



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

THALES ALVES CAMPELO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DROGA RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA, CEARÁ

FORTALEZA

2018

THALES ALVES CAMPELO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DROGA RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA, CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: doenças infecto parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane Cunha Frota

Co-orientadora: Dra. Luana Nepomuceno Gondim Costa.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C196c Campelo, Thales Alves.
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE Mycobacterium tuberculosis
DROGA RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA, CEARÁ / Thales
Alves Campelo. – 2018.
102 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Cristiane Cunha Frota.

Coorientação: Prof. Dr. Luana Nepomuceno Gondim Costa.

1. TB. 2. TB droga resistente. 3. PCR multiplex. I. Título.

CDD 571.9

THALES ALVES CAMPELO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* DROGA RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERÊNCIA EM FORTALEZA, CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Doenças infecto parasitárias.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Cristiane Cunha Frota (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Karla Valéria Batista Lima
Instituto Evandro Chagas (IEC)

Prof. Dra. Danielle Malta Lima
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dra. Elizabeth Clara Barroso
Ambulatório de Tisologia do Hospital de Messejana

Aos meus pais, Maria Eurides Alves Campelo
e Francisco Wilton Almeida Campelo, pelo
amor e incentivo a mim sempre dados.
Obrigado pelo exemplo de vidas, superação e
dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, e por todas as oportunidades que Ele me tem concedido ao longo da minha existência.

À Professora Doutora Cristiane Frota, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade e paciência durante todo o meu período de pós-graduação. Obrigado pelos ensinamentos científicos compartilhados e por proporcionar um crescimento acadêmico e pessoal.

Aos meus colegas do Laboratório de Micobactérias da UFC, D.Socorro, Caroliny Soares Silva, Soraya de Oliveira Sancho, Gizele Almada e Thales Cândido da Silva que muito me auxiliaram nas análises de PCR molecular e na preparação do material de trabalho.

À equipe do laboratório de microbiologia do Hospital de Messejana que sempre se mostraram solícitos em ajudar nas pesquisas.

À minha família, especialmente aos meus pais, por terem me educado, transmitido bons valores, por se fazerem presentes e serem meu alicerce. Obrigado pela compreensão e por me incentivarem

As professoras Karla Valéria Batista Lima, Danielle Malta Lima e Elizabeth Clara Barroso que aceitaram o convite de participação na banca e por colaborarem para o engrandecimento do trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado pela amizade, reflexões, críticas e sugestões durante todo o curso, especialmente Pricila Dourado.

À Doutora Luana Nepomuceno, pesquisadora do Instituto Evandro Chagas, por ter colaborado com as análises de Sequenciamento desse estudo.

Agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão dessa etapa.

“É preciso força pra sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê” (Los
Hermanos).

RESUMO

A doença tuberculose (TB) é altamente infecciosa, é causada pelo o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo estimado que um quarto da população mundial esteja infectada. O Brasil está incluído entre os vinte países responsáveis por 84% dos casos de TB. A TB multidroga resistente (MDR) é definida como a resistência à isoniazida (I) e rifampicina (R) e constitui um problema grave para o controle da TB. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2016 foi estimado que ocorreram 490.000 casos de TB-MDR, sendo que 4,1% dos casos novos de TB e 19% dos casos com história de tratamento prévio são TB-MDR. Também são descritas as resistências tipo TB-XDR (extensivamente resistente) e TB-TDR (totalmente droga resistente). Nesse contexto, o presente estudo avaliou e compreendeu as variáveis da frequência e da transmissão da TB e da TB-DR (droga resistente) relacionadas ao ambiente domiciliar e da comunidade. Foram identificadas mutações nos genes relacionados a resistência a rifampicina, isoniazida, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos através de técnicas moleculares e realizada a análise de georreferenciamento espacial dos casos na região metropolitana de Fortaleza. As 49 amostras isoladas foram divididas em dois grupos: o grupo caso constituído por indivíduos com bactérias resistência a três ou mais fármacos e o grupo controle, composto por pacientes com bactéria resistência até dois fármacos. Do total, tivemos 19 indivíduos no grupo caso e 30 indivíduos no grupo controle. Após a análise univariada foram encontradas as seguintes variáveis associada ao grupo dos casos: gênero masculino, 14/19 (73,7%; $p=0,0213$); diabetes 10/19 (52,6%; $p= 0,0017$); alcoolismo 14/19 (74%; $p= 0,0213$) e contatos domiciliares 13/19 (68,4%, $p= 0,0165$). Foi observado em um total de 49 amostras, uma frequência de 59 mutações pontuais. Destas, 36 estavam no códon 94 do gene *katG* códon 315, representando assim 92,0% (36/39). Na análise espacial foram observados agrupamentos de casos e controles, principalmente em áreas de baixa condição socioeconômica de Fortaleza.

Palavras-chave: TB. TB droga resistente. PCR multiplex

ABSTRACT

The tuberculosis (TB) disease is highly infectious, caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*, and it is estimated that a quarter of the world's population is infected. Brazil is among the 20 countries responsible for 84% of TB cases. Resistant multidrug TB (MDR) is defined as resistance to isoniazid (I) and rifampicin (R) and is a serious problem for TB control. According to the World Health Organization, in 2016 it was estimated that there were 490,000 cases of MDR-TB, with 4.1% of new TB cases and 19% of cases with a history of previous treatment being MDR-TB. Also described are resistors type TB-XDR (extensively resistant) and TB-TDR (totally drug resistant). The emergence of MDR-TB stresses the need for antimicrobial susceptibility testing, drug resistance surveillance, and case follow-up. In this context, the present study evaluated and understood the frequency and transmission variables of TB and DR-DR (resistant drug) related to home and community environment. Mutations were identified in genes related to resistance to rifampicin, isoniazid, fluoroquinolones, aminoglycosides through molecular techniques and spatial georeferencing analysis of the cases in the metropolitan region of Fortaleza. The 49 isolates were divided into two groups: the control group, composed of patients with resistance up to two drugs, and the group that was constituted by individuals with resistance to three or more drugs. Out of the total, we obtained 19 patients in the case group and 30 patients in the control group. In the control group there was a predominance of the female gender 60% (18/30) compared to the cases, 26.3% (5/19), the difference was statistically significant ($p = 0.0213$). In relation to comorbidities, the case group was statistically significant with a higher frequency of participants with diabetes, 52.6% (10/19), different from the control group, 52.6% (6/30; $p=0.017$). The presence of point mutations was observed in 39 samples. Out of these, 36 presented at codon 94 of the gene *katG* codon 315, thus representing 92.0% (36/39). In the spatial analysis, case and control groups were observed mainly in areas of low socioeconomic status of Fortaleza.

Keywords: TB. TB drug resistant. Multiplex PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Visualização de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) de amostras de escarro de pacientes com TB resistente.....	16
Figura 2	– Estimativa do número de casos novos de tuberculose referente ao ano de 2017.....	18
Figura 3	– Incidência de tuberculose no Brasil 1990-2017.....	19
Figura 4	– Casos novos e incidência de tuberculose por ano de diagnóstico no Ceará, período de 2013 a 2017.....	20
Figura 5	– Esquema da região 531 do gene <i>rpoB</i> amplificado por PCR multiplex..	26
Figura 6	– Fórmula para o cálculo de amostra em população finita.....	31
Figura 7	– Fluxograma de inclusão dos participantes do estudo.....	32
Figura 8	– Visualização dos bacilos de <i>M. tuberculosis</i>	33
Figura 9	– <i>Preparo da separação eletroforética para detecção de resistência dos genes <i>rpoB531</i>, <i>katG315</i>, <i>mabA-15</i>, <i>gyrA</i> e <i>rrs</i></i>	38
Figura 10	– Eletroforese em gel de agarose 1,5% com produtos de amplificação da região IS6110 de <i>M. tuberculosis</i>	47
Figura 11	– Eletroforese em gel de agarose 1,5% com produtos de amplificação do códon 531 do gene <i>rpoB</i> de <i>M. tuberculosis</i>	48
Figura 12	– Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de amplificação do códon 315 do gene <i>katG</i> de <i>M. tuberculosis</i>	49
Figura 13	– Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de amplificação do códon 15 do gene <i>mabA</i> de <i>M. tuberculosis</i>	49
Figura 14	– Eletroforese em gel de agarose 3% com produtos de amplificação do códon 94 do gene <i>gyrA</i> de <i>M. tuberculosis</i>	50
Figura 15	– Eletroforese em gel de agarose 3% com produtos de amplificação do códon 1401 do gene <i>rrs</i> de <i>M. tuberculosis</i>	50
Figura 16	– Eletroferograma da amostra 16, isolado clínico de <i>M. tuberculosis</i> evidenciando a qualidade do DNA.....	51

Figura 17 – Alinhamento de isolados de <i>M. tuberculosis</i> com a cepa padrão H37Rv quanto ao gene <i>gyrA</i>	51
Figura 18 – Distribuição geográfica dos casos e controles de tuberculose no ano de 2017, Fortaleza, Ceará.....	55
Figura 19 – Distribuição geográfica de casos e controles de tuberculose e densidade de Kernel georreferenciados no SINAN no ano de 2017, Fortaleza-Ceará.....	56
Figura 20 – Distribuição geográfica de casos e controles e notificações do SINAN de TB no ano de 2017, Fortaleza-Ceará.....	57
Figura 21 – Distribuição geográfica dos isolados de TB participantes do estudo e agrupamentos de TB notificados pelo SINAN no ano de 2017, Fortaleza-Ceará.....	58
Figura 22 – Distribuição geográfica das residências dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> participantes do estudo e dos isolados pelo SINAN em 2017, Fortaleza-Ceará.....	59
Figura 23 – Distribuição geográfica de casos, controles e isolados de TB resistentes no ano de 2017, Fortaleza –Ceará.....	60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Iniciadores para amplificação da região IS6110 de *M. tuberculosis*..... 35
- Tabela 2 - Iniciadores da técnica PCR-MAS para identificação das mutações em *M. tuberculosis*..... 36
- Tabela 3 - Iniciadores da técnica de sequenciamento genético para identificação das mutações em *M. tuberculosis*.....39
- Tabela 4 - Distribuição do perfil de resistência aos fármacos anti-tuberculose dos isolados de *M. tuberculosis* de 49 pacientes com tuberculose pulmonar atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a fevereiro de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil..... 41
- Tabela 5 - Associação entre as características sociodemográficas e o perfil de resistência realizado pelo sistema BACTEC MGIT 960 dos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil 43
- Tabela 6 - Fatores de riscos associados ao fenótipo de resistência obtido pelo sistema BACTEC MGIT 960 dos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil..... 44
- Tabela 7 - Aspectos clínicos apresentado pelos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil..... 45
- Tabela 8 - Análise do modelo de regressão logística dos fatores relacionados a resistência a três ou mais fármacos modelo logístico para modelar resistência aos fármacos..... 46
- Tabela 9 - Frequência das mutações nas regiões nucleotídicas dos genes *rpoB* (códon531), *katG* (códon 315), *mabA* (códon 15), *rrs* (códon 1401) e *gyrA* (códon 94) dos isolados de *M. tuberculosis* dos 41 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza,

Ceará-Brasil.....	48
Tabela 10 - Mutações observadas nos genes <i>mabA</i> , <i>rpoB</i> , <i>katG</i> , <i>rrs</i> e <i>gyrA</i> , e fenótipo de resistência e positividade ao PCR em isolados de <i>M. tuberculosis</i> resistentes aos fármacos, Fortaleza, Ceará.....	53
Tabela 11 - Tabela de contingência entre a positividade do BACTEC MGIT e o ensaio da PCR-MAS e o sequenciamento genético.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Aminoglicosídeo
Anti-TB	Anti-tuberculose
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistentes
C	Citosina
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ddNTP	didesoxinucleotídeos
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
E	Etambutol
FQ	Fluoroquinolona
G	Guanina
HM	Hospital de Messejana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
I	Isoniazida
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
LJ	Löwenstein-Jensen
radMS	Ministério da Saúde
MRN	Método da redução de nitrato
MNT	Micobactérias não tuberculosas
MGIT	Mycobacterial Growth Indicator Tube
NGS	Next-Generation Sequencing System
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR-MAS	Multiplex alelo específico
PZA	Pirazinamida
q-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
R	Rifampicina
SI	Sequência de Inserção
SINAN	Sistema de Informação de Agravos e Notificação
S	Estreptomicina
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
TB	Tuberculose

TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Resistente
TB-TDR	Tuberculose Totalmente Resistente
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Aspectos gerais da tuberculose.....	14
1.2	Gênero <i>Mycobacterium</i>	15
1.3	A espécie <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
1.4	Epidemiologia.....	17
1.4.1	<i>Tuberculose no Mundo</i>	17
1.4.2	<i>Tuberculose no Brasil</i>	18
1.4.3	<i>Tuberculose no Ceará</i>	19
1.5	Tratamento.....	20
1.6	Resistência	21
1.7	Aspectos moleculares associados a resistência.....	22
1.8	Diagnóstico Microbiológico	23
1.8.1	<i>Cultivo</i>	23
1.8.2	<i>Método da Redução de Nitrato</i>	23
1.8.3	<i>BACTEC 460 TB e BACTEC MGIT 960</i>	24
1.9	Métodos moleculares na detecção de resistência.....	24
1.9.1	<i>PCR em tempo Real</i>	24
1.9.2	<i>Gene Xpert™ MTB/Rif</i>	24
1.9.3	<i>PCR Multiplex Alelo específico</i>	25
1.9.4	<i>Sequenciamento genético</i>	26
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos.....	29
4	METODOLOGIA.....	30
4.1	Local de realização da pesquisa.....	30
4.2	Critérios de inclusão.....	30
4.3	Critérios de exclusão.....	30
4.4	Definição de casos e controles.....	30
4.5	Cálculo para o tamanho da amostra.....	31
4.6	Cultivo primário e teste de sensibilidade a drogas antimicrobianas	31

4.7	Aspectos éticos.....	33
4.8	Cultivo secundário	33
4.9	Baciloscopia	33
4.10	Extração do DNA genômico.....	33
4.11	Identificação de <i>M. tuberculosis</i> pela amplificação de IS6110.....	34
4.12	Identificação das mutações nos genes <i>rpoB531</i> , <i>katG315</i> , <i>mabA-15</i> , <i>gyrA</i> e <i>rrs</i>	36
4.12.1	Condições PCR–MAS <i>rpob531</i> e <i>gyrA</i>	37
4.12.2	Condições PCR–MAS nos genes <i>katG315</i> , <i>mabA-15</i>	37
4.12.3	Condições PCR–MAS no gene <i>rrs</i>	37
4.13	Eletroforese de detecção dos produtos dos genes <i>rpoB531</i> , <i>katG315</i> , <i>mabA-15</i> , <i>gyrA</i> e <i>rrs</i>	37
4.14	Sequenciamento.....	38
4.15	Georreferenciamento.....	39
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Características fenotípicas das amostras isoladas.....	41
5.2	Características da população.....	47
5.3	Caracterização genômica de resistência às drogas anti-TB.....	48
5.4	Sequenciamento genético.....	50
5.5	Associação da positividade BACTEC MGIT para rifampicina e isoniazida em relação a PCR-MAS e o sequenciamento.....	53
5.6	Geoprocessamento de pacientes com tuberculose pulmonar.....	54
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	85
	ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa tratável que afeta a humanidade há milhares de anos, sendo considerada a doença infectocontagiosa que mais causa óbito no mundo, superando de forma isolada as mortes causadas pela malária e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SIMON, 2016). Embora a Organização Mundial de Saúde (OMS) tenha declarado que a incidência de TB no mundo tenha diminuído, estima-se que um quarto da população mundial esteja infectada pelo bacilo (WHO,2017).

