 3ª ed. São Paulo: *Editora Atheneu*.

Kudoh, S. and Kodoh, T. **1974**. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull World Health Organ.* 51:71-82.

Kumaresan, J. **2002**. Epidemiology. In: Narain, JP. Tuberculosis: Epidemiology and Control. *World Health Organization*. 1ª ed. P.16-30.

Kurepina NE, Sreevatsan S, Plikaytis BB, Bifani PJ, Connell ND, Donnelly RJ, van Sooligen D, Musser JM, Kreiswirth BN. **1998**. Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis*: non-random integration in the dnaA-dnaN region. *Tuber Lung Dis.* 79(1):31-42.

Laserson, K. F., Kenyon, A.S., Kenyon, T.A., Layloff, T., Binkin, N. J. **2001**. Substandard tuberculosis drugs on the global market and their simple detection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5:448-454.

Laszlo A, Rahman M, Raviglione M, Bustreo F. **1997**. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round of proficiency testing. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1(3):231-8.

Levin, B. R., Lipsitch, M., Bonhoeffer, S. **1999**. Population biology, evolution, and infectious diseases: convergence and synthesis. *Science* 283:806-809.

Lillebaek, T., A. Dirksen, E. Vyunnycky, I. Baess, V. O. Thomsen, A. B. Andersen. **2003**. Stability of DNA patterns and evidence of *Mycobacterium tuberculosis* reactivation occurring decades after the initial infection. *J. Infect. Dis.* 188:1032-1039.

Liu, Z., Shikret, K.L. Finelli, L. **1998**. Initial drug regimens for the treatment of tuberculosis: evaluation of physician prescribing practice in New Jersey, 1994-1995. *Chest*, 113:1446-1451.

- Maguire H, Dale JW, McHugh TD, Butcher PD, Gillespie SH, Costetsos A, Al-Ghusein H, Holland R, Dickens A, Marston L, Wilson P, Pitman R, Strachan D, Drobniewski FA, Banerjee DK. **2002**. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995-7 showing low rate of active transmission. *Thorax*. 57:617-622.
- Mahmoudi A., Iseman, M. D. **1993**. Pitfalls in care of patients with tuberculosis. *J. Am Med Ass.* 270:65-68.
- Martins, ACP, Araújo, LMB. **1993**. Tuberculose e Diabetes mellitus. *J. Pneumol.* 19:110-112.
- Mausner, J. S. & Bahn, A. K. **1974**. Epidemiology: an Introductory Text. Philadelphia: *The W. Saunders Co.*
- Meacci F, Orru G, Iona E, Giannoni F, Piersimoni C, Pozzi G, Fattorini L, Oggioni MR. **2005**. Drug resistance evolution of a *Mycobacterium tuberculosis* strain from a noncompliant patient. *J Clin Microbiol.* 43(7):3114-20.
- Mendiola, M.V., C. Martín, I. Otal, and B. Gicquel. **1992**. Analysis of the regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Res. Microbiol.* 143: 767-772.
- Melo, FAF, Afiune JB, Neto JI, Almeida EA, Spada DTA, Antelmo ANL, Cruz ML. **2003**. Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Vol.36, no.1, p.27-34.
- Mistry NF, Iyer AM, D'souza DT, Taylor GM, Young DB, Antia NH. **2002**. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from multiple-drug-resistant tuberculosis patients from Bombay, India. *J Clin Microbiol.* 40:2677-80.
- Mitchison, D.A. **1950**. Development of streptomycin resistant isolates of tubercle bacilli in pulmonary tuberculosis. *Thorax* 4:144.
- Mitchison, D.A. **1968**. Natural sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to thacetazone. *Tubercle*, 49:38.
- Mitchison, D.A. **1985**. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle*, 66:219-226.
- Moro, M. L., Salamina, G., Gori, A., Penati, V., Sacchetti, R., Mezzetti, F., Infuso, A., Sodano L. **2002**. Two-year population-based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Milan, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21:114-122.

Moström, P., M. Gordon, C. Sola, M. Ridell, and N. Rastogi. **2002**. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 694-704.

Mukherjee JS, Rich ML, Socci AR, Joseph JK, Viru FA, Shin SS, Furin JJ, Becerra MC, Barry DJ, Kim JY, Bayona J, Farmer P, Smith Fawzi MC, Seung KJ. **2004**. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Lancet.* 7:474-481.

Munsiff SS, Bassoff T, Nivin B, Li J, Sharma A, Bifani P, Mathema B, Driscoll J, Kreiswirth BN. **2002**. Molecular epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerg Infect Dis.* 8:1230-8.

Musellim B, Erturan S, Sonmez Duman E, Ongen G. **2005**. Comparison of extra-pulmonary and pulmonary tuberculosis cases: factors influencing the site of reactivation. *Int J Tuberc Lung Dis.* 9(11):1220-1223.

Murray, S. **2006**. Challenges of tuberculosis control. *CMAJ.* 174(1):33-35

Narayanan, S., S. Das, R. Garg, L. Hari, V. B. Rao, T. R. Frieden, and P. R. Narayanan. **2002**. Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in south India: implications for disease control and prevention. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4785-4788.

Niemann S, Rusch-Gerdes S, Richter E. **1997**. IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol.* 35:3015-3020.

Ocepek M, Pate M, Zolnir-Dovc M, Poljak M. **2005**. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J Clin Microbiol.* 43(7):3555-3557.

Oliveira, Helenice B de and Moreira Filho, Djalma de C. **2000**. Abandono de tratamento e recidiva da tuberculose: aspectos de episódios prévios, Campinas, SP, Brasil, 1993-1994. *Rev. Saúde Pública.* vol.34, no.5, p.437-443.

Ormerod LP. **2005**. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment. *Br Med Bull.* 74:17-24.

Opsahl, R, Riddervold, HO, Wessel, T. **1961**. Pulmonary tuberculosis in mitral stenosis and diabetes mellitus. *Acta Tuberc. Scand.* 40:290-296.

Otal I, Martin C, Vincent-Levy-Frebault V, Thierry D, Gicquel B. **1991**. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 29(6):1252-4.

Ott, W P, e R S Gutierrez, em Ott, W P. **1993**. Tuberculose: Epidemiologia, diagnóstico, tratamento em clínica e saúde pública. Ed. *Médica e Científica*, Rio de Janeiro. 159-224.

Pablos-Mendez A, Sterling TR, Frieden TR. **1996**. The relationship between delayed or incomplete treatment and all-cause mortality in patients with tuberculosis. *JAMA*. 276(15):1223-8.

Pablos-Mendez A, Knirsch CA, Barr RG, Lerner BH, Frieden TR. **1997**. Nonadherence in tuberculosis treatment: predictors and consequences in New York City. *Am J Med*. 102(2):164-70

Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, Cohn DL, Lambregts-van Weezenbeek CS, Kim SJ, Chaulet P, Nunn P. **1998**. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. *N. Eng. J. Med*. 338:1641-1649.

Pablos-Mendez A, Gowda DK, Frieden TR. **2002**. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. *Bull World Health Organ*. 80(6):489-95

Park, Y. K., Bai G. H. & Kim, S. J. **2000**. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Countries in the Western Pacific Region. *J. Clin. Microbiol*. 38:191-197.

Pearson ML, Jereb JA, Frieden TR, Crawford JT, Davis BJ, Dooley SW, Jarvis WR. **1992**. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. A risk to patients and health care workers. *Ann Intern Med*. 117(3):191-196.

Pinheiro, R, Mattos, R A. **2001**. Os Sentidos da Integralidade na atenção e no cuidado à saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO.

Plikaytis, B. B., J. L. Marden, J. T. Crawford, C. L. Woodley, W. R. Butler, T. M. Shinnick. **1994**. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 32:1542-1546.

Post FA, Willcox PA, Mathema B, Steyn LM, Shean K, Ramaswamy SV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN, Kaplan G. **2004**. Genetic polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis*. 190:99-106.

Possuelo, LG. **2004**. Epidemiologia Molecular da Tuberculose na Região Metropolitana de Porto Alegre. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. UFRGS.

Pyle, M.M. **1947**. Relative numbers of resistant tubercle bacilli in sputa of patients before and during treatment with streptomycin. *Proceedings of Mayo Clinic*, 22:465.

Quitugua TN, Seaworth BJ, Weis SE, Taylor JP, Gillette JS, Rosas II, Jost Jr KC Jr, Magee DM, Cox RA. **2002**. Transmission of drug-resistant tuberculosis in Texas and Mexico. *J Clin Microbiol*. 40:2716-2724.

Rasolofo-Razanamparany V, Ramarokoto H, Auregan G, Gicquel B, Chanteau S. **2001**. A combination of two genetic markers is sufficient for restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex in areas with a high incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 39(4):1530-5.

Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. **1995**. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*. 273(3):220-6.

Riley, L. W. **2004**. Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Principles and Practices. Washington: ASM Press.

Rodrigues Vde F, Telles MA, Ribeiro MO, Cafrune PI, Rossetti ML, Zaha A. **2005**. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(1):444-6.

Ross, B. C., K. Raios, K. Jackson, and B. Dwyer. **1992**. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol*. 30: 942-946.

Rossetti ML, Valim AR, Silva MS, Rodrigues VS. **2002**. Resistant tuberculosis: a molecular review. *Rev Saude Publica*. 36(4):525-532.

Ruffino-Netto, Antonio. **1999**. Impacto da reforma do setor saúde sobre os serviços de tuberculose no Brasil. *Boletim de Penumologia Sanitária*. 7:7-18.

Ruffino-Netto, Antonio. **2002**. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 35:51-58.

Rusen ID, Enarson DA. **2006**. FIDELIS--Innovative Approaches to Increasing Global Case Detection of Tuberculosis. *Am J Public Health*. 96:14-16.

Sahadevan R, Narayanan S, Paramasivan CN, Prabhakar R, Narayanan PR. **1995**. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium*

tuberculosis from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. *J Clin Microbiol.* 33(11):3037-3039.

Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Gomez LI, Lafoz MC, Jimenez MS, Ortega A, Lezcano MA, Van Soolingen D, Martin C; Spanish Working Group on MDR-TB. **2005.** Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *J Clin Microbiol.* 43(3):1220-1227.