A doença pode ser adquirida a partir da inalação de gotículas (partículas $>5 \mu\text{m}$) e aerossóis (partículas $\leq 5 \mu\text{m}$) contendo bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) expelidos pela tosse, fala ou espirro de pacientes com TB pulmonar ativa (BURKE *et al.*, 2011). Depois da inalação de partículas infectantes, a micobactéria é depositada nos alvéolos pulmonares. Em seguida, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos alveolares que começam a produzir citocinas e quimiocinas para atrair outras células do sistema imunológico, desencadeando uma reação inflamatória inespecífica e posterior formação do granuloma (TANG; YAM, CHEN, 2016).

Após a exposição ao bacilo, é estimado que 20 a 25% dos expostos tornaram-se infectados e destes somente 3 a 3,5% desenvolverão a doença ativa em alguma fase da vida (BELO; NAIDOO, 2017). O adoecimento pode ocorrer em igual proporção nos dois primeiros anos da infecção ou tardiamente, por consequência de uma reativação endógena ou por uma reinfeção exógena (Al *et al.*, 2016).

Existem vários fatores que proporcionam a reativação e desenvolvimento da doença. Estão sob maior risco de desenvolver a doença ativa as pessoas com diabetes tipo 2, infecção pelo HIV, terapia com inibidor de TNF- α , imunossupressão e uso de cigarro. Além disso, existem condições sociais como situação de rua, privação de liberdade, que colocam o indivíduo em maior vulnerabilidade á infecção e consequente adoecimento (NARASIMHAN; WOOD, MACINTYRE, 2016).

A TB apresenta como principais sintomas: tosse, às vezes com hemoptise, adinamia, febre vespertina e sudorese. Podendo existir um período de doença subclínica entre o período de contágio e a forma clínica. A forma pulmonar é a apresentação clínica mais comum da doença. Entretanto, o bacilo pode sofrer disseminação do sítio de infecção primária por via hematogênica, por contiguidade tecidual e/ou via linfática; podendo acometer outros sítios anatômicos como ossos, rins e meninges, sendo denominada de TB extrapulmonar (SCRIBA; COUSSENS, FLETCHER, 2017).

1.2 Gênero *Mycobacterium*

O gênero pertence ao reino Monera, classe *Actinobacterias*, ordem Actinomycetales e família *Mycobacteriaceae*. Atualmente, este gênero é composto por mais de 160 espécies (EUZÉBY, 2017), sendo considerados patógenos oportunistas e/ou estritos que acometem homens e animais. O gênero é subdividido em três grupos principais: a espécie *Mycobacterium leprae*, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), formado por nove espécies: (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium mungi* e *Mycobacterium orygis* micobactérias) e outras espécies denominadas de micobactérias não tuberculosas (MNT) ou micobactérias atípicas. Em 2018 (GUPTA *et al.*, 2018), foi proposta uma nova classificação para o gênero *Mycobacterium*, sendo dividido em cinco novos gêneros: *Mycobacterium* (clade *Tuberculosis-Simiae*), gen. nov. *Mycolicibacterium*, gen. nov. *Mycolicibacter*, gen. nov. *Mycolicibacillus* e gen. nov. *Mycobacteroides*.

As MNT compreendem mais de 140 espécies que podem ser identificadas com base nas suas características morfológicas, tempo de crescimento e produção ou não de pigmentos após a exposição à luz. Conforme suas características fenotípicas, as MNT foram divididas em quatro grupos, tendo como base a produção de pigmentos carotenoides e o tempo de crescimento em meio de cultura. As espécies que apresentam crescimento em meio sólido após setes dias são classificadas como crescimento lento e aquelas que apresentam crescimento com menos sete dias são definidas como crescimento rápido (TORTOLI, 2003). O diagnóstico clínico de doença pulmonar ocasionado por MNT é complexo devido a semelhança com os sintomas de outras doenças pulmonares, principalmente a tuberculose. As espécies de MNT que mais causam doença pulmonar no Brasil, são: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* (SÃO PAULO, 2005; CHIMARA *et al.*, 2004).

As espécies participantes do gênero devem apresentar características mínimas que incluem o alto conteúdo lipídico, com cadeias de ácidos graxos de cadeia longa (ácido micólico), elevado teor de citocinas e guanina (C+G), variando de 65 a 75% do seu material genético, apresentar capacidade de fixar determinados corantes e de resistir a descoloração após exposição a solução álcool-ácida e, por isso são denominados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR; FIGURA 1; MARK, 2010). As espécies do CMTB são caracterizadas por apresentarem similaridade nucleotídica de 99,9% na sequências

de 16S RNAr, todavia diferem em termos de hospedeiro tropismo, características fenotípicas e patogenicidade (BROSCH, 2002; HERSHBERG, 2008). A espécie *M. microti* infecta roedores, podendo causar TB em pessoas com imunodeficiência. *M. caprae* causa TB em caprinos (PASESCHIK *et al.*, 2017).

Figura 1 - Visualização de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) de amostras de escarro de pacientes com TB resistente.



Fonte: Próprio autor. Em vermelho, BAAR. Coloração pela técnica Ziehl-Neelsen, aumento 1000x.

De modo geral, as micobactérias compreendem uma forma de transição entre as eubactérias e os actinomicetos (LEHMANN; NEUMANN, 2016). Apresentam-se como bacilos retos ou ligeiramente curtos, imóveis e não esporulados, com dimensões variando entre 0,2 a 0,6 μm de diâmetro por 1 a 10 μm de comprimento, sem flagelos, não produtores de toxinas, aeróbios e apresentam uma grande diversidade, podendo ser encontrados no solo, água, alimentos e leite (TORTOLI *et al.*, 2017; BOTHA; VAN PITTIUS; VAN HELDEN, 2013). A parede celular das micobactérias é uma estrutura complexa que contém macromoléculas, como ácido micólico de 60 a 90 carbonos associados com peptídeoglicanos, glicopeptídeos e polissacarídeos (BASABARA; HUNTER, 2017).

O tempo de geração é lento comparado ao da maioria das bactérias de interesse médico, sendo classificados em crescimento lento e rápido. As espécies de crescimento lento, como *M. tuberculosis* e *M. bovis*, apresentam tempo de geração de 15 a 20 horas, enquanto que as espécies de crescimento rápido apresentam tempo de geração de 2 a 5 horas (PROZOROV *et al.*, 2014).

1.3 A espécie *Mycobacterium tuberculosis*

A espécie *M. tuberculosis* é o principal agente etiológico da TB no ser humano. O bacilo foi visualizado pela primeira vez em 1882 por Robert Koch, sendo por isso

chamado de bacilo de Koch (KAUFMANN *et al.*, 2005). Inúmeros estudos evidenciam que as espécies do CMTB evoluíram a partir de uma ancestral comum, presente na África, através de grandes modificações no DNA que resultaram nas diferentes espécies observadas atualmente (AHAMAD, 2011).

Uma das características mais importantes do *M. tuberculosis* é o alto teor de lipídeos em sua parede celular. Este revestimento lipídico é responsável pela extrema hidrofobicidade, baixa permeabilidade aos fármacos e resistência aos agentes químicos, como os detergentes (BASABARA; HUNTER, 2017).

Com relação a sua estrutura genética apresenta aproximadamente 4.000 genes, um conteúdo de C + G de 65% distribuídos ao longo do DNA genômico. Além disto, apresenta sequências de inserção (SI) que são definidas como elementos genéticos móveis responsáveis por causar rearranjo gênico, tais como transposição, deleção, inversão e duplicação (VAN EMBDEN *et al.*, 1993).

O CMTB contém diferentes tipos de SI, como: IS6110, IS1081, IS1547 e os "IS-like elements". O IS6110 é considerado o elemento genético mais abundante do genoma do *M. tuberculosis*, apresentando uma sequência de 12350pb. Esta sequência apresenta uma variação de 0 a 25 cópias que se modifica de acordo com a espécie e linhagem (KIVI *et al.*, 2002). Em 1997, SREEVATSANN *et al.* sugeriram que as SI, particularmente a IS6110, estariam relacionadas com a evolução bacteriana. Portanto, a transposição do IS6110 e de outros elementos móveis são úteis tanto na identificação mais fidedigna do *M. tuberculosis*, bem como na diferenciação de espécies do CMTB (FORRELLAD *et al.*, 2013).

1.4 Epidemiologia

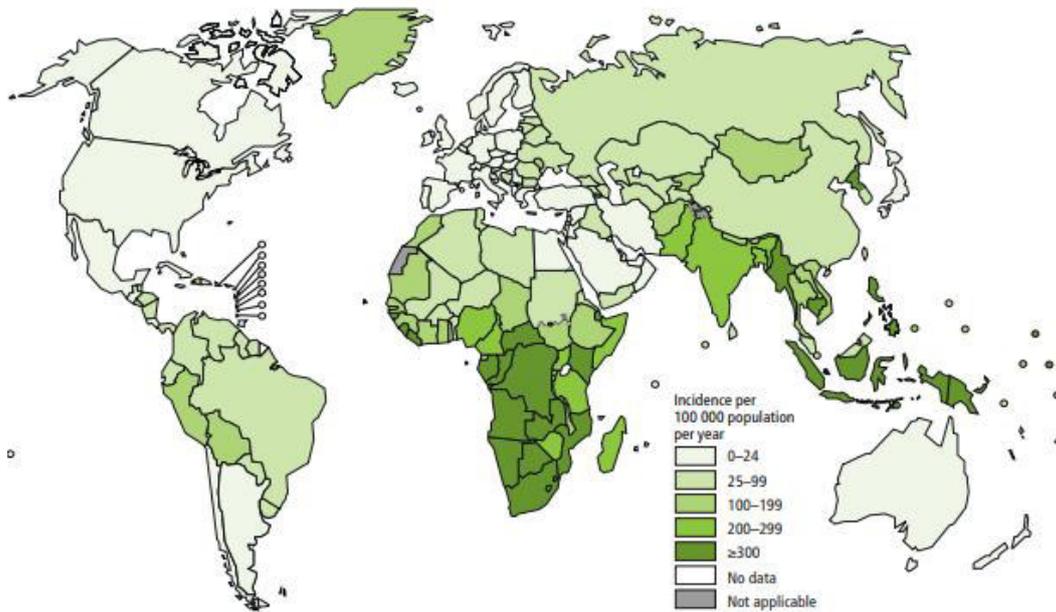
1.4.1 Tuberculose no mundo

A TB continua causando graves problemas de saúde pública no mundo, apesar dos avanços tecnológicos como a introdução de testes moleculares na rotina laboratorial, utilização de medicamentos em dose fixa combinada e o desenvolvimento de ações na busca ativa e na prevenção da doença (BRASIL, 2011).

Segundo a OMS, em 2016 foi estimada a incidência de 10,4 milhões de casos novos de TB no mundo equivalente a 10,4 casos para cada 100 mil habitantes (FIGURA 2). Deste total, apenas 6,3 milhões foram notificados, o que reflete subnotificação e subdiagnóstico, ocasionado por países com setores da rede privada não regulamentados e

sistemas de saúde deficiente (WHO, 2017).

Figura 2 - Estimativa do número de casos novos de tuberculose referente ao ano de 2017.



Fonte: WHO (2017).

Com relação ao número de mortes no mundo em 2016, foi estimado 1,3 milhões de mortes por TB em pacientes HIV-negativos e 374.000 mortes entre os HIV-positivos (WHO, 2017).

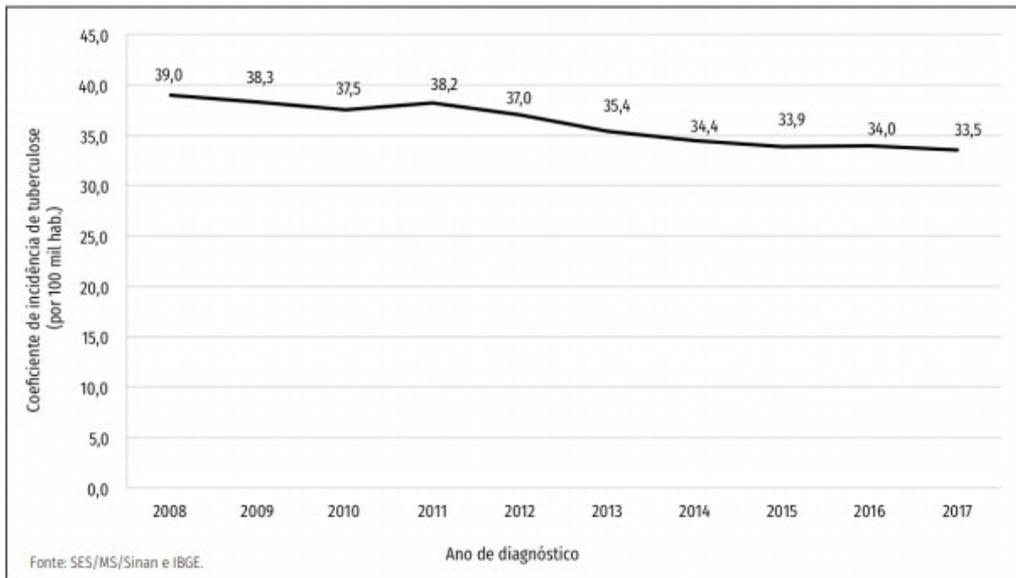
1.4.2 Tuberculose no Brasil

Segundo a OMS, o Brasil ocupa a 20ª posição entre os países que concentram mais de 84% dos casos novos de TB no mundo e é o único país da América latina nessa classificação. A doença apresenta uma distribuição heterogênea em todo território nacional. As regiões Norte, Nordeste e Sudeste apresentam as maiores taxas de detecção (incidência) e mortalidade (BRASIL, 2018).

No ano de 2017, o Brasil detectou 69.590 casos novos de TB. O coeficiente de incidência de TB passou de 39/100 mil habitantes em 2008 para 33,5/100 mil habitantes em 2017 o que representa uma queda anual de 1,8% ao ano (FIGURA 3). Entre as capitais brasileiras com maior número de notificações, destacam-se Manaus (104,7/100mil habitantes), Rio de Janeiro (88,5/100mil habitantes) e Recife (85,5/100mil habitantes). É importante ressaltar que a situação da TB nas capitais requer atenção, pois 19 delas apresentam incidência superior ao registrado no país. Em 2017 ocorreram

aproximadamente 4.426 mortes exclusivamente por TB o que representa uma coeficiente de mortalidade de 2,1 óbitos/100 mil habitantes (BRASIL, 2018).

Figura 3 - Incidência de tuberculose no Brasil 1990-2017.

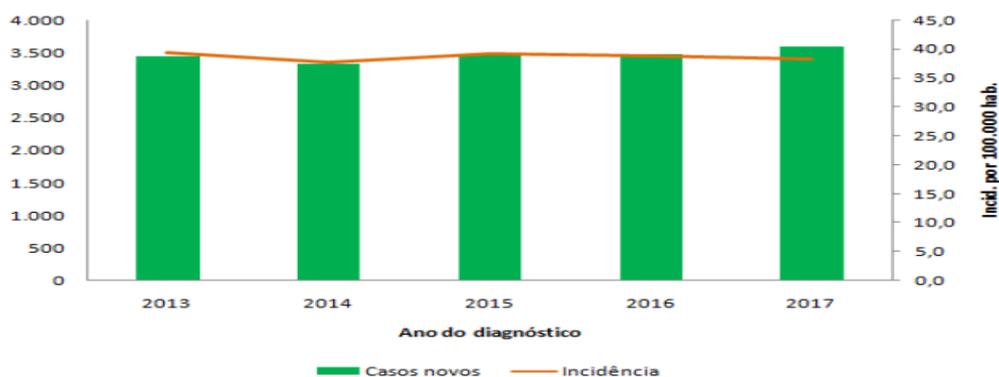


Fonte: SINAN/SVS-MS, 2017.

1.4.3 Tuberculose no Ceará

De acordo com a Secretária de Saúde do Estado do Ceará, no período de 2013 a 2017, ocorreu um declínio nos coeficientes de incidência de 39,4/100 mil habitantes para 38,3/ 100 mil habitantes (FIGURA 4). Em 2017, foram notificados 3.076 casos de TB no Ceará, dos quais 1.847 foram notificados apenas em Fortaleza o que representa uma taxa de incidência de 63,8 casos novos por 100 mil habitantes, o que é considerado um parâmetro elevado com relação à média nacional (CEARÁ, 2018)

Figura 4 - Casos novos e incidência de tuberculose por ano de diagnóstico no Ceará, período de 2013 a 2017.



Segundo o Ministério da saúde (MS) as metas para o controle da TB até 2035 são: reduzir o coeficiente de incidência em 90% e reduzir o número de óbitos por tuberculose em 95%, comparado com 2015 (BRASIL, 2017). Infelizmente, o estado do Ceará não vem atingindo as metas estabelecidas. No ano de 2013, houve um percentual de 70% de cura nos casos novos, entretanto é observado uma tendência de declínio no decorrer dos anos subsequentes. No ano de 2017 houve um percentual de cura de 64%, o que representa uma diminuição de 6% em relação ao ano de 2013 (CEARÁ, 2018).

No ano de 2017 houve um percentual de 11% de abandono de tratamento no estado do Ceará, mais do que o dobro preconizado pelo MS. Entre as cidades cearenses com maior taxa de abando destacam-se: Fortaleza como 15%, segunda capital do nordeste com maior taxa de abandono, seguida por Caucaia com 12,9% e Maracanaú com 10%, ambas cidades da região metropolitana de Fortaleza (CEARA, 2018).

1.5 Tratamento

No Brasil, ocorreram mudanças no tratamento terapêutico após a instalação do II inquérito nacional de resistência aos fármacos anti-TB. A primeira mudança está relacionada com a adição do E na fase intensiva (fase de ataque), após a constatação do aumento de monorresistência aos fármacos R e I de forma isolada (BRASIL, 2018). A segunda alteração, foi a formulação dos quatro fármacos utilizados durante o tratamento da “fase de ataque” em um só comprimido. O esquema básico é realizado a nível ambulatorial com no mínimo três observações semanais nos primeiros dois meses de tratamento (MICHELETTI *et al.*, 2014).

O regime terapêutico adotado pela OMS para qualquer caso novo de TB consiste em um tratamento dividido em duas etapas. A primeira etapa do tratamento, “fase de ataque”, é composta pelos fármacos considerados de primeira linha: rifampicina (R), isoniazida (I), pirazinamida (PZA) e etambutol (E). Os fármacos são usados de forma combinada com objetivo de evitar resistência bacteriana ao fármaco e, conseqüente, falha no tratamento. Essa etapa apresenta uma duração de dois meses. Na segunda fase do tratamento, são utilizados os fármacos R e I por quatro meses seguidos, para eliminar os bacilos resistentes e evitar a recidiva da doença (ZUMLA *et al.*, 2015). No caso de pacientes com TB meníngea e óssea a fase de manutenção é de sete meses, o que aumenta o tempo do tratamento terapêutico para nove meses (DUARTE *et al.*, 2010).

A utilização dos fármacos de segunda linha de tratamento anti-TB está indicado aos casos de TB resistente aos antimicrobianos de primeira escolha ou a falha no tratamento anterior. Para estes casos, são utilizados esquemas constituídos por fluoroquinolonas (FQ): levofloxacino, gatifloxacino e moxifloxaciono e aminoglicosídeo (AG): estreptomicina, canamicina, amicacina e capreomicina. O uso destes fármacos apresenta como desvantagem maiores efeitos colaterais, tempo prolongado de tratamento e uma eficácia menor que os fármacos de primeira linha (TESSEMA *et al.*, 2012).

1.6 Resistência

Os primeiros casos de isolados clínicos de TB droga resistente (TB-DR) foram relatados na década de 1940, logo após o uso dos primeiros fármacos para o tratamento anti-TB. Neste caso, acontecia notificação de *M. tuberculosis* que era resistente à apenas um fármaco, sendo definido como monoresistência. Entretanto, devido a deficiência nos programas de controle de TB, a baixa adesão ao tratamento e ao aumento de casos da coinfeção TB-HIV ocorreu o surgimento da TB multidroga resistente (TB-MDR), TB extensivamente resistente (TB-XDR) e mais recentemente o surgimento da TB totalmente droga resistente (TB-TDR). Este problema causa grandes prejuízos ao paciente pois aumenta o tempo de tratamento para até 24 meses, levando a uma menor taxa de cura e mais efeitos colaterais (SEUNG; KESHAVJE; RICH, 2015).

A TB-MDR é definida como a resistência a I e R e constitui um problema grave para o controle da doença (MIGLIORI *et al.*, 2010). Existem formas de TB polirresistentes que são definidas como resistência à mais de um medicamento anti-TB, desde de que não tenha a combinação de I e R. De acordo com a OMS (WHO, 2017), em 2016 ocorreram 490.000 casos de TB-MDR, sendo a maioria dos casos (47%) concentrados em três países: Índia, China e Rússia. A emergência da TB-MDR salienta a necessidade da realização de testes de susceptibilidade aos fármacos antimicobacterianos, da vigilância da resistência e do acompanhamento dos casos. Também é essencial o diagnóstico precoce para iniciar um regime de tratamento eficaz e conseqüentemente reduzir a transmissão na população (FREGONA *et al.*, 2017).

A TB-XDR, é um tipo menos comum de TB-MDR, com resistência à R e I, adicionado de resistência a FQ e a pelo menos uma das três drogas injetáveis da segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) (CENTERS FOR DISEASE AND PREVENTION, 2006). A TB-TDR foi relatada primeiramente na Itália, em 2014 e

posteriormente no Irã, Índia e África do Sul, tendo como característica a resistência a todos os fármacos da primeira e segunda linha de tratamento (UDWADIA *et al.*, 2012). Globalmente, apenas 54% dos pacientes com TB-MDR tiveram sucesso no tratamento. Em 2016, a TB-XDR foi relatada em 123 países, sendo estimado que 6,2% das pessoas com TB-MDR tem TB-XDR (WHO, 2017). Em 2014, foi identificado no Ceará 37 casos novos de TB-MDR e 14 casos de TB-XDR (CEARÁ, 2015).

1.7 Aspectos moleculares associados à resistência

O desenvolvimento da resistência está associado a diversos fatores, como a acetilação dos fármacos, bomba de efluxo e impermeabilidade da membrana celular e alterações no sítio de ligação. No caso, do *M. tuberculosis* a resistência está relacionada com alterações no gene que codifica o alvo do fármaco anti-TB. As linhagens de TB-MDR e TB-XDR surgem após uma sequência de mutações nos diferentes genes envolvidos em cada um dos fármacos (ALMEIDA; PALOMINO, 2011).

Os fármacos R e I são os dois mais usados no tratamento de primeira linha da TB. A R é um derivado semissintético da rifamicina, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da transcrição gênica. A resistência à R ocorre por mutações no gene *rpoB* que codifica para a subunidade β da RNA polimerase. Em cerca de 96% dos casos, os isolados resistentes apresentam mutação numa região bem definida de 81 pares de base (pb), o que torna a sua identificação muito facilitada. As Mutações mais frequentes ocorrem nos códons 531 (41%), 526 (34%) e 516 (8%) (VALIM *et al.*, 2000; DE FREITAS *et al.*, 2014; UNISSA *et al.*, 2016).

A resistência a I está aparentemente controlada por um sistema genético mais complexo que envolve vários genes, são eles, *katG* (codifica a catalase- peroxidase), *inhA* (envolvido na biossíntese do ácido micólico), *kasA* (resposta celular ao estresse oxidativo) e *ahpC* (envolvido com a síntese da enzima β -cetoacil ACP sintase) (SLAYDEN; BARRY, 2000). Todavia, estudos têm demonstrado que a resistência à I é frequentemente associada com mutações em *katG315* (75%), enquanto que 14,9% dos isolados possuem mutação na região promotora do gene *inhA* (MOKROUSOV *et al.*, 2003; KALOKHE *et al.*, 2014; BOLLELA *et al.*, 2016).

As FQ possuem como mecanismo de ação o bloqueio da replicação, transcrição e reparo do DNA através da inibição da enzima topoisomerase II (DNA girase) e ou topoisomerase IV. Estudos de coorte de TB-XDR, demonstraram que 73 e 20% dos isolados resistentes a FQ tinham mutações nos códons 94 e 90 do gene *gyrA*. (AJBANI *et*

al., 2011).

Os aminoglicosídeos (AG) possuem como mecanismo de ação a inibição da síntese de proteínas, ao ligarem-se à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a leitura correta do RNA mensageiro e síntese da proteína. Estudos descrevem que 75 e 20% dos isolados resistentes aos AG possuíam mutações nos códons 1401 e 1484 do gene *rrs* respectivamente (AJBANI *et al.*, 2011).

1.8 Diagnóstico Microbiológico.

1.8.1 Cultura

Diante da situação epidemiológica da TB resistente, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce facilitam uma detecção mais segura da doença e, assim, reduz as fontes de infecção e o risco de propagação de cepas resistentes aos medicamentos (SCHUMACHER *et al.*, 2016)

O isolamento do *M. tuberculosis* requer o uso de meios fastidiosos que tenham uma grande quantidade de carbono e oxigênio. Vários meios de cultura são comercialmente disponíveis, sendo o meio Löwenstein-Jensen (LJ) o mais utilizado no Brasil e o recomendado pela OMS. Trata-se de um meio constituído por ovos integrais o que facilita o desenvolvimento de micobactérias e o crescimento necessário para realizar o teste sensibilidade aos antimicrobianos (BRASIL, 2008).

A cultura necessita 10 a 100 bacilos viáveis por milímetro de amostra para se obter um resultado positivo, sendo assim, considerada um técnica mais sensível que a baciloscopia. A sensibilidade da cultura varia de 80 a 95% e sua especificidade é de 95%. No entanto, apesar do exame cultural ser considerado padrão ouro para o diagnóstico de micobactérias, essa técnica requer um tempo de até 60 dias para obter um resultado positivo (MORGAN *et al.*, 1999).

1.8.2 Método da Redução de Nitrato (MRN)

Esta técnica é baseada na capacidade do *M. tuberculosis* reduzir nitrato em nitrito durante o seu crescimento. Desta forma, isolados de TB resistente em desenvolvimento reduzem o nitrato presente no meio de cultura, ocasionado uma mudança no meio de cultura após a adição de uma substância reveladora. Atualmente, o MRN é considerado um método bastante eficaz, de baixo custo e que pode ser utilizado em diferentes meios de culturas com fármacos de primeira e segunda linha (BARRETO *et al.*, 2014).

1.8.3 BACTEC 460 TB e BACTEC MGIT 960

O desenvolvimento de meios líquidos mais enriquecidos (meio Middlebrook) aliado com o aparecimento de sistemas automatizados e semi-automatizados de leitura do crescimento de micobactérias constituíram um grande avanço para o diagnóstico de TB. Esses sistemas permitem a detecção precoce do crescimento através de métodos radiométrico, fluorimétrico e colorimétrico (DRIBA *et al.*, 2017).

O sistema semi-automatizado BACTEC 460 TB foi criado em 1977 com uma alternativa mais sensível e rápida que a cultura tradicional. Este procedimento indica o desenvolvimento bacteriano através da concentração de gás carbônico radiomarcado produzido pela duplicação da micobactéria no meio líquido Middlebrook 7H9 com ácido palmítico marcado com carbono 14 (MAHOMED *et al.*, 2017).

Com o desenvolvimento tecnológico ocorreu a criação do sistema BACTEC 960 TB que baseia-se em uma metodologia totalmente automatizada e não radioativa. Esta técnica permite a detecção do consumo de oxigênio pelas micobactérias através de tubos de ensaios contendo o meio líquido Middlebrook 7H9 e sais de rutênio. Este metal é marcado com fluocromo que emite uma luz em baixas concentrações de oxigênio, podendo-se obter o perfil de resistência em cerca de 13 dias (GERDES *et al.*, 2006).

1.9 Métodos moleculares na detecção de resistência

1.9.1 PCR em tempo Real

A técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR) é uma variante da PCR convencional que permite que a duplicação do DNA e sua amplificação ocorram simultaneamente através do acúmulo de fluorescência dos produtos da PCR. Diversos tipos de reações são utilizados para monitorar a formação de produtos e assim como identificar as mutações. A q-PCR é considerada uma técnica rápida, sensível, reprodutível e diminui o risco de contaminação. Entretanto, apresenta como desvantagem o custo do equipamento e de reagentes necessários, além da necessidade de recursos humanos especializados (SALES *et al.*, 2014; MAURYA *et al.*, 2012).