Schoenborn, C.A. **2004.** Marital Status and Health: United States, 1999-2002. Advance Data From Vital and Health Statistics. 351:1-36. Hyattsville, Maryland: *National Center for Health Statistics.*

Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. **1995.** Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev.* 8(2):180-99.

Siddiqi N, Shamim M, Hussain S, Choudhary RK, Ahmed N, Prachee, Banerjee S, Savithri GR, Alam M, Pathak N, Amin A, Hanief M, Katoch VM, Sharma SK, Hasnain SE. **2002.** Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:443-450.

Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A, Morlock GP, Cooksey RC, Zaha A, Rossetti ML. **2003.** Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 41(9):4471-4474.

Small, P. M., P. C. Hopewell, S. P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D. C. Ruston, G. F. Schechter, C. L. Daley, and G. K. Schoolnik. **1994a.** The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N. Engl. J. Med.* 330:1703-1709.

Small, P. M., and J. D. A. van Embden, in Bloom, B. R. **1994b.** Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington, DC: *ASM Press.* 569-582.

Smith, P. G., and Moss, A. R. 1994. Epidemiology of tuberculosis (chapter 4). In: Bloom, B. R. (Ed.). Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington: **ASM Press.**

Smith I. **2003.** *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 16(3):463-96.

Soini, H., X. Pan, L. Teeter, J. M. Musser, and E. A. Graviss. **2001.** Transmission dynamics and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of *IS6110*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 217-221.

Sola, C., L. Hoegen, J. Maïsetti, A. Devallois, K. S. Goh, and N Rastogi. **1998**. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to *IS6110* fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1122-1124.

Souza, W.V., Albuquerque, MFM, Barcellos, CC, Ximenes, RAA Carvalho, MS. **2005**. Tuberculosis in Brazil: construction of a territorially based surveillance system. *Rev. Saúde Pública.* vol.39, no.1, p.82-89.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. **1997**. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(18):9869-9874.

Stead WW. **1997**. Perspective: a molecular approach to tuberculosis control-- an idea that might work. *J Infect Dis.* 176(3):547-548.

Stewart, S. M., Hall, E., Riddell, R. W. & Somner, A. R. **1962**. Bacteriological aspects of the use of ethionamide, pyrazinamide and cycloserine in the treatment of chronic pulmonary tuberculosis. *Tubercle.* 43:417-431.

Styblo K, Meijer J. **1976**. Impact of BCG vaccination programmes in children and young adults on the tuberculosis problem. *Tubercle.* 57(1):17-43.

Suarez PG, Floyd K, Portocarrero J, Alarcon E, Rapiti E, Ramos G, Bonilla C, Sabogal I, Aranda I, Dye C, Raviglione M, Espinal MA. **2002**. Feasibility and cost-effectiveness of standardised second-line drug treatment for chronic tuberculosis patients: a national cohort study in Peru. *Lancet.* 359(9322):1980-1689.

Surucuoglu S, Ozkutuk N, Celik P, Gazi H, Dinc G, Kurutepe S, Koroglu G, Havlucu Y, Tuncay G. **2005**. Drug-resistant pulmonary tuberculosis in western Turkey: prevalence, clinical characteristics and treatment outcome. *Ann Saudi Med.* 25(4):313-318.

Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Rossetti ML, Zaha A, Barroso EW, Barreto AM, Campos E, van Soolingen D, Kremer K, Heersma H, Degraeve WM. **2000**. Usefulness of *IS6110*-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol.* 151:343-351

Sumartojo, E.M. Geiter, L.J., Miller, B., Hale, B.E. **1997**. Can physicians treat tuberculosis? Report on national survey of physician practice. *American Journal of Public Health* 87:2008-2011.

Sutherland, I., Svandova, E., Radhakrishna, S.E. **1982**. The development of clinical tuberculosis following infection with tubercle bacilli. *Tubercle*, 63: 255-268.

Telles MA, Ferrazoli L, Waldman EA, Giampaglia CM, Martins MC, Ueki SY, Chimara E, Silva CA, Cruz V, Waldman CC, Heyn I, Hirono IU, Riley LW. **2005**. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. *Int J Tuberc Lung Dis*. 9:970-976.

Telzak EE, Sepkowitz K, Alpert P, Mannheimer S, Medard F, el-Sadr W, Blum S, Gagliardi A, Salomon N, Turett G. **1995**. Multidrug-resistant tuberculosis in patients without HIV infection. *N Engl J Med*. 333(14):907-911.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, and R. V. Goering. **1997**. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 18: 426-439.

Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. **1990**. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*. 28(12):2668-73.

Torrea G, Levee G, Grimont P, Martin C, Chanteau S, Gicquel B. **1995**. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. *J Clin Microbiol*. 33(7):1899-904.

Torrea G, Offredo C, Simonet M, Gicquel B, Berche P, Pierre-Audigier C. **1996**. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 34(5):1043-1049.

Toungousova OS, Sandven P, Mariandyshv AO, Nizovtseva NI, Bjune G, Caugant DA. **2002**. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. *J Clin Microbiol*. 40:1930-1937.

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(8):3119-3122.

Valway SE, Richards SB, Kovacovich J, Greifinger RB, Crawford JT, Dooley SW. **1994**. Outbreak of multi-drug-resistant tuberculosis in a New York State prison, 1991. *Am J Epidemiol*. 140(2):113-22.

van Deutekom H, Gerritsen JJ, van Soolingen D, van Ameijden EJ, van Embden JD, Coutinho RA. **1997**. A molecular epidemiological approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. *Clin Infect Dis*. 25:1071-1077.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. **1993**. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 31:406-409.

van Embden, J. D., D. van Soolingen, P. M. Small, and P. W. M. Hermans. **1992**. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Res. Microbiol*. 143: 385-391.

van Soolingen, D., P. W. M. Hermans, P. E. W. de Haas, P. M. D. R. Soll, J. D. A. van Embden. **1991**. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in epidemiology da tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*. 29:2578-2586.

van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. **1993**. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 31(8):1987-1995.

van Soolingen, D., P. E. W. De Haas, P. W. M. Hermans, and van D. A. Embden. **1994**. DNA fingerprinting of *M. tuberculosis*. *Methods in enzymology*. 235: 196-204.

van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JD. **1995**. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol*. 33(12):3234-3238.

van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PE, Sebek MM, Veen J, Dessens M, Kremer K, van Embden JD. **1999**. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis*. 180(3):726-36.

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.

Vynnycky E, Borgdorff MW, van Soolingen D, Fine PE. **2003**. Annual *Mycobacterium tuberculosis* infection risk and interpretation of clustering statistics. *Emerg Infect Dis*. 9:176-183.

Weis SE, Slocum PC, Blais FX, King B, Nunn M, Matney GB, Gomez E, Foresman BH. **1994**. The effect of directly observed therapy on the rates of drug resistance and relapse in tuberculosis. *N Engl J Med*. 28:1179-1184.

World Bank. **1993**. World Development Report 1993: investing in health. New York, *Oxford University*

World Health Organization. **1997**. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUALTD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Geneva, 1997 (WHO/TB/1997.229).

World Health Organization. **2000**. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUALTD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Report 2: Prevalence and trends. Geneva, 2000 (WHO/CDS/TB/2000.278).

World Health Organization Communicable Disease. **2001a**. WHO Report 2001, Global Tuberculosis. *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. **2001b**. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva (WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2).

World Health Organization. **2001c**. Involving private practitioners in tuberculosis control: issues, intervention, and emerging policy framework. Geneva, 2001 (WHO/CDS/TB/2001.285).

World Health Organization. **2002**. Global tuberculosis control: surveillance, planning, Finance. Geneva, 2002 (WHO/CDS/2002.295).

World Health Organization Communicable Disease. **2003a**. WHO Report 2003, Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. **2003b**. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Geneva (WHO/CDS/CSR/RMD/2003.3).

World Health Organization. **2004a**. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUALTD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Third Global Report. Geneva (WHO/HTM/TB/2004.343).

World Health Organization. **2004b**. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planing, Financing: *WHO report* 2004. Geneva, 2004 (WHO/HTM/TB/2004.331).

World Health Organization. **2005**. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva, 2005 (WHO/HTM/TB/2005).

Yang Z., F. Chaves, P. F. Barnes, W. J. Burman, J. Koehler, K. D. Eisenach, J. H. Bates, and M. D. Cave. **1996**. Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 3044-3048.

Yeh, R.W., P. de Leon, C. B. Agasino, J. A. Hahn, C. L. Daley, P.C. Hopewell, P. M. Small. **1998**. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J. Infec. Dis.* 177:1107-1111.

Apêndices

Apêndice 1. Artigo submetido a publicação no Microbiol Drugs Resistance.

Evaluation and Genotyping of Multidrug-Resistant Cases of Tuberculosis in Southern Brazil

Andréia Rosane de Moura Valim ^{1,2,4}, Lia Gonçalves Possuelo ^{4,5}, Patrícia Izquierdo Cafrune ^{4,5}, Michele Borges ⁴, Marta Osório Ribeiro ³, Maria Lúcia Rosa Rossetti ⁴ and Arnaldo Zaha ¹.

- 1- Centro de Biotecnologia and Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
- 2- Universidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil
- 3- Instituto de Pesquisas Biológicas/ Laboratório Central do Rio Grande do Sul/ Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Brazil.
- 4- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Brazil.
- 5- Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author. Mailing address: Centro de Biotecnologia/UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, CEP 91501-970 Porto Alegre - RS, Brazil. Phone: +55 51 3316-6054. Fax: +55 51 3316 7309. Email: zaha@cbiot.ufrgs.br

Runing Title: Multidrug-Resistant TB in Southern of Brazil

Abstract

Sixty isolates of *Mycobacterium tuberculosis* identified as multidrug-resistant (MDR) at a reference laboratory in Rio Grande do Sul State during years 1999 and 2000 were analyzed using *IS6110*-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique. We also genotyped 202 susceptible strains to compare the genotyping results, as well as the clinical and demographic data. Spoligotyping analysis was performed for isolates presenting low *IS6110* copy number. Patients with identical DNA pattern strains were considered clustered. From 262 isolates, ninety-four (36%) belonged to 20 distinct RFLP clusters, and after spoligotyping analysis, 89 of the isolates (34%) remained in cluster. MDR isolates did not differ statistically in clustering proportion from susceptible strains. A significant association between the occurrence of MDR and previous tuberculosis (TB) treatment was observed ($P < 0.001$), as well as failure on TB treatment ($P < 0.001$). HIV positive patients were associated to susceptible tuberculosis ($P = 0.024$). We also identified that unmarried patients were more likely to develop TB due to recent transmission than married patients ($P < 0.005$). The introduction of directly observed short-course therapy strategy (DOTS) will be important to decrease default and failure rates, avoiding the development of new MDR strains.