1.9.2 Gene Xpert™ MTB/Rif

No ano de 2010, o sistema Gene Xpert™ MTB/Rif foi recomendado pela OMS para o diagnóstico de TB pulmonar e laríngea, especialmente em pacientes suspeitos de TB

resistente e indivíduos com coinfeção TB-HIV. O teste é utilizado para identificação do *M. tuberculosis* e para triagem de amostras resistentes a R por meio de uma *nested*-PCR em tempo real, empregando cinco sondas sobrepostas que são complementares à região determinante da resistência à R, composta por 81 pb do gene *rpoB* (ZEKA; TABASKAN; CAVUSOGLU, 2017).

Esta técnica apresenta como principal vantagem a integração e a automatização dos processos de extração de DNA, amplificação e detecção dos produtos da PCR. Este benefício auxilia na liberação de resultados em menos de duas horas, sem necessitar de tratamento da amostras e de conhecimento especializado em biologia molecular (ZMAK; JANKOVIC, 2013).

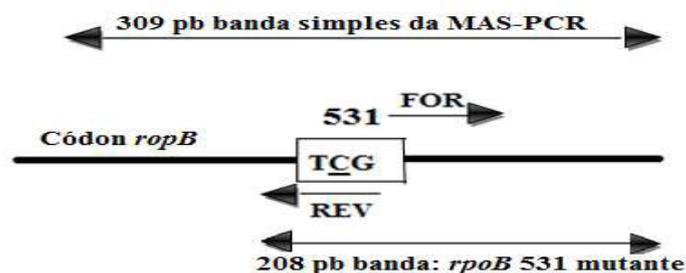
Embora estudos demonstrem elevada sensibilidade e especificidade desta tecnologia, no momento, apresenta algumas limitações relativas ao custo do equipamento e de insumos presentes na reação como: reagentes liofilizados, tampões líquidos e soluções de lavagem. Além disso, é necessária uma infraestrutura adequada para sua instalação e condições de operação (TSUYUGUCHI *et al.*, 2017).

1.9.3 PCR multiplex alelo específico

A PCR multiplex alelo específico (PCR-MAS) utiliza-se de diferentes tipos de iniciadores, sendo cada um deles direcionados a uma região específica da mutação. Isto permite uma análise de múltiplos alvos de mutação em uma única amostra. Como, por exemplo, em ensaios para detectar as mutações associadas à resistência aos fármacos da TB (CHIA *et al.*, 2012).

Estes ensaios utilizam em uma única PCR, cinco pares de iniciadores alelos específicos, para produzir diferentes padrões de bandas de fragmentos de DNA e detectar as mutações. No desenho dos iniciadores, o final 3' de cada iniciador alelo específico é posicionado para parear com o nucleotídeo do respectivo códon da sequência da cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv (sensível a todos os fármacos). As mesmas posições onde os pontos de mutações mais frequentes foram relatados para as cepas resistentes. Desta maneira, quando não há mutação na sequência de DNA referente ao códon, o fragmento de DNA é amplificado. Portanto, quando há mutação na sequência referente ao códon alvo, não há produto da PCR (FIGURA 5) (YANG *et al.*, 2005; CHIA *et al.*, 2012).

Figura 5 - Esquema da região 531 do gene *rpoB* amplificado por PCR multiplex.



Fonte: Vadwai *et al.* (2012).

Mokrousov *et al.* (2002a) adaptou a técnica da PCR-MAS, para detectar as mutações associadas à resistência ao E em amostras de cultivo de *M. tuberculosis*. Estes pesquisadores ainda investigaram as mutações que conferem resistência à I no códon 315 do gene *katG*. No mesmo ano também utilizaram a técnica para R (MOKROUSOV *et al.*, 2002b; MOKROUSOV *et al.*, 2003).

Allegui *et al.* (2012) utilizaram o PCR-MAS para detectar simultaneamente as mutações associadas as resistências à I (códon 315 do gene *katG* e na região promotora *mabA-inhA-15*) e R (códon 516, 526 e 531 no gene *rpoB*). Com o surgimento da TB-XDR, Vadwai *et al.* (2012) otimizaram a técnica para detectar simultaneamente as mutações associadas à resistência à R e I (TB-MDR) e à FQ e AG (TB-XDR).

1.9.4 Sequenciamento genético

O sequenciamento genético é uma técnica molecular que determina a ordem exata dos nucleotídeos em uma molécula de DNA ou RNA, sendo a principal forma de detectar mutações conhecidas e identificar novas mutações (NIERMAN *et al.*, 2000).

Esta técnica teve seu início em meados da década de 70 quando Frederick Sanger desenvolveu o método de sequenciamento por terminação de cadeia (SANGER *et al.*, 1977). Este método tem como princípio a identificação de fragmentos de DNA através de didesoxinucleotídeos (ddNTP) marcados com fluocromos. Desta forma, a adição de um ddNTP à cadeia recém formada impede a polimerização do fragmentos de DNA, possibilitando a formação de cadeias de DNA de diferentes tamanhos e conseqüentemente diferentes pesos moleculares. Essa diferença permite que os fragmentos sejam separados pela eletroforese e identificados pelo sequenciador (SANGER; COULSON, 1975). Tal descoberta proporcionou uma grande avanço na análise de fragmentos de DNA, que permitiram uma análise mais fidedigna das mutações relacionadas aos microrganismos (LOMAN *et al.*, 2012).

Contudo, apesar do grande desenvolvimento obtido, a técnica de Sanger apresentava limitações que impossibilitavam a geração de uma grande quantidade de dados a baixo custo. A partir de então, ocorreu um avanço tecnológico na técnica de sequenciamento, o que ocasionou o surgimento dos sequenciadores de nova geração, conhecidos como *next generation sequencing* (NGS) (HENSON *et al.*, 2012). Os NGS começaram a serem comercializados em 2005 com a criação da plataforma 454 pela Roche. Posteriormente, ocorreu o desenvolvimento de outras plataformas como a GA Illumina, lançada pela solexa® e a SOLiD® da Life Technologies. As principais características que diferenciam os sequenciadores NGS do método Sanger são: o baixo custo, redução no tempo de sequenciamento e o alto rendimento (ZHANG *et al.*, 2011).

Embora o sequenciamento necessite de equipamentos e reagentes de alto custo, os resultados demonstram ser altamente confiáveis e podem ser utilizados como padrão ouro para o diagnóstico de mutações de forma mais rápida (LIU *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O número crescente de casos da infecção por TB-MDR e o surgimento de TB-XDR são fortes ameaças ao controle e prevenção da TB no mundo. O diagnóstico fenotípico da resistência requer muito tempo e retarda o início do tratamento adequado, causando prejuízos ao paciente.

Pacientes com TB-XDR relatam dois ou mais esquemas de tratamento prévio, sendo o número de tratamentos anteriores maior entre os casos de TB-XDR comparados aos casos de TB-MDR. Em pesquisa realizada em 26 de maio de 2017, no sistema de busca de periódicos indexados “Pubmed”, usando os descritores “tuberculosis”, “resistance” e “Brazil”, somente são encontrados cinco artigos publicados no período de 2012 a 2017, que abordam o tema de fatores de risco e epidemiologia molecular da TB resistente no Brasil. No mesmo período, nenhum dos periódicos publicados trata da análise espacial por georreferenciamento dos casos de TB. Além disto, nenhum periódico relata a situação da TB-MDR ou TB-XDR no Ceará.

A detecção dos mecanismos moleculares de resistências das drogas anti-TB tornou viável a elaboração de ensaios de PCR, que permitem identificar mutações nos genes relacionados que conferem resistência a estes fármacos. Em nosso estudo, analisaremos mutações por PCR multiplex alelo específica (PCR–MAS) nos genes *rpoB*, *katG*, *mabA*, *gyrA* e *rrs*. Mutações pontuais nesses genes são responsáveis pelo o padrão TB-XDR (Vadwai *et al.*, 2012).

Neste contexto, justifica-se o presente estudo, a fim de avaliar a frequência das mutações em isolados TB-DR nos genes *rpoB*, *katG*, *mabA*, *gyrA* e *rrs* e estabelecer relações com as características demográficas e de história prévia de tratamento dos pacientes. Além disso, é de grande importância o georreferenciamento da residência dos casos para analisar a distribuição da doença na região metropolitana de Fortaleza. Dessa forma, será possível contribuir para o planejamento e avaliação das ações de saúde desenvolvidas no município, de forma a mapear, monitorar e disseminar as informações em saúde no âmbito do SUS, propiciando a evolução do sistema de saúde como um todo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar e compreender as variáveis da frequência de TB-DR relacionadas ao ambiente domiciliar e da comunidade, e frente às características clínicas do hospedeiro.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar variáveis socioeconômicas, ambientais, comportamentais (dados clínicos) e presença de comorbidades associadas à TB-DR no âmbito familiar e na comunidade.
- Caracterizar o perfil fenotípico de sensibilidade aos principais antimicobacterianos dos isolados clínicos de *M. tuberculosis*.
- Analisar as mutações nos genes *rpoB*, *katG*, *gyrA*, *mabA* e *rrs* dos isolados de TB-DR em relação a resistência fenotípica.
- Determinar a distribuição espacial dos casos de TB-DR na regionais administrativas de Fortaleza, Ceará.

4 METODOLOGIA

4.1 Local de realização da pesquisa

Foi realizado um estudo observacional e prospectivo durante 12 meses, janeiro a dezembro de 2017. O estudo foi realizado nas quatro instituições abaixo discriminadas:

- Hospital da rede da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Ceará, Hospital Dr. Calos Alberto Studart Gomes, também conhecido como Hospital de Messejana (HM), (Fortaleza-CE);
- Laboratório de Pesquisa em Micobactérias do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-CE);
- Laboratório de Micobactérias do Instituto Evandro Chagas (Belém-PA);
- Núcleo de vigilância epidemiológica da Secretária de Saúde do Estado do Ceará

4.2 Critérios de inclusão

Todos os participantes com TB pulmonar com idade igual ou maior que 16 anos, com isolamento de *M. tuberculosis* com resistência a pelo menos um fármaco anti-TB, que foram atendidos no ambulatório de tisiologia do HM.

4.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os participantes que não deram o consentimento pós-informação ou foram incapazes do consentimento pós-informação devido a alguma deficiência mental, indivíduos HIV positivos e os com idade igual ou inferior a 15 anos. Também foram excluídos do estudo os isolados com colônias características de MNT, os casos de contaminação ou que por problemas técnicos não tiveram seus resultados catalogados.

4.4 Definição de casos e controles

Foram considerados casos os isolados com resistência igual ou superior a três fármacos, enquanto que os controles foram definidos para os isolados com resistência a um ou dois fármacos.

4.5 Cálculo para o tamanho da Amostra

Para o cálculo, foi observado que no ano de 2013 foram reportados 83 casos de TB-MDR, 95 em 2014, 75 em 2015 e 45 em 2016. E para os casos de TB-XDR foram reportados no HM: 10 casos em 2013, 21 em 2014, 05 em 2015 e 03 em 2016. Também foi considerado que as mutações nos genes *rpoB*, *gyrA*, *rrs* e *katG* ocorrem numa frequência de 96%, 73%, 75% e 75% respectivamente. Ainda para o cálculo (FIGURA 06) do tamanho amostral, foi aplicado uma margem de erro de 5% e nível de confiança de 95%. De acordo com o uso da fórmula abaixo é esperada a coleta de no mínimo 37 casos de TB-MDR para a detecção de mutação nos genes relatados para o padrão TB-XDR.

Figura 6 - Fórmula para o cálculo de amostra em população finita.

$$n = \frac{\frac{z^2 p(1-p)}{e^2}}{\frac{N-1}{N} + \frac{z^2 p(1-p)}{N e^2}}$$

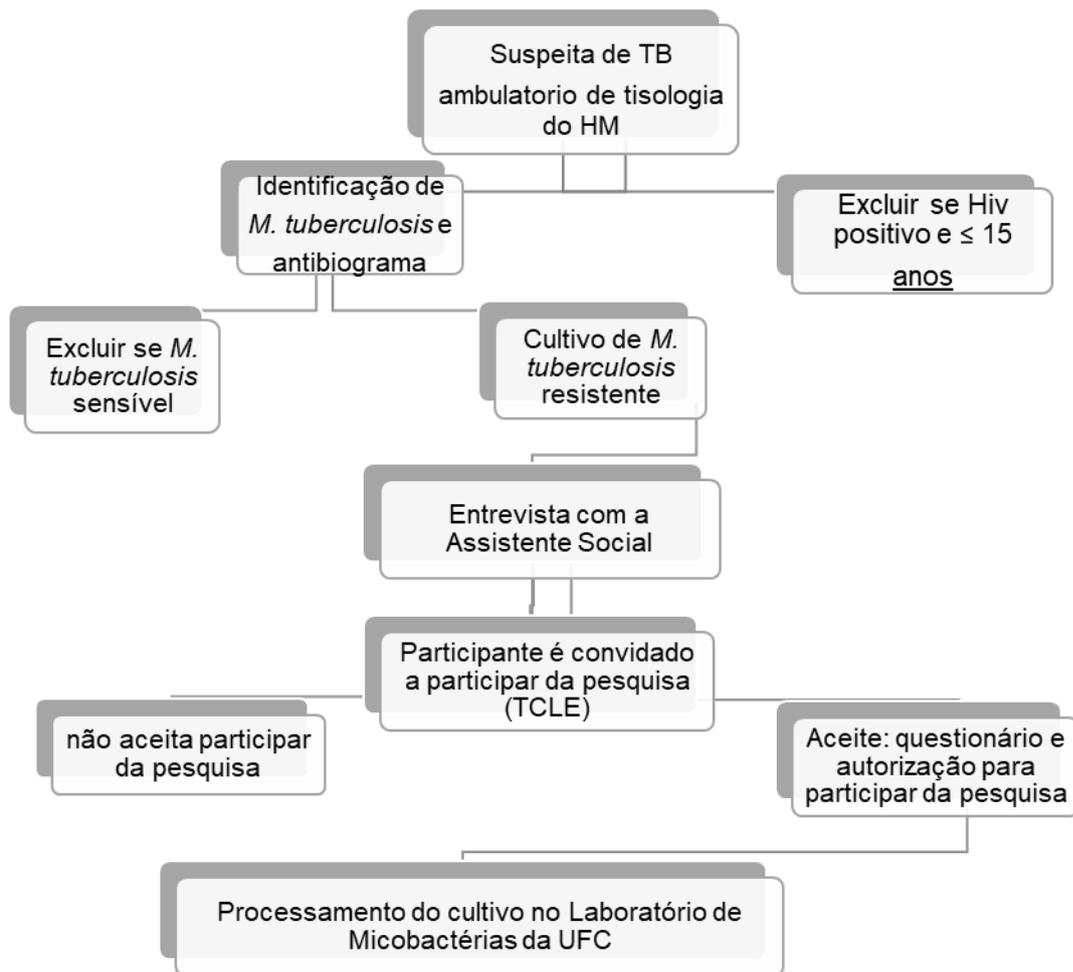
Fonte: Autoria própria baseada em dados da pesquisa.

n = Tamanho amostral; z = valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado, e significância $\alpha/2$, geralmente $\alpha = 0,05$ e $z = 1,96$; p = Proporção populacional de indivíduos que pertencem a categoria que estamos querendo estudar; e = Erro amostral ou margem de erro.

4.6 Cultivo primário e teste de sensibilidade a drogas antimicrobianas

As amostras clínicas dos pacientes atendidos no ambulatório de tisiologia do HM e com suspeita de TB pulmonar foram cultivados no sistema BD *BACTEC* Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) 460TB. Em seguida, as amostras com cultivo positivo (consumo de oxigênio) foram submetidas ao teste fenotípico de sensibilidade aos antimicobacterianos (TSA): R, I, S e E. Os paciente com TB-DR foram convidados a participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) na presença do responsável pelo estudo. Posteriormente, os isolados bacterianos foram enviados ao Laboratório de Micobactérias do Departamento Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFC, para posterior subcultivo e detecção molecular da resistência. Os participantes foram recrutados de acordo com o esquema da Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma de inclusão dos participantes do estudo.



Fonte: próprio autor.

4.7 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, via Plataforma Brasil, sendo aprovado com o parecer número 1.956.894 (ANEXO B). No momento da entrevista com a assistente social do HM foi aplicado um questionário semiestruturado a todos os participantes do estudo. Foram coletadas informações de endereço residencial, demográficas, socioeconômicas, comportamentais, clínicas e laboratoriais (APÊNDICE A).

4.8 Cultivo secundário

No Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Medicina da UFC, os isolados de *M. tuberculosis* resistentes foram subcultivados em meio LJ e incubados a 37°C por 14 a 21 dias. Esta etapa do estudo foi realizado em capela de fluxo laminar, tipo IIb, do laboratório de nível e biossegurança 3, localizado no Laboratório de Pesquisa em Micobactérias do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Durante todo o processo foram

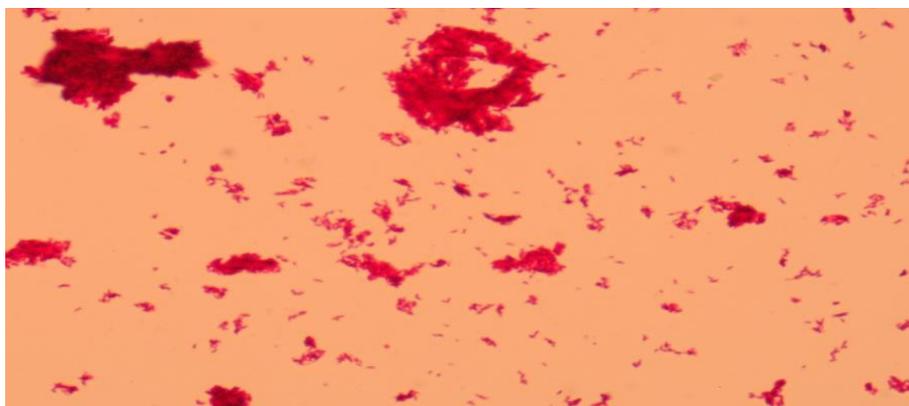
utilizadas as medidas de biossegurança adequadas, como o uso de máscara com filtro N-95, luvas, aventais e gorros.

4.9 Baciloscopia

As culturas que apresentavam crescimento visível e em fase exponencial de crescimento (entre 10-15 dias de cultivo), foram confirmadas como BAAR através da coloração de Ziehl-Neelsen (BRASIL, 2005), sendo visualizadas em microscopia óptica.

Primeiramente as amostras foram cobertas por fucsina fenicada e em seguida foram fixadas através do bico de Bunsen até a emissão de calor. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água corrente e cobertas com uma solução álcool-ácido resistente a 3% até descorar totalmente o esfregaço. Após este processo as lâminas foram novamente lavadas com água corrente e, em seguida, foi adicionado o azul de metileno. Após 30 segundos as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas para secar. A visualização foi feita em microscópio ótico, modelo Zeiss modelo Axio Scope.A1 em objetiva de imersão (FIGURA 8).

Figura 8 - Visualização dos bacilos de *M. tuberculosis*



Fonte: próprio autor. Microscopia óptica de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) cultivados em meio Löwenstein-Jensen, corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, aumento de 1000x.

4.10 Extração do DNA genômico

Antes de iniciar a extração de DNA, a cabine de fluxo laminar foi limpa com glutaraldeído 2% e submetida à luz ultravioleta por 20 minutos. A extração de DNA seguiu o protocolo publicado por Parish e Stoker (2001). O crescimento bacteriano, cultivado em meio LJ, foi retirado com uma alça estéril e colocado em tubo de microcentrífuga contendo 500 µL de Tampão TE (0,01M Tris-HCl e 0,001 EDTA [ph 8]),

etapa de lavagem das células. Em seguida, centrifugado por 15 min a 2500rpm. Em seguida, as células foram ressuspensas com auxílio de pipetagem no tampão de extração e o tubo foi selado com parafilm®, e levado para aquecimento em banho-maria entre 80 e 100°C por 20 min, procedendo-se assim a inativação celular. Após esta etapa, foi aguardado o resfriamento da suspensão bacteriana, e adicionados 10µL de lisozima (concentração final 1mg/mL; ou 400µl de lisozima a 50mg/ml) e 10µl de RNase 10mg/ml. Posteriormente o tubo foi homogeneizado por lenta inversão e incubado a 37°C por 1 hora. Depois foi adicionado 150µl de proteinase K 10mg/ml e 30µl de SDS 20% e em seguida homogeneizado por lenta inversão e incubado a 45°C por 2 horas. Foi adicionado ao extrato de DNA o mesmo volume de mistura fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e misturado gentilmente ~5 vezes por inversão e centrifugado à 6000 rpm (temperatura ambiente) por 10 minutos. A fase superior aquosa, contendo o DNA, foi coletada e adicionada o mesmo volume de clorofórmio, sendo misturada gentilmente por inversão, em seguida centrifugada a 6.000 rpm por 10 minutos (temperatura ambiente), e finalmente foi coletada a fase superior aquosa.

Ao extrato de DNA foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3M ao sobrenadante e foi adicionado igual volume de isopropanol. Em seguida foi homogeneizado por lenta e gentil inversão (2-4 vezes), até formação de 'nuvem' de DNA. Caso não houvesse visualização do sedimento de DNA, o extrato foi incubado a -20°C por 30 min e depois centrifugado a 6.000rpm por 20 min. O sedimento foi lavado com 1ml de etanol 70% (4°C). Em seguida centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado tendo cuidado para *não tocar no sedimento*. O resíduo de etanol foi então deixado evaporar (temperatura ambiente ou 55°C por no máximo 30min) e depois o sedimento de DNA s foi solubilizado em 200µl de TE (ou outro volume menor). A suspensão foi incubada a 65°C *overnight* e depois o DNA foi estocado a -20°C. A concentração de DNA das amostras foi medida em nanoespectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) na absorbância de 260nm.

4.11 Identificação de *M. tuberculosis* pela amplificação de IS6110

A identificação do complexo *M. tuberculosis* se baseou na amplificação do gene *Rv2168c* que codifica a transposase IS6110, sendo o número de cópias desta transposase repetida na espécie *M. tuberculosis* de 1 à 25 vezes (MCEVOY *et al.*, 2007). Nas outras espécies do complexo a transposase IS6110 é encontrada variando de 0 à 1

A reação de amplificação foi composta de 1 µl de DNA genômico (20 ng/µl), 1 µl de cada iniciador (25 pMol/µl; Quadro 1), 12,5 µl de Hot Green Master Mix 2× e 9,5 µl de H₂O ultrapura, suficiente para completar 25 µl. O controle negativo foi adicionado a todas reações pela substituição de DNA por água Milli-Q. Como controle positivo foi empregado 1 µl de DNA (20ng/µl) de *M. tuberculosis* H37Rv (TABELA 1).

Tabela 1 - Iniciadores para amplificação da região IS6110 de *M. tuberculosis*.

Iniciadores	Sequencia (5' - 3')	Tm (°C)	Produto (pb)
IS6110 up	GAG CGG GCG GTG CGG ATG GTC	72	179pb
IS6110 low	TCA GCG GAT TCT TCG GTC GTG GTC	66	

Fonte: Frota (2015).

A amplificação foi realizada no Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) e envolveu a desnaturação inicial das fitas de DNA por 2 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 63,4°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 15 minutos. Após o término, as amostras foram mantidas a 4°C no termociclador e armazenadas a -20°C. O produto obtido foi de 179 pb.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% (*mabA* e *katG*) e 3% (*rrs*, *rpoB* e *katG*) para confirmação da amplificação. Para tanto, 2 µl dos produtos da PCR foram misturados a 2 µl de tampão e aplicados em gel de agarose 1% preparado com TBE 1× contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100pb (Promega) para comparação do tamanho das bandas. A eletroforese foi desenvolvida a 90V no Eletrophoresis Power Supply EPS 300 (GE Healthcare) e as bandas foram digitalizadas em Imagequant 300 (GE Healthcare).

4.12 Identificação das mutações nos genes *rpoB* 531, *katG*315, *mabA*-15, *gyrA* e *rrS*

A técnica de PCR-MAS que foi realizada neste estudo foi baseada nos protocolos de VADWAI *et al.* (2012), KUMARI *et al.* (2017) e SIU *et al.* (2010) (TABELA 2).

Tabela 2 - Iniciadores da técnica PCR-MAS para identificação das mutações em *M. tuberculosis*.

Iniciadores	Sequencia (5'->3')	Tm (°C)	Produto (pb)
rpoBF	CGT TGA TCA ACA TCC GGC CGG TG	74	243
rpoBR	CCA CCT TGC GGT ACG GCG TT	66	
rpoB531F	CCA CAA GCG CCG ACT GTC	60	164
gyrAF	ATC GCC GGG TGC TCT ATG CGA	66	327
gyrAR	GCA CCC GGC CGT CGT AGT TA	66	
gyrA94F	CGA CGC GTC GAT CTA CGA	58	218
rrsF	GCA ACC CTT GTC TCA TGT TG	64	438
rrsR	GAA AGG AGG TGA TCC AGC CG	62	
RRSR2	GTT ACC GAC TTT CAT GAC G	64	322
katG315_0Fx	GCA GAT GGG GCT GAT CTA CGT GAA CC	72	435
KatG315_4Rx	AAC GGG TCC GGG ATG GTG CC	70	
katG315_5Rx	TCC ATA CGA CCT CGA TGC CGC	72	296
MabA-115Fx	ACA AAC GTC ACG AGC GTA ACC CCA G	72	454
MabA+366-Rx	GAG GTT GGC GTT GAT GAC CTT CTC G	70	
MabA+4Rx	GCA GTC ACC CCG ACA HCC TAT CG	72	123

Fonte: VADWAI *et al.*, (2012), KUMARI *et al.*, (2017) e SIU *et al.*, (2010).

PCR-MAS: PCR multiplex alelo específico Tm: temperatura de anelamento; pb: pares de base.

4.12.1 Condições PCR-MAS *rpob-531* e *gyrA*

As amplificações ocorreram de acordo com o descrito por Vadwai *et al.* (2012). Para amplificação da R: 0,125 µl do iniciador rpoBF (20 pMol), 0,5 µl do iniciador rpoBR (20 pMol), 2,5 µl do iniciador *rpob531Fy* (20 pMol), 1 µl de DNA (20 ng/µl), 12,5 µl de Go Taq G2 Green Master Mix 2x, 1,25µl de DMSO e 7 µl de água. As condições da reação foram 94°C por 15 min, seguido de 25 ciclos a 94°C por 1 min, 72°C por 1min e 72°C por 1min, 30 ciclos de 94°C por 1min, 65°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final a

72°C por 10min.

Como controle positivo foi utilizado 1µl de DNA (20 ng/µl) de *M. tuberculosis* H37Rv. Para amplificação da FQ: 0,25 µl do iniciador gyrAF (20 pMol), 0,5 µl do iniciador gyrAR (20 pmol), 2,5 µl do iniciador gyrA94F, 1 µl de DNA (20 ng/ µl), 12,5 µl de Go Taq G2 Green Master Mix. As condições da reação foram as mesmas da R.

4.12.2 Condições PCR–MAS nos genes *katG315*, *mabA-15*

O estudo das mutações para I teve como base SIU *et al.* (2010). Para amplificação do códon katG-315: 0,6 µl do iniciador katG315_0Fx (20 pMol), 0,8 µl do iniciador katG315_4Rx (20 pMol), 0,6 µl do iniciador katg315_5Rx (20 pMol), 2,5 µl de DNA (20 ng/µl), 12,5 µl 12,5 µl de Go Taq G2 Green Master Mix e 8,0 µl de água. As condições da reação foram 96°C por 8 min, seguido de 6 ciclos de 95°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 30 seg, 6 ciclos de 95°C por 1 min, 70°C por 40 seg e 72°C por 30 seg, 25 ciclos de 94°C por 1 min, 68°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e extensão final a 72°C por 10 min. Como controle positivo foi utilizado 2,5 µl de DNA (20 ng/µl) de *M. tuberculosis* H37Rv. Para amplificação do códon mabA-15: 0,85 µl do iniciador MabA-115Fx (20pMol), 0,17 µl MabA+366-Rx (20 pMol), 0,85 µl MabA+4Rx (20 pMol), 2,5 µl de DNA (20ng/µl), 12,5 µl de PCR 12,5 µl de Go Taq G2 Green Master Mix e 8,0 µl de água. As condições da PCR foram as mesmas do katG315.

4.12.3 Condições PCR–MAS no gene *rrs*

A amplificação ocorreu conforme KUMARI *et al.* (2017). As condições de amplificação foram: 1 µl do iniciador rrsF (10 pMol), 1 µl do iniciador rrsR (10 pMol), 1,0ul rrsR2 (10pMol), 5,0ul de DNA (50 ng/µl), 12,5 µl de Go Taq G2 Green Master Mix e 4 µl de água. As condições da reação foram 96°C por 5 min, seguido de 5 ciclos de 95°C por 15 seg, 66°C por 5 seg e 72 °C por 20 seg, 5 ciclos de 95 °C por 15 seg, 95°C por 5 seg e 64 C por 5 seg, 25 ciclos de 94°C por 15 seg, 62 °C por 5 seg e 72°C por 20 seg e extensão final a 72°C por 10min.