Introduction

Brazil is one of the 23 countries responsible for 80% of global tuberculosis (TB)³⁴ and the estimated incidence is 64/100,000 inhabitants³⁵. In this country, as in many other regions of the world, the surveillance system does not allow an accurate estimation of the proportion of drug-resistant bacilli, since the organisms are not cultured routinely and drug susceptibility testing is not performed for all suspected cases. However, the data available point to less than 1% of these cases as multidrug-resistant (MDR) in Brazil³⁵, similar to the situation in the majority of the countries⁹. MDR TB is a serious problem because patients are less likely to become cured and due to the toxicity and higher cost of treatment^{9, 7}. The drug-resistant phenotype may get selected due to single-drug therapy, poor patient adherence to the therapy, and improper diagnosis²⁷.

MDR TB is among the greatest concerns of antibiotic resistance pandemic due to a high risk of death²⁸ and because patients may remain infected for many months or even years²⁴. In Rio Grande do Sul, a State located in southern Brazil, presents a population of 10,187,798 inhabitants. The incidence of TB in this State during year 2003 was 45 new cases per 100,000 inhabitants and the majority of the cases were notified in metropolitan region (data from Secretary of Health of Rio Grande do Sul State, 2003).

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis is an useful epidemiological tool to investigate the transmission of particular strains of *M. tuberculosis* including MDR. It is important to delineate MDR disease transmission patterns and risk factors that are associated to resistance in order to prevent the increase of MDR TB^{4, 9}. The design of strategies for MDR TB management depends on a better understanding of the development and transmission of resistant isolates¹⁶. In order to evaluate the extension of MDR strains contribution on the disease transmission in Rio Grande do Sul State, we genotyped, by RFLP based on IS6110, MDR and susceptible isolates of *M. tuberculosis* obtained during the years 1999 and 2000. Clinical and demographic data from patients were compared among the groups aiming to identify risk factors for infection with MDR and/ or cluster strains.

Material and Methods

Ethical aspects: The collection of epidemiological data used in this study was approved by the Research Ethics Committee from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (protocol number 16/2002).

Patients and bacterial isolates. Clinical and demographic data were obtained from the National System of Disease Notification (SINAN) and medical records of about 262 patients were reviewed retrospectively to identify factors that might be associated with MDR strains infection. Two hundred and sixty-two *M. tuberculosis* isolates, from which 60 were MDR and 202 susceptible, were recovered from patients with tuberculosis for this study. Isolates were collected in a two-year period (1999 and 2000) at Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN/RS) from patients assisted at outpatient clinics in different regions of Rio Grande do Sul State. Specimens were cultured on Ogawa slants and identified as *M. tuberculosis* on the basis of a positive niacin test. Drug susceptibility testing was done using Löwenstein-Jensen slants according to the proportion methods³. Isolates resistant to at least isoniazid (INH) and rifampin (RIF) were considered MDR³³.

Genotyping analyses. Extraction of DNA from mycobacterial strains and DNA fingerprinting using IS6110 as a probe were performed by a standardized protocol described by van Embeden *et al.*³⁰ Briefly, chromosomal DNA was prepared by chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction and 4 µg of DNA from each isolate was restricted with PvuII, separated by agarose gel electrophoresis and hybridized to the IS6110 probe. Hybridizing DNA was detected with chemiluminescent ECL detection liquid (enhanced chemiluminescence detection kit; Amersham. Little Chalfont, England). The IS6110 RFLP patterns were inspected visually, scanned, and analyzed using the software GelCompar, version 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The unweighted pair-group method of arithmetic averaging (UPGMA) with the Dice coefficient as a similarity measure was used. Band position tolerance was set to 1.2%, and optimization was 0.5%. All fingerprint patterns with 100% of similarity were clustered in one fingerprint group. Spacer oligo typing (i.e., spoligotyping) was

performed by amplification of direct repeat region of each isolate, with primers Dra and Drb as reported previously¹⁵. Detection of hybridizing DNA was done as describe for RFLP. Secondary genotyping was done for low IS6110 copy band strain (less than six). Two or more isolates were defined as belonging to a cluster if their RFLP patterns were indistinguishable and if they had six or more copies of IS6110. Those strains carrying less than six IS6110 copies were considered clustered when both RFLP and spoligotyping patterns were indistinguishable.

Statistical analyses. EpiInfo (version 6.04d, Centers for Disease Control & Prevention, USA) and SPSS for Windows, version 8.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.) were used for statistical analyses. Associations between categorical variables were assessed by the χ^2 test or Fisher's exact test when the assumptions for this test were not met. Difference between groups were tested by univariate analysis and expressed as odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (95% CI). A *P* value of <0.05 was considered significant.

In order to identify the factors associated with clustering and MDR, demographic and epidemiologic characteristics from patients were compared. We divided the patients into four groups: MDR cluster (group 1, n = 23), susceptible cluster (group 2, n = 66), MDR noncluster (group 3, n = 37), and susceptible noncluster (group 4, n = 136).

Results

Susceptibility testing and patients description. In 1999 and 2000, a total of 10,967 cases of TB were notified in Rio Grande do Sul State. All cases suspected of drug resistance were sent to LACEN/RS. Susceptibility testing was performed for 393 isolates at LACEN/RS, resulting in 85 (22%) resistant strains at least to RIF and INH (MDR cases). Table 1 presents drug resistance patterns of the *M. tuberculosis* isolates. Sixty MDR isolates (71%) were available for this study and 202 susceptible isolates were included as controls. One hundred eighty-six patients (71%, Table 2) included in this study were male and ages ranged from 15 and 74 (mean, 39 years). As for race/ethnicity, 74.8% of patients were white (182). The following results were

obtained for the demographic and clinical characteristics analyzed: diabetes (12% in 141 valid answer), alcohol abuse (45% in 129 valid answer), history of imprisonment (2.9% in 170 valid answer), and HIV positivity (32% in 127 valid answer). Sixty-eight percent of the patients were positive by microscopy.

Genotyping analyses of *M. tuberculosis* strains. Two hundred sixty-two isolates were obtained for analysis and the number of IS6110 copies ranged from 2 to 18 per isolate. Two hundred twenty-eight isolates (87%) presented from 6 to 16 IS6110 copies, with a mean of 10 bands. No strains lacking IS6110 were found, but seven strains showed only two IS6110 copies. One hundred eighty seven distinct IS6110 fingerprint patterns were observed, from which 167 were observed only once in this study (unique patterns). Ninety-four isolates (36%) belonged to 20 distinct clusters by IS6110 RFLP, which included from 2 to 13 isolates (mean 5 isolates per cluster) (Figure 1). After spoligotyping analysis, 89 of isolates (34%) remained in cluster. It was assumed that all clustered patients developed TB from recent infection.

Comparison of patients by clustering. MDR isolates did not differ statistically in clustering proportion from susceptible strains (38% and 33%, respectively – $P = 0.45$). MDR isolates were distributed in 11 of 20 clusters found in the study. Characteristics such as gender proportion, race/ethnicity, age group and BCG vaccination also did not differ among the 4 study groups (Table 2). A significant association between the occurrence of MDR and previous TB treatment was observed ($P < 0.001$) as well as failure on TB treatment ($P < 0.001$). HIV positive patients were associated with susceptible tuberculosis ($P = 0.032$) (Table 2). From 41 HIV positive patients, 6 (15%) harbored MDR strains, 4 were clustered (different clusters) and 2 presented unique patterns.

Sixty-four patients reported to be married and 10 of them (16%) were infected with cluster patterns strains. Among 93 unmarried patients, 34 were clustered (37%) (OR 3.11, 95% CI 1.32-7.48). Unmarried patients are younger (mean age 34 ± 11.16 SD) than married (mean age 44 ± 12.44 SD) ($P < 0.001$). The data were also analyzed considering the age range of 15-39 years, and still the unmarried patients were more likely to be clustered (OR 2.95, 95% CI 1.08-8.31) (Table 3), indicating that age was

not a risk factor for recent transmission. The marital status was not associated with MDR TB (OR 1.02, 95% CI 0.48-2.17), although we observed 5 single MDR patients (71%) in cluster D.

Discussion

This report brings new information about the situation of MDR TB in Rio Grande do Sul State. Like the majority of other States in Brazil, the diagnosis of TB is based on results of sputum acid-fast microscopy and radiographic exams. Culture and susceptibility tests are required in specific situations including suspicion of resistance². In this study we analyzed, by genotyping methods, 262 isolates, including 60 MDR isolates and 202 isolates susceptible to all drugs tested. It was assumed that isolates harboring the same fingerprint represent recent transmission and unique patterns are reactivation of disease.

The percentage of clustered isolates (34%) was similar to that found in other studies, including those carried out in some regions of Brazil (32%) and the city of São Paulo (33%)^{28, 11}, as well as high prevalence countries like Haiti (34%) or low prevalence like USA (New York – 37%) and France (36%)^{12, 14, 10}. In our study, MDR strains were involved in recent transmission in 9% of the cases. The great majority of the isolates had 6 to 16 IS6110 copies, which is in agreement with results reported for isolates from other studies in Brazil^{28, 11} and worldwide^{6, 31, 29, 13, 21}, except some countries like in south Asia^{20, 23}.

Assuming that all patients infected with MDR *M. tuberculosis* have been identified at LACEN/RS (reference laboratory), we have analyzed 76% of MDR cases in a two-year period. Among 60 MDR strains, 38% were clustered and among 202 susceptible strains, the proportion was 33%, indicating a similar degree of transmission between cases and controls. These data differ from studies conducted in Italy and USA (New York), where the proportion of MDR clustering is higher than in non-MDR cases (65% and 74%, respectively)^{17, 19}. This might be related to the endemicity of disease in Rio Grande do Sul, where susceptible TB poses a major threat. Twenty-one percent of the isolates were included into 6 major clusters, but none of those clusters comprised exclusively MDR or susceptible strains, but a mixture of them (Figure 1).