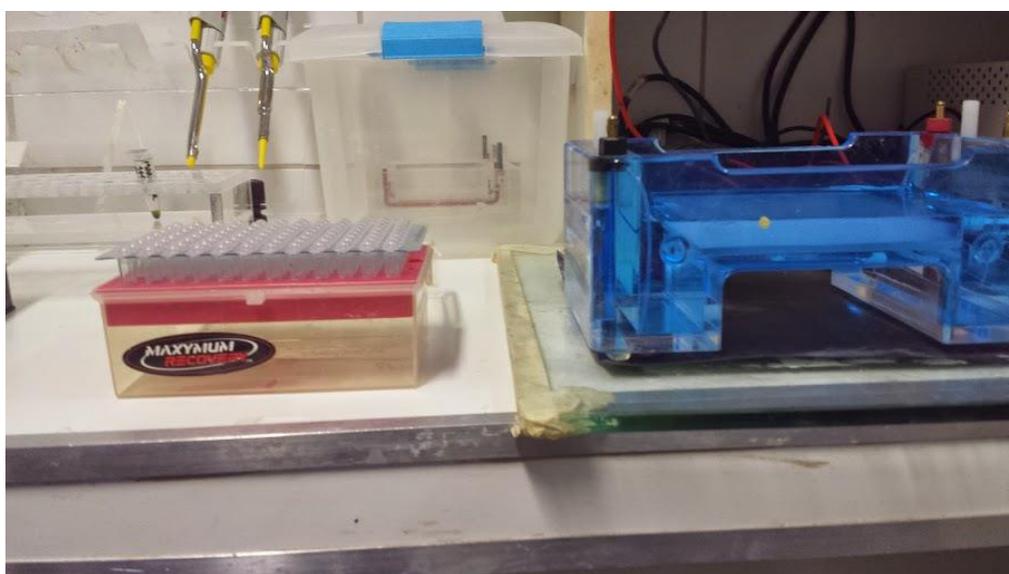
4.13 Eletroforese de detecção dos produtos dos genes *rpoB531*, *katG315*, *mabA-15*, *gyrA* e *rrs*.

Os produtos foram separados por eletroforese na fonte voltagem “Eletrophoresis Power Supply” - EPS 300 (GE Healthcare) em gel de agarose a 3 % em tampão TBE 1× (tris base 1 mM, ácido bórico 0,9 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e coloração com 0,5 µL de

brometo de etídio 10 mg/ml. Os géis foram preparados em bandejas eletroforéticas de 12 por 8 cm de tamanho. As corridas ocorreram a 90 volts por 40 a 55 minutos.

As amostras foram aplicadas nos poços dos géis, sempre em ordem padronizada dos iniciadores, ficando por último os controles negativos, sendo colocado em cada poço do gel 10 µl de cada produto de PCR-mix correspondente da placa. No primeiro poço e último poço foram aplicados 6µL do marcador de DNA de peso molecular de 100pb (Promega). Os fragmentos foram ao final visualizados e digitalizados no sistema "ImageQuant" 300 (GE Healthcare; FIGURA 9).

Figura 9 - Preparo da separação eletroforética para detecção de resistência dos genes *rpoB531*, *katG315*, *mabA-15*, *gyrA* e *rrs*.



Fonte: Próprio autor.

4.14 Sequenciamento

Esse procedimento foi realizado no Instituto Evandro Chagas, na cidade de Belém, no estado do Pará. Com a finalidade de confirmar os produtos amplificados, foi realizado o sequenciamento do produto amplificado da região referente a cada mutação nos genes estudados (*rpoB*, *katG315*, *mabA* *gyrA* e *rrs*), empregando os iniciadores que foram desenhados pelos próprios pesquisadores (TABELA 3).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit QIAquick PCR Purification antes do sequenciamento no equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), com a utilização dos kits BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®) e BigDye XTerminator Purification (Applied Biosystems®). As sequências obtidas foram analisadas com o software SecScape v2.7 (Applied Biosystems) e BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright © 1997-2013 Tom Hall, com posterior

realização de BLAST no site da NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando um ciclo de BigDye Terminator Kit de sequenciamento.

Tabela 3 - Iniciadores da técnica de sequenciamento genético para identificação das mutações em *M. tuberculosis*

Iniciadores	Sequencia (5'->3')	Tm (°C)	Localização em relação ao gene alvo	Produto (pb)
rpoBF	GCGTCGGTCGCTATAAGGTC	60,6	991 á 1728	818
rpoBR	CGAGACGTCCATGTAGTCCA	58,9		
gyrAF	CGCAACCCTGCGTTCTGAATTG	62,8	-34 à 774	809
gyrAR	CCTCAACAACCTCCGCGCAT	61,3		
rrsF	ATAGGCGTTCCTTGTGGC	60,8	1009 à 1787	778
rrsR	CACAAAGAACACGCCACCG	60,0		
katG315F	GCTTCAAGACGTTCTGGGTTTC	59,5	529 à 1369	840
katG315R	TGGCAATCTCGGCTTCGC	60,8		
mabAF	CGGGAAGATCCGCGTCG	60,3	-375 à 431	806
mabAR	CTGCCGGAGACCGAACCT	61,3		

Fonte: próprio autor

4.15 Georreferenciamento

Para o georreferenciamento, em coordenadas geográficas, dos endereços de residência dos casos de TB resistente foi utilizado o Google Earth versão 6.2. Com relação, a distância entre casos de TB foi utilizada a ferramenta de medição linear do software QGIS, após inspeção visual de definição dos clusters. Os mapas foram elaborados no software QGIS versão 2.16.2. As propriedades de primeira ordem foram descritas em termos de densidade populacional, utilizando-se um procedimento de estimacão denominado Kernel bivariado (DIGGLE, 1983), usando o ArcMap. A propriedade de segunda ordem, também denominada agregacão espacial ou "clustering", foi avaliada através da função-K e estatísticas baseadas nas distâncias inter eventos (DIGGLE, 1983). O QGIS é um software livre. "GNU GENERAL PUBLIC LICENSE Version 2, June 1991. Copyright (C) 1989, 1991 Free Software Foundation, Inc., 51

Franklin Street, Fifth Floor, Boston, MA.

A base cartográfica utilizada no estudo foi vetorial do tipo “shapefile” com bairros de Fortaleza, na projeção Universal Transversa de Mercator (UTM), Sirgas 2000, obtida no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Essa base é atualizada para o Censo de 2010 e é constituída por 119 bairros. Os municípios oficiais que compõem a região metropolitana de Fortaleza são: Aquiraz, Cascavel, Caucaia, Chorozinho, Eusébio, Guaiuba, Horizonte, Itaitinga, Maracanaú, Maranguape, Pacajus, Pacatuba, Pindoretama e São Gonçalo do Amarante.

5 RESULTADOS

5.1 Características fenotípicas das amostras isoladas

No período de janeiro a dezembro de 2017, foi reportado no HM 56 amostras com cultura positiva e perfil fenotípico de resistência aos fármacos anti-TB obtidos pelo sistema BD BACTEC MGIT 460TB. Deste total de amostras foram excluídas sete, cinco por apresentarem resultado positivo para HIV e duas por contaminação. Deste modo nosso estudo incluiu 49 amostras de isolados de *M. tuberculosis* DR.

Entre as 49 amostras isoladas, obtivemos 24,5% (12/49) com resistência a um fármaco, sendo que destes 14,3% (7/49) apresentavam resistência a I, 8,2% (4/19) resistência a R e 2,0% (1/49) apresentava resistência a S (TABELA 4). A resistência até dois fármacos correspondeu a 36,7% (18/49) das amostras, dentre as quais 30,6% (15/49) foram classificadas como TB multidroga resistente. Com relação ao padrão de resistência a três ou mais fármacos, verificamos um percentual de 38,7% (19/49). Destes, 22,4% (11/49) dos isolados foram resistentes às quatro drogas testadas (R+I+S+E). Essas amostras com resistência a quatro fármacos não foram caracterizadas como TB-XDR pois não é realizado o teste de susceptibilidade às FQ.

Tabela 4 - Distribuição do perfil de resistência aos fármacos anti-tuberculose dos isolados de *M. tuberculosis* de 49 pacientes com tuberculose pulmonar atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a fevereiro de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.

Perfil de resistência	<i>M. tuberculosis</i> (N)	(%)
1 fármaco	12	(24,5)
S	1	(2,0)
R	4	(8,2)
I	7	(14,3)
2 fármacos	18	(36,7)
I + E	1	(2,0)
I + S	2	(4,1)
I + R	15	(30,6)
≥ 3 fármacos	19	(38,7)
R + I + S	8	(16,3)
R + I + E + S	11	(22,4)
Total	49	100

Fonte: Próprio autor (2018).

I - isoniazida, R - rifampicina, S – estreptomicina, E – etambutol.

5.2 Características da população

As 49 amostras isoladas foram divididas em dois grupos: o grupo controle, composto por pacientes com resistência até dois fármacos, e o grupo caso que foi constituído por indivíduos com resistência a três ou mais fármacos. Deste modo, 19 pacientes foram classificadas como sendo do grupo caso e 30 pacientes como do grupo controle.

De acordo com as características sócio-demográficas apresentadas na Tabela 5, verificamos que a mediana da idade de todos os 49 participantes foi de 44 anos. Na distribuição entre as faixas etárias a maioria dos participantes se encontrava na faixa menor que 30 anos, com frequência de 36,7% (18/49); este predomínio foi observado no grupo controle com 43,3% (13/30); porém, nos casos, a faixa etária predominante foi com idade superior ou igual a 50 anos com frequência de 42,1% (8/19). Em relação ao sexo, houve um predomínio de homens no total dos participantes de 53,1% (26/49); todavia, no grupo controle ocorreu predomínio do sexo feminino 60% (18/30) comparado aos casos, que apresentou 26,3% (5/19) sendo esta diferença com significância estatística ($p=0,0213$). Deste modo, no presente estudo, os homens apresentaram um maior risco no desenvolvimento de resistência a três ou mais fármacos (Tabela 5).

Em relação ao nível de escolaridade, houve um predomínio no total de participantes com mais de quatro anos de estudo 73,5% (36/49), sendo este semelhante ao observado entre os grupos casos 68,4% (13/19) e controles 63,3% (19/30). Com relação ao emprego, a maioria dos participantes eram desempregados 77,5% (38/49); esta frequência, foi semelhante ao encontrado nos casos 84,2% (16/19) e nos controles 73,4% (22/30). Analisando a procedência dos participantes, a maioria residia em Fortaleza 81,6% (40/49); este dado foi semelhante entre os casos 78,9% (15/19) e controles 83,3% (25/30).

Tabela 5 - Associação entre as características sociodemográficas e o perfil de resistência realizado pelo sistema BACTEC MGIT 960 dos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.

Variáveis	Total		Casos		Controle		p ^a	95% IC (RC)
	49	(%)	19	(%)	30	(%)		
Idade (anos)								
Média (± DP)	42,5	(±11,2)	45,0	(±14,5)	40,9	(±12,1)		
< 30	18	(36,7)	5	(±15,7)	13	(±43,3)	1	
40 - 49	16	(36,6)	6	(±31,5)	10	(±33,3)	0,366 ^b	1,6 (0,4-6,6)
> 50	15	(19,5)	8	(±42,1)	7	(±23,3)	2,238 ^c	3,0 (0,7-12,6)
Sexo								
Masculino	26	(53,1)	14	(73,7)	12	(40,0)	0,0213	4,2 (1,2-14,7)
Feminino	23	(46,9)	5	(26,3)	18	(60,0)		1,0
Escolaridade								
< 4 anos	13	(26,5)	6	(31,6)	11	(36,7)	0,524	1,5 (0,4-5,4)
> 4 anos	36	(73,5)	13	(68,4)	19	(63,3)		1,0
Ocupação								
Desempregado	38	(77,5)	16	(84,2)	22	(73,4)	0,492	1,9 (0,4-8,4)
Aposentado	11	(22,5)	3	(15,8)	8	(26,6)		1,0
Procedência								
Fortaleza	40	(81,6)	15	(78,9)	25	(83,3)		
Região metropolitana	5	(10,2)	2	(10,5)	3	(10,0)		
Interior do Estado	4	(8,1)	2	(10,0)	2	(6,7)		

Fonte: Próprio autor (2018). DP – desvio padrão; IC – intervalo de confiança; RC – razão de chance.

^a Teste qui-quadrado de Pearson.

^b Comparação de 40 a 49 anos com acima de 50 anos;

^c Comparação de menos de 39 anos com acima de 50 anos.

A Tabela 6 apresenta as comorbidades e os hábitos sociais entre os participantes incluídos no estudo. Somente dois pacientes eram portadores de hipertensão arterial, com distribuição semelhante entre os dois grupos. Em relação a diabetes, a maioria dos participantes não apresentava essa comorbidade 67,8% (33/49). Entretanto, quando comparado o grupo caso com o controle, é observado que nos casos há um predomínio significativamente estatístico de pessoas com diabetes, apresentando 52,6% (10/19), ao contrário dos controles, onde o predomínio foi de pessoas sem diabetes 80% (24/30; p=0,017). Desta forma, a diabetes se revelou como um fator de risco para resistência a três ou mais fármacos.

Tabela 6 – Comorbidades e hábitos sociais associados ao fenótipo de resistência obtido pelo sistema BACTEC MGIT 960 dos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.

Variáveis	Total N = 49 (%)	Casos N=19 (%)	Controle N= 30 (%)	p ^a	95% IC (RC)
Diabetes					
Sim	16 (32,2)	10 (52,6)	6 (20,0)	0,017	4,4 (1,23-15,6)
Não	33 (67,8)	9 (47,4)	24 (80,0)		
Etilismo					
Sim	26 (53,1)	14 (73,7)	12 (40,0)	0,021	4,2 (1,2-14,7)
Não	23 (46,9)	5 (27,3)	18 (60,0)		
Tabagismo					
Sim	18 (36,7)	6 (31,6)	12 (40,0)	0,551	1,4 (0,4-4,8)
Não	31 (63,3)	13 (68,4)	18 (60,0)		
Drogas ilícitas					
Sim	5 (10,2)	3 (15,8)	2 (6,7)	1,057	2,6 (0,4-17,4)
Não	44 (89,8)	16 (84,2)	28 (93,3)		

Fonte: Próprio autor (2018). DP – desvio padrão; IC – intervalo de confiança; RC – razão de chance.
^a teste qui-quadrado de Pearson

Para os hábitos sociais, foi observado que o alcoolismo foi significativamente predominante entre os casos, com 73,7% (14/19); em relação aos controles apresentou 40% (12/30). O alcoolismo aumentou o risco da resistência aos fármacos. Com relação ao tabagismo a maioria dos participantes declarou não ter o hábito de fumar, com frequência de 63,3% (31/49), sendo semelhante ao observado entre os grupos casos, com 68,4% (13/19) e controle de 60% (18/30). Em relação a taxa de usuários de drogas ilícitas a maioria dos participantes negou o hábito 89,8% (44/49). Este dado foi semelhante ao encontrado entre os grupos caso, com 84,2% (16/19) e controle de 93,3% (28/30), conforme observado na Tabela 6.

A Tabela 7 mostra as frequências dos pacientes quanto a história prévia de tratamento anterior. Foi observado que a maioria dos participantes, 69,4% (34/49) realizou tratamento prévio para TB. Este predomínio, foi semelhante nos casos com 73,7% (14/19) e no grupo controle com 66,7% (20/30). Com relação ao local do provável contato, a maioria dos participantes, ou seja, 69,4% (34/49) não souberam como adquiriram TB. Este dado foi semelhante entre os casos, com 73,7% (14/19) e controles, com 66,7% (20/30).