Many of the demographic and clinical characteristics (age, gender, race, BCG, baciloscopia results, no compliance to treatment, alcohol abuse, diabetes, and history of imprisonment) were not associated with clustering and/or MDR disease. Ferdinand and colleagues¹⁰, in a study conducted in Haiti also did not find gender, age, and HIV positivity as risk factor to recent transmission.

Studies conducted in Texas and in New York City revealed that HIV infection is predictive to the development of drug-resistant TB^{25, 19}, and that most of the patients were recently infected. In our study we observed the opposite, HIV patients were significantly found more frequently in the control than the MDR group ($P < 0.05$). There are several factors linked to these differences. First, recent transmission of TB, in our setting, occurs in a higher frequency involving susceptible strains (25%) when compared to MDR (9%). According to Dye and colleagues⁷ HIV has been linked to MDR in small-scale outbreaks, such as those originating in hospitals, and there is no evidence that MDR is associated with HIV in the community. Another factor is the prevalence of TB, once in these USA regions TB infection is a relatively rare event outside risk areas, such as hospitals, residential facilities and prisons, places where MDR TB is concentrated. In Brazil, TB infection is not restricted to those places, but spread in the community where MDR and susceptible strains coexist.

Previous treatment for TB is one of the main risk factors for resistance in different places with high incidence of TB^{5, 10, 1} and in our study it was strongly correlated to the development of MDR TB ($P < 0.001$). According to Mukherjee and colleagues¹⁸ the proportion of MDR patients who were previously treated for TB ranges from 32-100%. It appears more likely that multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis* would be isolated from patients who have been subjected to extensive and apparently unsuccessful treatment courses³² confirming that most of the MDR TB cases are due to acquired resistance. This is in agreement to our finding that TB treatment failure history was higher among patients bearing a MDR strain ($P < 0.001$). However, in settings with low incidence of TB, this might not be true, for instance, in New York City, it was reported that 90% of patients with MDR TB had no prior

treatment history¹⁹, showing that in this setting primary MDR transmission is occurring.

In our study unmarried patients were more likely to develop TB due to recent transmission than married ($P < 0.005$), regardless of the susceptibility profile of the strains. Even comparing unmarried to married patients in the same age range, those unmarried were almost 3 times more likely to be clustered ($P < 0.05$). It is reported that unmarried patients are more exposed to a large range of diseases²⁶ due to an unruly life style, which might include low quality feeding, sleeping and healthcare. This could be an explanation to our finding.

In conclusion, although the incidence of TB in Rio Grande do Sul State is high, the rate of active transmission of MDR TB appears to be low, once MDR TB was essentially associated with treatment failures. To avoid the increase of MDR TB it will be necessary to ensure that all patients are diagnosed and effectively treated so that the strains do not develop resistance and are not transmitted in the community. Introduction and expansion of DOTS could improve the TB control program in many, if not all aspects, decreasing TB transmission, risk of drug resistance emergence, patient's treatment failure, TB relapse and death.

Acknowledgment

We thank Dr Sidia Maria Callegari Jacques for the assistance with statistical analyses. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Instituto do Milênio – Ministério de Ciência e Tecnologia.

References

1. **Barroso, E. C., Mota, R. M. S., Santos, R. O., Sousa, A. L. O., Barroso, J. B., Rodrigues, J. L. N.** 2003. Risk Factors for Acquired Multidrug-Resistant Tuberculosis. *J. Penumol* 29:89-97.
2. **Brasil. Ministério da Saúde.** 2004. II Diretrizes Brasileiras para a Tuberculose. *J Bras. Pneumol.* 30:supl 1.
3. **Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler Ht, Meissner G, Mitchison Da, Sula L.** 1963. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity And Resistance. *Bull World Health Organ.* 29:565-78.
4. **Coker RJ.** 2004. Review: multidrug-resistant tuberculosis: public health challenges. *Trop Med Int Health.* 9:25-40.
5. **Cox HS, Orozco JD, Male R, Ruesch-Gerdes S, Falzon D, Small I, Doshetov D, Kebede Y, Aziz M.** 2004. Multidrug-resistant tuberculosis in central Asia. *Emerg Infect Dis.* 10:865-72.
6. **Diel R, Niemann S.** 2003. Outcome of tuberculosis treatment in Hamburg: a survey, 1997-2001. *Int J Tuberc Lung Dis.* 7:124-31.
7. **Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG.** 2002. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis.* 15:1197-202
8. **Dye C, Williams BG.** 2000. Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci* 97:8180-5
9. **Espinal MA.** 2003. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis* 83:44-51.
10. **Ferdinand S, Sola C, Verdol B, Legrand E, Goh KS, Berchel M, Aubery A, Timothee M, Joseph P, Pape JW, Rastogi N.** 2003. Molecular

- characterization and drug resistance patterns of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in an AIDS counseling center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-year study. *J Clin Microbiol.* 41:694-702.
11. **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.
 12. **Frieden TR, Woodley CL, Crawford JT, Lew D, Dooley SM.** 1996. The molecular epidemiology of tuberculosis in New York City: the importance of nosocomial transmission and laboratory error. *Tuber Lung Dis.* 77:407-13.
 13. **Gledovic Z, Jovanovic M, Pekmezovic T.** 2000. Tuberculosis trends in Central Serbia in the period 1956-1996. *Int J Tuberc Lung Dis.* 4:32-5.
 14. **Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, Le Pendeven C, Le Pennec MP, Mathieu D, Offredo C, Pangon 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.* 36:486-92.
 15. **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.* 35:907-14.
 16. **Mistry NF, Iyer AM, D'souza DT, Taylor GM, Young DB, Antia NH.** 2002. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from multiple-drug-resistant tuberculosis patients from Bombay, India. *J Clin Microbiol.* 40:2677-80.

17. **Moro, M. L., Salamina, G., Gori, A., Penati, V., Sacchetti, R., Mezzetti, F., Infuso, A., Sodano L.** 2002. Two-year population-based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Milan, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21:114-22.
18. **Mukherjee JS, Rich ML, Socci AR, Joseph JK, Viru FA, Shin SS, Furin JJ, Becerra MC, Barry DJ, Kim JY, Bayona J, Farmer P, Smith Fawzi MC, Seung KJ.** 2004. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Lancet.* 2004 7:474-81.
19. **Munsiff SS, Bassoff T, Nivin B, Li J, Sharma A, Bifani P, Mathema B, Driscoll J, Kreiswirth BN.** 2002. Molecular epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerg Infect Dis.* 8:1230-8.
20. **Narayanan, S., S. Das, R. Garg, L. Hari, V. B. Rao, T. R. Frieden, and P. R. Narayanan.** 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in south India: implications for disease control and prevention. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4785-4788.
21. **Niemann S, Rusch-Gerdes S, Richter E.** 1997. IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol.* 35:3015-20.
22. **Niemann S, Rusch-Gerdes S, Richter E.** 1997. IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol.* 35:3015-20.
23. **Park, Y. K., Bai G. H. & Kim, S. J.** 2000. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Countries in the Western Pacific Region. *J. Clin. Microbiol.* 38:191-197.
24. **Post FA, Willcox PA, Mathema B, Steyn LM, Shean K, Ramaswamy SV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN, Kaplan G.** 2004. Genetic

- polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis. J Infect Dis. 190:99-106
25. **Quitugua TN, Seaworth BJ, Weis SE, Taylor JP, Gillette JS, Rosas II, Jost Jr KC Jr, Magee DM, Cox RA.** 2002. Transmission of drug-resistant tuberculosis in Texas and Mexico. J Clin Microbiol. 40:2716-24.
26. **Schoenborn, C.A.** 2004. **Marital Status and Health: United States, 1999–2002.** Advance Data From Vital and Health Statistics. 351:1-36. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics
27. **Siddiqi N, Shamim M, Hussain S, Choudhary RK, Ahmed N, Prachee, Banerjee S, Savithri GR, Alam M, Pathak N, Amin A, Hanief M, Katoch VM, Sharma SK, Hasnain SE.** 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in North India. Antimicrob Agents Chemother. 46:443-50.
28. **Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Rossetti ML, Zaha A, Barroso EW, Barreto AM, Campos E, van Soolingen D, Kremer K, Heersma H, Degraeve WM.** 2000. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. Res Microbiol. 151:343-51
29. **Toungoussova OS, Sandven P, Mariandyshev AO, Nizovtseva NI, Bjune G, Caugant DA.** 2002. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. J Clin Microbiol. 40:1930-7.
30. **van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 31:406-9.

31. **Vukovic D, Rusch-Gerdes S, Savic B, Niemann S.** 2003. Molecular epidemiology of pulmonary tuberculosis in Belgrade, Central Serbia. *J Clin Microbiol.*41:4372-7.
32. **Weis SE, Slocum PC, Blais FX, King B, Nunn M, Matney GB, Gomez E, Foresman BH.** 1994. The effect of directly observed therapy on the rates of drug resistance and relapse in tuberculosis. *N Engl J Med.* 28:1179-84.
33. **World Health Organization Communicable Disease.** 1997. WHO Global Tuberculosis Programme, Geneva. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
34. **World Health Organization Communicable Disease.** WHO Report 2001, Global Tuberculosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
35. **World Health Organization Communicable Disease.** WHO Report 2003, Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Table 1. Drug resistance patterns presented by the *M. tuberculosis* isolates (n = 393).

Resistance patterns	Number of isolates/pattern	Percentage
One drug	81 isolates: 76 INH ^R 03 SM ^R 02 RMP ^R	20,6%
Two drugs	76 isolates: 61 INH ^R + RMP ^R 08 INH ^R + SM ^R 05 INH ^R + EMB ^R 01 INH ^R + PZA ^R 01 INH ^R + ETH ^R	19,3%
Three drugs	19 isolates: 09 INH ^R + RMP ^R + SM ^R 05 INH ^R + RMP ^R + PZA ^R 03 INH ^R + RMP ^R + EMB ^R 01 INH ^R + EMB ^R + SM ^R 01 INH ^R + PZA ^R + SM ^R	4,8%
Four drugs	07 isolates: 04 INH ^R + RMP ^R + SM ^R + PZA ^R 02 INH ^R + RMP ^R + EMB ^R + PZA ^R 01 INH ^R + RMP ^R + EMB ^R + SM ^R	1,8%

Table 2. Characteristics of case and control patients based on cluster or non-cluster.