Também perguntamos no questionário a quantidade de pessoas que residiam no mesmo domicílio com o paciente de TB. A maioria dos participantes, ou seja, 67,3% (33/49) informaram que residiam com três ou menos pessoas na sua residência. Todavia, entre os pacientes com resistência a três ou mais fármacos (grupo caso), foi verificado que 68,4% (13/19) conviviam com quatro ou mais pessoas, ao contrário do grupo controle, em que o predomínio foi de convivência com três ou menos pessoas, ou seja, 90,0% (27/30; $p=0,0165$). Deste modo, a convivência com uma quantidade acima de quatro pessoas apresentou-se como um fator de risco para o desenvolvimento de resistência aos fármacos.

Tabela 7 - Aspectos clínicos apresentado pelos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.

Variáveis	Total N = 49 (%)	Casos N=19 (%)	Controle N= 30 (%)	p ^a	95% IC (RC)
História de tratamento anterior					
Sim	34 (69,4)	14 (73,7)	20 (66,7)	0,604	1,4 (0,39-4,9)
Não	15 (30,6)	5 (26,3)	10 (33,3)		
Local do provável contato					
Ignorado	34 (69,4)	14 (73,7)	20 (66,7)	0,604	1,4 (0,39-4,9)
Intradomicílio	15 (30,6)	5 (26,3)	10 (33,3)		
Número de contatos intradomiciliares					
≤ 3	33 (67,3)	6 (31,6)	27 (90,0)	0,0165	1 4,3 (0,3-14,8)
≥ 4	16 (32,7)	13 (68,4)	3(10,0)		
Padrão da radiografia do tórax					
Unilateral não cavitária	6 (12,2)	3 (15,8)	3 (10,0)	0,719 ^b	2,3 (0,2-18,9)
Unilateral cavitária	10 (20,4)	3 (15,8)	7 (23,3)		
Bilateral cavitária	33 (67,3)	13 (68,4)	20 (66,7)	0,673 ^c	1,5 (0,3-6,9)
Baciloscopia (No de cruces)					
Uma	18 (36,7)	6 (31,6)	12 (40,0)		1,0 1,73(0,5-14,8)
≥ duas	31 (63,3)	13 (68,4)	18 (60,0)		

Fonte: próprio autor (2018).

Abreviações: IC – intervalo de confiança; RC – razão de chance.

^aTeste qui-quadrado de Pearson;

^bComparação de unilateral não cavitária a com unilateral cavitária;

^cComparação de unilateral não cavitária anos com bilateral cavitária.

Sobre a análise de exames laboratoriais para diagnóstico da TB (TABELA 7), foi observado o padrão radiológico para TB pulmonar de acordo com as recomendações do Manual de controle da tuberculose do Ministério da Saúde (SAÚDE, 2011). A presença de lesões bilaterais cavitárias foram predominantes em todos os participantes, com 67,3% (33/49). Este dado, foi semelhante aos casos, com 68,4% (13/19) e aos controles, com 66,7% (20/30). A lesão unilateral cavitária obteve frequência de 15,8% (3/19) e 23,3% (7/30) para os casos e controles, respectivamente. Em relação à quantificação baciloscópica no escarro, 63,3% (31/49) do total dos participantes apresentavam como resultado o padrão de duas ou três cruzes, sendo este resultado semelhante ao observado entre os grupos casos, com 68,4% (13/19) e controles, 60,0% (18/30).

As variáveis sexo masculino, diabetes, alcoolismo e número de contatos intradomiciliares, que apresentaram significância estatística foram levadas ao modelo de regressão logística com objetivo de modelar a probabilidade de ocorrência de resistência a três ou mais fármacos, em função destas variáveis (TABELA 8).

Tabela 8 - Análise do modelo de regressão logística dos fatores relacionados a resistência a três ou mais fármacos modelo logístico para modelar resistência aos fármacos.

Variáveis	OR	IC 95%	p^a
Sexo Masculino	5,25	1,4 – 18,4	0,034
Diabetes	13,0	2,9 – 37,1	0,003
Alcoolismo	2,33	0,6 – 8,1	0,284
Número de Contatos	2,05	0,6 – 7,0	0,0165

Fonte: próprio autor (2018).

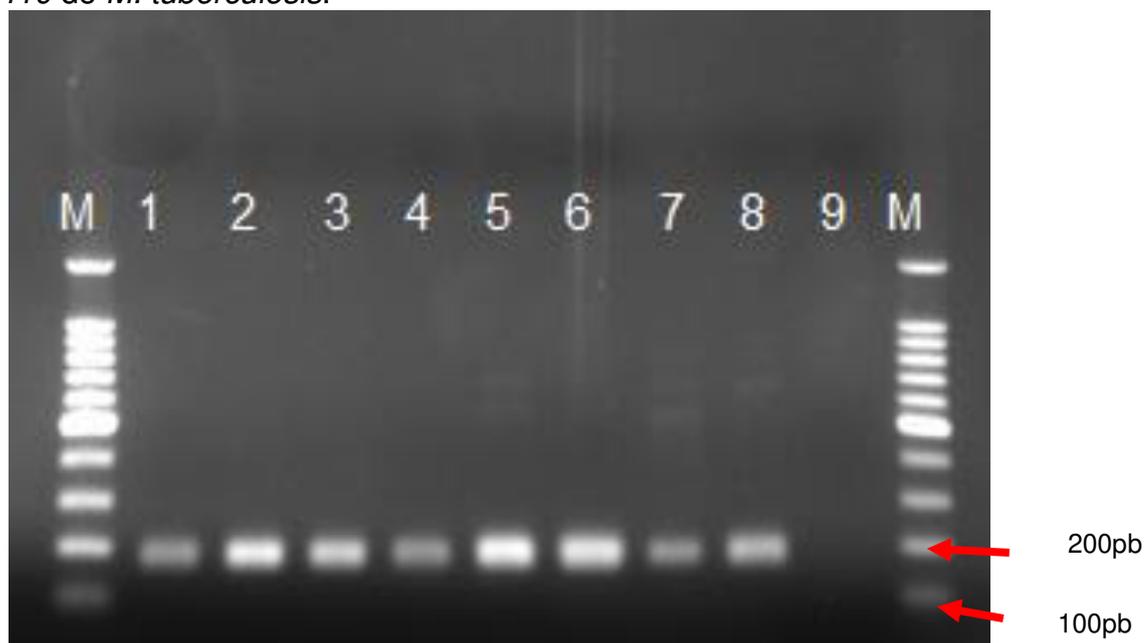
^aTeste qui-quadrado de Pearson;

Verificamos que pacientes do sexo masculino tem 5,25 vezes mais chances de terem TB resistente a três ou mais fármacos, do que as mulheres. Com relação a diabetes observamos que os pacientes que tem essa comorbidade apresentam 13,0 vezes mais chances de terem TB a três ou mais fármacos, do que os que não tem. Como podemos observar os resultados encontrados no modelo de regressão logística é muito semelhante aos encontrados no teste do Qui-Quadrado e razão de chances, enfatizando a associação dessa variáveis com o fenótipo de resistência da TB.

5.3 Caracterização genômica de resistência às drogas anti-TB

Em nosso estudo 49 pacientes portadores de TB resistente foram submetidos a PCR convencional da região 179 pb da sequência IS6110, específica para identificação molecular do complexo *M. tuberculosis*. O ensaio mostrou positividade de 100% (49/49; (FIGURA 10).

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com produtos de amplificação da região IS6110 de *M. tuberculosis*.



Fonte: Próprio autor (2018). Gel de agarose 1,5% de produtos de amplificação da região IS6110 do *M. tuberculosis* (179pb). Poços M :marcadores 100pb; poços 1 a 7, representam amostras positivas; poço 8: controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis* e poço 9: controle negativo com H₂O.

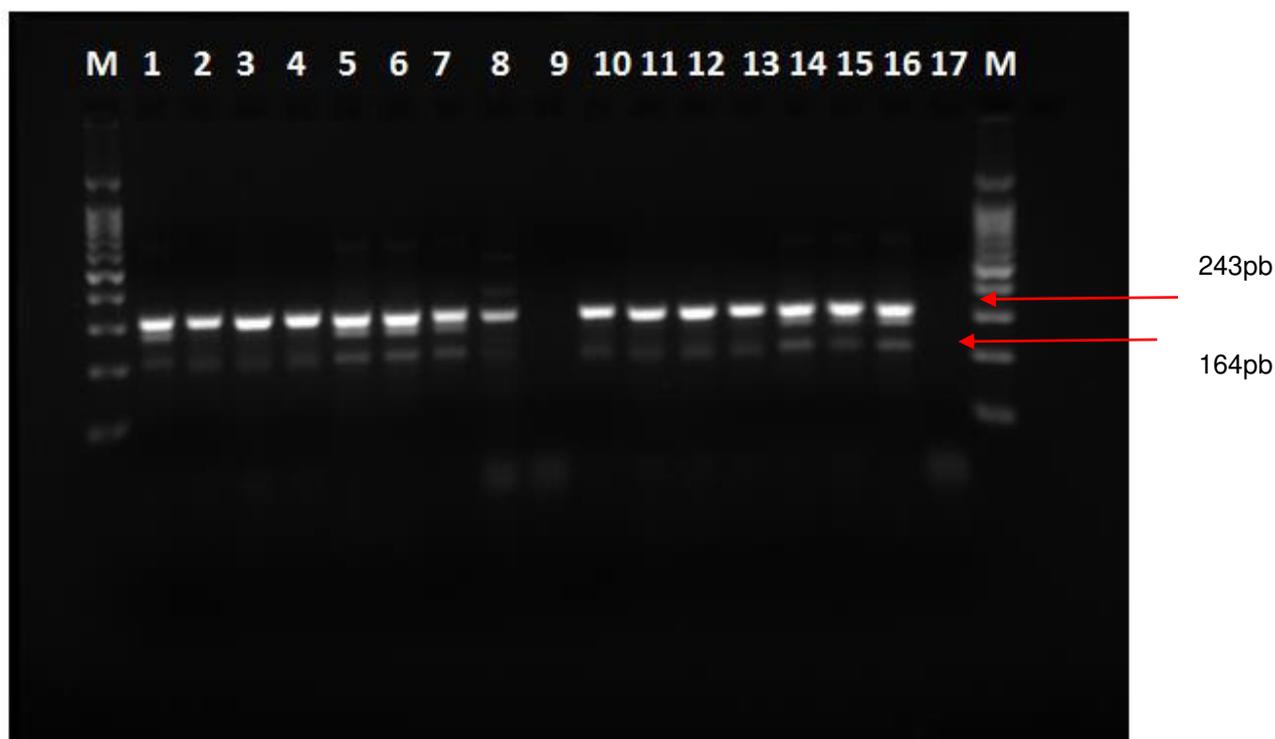
As amostras de TB resistente que foram positivas para o IS6110 foram submetidas aos ensaios de PCR – MAS para identificação de mutação nos genes *rpoB*, *katG*, *mabA*, *rrs* e *gyrA* (TABELA 9 e FIGURAS 11 a 15). Foram observadas 59 mutações pontuais nas 49 isolados de *M. tuberculosis* analisados por PCR-multiplex alelo específico. Destas, 31 apresentaram mutação no códon 315 do gene *katG*, representando assim 52,4% (31/59), seis amostras apresentaram mutação no gene *mabA* apresentando uma frequência de 12,2% (6/49). Com relação ao gene *rpoB*, foi observado que 18 amostras apresentaram resistência o que demonstra uma frequência de 30,5% (18/59) .Destas 18 amostras, 15 apresentaram resistência o códon 516 e três ao códon 526. Apenas três amostras positivaram para o gene *gyrA* o que caracteriza uma frequência de 5,0% (3/59).

Tabela 9 - Frequência das mutações nas regiões nucleotídicas dos genes *rpoB* (códon 516,526 e 531), *katG* (códon 315), *mabA* (códon 15), *rrs* (códon 1401) e *gyrA* (códon 94) dos isolados de *M. tuberculosis* dos 49 pacientes diagnosticados com tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.

MAS PCR	N	(%)
<i>rpoB</i>	18	(30,5)
<i>katG</i>	31	(52,4)
<i>mabA</i>	6	(12,2)
<i>gyrA</i>	4	(5,0)
<i>rrs</i>	0	(0,0)
Total	59	(100,0)

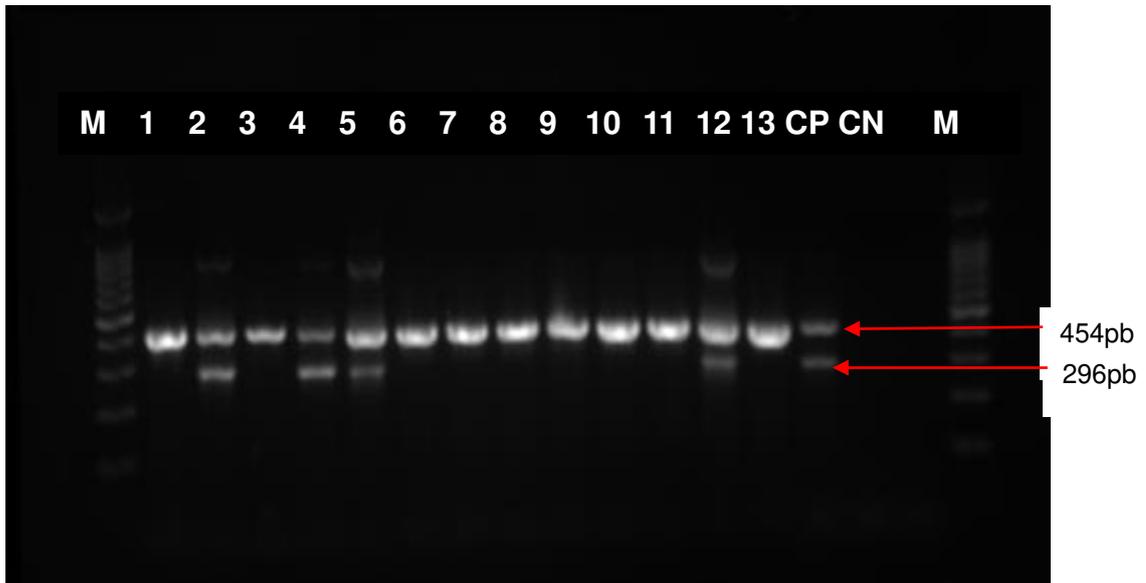
Fonte: próprio autor (2018).

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com produtos de amplificação do códon 531 do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*.