Characteristic	Total (n = 262)	Case Clustered (n = 23)	Control Clustered (n = 66)	Case Nonclustered (n = 37)	Control Nonclustered (n = 136)	P value
Male sex	186	18	53	23	92	0.138
Race						0.504
White	182	16	48	28	90	
Nonwhite	61	05	16	07	33	
Unknown	19	02	02	02	13	
Age in years						0.202
<19	73	06	20	07	40	
20-39	126	14	26	19	67	
40-59	59	03	20	11	25	
>60	02	-	-	-	02	
Unknown	02	-	-	-	02	
Marital status						0.038
Unmarried	93	12	22	16	43	
Married	64	03	07	16	38	
Unknown	105	08	37	05	55	
Previous TB treatment						< 0.001
Yes	121	20	18	32	51	
No	134	02	46	04	82	
Unknown	07	01	02	01	03	
Failure in TB treatment						< 0.001
Yes	45	09	03	17	16	
No	175	08	57	09	101	
Unknown	42	06	06	11	19	
BCG						0.893
Yes	81	04	22	06	49	
No	109	07	33	09	60	
Unknown	72	12	11	22	27	
HIV status						0.032
Positive	41	04	09	02	26	
Negative	86	11	13	22	40	
Unknown	135	09	44	12	70	

Table 3: Clustering proportion according to marital status and age range.

Age range	Unmarried (n= 93)		Married (n= 64)		<i>P</i> value
	Cluster (%)	Non-cluster (%)	Cluster (%)	Non-cluster (%)	
0-39	29 (36)	52 (64)	7 (16)	37 (84)	0.03
40-79	5 (42)	7 (58)	3 (15)	17 (85)	0.11

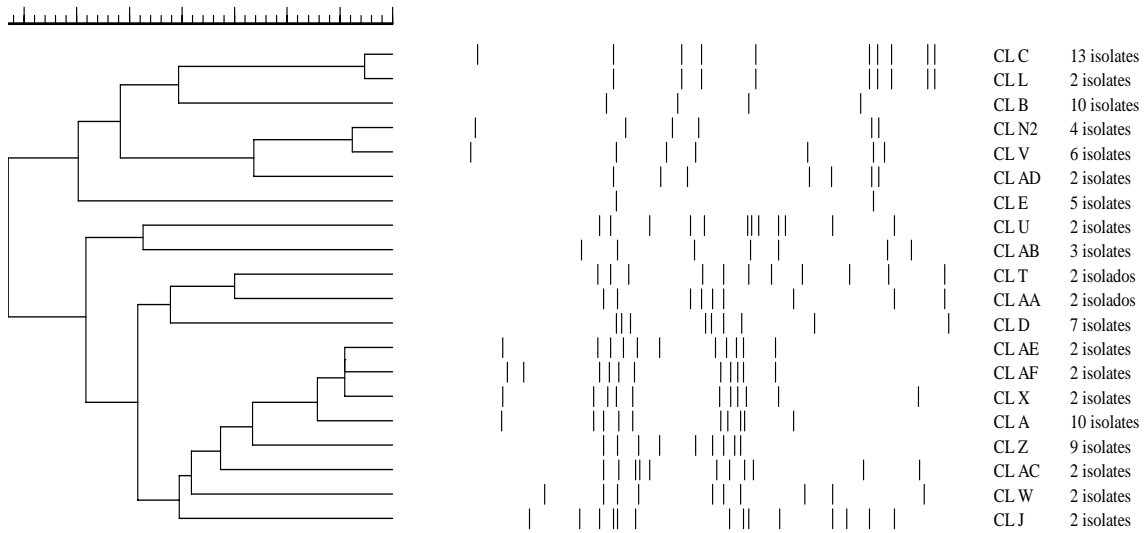


Figure 1. Dendrogram showing the clustered IS6110 RFLP patterns of MDR and susceptible isolates of *M. tuberculosis* from patients of Rio Grande do Sul State. CL = cluster name. Clusters in bold contain both MDR and sensitive isolates. * Only in cluster J the isolates were both MDR.

Apêndice 2. Curriculum Vitae – CNPq

Janeiro/2006

Dados Pessoais

Nome Andréia Rosane de Moura Valim

Nascimento 01/01/1973 - Santo Augusto/RS - Brasil

CPF 61567671004

Formação Acadêmica/Titulação

- 2001 Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Análise Epidemiológica de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiplos fármacos
Orientador: Arnaldo Zaha
- 1998 - Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica).
2000 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Alterações Genéticas Relacionadas com a Resistência à Rifampicina em *Mycobacterium tuberculosis*, Ano de obtenção: 2000
Orientador: Arnaldo Zaha
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1997 - Especialização em Análises Clínicas.
1999 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 1991 - Graduação em Farmácia Bioquímica.
1997 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
-

Formação complementar

- 2000 - Curso de curta duração em Análise Computacional de Homologias e Análise Filo.
2000 Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio De Janeiro, Brasil, Ano de obtenção: não
- 2001 - Curso de curta duração em Estatística Aplicada a Epidemiologia.
2001 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2002 - Curso de curta duração em II Curso Nacional de Epidemiologia Molecular
2002 Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-BA, Brasil
- 2002 - Curso de curta duração em Atualização Profissional Millipore.
2002 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
-

Atuação Profissional

1. Farmácia de Manipulação Fitonfarma - FMF

Vínculo institucional

1996 - 1997 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime : Parcial

Atividades

7/1996 - 10/1996

Estágio

Estágio

1. Estágio Curricular em farmácia de manipulação para a obtenção do título de Farmacêutico, 260 horas.

2. Hospital de Pronto Socorro - HPS

Vínculo institucional

1998 - 1999 Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime : Parcial

Atividades

9/1998 - 2/1999

Extensão Universitária, Laboratório de Análises Clínicas

Especificação

1. Participou da coleta de amostras de sangue, na determinação das Análises Bioquímicas, na preparação de lâminas para a hematologia incluindo leitura, na determinação de hematócritos, hemoglobina e provas da coagulação, na determinação de gasometrias e na urinálise.

3. Laboratório Central do Estado do RS - LACEN

Vínculo institucional

1997 - 1998 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Bolsista , Carga horária: 20, Regime : Parcial

2000 -

Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Pesquisadora , Carga horária: 40, Regime : Integral

Atividades

8/1997 - 2/1998

Pesquisa e Desenvolvimento, Setor de Técnicas Especiais

Linhas de Pesquisa

1. Desenvolvimento de metodologias para a caracterização de linhagens de M. tuberculosis
2. Atenção Farmacêutica
3. Epidemiologia Molecular de doenças infecciosas

4. **Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC**

Vínculo institucional

2002 - Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 40, Regime : Integral

Atividades

03/2002 - Atual

Graduação

1. Microbiologia dos Alimentos
2. Bioquímica Geral
3. Bioquímica 1
4. Farmacologia
5. Bioquímica 4
6. Bioquímica 3

03/2004 - Atual

Direção e Administração, Departamento de Biologia, Curso de Farmácia

Cargos Ocupados

1. Coordenador de Curso

6. **University Of California Berkeley - UCB**

Vínculo institucional

1999 - 1999 Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Pesquisador Visitante , Carga horária: 40, Regime : Dedicção Exclusiva

Atividades

8/1999 - 12/1999

Outra atividade técnico-científica, School Of Public Health

Especificação

1. Cursou as disciplinas de "Molecular Epidemiology" e "Methods in Epidemiology" na University of California Berkeley

8/1999 - 12/1999

Pesquisa e Desenvolvimento, School Of Public Health

Linhas de Pesquisa

1. No período participou do desenvolvimento de metodologia para a tipificação de *Mycobacterium tuberculosis* resistente à rifampicina e usando um método de tipagem molecular baseado em PCR para comparar com a metodologia padrão (RFLP).

Artigos completos publicados em periódicos

1. VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., CAFRONE, P. I., BORGES, M., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. Evaluation and Genotyping of Multidrug-Resistant Cases of Tuberculosis in Southern Brazil. Submetido à publicação no *Microbiol Drugs Resistance*.

2. CAFRUNE, P. I., RILEY, L. W., POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

Recent Transmission of Tuberculosis Involving Retired Patients. *Journal of Infection*. No prelo. , 2006.

3. BORGES, M., CAFRUNE, P. I., VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R.

Análise molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de um centro de saúde ambulatorial em Porto Alegre, (RS). *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. São Paulo: , v.30, n.4, p.358 - 364, 2004.

4. SILVA, M. S. N., SENNA, S. G., VALIM, A. R. M., KRITSKI, A., COOKSEY, R., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R. Mutations in katG, inhA and ahpC genes of Isoniazid Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* From Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. Washington. v.41, n.09, p.4471 - 4474, 2003.

5. OLIVEIRA, M. M., ROCHA, A. S., VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., SUFFYS, P. Rapid detection of resistance against rifampicin in isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Brazilian patients using a reverse-phase hybridization assay. *Journal of Microbiological Methods*. , v.53, n.03, p.335 - 342, 2003.

6. ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., SILVA, M. S. N., RODRIGUES, V. F. S. TUBERCULOSE RESISTENTE: UMA REVISÃO MOLECULAR. *Revista de Saúde Pública*. São Paulo: , v.36, p.525 - 532, 2002.

7. VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., RIBEIRO, M. O., ZAHA, A. Mutations in the rpoB gene of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. USA: , v.38, n.8, p.3119 - 3122, 2000.

8. ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., RODRIGUES, V. F. S., ZAHA, A., OLIVEIRA, H., JARDIM, S. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by Sephaglas. *J Microbiol Methods*. USA: , v.28, p.139 - 146, 1997.

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

1. WERNER, V, HELFER, A. P., FRANCO, J. A., SILVA, A. G., VALIM, A. R. M.

A participação do farmacêutico em Equipe Multiprofissional na Atenção de Pacientes Portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica In: Farmapolis -13ª edição: V Encontro de Farmacêuticos do Mercosul, I Seminário da Cadeia Produtiva do Medicamento, 2005, Joinville. **Livro de Resumo do Farmapolis -13ª edição: V Encontro de Farmacêuticos do Mercosul, I Seminário da Cadeia Produtiva do Medicamento.** , 2005.

2. WERNER, V, HELFER, A. P., SILVA, A. G., VALIM, A. R. M.

Aplicação da Metodologia Dader de Seguimento Farmacoterapêutico na Atenção Farmacêutica In: XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2005, Santa Cruz do Sul. **XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão 2005.** , 2005.

3. HELFER, A. P., Werner, V, SILVA, A. G., VALIM, A. R. M.

Atenção Farmacêutica à Pacientes Portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) In: Farmapolis -13ª edição: V Encontro de Farmacêuticos do Mercosul, I Seminário da Cadeia Produtiva do Medicamento, 2005, Joinville. **Livro de Resumo do Farmapolis -13ª edição: V Encontro de Farmacêuticos do Mercosul, I Seminário da Cadeia Produtiva do Medicamento.** , 2005.

4. HELFER, A. P., Werner, V, VALIM, A. R. M.

Atenção Farmacêutica na Prevenção e Resolução de Problemas relacionados com medicamentos em Pacientes Portadores de Doença Pulmonar Obsrtutiva Crônica In: XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão 2005, 2005, Santa Cruz do Sul. **XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão 2005.** , 2005.

5. ORTIZ, F., LEUSIN, P. A. P., VALIM, A. R. M.

Atualização Bibliográfica sobre a Ação Hipolipêmica das Estatinas In: XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2005, Santa Cruz do Sul. **XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão 2005.** , 2005.

6. TEICHMANN, A., RENNER, J. D., AGRA, H., ROCHA, M. P., VALIM, A. R. M.

Caracterização de Isolados de *Escherichia coli* uropatogênicos obtidos de pacientes ambulatoriais e hospitalizados In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos - SP. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia.** , 2005.

7. TEICHMANN, A., VALIM, A. R. M.

Padronização de Metodologia para Extração e Amplificação de DNA de *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) In: XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2005, Santa Cruz do Sul. **XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão.** , 2005.

8. HELFER, A. P., FRANCO, J. A., SILVA, A. G., VALIM, A. R. M.

Pharmaceutical Care (PC) for Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) In: 5th International Congress Of Pharmaceutical Sciences, 2005, Riberão Preto - SP. **Abstract Book of 5th International Congress Of Pharmaceutical Sciences.** , 2005.

9. KIST, L. W., SEEGER, B. M., KAUFFMANN, C., BENITEZ, L. B., VALIM, A. R. M.

Proposta de Atenção Farmacêutica à Pacientes Diabéticos Atendidos no Serviço Integrado de Saúde (SIS) da Universidade de Santa Cruz do Sul In: Farmapolis -13ª edição: V Encontro de Farmacêuticos do Mercosul, I Seminário da Cadeia Produtiva do Medicamento, 2005, Joinville - SC. **Livro de Resumos do Farmapolis -13ª edição: V Encontro de Farmacêuticos do Mercosul, I Seminário da Cadeia Produtiva do Medicamento.** , 2005.

10. QUEIROZ, A. L., VECHIETTI, C. F., VALIM, A. R. M.

Revisão Bibliográfica sobre a Fluoxetina In: PHARMA RS, 2005, Caxias do Sul. **Revista da Associação dos Farmacêuticos do Estado do Rio Grande do Sul.** , 2005. v.21.

11. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from previously treated patients from the metropolitan Region of Porto Alegre In: I Encontro Nacional de tuberculose, 2004, Brasília., 2004, Brasília. **Livro de resumos do I Encontro Nacional de Tuberculose.** , 2004.

12. VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., CAFRUNE, P. I., BORGES, M., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

Characterization of multi-drug-resistant tuberculosis in Rio Grande do Sul satate by a case-control study In: I Encontro Nacional de Tuberculose, 2004, Brasília. **Anais do I Encontro Nacional de Tuberculose.** , 2004.

13. VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., CAFRUNE, P. I., BORGES, M., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

Characterization of multi-drug-resistant tuberculosis in Rio Grande do Sul State by a case-control study
In: I Encontro Nacional de Tuberculose, 2004, Brasília. **Livro de resumos do evento.** , 2004.

14. VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., CAFRUNE, P. I., BORGES, M., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

Estudo Epidemiológico das linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* Resistentes a Múltiplos Fármacos In: 2ª Jornada Científica FEPPS, 2004, Porto Alegre. **Livro de Resumos da 2ª Jornada Científica FEPPS.** , 2004.

15. VALIM, A. R. M., ROCHA, G. A.

Os efeitos dos antiinflamatórios não esteroidais em pacientes idosos no Asilo São Vicente, Rio Pardo - RS In: X Seminário de Iniciação Científica e IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNISC, 2004, Santa Cruz do Sul. **Anais 2004 - X Seminário de Iniciação Científica e IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNISC.** , 2004.

16. VALIM, A. R. M., HORTA, J. A., THOMASI, H., FERRUGEM, F.

Prevalência de Hiperuricemia em pacientes ambulatoriais na região de Santa Cruz do Sul - RS In: XXXI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e IV Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, 2004, Salvador - Bahia. **Livro de Resumos do XXXI Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e IV Congresso Brasileiro de Citologia Clínica.** , 2004.

17. VALIM, A. R. M., HELFER, A. P., FRANCO, J. A.

Revisão Bibliográfica sobre atenção farmacêutica para pacientes com doenças pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) In: X Seminário de Iniciação Científica e IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNISC, 2004, Santa Cruz do Sul. **Resumos : X Seminário de Iniciação Científica e IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNISC.** , 2004.

18. VALIM, A. R. M., HELFER, A. P., FRANCO, J. A.

Revisão Bibliográfica sobre terapia farmacológica na doença pulmonar obstrutiva crônica In: X Seminário de Iniciação Científica e IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNISC, 2004, Santa Cruz do Sul. **Livro de Resumos X Seminário de Iniciação Científica e IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNISC.** , 2004.

19. VALIM, A. R. M., SOUZA, J. S.

Revisão Bibliográfica sobre Terapia Farmacológica utilizada no Tratamento da Gota In: 12º Farmapólis, 2004, Florianópolis. **Livro de resumos do 12º Farmapólis.** , 2004.

20. BORGES, M., POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R.

Study of *Mycobacterium tuberculosis* isolates viability after freezing at -20 C In: I Encontro Nacional de tuberculose, 2004, 2004, Brasília. **I Encontro Nacional de tuberculose, 2004.** , 2004.

21. VALIM, A. R. M., ZAHA, A., POSSUELO, L. G., CAFRUNE, P. I., BORGES, M., ROSSETTI, M. L. R.

Tuberculose Resistente a Múltiplos Fármacos no Estado do Rio Grande do Sul In: IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2004, Porto Alegre. **Livro de resumos do PPGBCM.** , 2004.

22. SOUZA, J. S., THOMASI, H., VALIM, A. R. M.

Atualização sobre tratamento e patologia da gota In: IX Seminário de Iniciação Científica e VIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2003, Santa Cruz do Sul. **CD de resumos do evento.** , 2003.

23. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

Classical and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from the Metropolitan Region of Porto Alegre - Brazil In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, Florianópolis.

Livro de resumos. , 2003.

24. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* by RFLP isolates from Porto Alegre In: 103rd ASM General Meeting, 2003, Washington. **103rd ASM General Meeting.** , 2003.

25. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

GENOTYPING OF *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATES FROM METROPOLITAN REGION OF PORTO ALEGRE – BRAZIL In: 103rd ASM General Meeting, 2003, Washington. **Proceedings of 103rd ASM General Meeting.** , 2003.

26. CAFRUNE, P. I., POSSUELO, L. G., BORGES, M., VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

GENOTYPING OF *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATES FROM RIO GRANDE DO SUL STATE, BRAZIL, USING RFLP AND SPOLIGOTYPING In: 103rd ASM General Meeting, 2003, Washington. **Proceedings of 103rd ASM General Meeting.** , 2003.

27. CAFRUNE, P. I., POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A., RILEY, L. W.

GENOTYPING OF *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS ISOLATED FROM RIO GRANDE DO SUL STATE, BRAZIL In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003, Caxambu. **Livro de Resumos do XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** , 2003.

28. BORGES, M., CAFRUNE, P. I., POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY APPLIED TO A SINGLE PUBLIC HEALTH CARE FACILITY OF TUBERCULOSIS In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003, Caxambu. **Publicado no livro de resumos da SBBq.** , 2003.

29. VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS BY CASE-CONTROL STUDY, RIO GRANDE DO SUL STATE, BRAZIL In: 103rd American Society of Microbiology General Meeting, 2003, Washington. **Proceedings of 103rd American Society of Microbiology General Meeting.** , 2003.

30. THOMASI, H., SOUZA, J. S., VALIM, A. R. M., HORTA, J. A. Prevalência de Hiperuricemia em Pacientes Ambulatoriais na Região de Santa Cruz do Sul In: IX Seminário de Iniciação Científica VIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão - UNISC, 2003, Santa Cruz do Sul. **Cd de resumos do evento.** , 2003.

31. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., CAFRUNE, P. I., BORGES, M., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003, Caxambu. **Livro de Resumos do XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** , 2003.

32. BORGES, M., POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R. ANÁLISE COMPARATIVA DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* PROVINDOS DE UM CENTRO DE SAÚDE AMBULATORIAL E UM HOSPITAL ESPECIALIZADO PARA TRATAMENTO DA TUBERCULOSE In: 48º Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia. **Livro de resumos do 48º Congresso Nacional de Genética**. , 2002.

33. BORGES, M., VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., ROSSETTI, M. L. R. ANÁLISE MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Mycobacterium tuberculosis* PELA TÉCNICA DE RFLP In: *I Semana de Estudos Avançados em Cardiologia e do VI Salão de Iniciação Científica do IC-FUC Instituto de Cardiologia., 2002, Porto Alegre. **Livro de resumos do I Semana de Estudos Avançados em Cardiologia e do VI Salão de Iniciação Científica do IC-FUC Instituto de Cardiologia**. , 2002.

34. VALIM, A. R. M., ZAHA, A., POSSUELO, L. G., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTES A MÚLTIPLOS FÁRMACOS OBTIDOS DE PACIENTES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL In: VIII Seminário de Iniciação Científica e VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2002, Santa Cruz do Sul. **CD com os resumos do VIII Seminário de Iniciação Científica e VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**. , 2002.

35. VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. CHARACTERIZATION OF MULTIDRUG-RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis* BY RFLP OBTAINED FROM PATIENTS OF DIFFERENT PLACES OF RIO GRANDE DO SUL STATE, BRAZIL In: Third European Congress on Tropical Medicine and International Health, 2002, Lisboa. **Proceedings of Third European Congress on Tropical Medicine and International Health**. , 2002.

36. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE In: IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular-PPGBCM, 2002. **Livro de Resumos da IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular-PPGBCM**. , 2002.

37. BORGES, M., VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., ROSSETTI, M. L. R. EVALUATION OF *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATES FROM A PUBLIC HEALTH UNITY In: I Workshop da Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose. REDE-TB, 2002, Rio de Janeiro. **Anais do I Workshop da Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose. REDE-TB.** , 2002.
38. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. GENOTIPAGEM DE *Mycobacterium tuberculosis* POR RFLP EM AMOSTRAS ISOLADAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE In: VIII Seminário de Iniciação Científica e VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2002, Santa Crz do Sul. **CD com os resumos do VIII Seminário de Iniciação Científica e VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão.** , 2002.
39. BORGES, M., VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., ROSSETTI, M. L. R. GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* PROVINDOS DE UM CENTRO DE SAÚDE AMBULATORIAL In: VIII Seminário de Iniciação Científica e VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2002, Santa Cruz do Sul. **CD com os resumos do VIII Seminário de Iniciação Científica e VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão.** , 2002.
40. CAFRUNE, P. I., POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., Martha M de Oliveeira, ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DO RIO GRANDE DO SUL ATRAVÉS DE DIFERENTES TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR In: I Workshop da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, 2002, Porto Alegre. **Livro de Resumos do I Workshop da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.** , 2002.
41. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. GENOTYPING BY RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OF *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATED FROM METROPOLITAN REGION OF PORTO ALEGRE – BRAZIL In: 1st Annual Workshop of Brazilian Tuberculosis Research Network, 2002, Rio de Janeiro. **Anais do 1st Annual Workshop of Brazilian Tuberculosis Research Network.** , 2002.
42. VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. MOLECULAR ANALYSIS OF MULTIDRUG-RESISTANT *Mycobactrium tuberculosis* ISOLATES FROM RIO GRANDE DO SUL STATE BY IS6110 RESTERICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHIM In: I Workshop da Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose. REDE-TB, 2002,

Rio de Janeiro. **Anais do I Workshop da Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose. REDE-TB.** , 2002.

43. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. MOLECULAR EPIDEMIOLOGY STUDY OF ENDOGENOUS REACTIVATION OF *Mycobacterium tuberculosis* IN PORTO ALEGRE- BRAZIL In: Third European Congress on Tropical Medicine and International Health, 2002, Lisboa. **Proceedings of Third European Congress on Tropical Medicine and International Health.** , 2002.

44. ALMEIDA, D. V., VALIM, A. R. M., SPERHACHE, R. D., SENNA, S. G., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R. Padronização da PCR de um fragmento do gene rpoB a partir de amostras clínicas In: XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, 2002, Porto Alegre. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular.** , 2002.

45. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS OF *Mycobacterium tuberculosis* ISOLATED FROM PORTO ALEGRE – BRAZIL In: 33rd Iuatld World Conference On Lung Health & 3rd Stop Tb Dots Expansion Working Group Meeting, 2002, Montreal - Ca. **Proceedings of 33rd Iuatld World Conference On Lung Health & 3rd Stop Tb Dots Expansion Working Group Meeting.** , 2002.

46. VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., KAPPKE, F., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. ANALYSIS OF MULTIDRUG-RESISTANT *Mycobacterium tuberculosis* BY RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OBTAINED FROM PATIENTS OF A INSTITUTION SPECIALIZED IN TREAT RESISTANT TUBERCULOSIS In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia.** , 2001.

47. POSSUELO, L. G., BORGES, M., VALIM, A. R. M., SILVA, M. S. N., KAPPKE, F., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. CARACTERIZAÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RFLP EM ISOLADOS CIRCULANTES NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia.** , 2001.

48. CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., RIBEIRO, M. O., ZAHA, A. Comparison of RFLP and DRE-PCR with Regard to Discriminatory Power and Reproducibility of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Rio Grande do Sul State, Brazil In: 101ST ASM GENERAL MEETING MAY 20TH TO 24TH, 2001, 2001, Orlando-Flórida. <http://www.asmta.org/memonly/abstracts/abstractsearch.asp> , 2001.

49. BORGES, M., VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R. ESTUDO DA VIABILIDADE DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* APÓS SUA CONSERVAÇÃO À -20°C In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia** , 2001.

50. VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTES A MÚLTIPLOS FÁRMACOS. In: III Reunião Científica Anual do PPGBCM - CBIOT/ UFRGS, 2001, Porto Alegre. **Livro de Resumos da III Reunião Científica Anual do PPGBCM - CBIOT/ UFRGS** , 2001.

51. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. GENOTIPAGEM POR RFLP EM ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* OBTIDOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO ALEGRE In: III Reunião Científica Anual do PPGBCM - CBIOT/ UFRGS, 2001, Porto Alegre. **Livro de Resumos da III Reunião Científica Anual do PPGBCM - CBIOT/ UFRGS** , 2001.

52. CAFRUNE, P. I., VALIM, A. R. M., POSSUELO, L. G., BORGES, M., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. GENOTYPING OF *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS ISOLATED IN RIO GRANDE DO SUL STATE BY MOLECULAR TECHNIQUES In: * III Reunião Científica Anual do PPGBCM - CBIOT/ UFRGS, 2001, Porto Alegre. **Livro de Resumos da III Reunião Científica Anual do PPGBCM - CBIOT/ UFRGS** , 2001.

53. VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., RIBEIRO, M. O., SILVA, M. S. N., CAFRUNE, P. I., POSSUELO, L. G., SENNA, S. G., ZAHA, A. Relationship between rpoB Mutations and Typing by IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from three States of Brazil

In: 101ST ASM GENERAL MEETING MAY 20TH TO 24TH , 2001, 2001, Orlando - Flórida. **101ST ASM GENERAL MEETING MAY 20TH TO 24TH , 2001.** , 2001.

54. CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., JARDIM, S., SPERHACKE, R. D., VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R.

Análise comparativa das técnicas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e DRE-PCR (Double Repetitive Element-PCR) para a caracterização de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* In: IV Salão de Iniciação Científica - Instituto de cardiologia/Fundação Universitária cardiologia, 2000, Porto Alegre, RS. **Anais do IV Salão de Iniciação Científica do IC/FUC-CNPq.** , 2000.

55. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., CAFRUNE, P. I., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADAS EM DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL In: 1º Salão de Iniciação Científica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2000, Porto Alegre. **Livro de resumos do 1º Salão de Iniciação Científica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.** , 2000.

56. VALIM, A. R. M., CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., JARDIM, S., ROSSETTI, M. L. R., SPERHACKE, R. D., ZAHA, A.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE TECHNIQUES RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) AND DRE-PCR (DOUBLE- REPETITIVE- ELEMENT PCR) FOR THE CHARACTERIZATION OF *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS In: 20th Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2000, Porto Alegre. **Livro de Resumos da * 20th Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre..** , 2000.

57. POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS CIRCULATING IN RIO GRANDE DO SUL STATE In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2000, São Paulo. **Livro de Resumos Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP.** , 2000.

58. SENNA, S. G., SILVA, M. S. N., SPERHACKE, R. D., VALIM, A. R. M., RIBEIRO, M. O., ZAHA, A. Identificação de Mutações nos Genes katG, inhA, ahpC em *Mycobacterium tuberculosis* nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul In: IV Salão de Iniciação Científica - Instituto de cardiologia/Fundação Universitária cardiologia, 2000, Porto Alegre, RS. **Anais do IV Salão de Iniciação Científica do IC/FUC-CNPq.** , 2000.

59. CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., SPERHACKE, R. D., VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

IDENTIFICATION OF *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS THROUGH THE TECHNIQUES OF RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) AND DRE-PCR (DOUBLE-REPETITIVE- ELEMENT PCR): A COMPARISON In: XII Salão de Iniciação Científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000, Porto Alegre.

Livro de resumos XII Salão de Iniciação Científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 2000.

60. SILVA, M. S. N., SPERHACKE, R. D., OSÓRIO, B. M., VALIM, A. R. M., BAETHGEN, L. F., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R.

Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* genomic regions involved with isoniazid resistance In: xx Congresso Brasileiro de Microbiologia e VIII Simpósio em Micobactérias, 1999, Salvador, Ba.

Livro de resumos do evento., 1999.

61. VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., RIBEIRO, M. O., SILVA, M. S. N., ZAHA, A.

Analysis of rpoB gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Rio Grande do Sul, São Paulo, and Rio de Janeiro and fingerprinting by RFLP In: 45o. Congresso nacional de Genética, 1999, Gramado, RS. **Genetics and Molecular Biology.**, 1999. v.22.

62. CAFRUNE, P. I., RIBEIRO, M. O., SPERHACKE, R. D., VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

COMPARISON BETWEEN DOUBLE- REPETITIVE- ELEMENT PCR (DRE-PCR) AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) FOR IDENTIFICATION OF *Mycobacterium tuberculosis* STRAINS In: XI Salão de Iniciação Científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999, Porto Alegre.

Livro de Resumos XI Salão de Iniciação Científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 1999.

63. SILVA, M. S. N., SPERHACKE, R. D., OSÓRIO, B. M., VALIM, A. R. M., RIBEIRO, M. O., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R.

Molecular Analysis of katG gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* In: 45o congresso Nacional de Genética, 1999, Gramado, Rs. **Genetics and Molecular Biology.**, 1999. v.22.

64. VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., RIBEIRO, M. O., SILVA, M. S. N., ZAHA, A.

Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil In: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia e VIII Simpósio em Micobactérias, 1999, Salvador, Ba. **Livro de Resumo do evento.** , 1999.

65. OSÓRIO, B. M., ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., BAETHGEN, L. F., SILVA, M. S. N., SPERHACKE, R. D., RODRIGUES, V. F. S., RIBEIRO, M. O., JARDIM, S., ZAHA, A.
Análise do diagnóstico de tuberculose por PCR In: Salão de Iniciação Científica do IC/FUC, 1998, Porto Alegre. **Livro de resumos do evento.** , 1998.

66. ROSSETTI, M. L. R., SILVA, M. S. N., SPERHACKE, R. D., VALIM, A. R. M., RODRIGUES, V. F. S., BAETHGEN, L. F., OSÓRIO, B. M., JARDIM, S., ZAHA, A.
Analyse on PCR diagnosing tuberculosis in the public health laboratory from a country whit high prevalence In: Global Congress on Lung Health 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1998, Bangkok, Tailândia. **Abstract Book.** , 1998.

67. SILVA, M. S. N., SPERHACKE, R. D., RIBEIRO, M. O., VALIM, A. R. M., OSÓRIO, B. M., JARDIM, S., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R.
Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to isoniazid In: Global Congress on Lung Health 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1998, Bangkok, Tailândia. **Abstract Book.** , 1998.

68. RODRIGUES, V. F. S., BAETHGEN, L. F., OSÓRIO, B. M., VALIM, A. R. M., RIBEIRO, M. O., JARDIM, S., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.
Detecção de *Mycobacterium avium* em soros de pacientes HIV positivos por PCR In: Salão de Iniciação Científica do Instituto do Coração/ Fundação Universatária Cardiologia, 1998, Porto Alegre, RS. **Livro de resumos do evento.** , 1998.

69. RODRIGUES, V. F. S., BAETHGEN, L. F., VALIM, A. R. M., OSÓRIO, B. M., RIBEIRO, M. O., JARDIM, S., ZAHA, A.
Detection of *Mycobacterium avium* infections in serum of AIDS patients by polymerase chain reaction In: Global Congress on Lung Health 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1998, Bangkok, Tailândia. **Abstract Book.** , 1998.

70. RODRIGUES, V. F. S., ROSSETTI, M. L. R., BAETHGEN, L. F., VALIM, A. R. M., OSÓRIO, B. M., JARDIM, S., ZAHA, A.

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* infections in serun of AIDS patients by polymerase chain reaction In: XXVII Reunião Anual da SBBq, 1998, Caxambu, MG. **Livro de Anais do Evento.** , 1998.

71. BAETHGEN, L. F., SILVA, M. S. N., ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., OSÓRIO, B. M., SPERHACKE, R. D., KAPPKE, F., ZAHA, A.

Diagnóstico de meningite bacteriana por PCR In: Salão de Iniciação Científica do Instituto do Coração/ Fundação Universitária Cardiologia, 1998, Porto Alegre, RS. **Livro de resumos do evento.** , 1998.

72. VALIM, A. R. M., RIBEIRO, M. O., SILVA, M. S. N., SPERHACKE, R. D., ZAHA, A. Genetic Characterization of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Rio Grande do Sul State In: Global Congress on Lung Health 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1998, Bangkok, Tailândia. **Abstract Book.** , 1998.

73. VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., RIBEIRO, M. O., RODRIGUES, V. F. S., BAETHGEN, L. F., ZAHA, A.

Genetic characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Rio Grande do Sul State In: XXVII Reunião Anual da SBBq, 1998, Caxambu, MG. **Livro de Anais do evento.** , 1998.

74. BAETHGEN, L. F., OSÓRIO, B. M., VALIM, A. R. M., SILVA, M. S. N., SPERHACKE, R. D., RODRIGUES, V. F. S., RIBEIRO, M. O., ROSSETTI, M. L. R.

Análise do diagnóstico de tuberculosis por PCR In: IX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 1997, Porto Alegre. **Livro de resumos do congresso.** , 1997.

75. VALIM, A. R. M., RIBEIRO, M. O., RODRIGUES, V. F. S., ZAHA, A., ROSSETTI, M. L. R. Análise do gene rpoB em amostras de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à rifampicina isoladas no Rio Grande do Sul In: XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia e VII Simpósio Brasileiro em micobactérias, 1997, Rio de Janeiro, RJ. **Livro de resumos do evento.** , 1997.

76. BAETHGEN, L. F., VALIM, A. R. M., OSÓRIO, B. M., RODRIGUES, V. F. S., RIBEIRO, M. O., JARDIM, S., ROSSETTI, M. L. R.

Detecção de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR em soro de paciente com tuberculose In: XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia e VII Simpósio Brasileiro em Micobactérias, 1997, Rio de Janeiro. **Livro de resumos do evento.** , 1997.

77. RODRIGUES, V. F. S., ROSSETTI, M. L. R., BAETHGEN, L. F., VALIM, A. R. M., RIBEIRO, M. O., JARDIM, S., ZAHA, A.

Detecção de *Mycobacterium avium* por PCR em soro de pacientes HIV positivos In: IX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 1997, Porto Alegre, RS. **Livro de Resumos do evento.** , 1997.

78. VALIM, A. R. M., BAETHGEN, L. F., ROSSETTI, M. L. R., JARDIM, S., RIBEIRO, M. O., RODRIGUES, V. F. S., ZAHA, A.

Análise de polimorfismo em amostras de *Mycobacterium tuberculosis* através de RFLP In: VIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 1996, Porto Alegre, RS. **Livro de resumos do evento.** , 1996.

79. RODRIGUES, V. F. S., VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., JARDIM, S., ZAHA, A. Detecção de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR em soro de pacientes com tuberculose In: VIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 1996, Porto Alegre, RS. **Livro de resumos do congresso.** , 1996.

80. VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., JARDIM, S., ZAHA, A. Análise de polimorfismos em *Mycobacterium tuberculosis* por amplificação de regiões de DNA situadas entre os elementos de inserção IS6110 In: VI Simpósio de Micobactéria, 1995, Vitória, ES. **Livro de resumos do congresso.** , 1995.

81. VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., RODRIGUES, V. F. S., JARDIM, S., ZAHA, A. Caracterização de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando as técnicas de RFLP e PCR In: VII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 1995, Porto Alegre, RS. **Livro de resumos do congresso.** , 1995.

82. ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., ZAHA, A.

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples purified by sephaglass In: XXIV Reunião Anual da SBBq, 1995, Caxambu, MG. **Anais dos resumos apresentados no congresso.** , 1995.

83. ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., JARDIM, S., ZAHA, A.

Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using purified on sephaglas In: Conference on Global Lung Health and 1995 Annual Meeting of the IUATLD, 1995. **Livro dos resumos do congresso.** , 1995.

84. VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., JARDIM, S., ZAHA, A.

Clonagem e seqüenciamento de fragmentos de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos por PCR In: VI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 1994, Porto Alegre. **Livro dos resumos.** , 1994.

85. ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., JARDIM, S., SILVA, C. M. D., ZAHA, A.

Detecção e diferenciação de micobactérias por PCR utilizando primers específicos e aleatórios In: Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 1994, Salvador, Ba. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** . , 1994. v.27.

86. ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., ZAHA, A.

Detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em culturas por PCR In: XVII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1993, Santos, SP. **Livro de Resumos do Congresso** . , 1993.

87. ROSSETTI, M. L. R., VALIM, A. R. M., ZAHA, A.

Diferenças no DNA de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* detectadas por RAPD In: XVII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1993, Santos, SP. **Livro de resumos do congresso** . , 1993.

Trabalhos resumidos expandidos publicados em anais de evento

1. CAFRUNE, P. I., POSSUELO, L. G., VALIM, A. R. M., BORGES, M., RILEY, L. W., ROSSETTI, M. L. R., ZAHA, A.

Epidemiology of tuberculosis in Rio Grande do Sul state through fingerprinting analysis In: I Encontro Nacional de tuberculose, 2004, Brasília., 2004, Brasília. **Livro de resumos do I Encontro Nacional de Tuberculose**.. , 2004.

Outras produções técnicas

1. VALIM, A. R. M.

Coordenação da V Semana Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, 2005. (Outro, Organização de evento).

2. VALIM, A. R. M.

Coordenadora da IV Semana Acadêmica do Curso de Farmácia, 2004. (Outro, Organização de evento)

3. VALIM, A. R. M.

II Semana Acadêmica do Curso de Farmácia, 2002. (Outra,Apresentação de Trabalho)

4. VALIM, A. R. M., ROSSETTI, M. L. R., SPERHACKE, R. D., SILVA, M. S. N., SILVA, C. M. D.
Biologia Molecular Aplicada à Área da Saúde, 1999. (Especialização,Curso de curta duração ministrado)

Orientações concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação Orientações concluídas

1. Jussara de Moreira. **A influência da Eritropoetina nos Parâmetros Bioquímicos e na Qualidade de Vida de Paicentes com Insuficiência Renal Crônica**. 2005. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

2. Luiza Wilges Kist. **Atenção Farmacêutica a Pacientes diabéticos atendidos no Serviço Integrado de Saúde (SIS) da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC)**. 2005. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

3. Alini Auler. **Atenção Farmacêutica ao Paciente Oncológico em Tratamento Quimioterápico Atendido no Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS**. 2005. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

4. Fabiana Cristina Geller. **Estudos Epidemiológicos da Evolução da Resistência Bacteriana em Isolados Clínicos de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de origem ambulatorial e hospitalar**. 2005. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

5. Caroline Moreira Sperb. **Padronização de um Método Genotípico para Diferenciação Intraespécie de Echerichia coli**. 2005. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

6. Vivian Scherer. **Perfil das Usuárias de Métodos Contraceptivos no Município de Vale Verde, Rio Grande do Sul.** 2005. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

 7. Gustavo Azambuja Rocha. **Efeitos Antiinflamatórios não esteroidais em pacientes idosos.** 2004. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

 8. Janaína Jardim Lopes. **Estudo das reações adversas relatadas por pacientes oncológicos atendidos no Hospital de Caridade e Benificiência de Cachoeira do Sul - RS.** 2004. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

 9. Luciana de Souza Nunes. **Estudo dos pacientes com infecção do trato urinário causada por *Escherichia coli* no município de Santa Cruz do Sul - RS.** 2004. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

 10. Débora Cristine Assmann. **Fármacos Anti-Hipertensivos: uma revisão bibliográfica e sua utilização por pacientes atendidos em uma farmácia comercial.** 2004. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul

 11. Aline Teixeira Dornelles. **Peril dos Pacientes com tuberculose no município de Venâncio Aires - RS nos anos de 2001 e 2003.** 2004. Curso (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul
-

Iniciação científica Orientações concluídas

1. Juciane Franco. **Atenção Farmacêutica ao Paciente Portador de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.** 2004. Iniciação científica (Farmácia) - Universidade de Santa Cruz do Sul
-