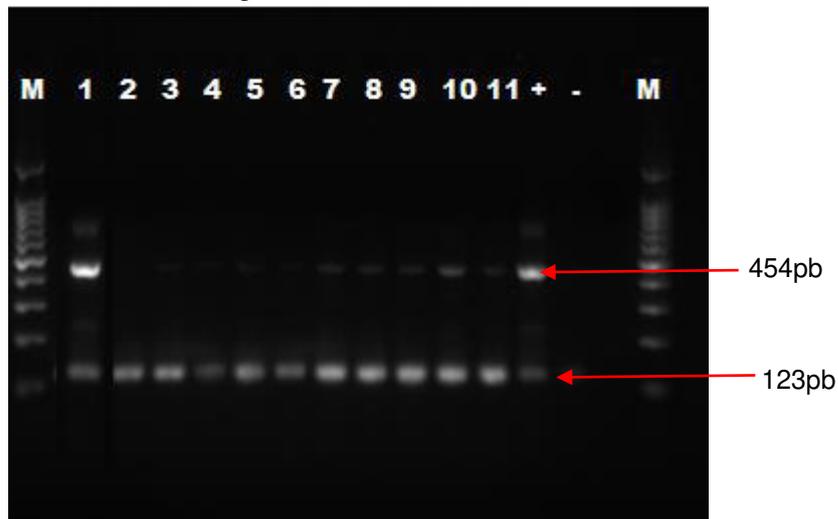
Fonte: Próprio autor (2018). Gel de agarose 3% de produtos de amplificação da região 531 do gene *rpoB*. Poços M: marcadores 100pb; poços 1 a 8 e 10 a 15 representam amostras sem mutação no códon 531 do gene *rpoB*, produtos de 164pb e 243pb. Poço 9: amostra sem amplificação. Poço 16: controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis* e poço 17: controle negativo com H₂O.

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de amplificação do códon 315 do gene *katG* de *M. tuberculosis*.



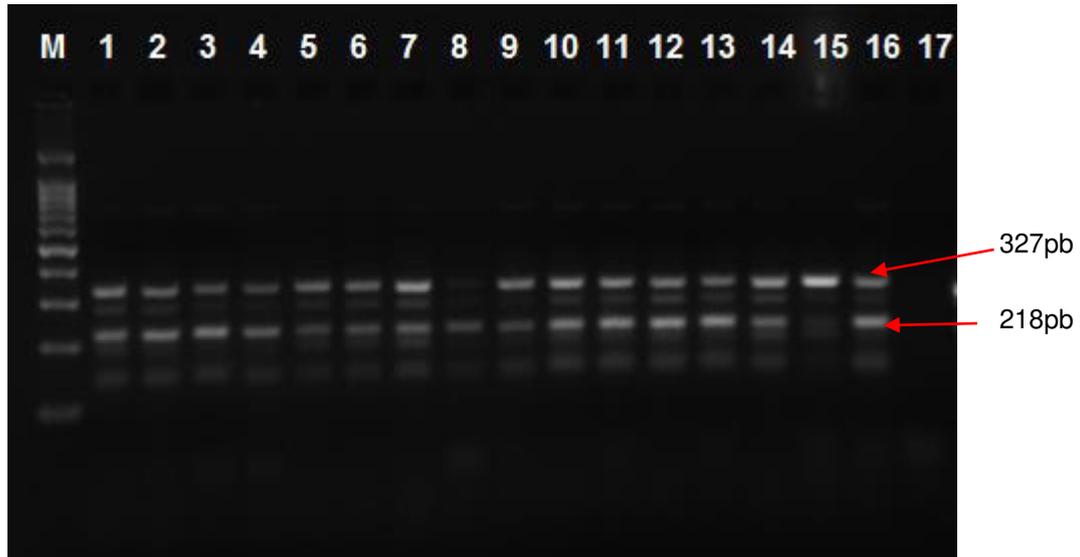
Fonte: Próprio autor (2018). Gel de agarose 2% de produtos de amplificação da região *katG* 315. Poços M - marcadores 100pb; 2, 4, 5 e 12 representam amostras sem mutação no códon 315 do gene *katG*, produtos de 296pb e 454pb. Poços 1, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 13 amostras com mutação (produto de 454pb); CP - controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis* e CN - controle negativo com H₂O.

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 2% com produtos de amplificação do códon 15 do gene *mabA* de *M. tuberculosis*.



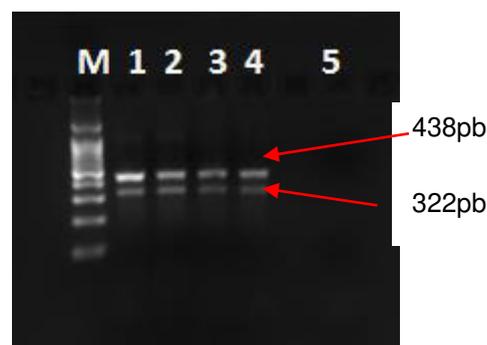
Fonte: Próprio autor (2018). Gel de agarose 3% de produtos de amplificação da região 15 do gene *mabA*. Poços M: marcadores 100pb; poços 1 a 11 representam amostras sem mutação no códon 15 do gene *mabA*, produtos de 123pb. Poço "+": controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis* e poço "-": controle negativo com H₂O.

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 3% com produtos de amplificação do códon 94 do gene *gyrA* de *M. tuberculosis*.



Fonte: Próprio autor (2018). Gel de agarose 3% de produtos de amplificação do códon 94 do gene *gyrA*. Poços M: marcadores 100pb; poços 1 a 15 representam amostras sem mutação no códon 94 do gene *gyrA*, produtos de 327pb e 218pb. Poço 16: controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis* e poço 17: controle negativo com H₂O.

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 3% com produtos de amplificação do códon 1401 do gene *rrs* de *M. tuberculosis*.



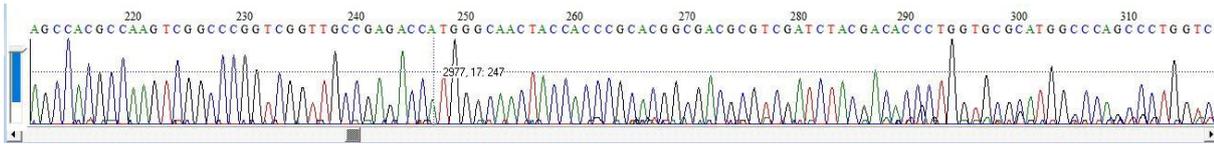
Fonte: Próprio autor (2018). Gel de agarose 3% de produtos de amplificação do códon 1410 do gene *rrs*. Poços M: marcadores 100pb; poços 1, 2 e 3 representam amostras sem mutação no códon 1401 do gene *rrs*, produtos de 438pb e 322pb; poço 4 - controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis* e poço 5 - controle negativo com H₂O.

5.4 Sequenciamento genético

Do total de 49 amostras submetidas a técnica de PCR-MAS, foi possível realizar o sequenciamento genético em 41 isolados *M. tuberculosis*. O procedimento aconteceu no Instituto Evandro Chagas, sendo realizado o alinhamento das sequencias, seguido de

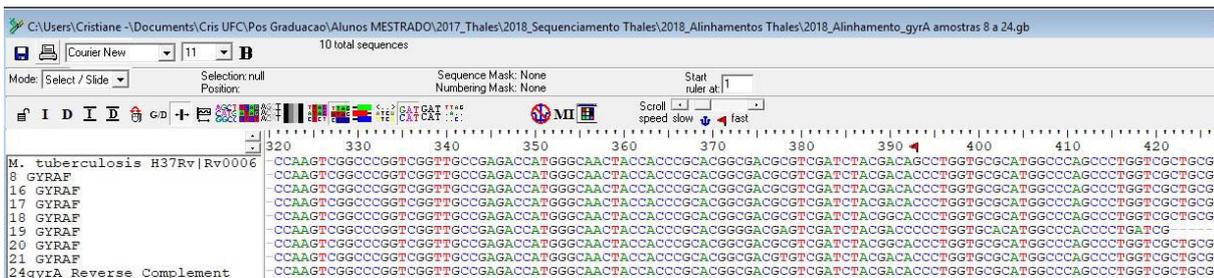
análise das mutações pontuais situadas na região alvo de cada gene de interesse. A figura 16 mostra a qualidade do DNA sequenciado e a Figura 17 mostra um exemplo de alinhamento dos isolados analisados.

Figura 16 - Eletroferograma da amostra 16, isolado clínico de *M. tuberculosis* evidenciando a qualidade do DNA.



Fonte: Própria autora (2018). O procedimento mostra boa linha de base, picos bem definidos e regular distância entre os picos (Programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*).

Figura 17 - Alinhamento de isolados de *M. tuberculosis* com a cepa padrão H37Rv quanto ao gene *gyrA*.



Fonte: Própria autora (2018). Alinhamento realizado no BioEdit software. A bandeira vermelha evidencia a mutação pontual no códon 95 (aGc/aCc).

A Tabela 10 mostra as frequências das mutações detectadas por sequenciamento dos genes relacionados a resistência aos fármacos I, R, S e FQ. Em relação ao fármaco I, foram sequenciadas 41 amostras em relação ao gene *mabA* (posição -375 a 431), sendo que oito (19,5%; 8/41) amostras apresentaram mutação no nucleotídeo -15. Com relação ao gene *katg*, foi verificada a presença de mutação em 31 isolados o que corresponde (75,6%; 31/41). Foram analisados os sítios que compreendem os códons 303 a 315, e todas as mutações encontradas corresponde ao códon 315(aGc/aCc). Destes 31 isolados com mutação, 3 (9,6%) isolados foram sensíveis no BACTEC e 28 (90,4%) apresentaram o fenótipo de resistente. A PCR-MAS foi capaz de identificar 27 isolados (87,1%; 27/31) destas amostras com mutação no códon 315.

Com relação a R, 41 amostras foram submetidas ao sequenciamento do gene *rpoB* (posição 911 a 1728), sendo capaz de detectar mutações nos códons 516, 526 e 531. Destas, a mutação mais frequente foi no códon 531 com 17 isolados (41,5%; 17/41) tCg para tTg, seguido do códon 516 com 15 isolados (36,5%;15/41) com mutações de

gAc para gTc (53,4%; 8/15) e Gac para Tac (46,6%; 7/15). No códon 526 foram detectadas mutações em três isolados (7,3%; 3/41), com mutações de Cac para Tac (33,3%; 1/3) e cAc para cGc (66,7%; 2/3). Dos 37 isolados com mutação, 35 (94,6%; 35/37) apresentaram fenótipo de resistência no BACTEC e 2 (5,4%; 2/37) foram sensíveis, sendo estas com mutações no códon 531. Em relação a PCR-MAS, somente 18 (48,6%; 18/37) isolados com mutação foram detectados.

Em relação ao gene *rrs* (posição 1009 a 1787)] relacionado a resistência a S, foram sequenciadas 41 isolados e nenhuma mutação foi detectada. A PCR-MAS também não detectou mutação nestas 41 amostras.

Em relação a FQ, foi sequenciado o gene *gyrA* (posição -34 até 774), sendo detectado mutações nos códons 89, 90, 94 e 95. Mutações no códon 95 foi o mais frequente (63,1%; 29/41), seguido do códon 90 (24,3%; 10/41), códon 94 (14,6%; 6/41) e códon 89 (2,4%; 1/41). A PCR-MAS identificou quatro dos seis isolados com mutação no códon 94 (gAc/gGc). O teste BACTEC não avalia o perfil de sensibilidade ao fármaco FQ.

Tabela 10 - Mutações observadas nos genes *mabA*, *rpoB*, *katG*, *rrs* e *gyrA*, e fenótipo de resistência e positividade ao PCR em isolados de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos, Fortaleza, Ceará.

Fármaco	Gene	Sequenciamento	BACTEC MGIT		PCR MAS
		Mutação Positiva N (%)	S ^a N (%)	R ^b N (%)	N (%)
Isoniazida (N=41)	<i>Gene mabA</i>	8 ^g	4 (9,9)	37 (90,1)	6 (14,6)
	Nucleotídeo C/T	8	0	8 (100,0)	6 (75,0)
	<i>Gene katG</i>	31 ^g	4 (9,9)	37 (90,1)	31 (75,6)
	Códon 315 S315T (aGc/aCc)	31 (77,5) 31 (100,0)	3 (9,6) 3 (9,6)	28 (90,0) 28 (90,3)	27 (87,1) 27 (87,1)
Rifampicina (N=41)	<i>Gene rpoB</i>	35 ^g	4 (9,7)	37 (90,6)	18 (43,9)
	Códon 516	15 (42,8)	0	15(100,0)	15 (100)
	D516J (Gac/Tac)	7 (46,6)	0	7 (100,0)	7 (100)
	D516V (gAc/gTc)	8 (53,4)	0	8 (100,0)	8 (100)
	Códon 526	3 (8,3)	0	3 (100,0)	3 (100)
	H526Y (Cac/Tac)	1 (33,3)	0	1 (100,0)	1 (100)
	H526S (CAc/CGc)	2 (66,7)	0	2 (100,0)	2 (100)
	Códon 531 S531L (tCg/tTg)	17 (48,9) 17 (100)	2 (11,8) 2 (11,8)	15 (88,2) 15 (88,2)	0
Aminoglicosídeo (N=41)	<i>Gene rrs</i>	sm ^g	23 (56,1)	18 (43,9)	0
	Códon 1401	sm			
Fluoroquinolona (N=41)	<i>Gene gyrA</i>	41 ^g	nt ^f		
	Códon 89	1 (2,4)	nt ^f	nt	0
	D89A (gAc/gGg)	1 (100)	nt	nt	0
	Códon 90	10 (24,3)			
	A90Z (gCg/gAg)	2 (20,0)	nt	nt	0
	A90V (gCg/gTg)	8 (80,0)	nt	nt	0
	Códon 94	6 (14,6)			
	D94A (gAc/gGc)	5 (83,3)	nt	nt	4 (80,0)
	D94N (Gac/Aac)	1 (16,7)	nt	nt	0
	Códon 95 S95N (aGc/aCc)	29 (63,1) 29 (100)	nt	nt	0

Fonte: próprio autor (2018). Abreviações: A, alanina; D, ácido aspártico; N, asparagina; S, serina; V, valina; Z, ácido glutâmico; Y, tirosina; H, histidina; F, fenilalanina; L, Leucina; T, treonina; G, glicina.

^aS, sensível; ^bR, Resistente; ePCR-MAS; ^esm, sem mutação; ^fnt, não testado; ^gtotal de amostras sequenciadas.

5.5 Associação da positividade BACTEC MGIT para rifampicina e isoniazida em relação a PCR-MAS e o sequenciamento.

Em relação a positividade das amostras do BACTEC MGIT com a positividade da PCR-MAS, não houve diferença estatisticamente significativa. Todavia, quando comparamos a positividade do BACTEC MGIT com a positividade do sequenciamento, foi observado uma diferença estatística (TABELA 11).

Tabela 11 – Tabela de contingência entre a positividade do BACTEC MGIT e o ensaio da PCR-MAS e o sequenciamento genético

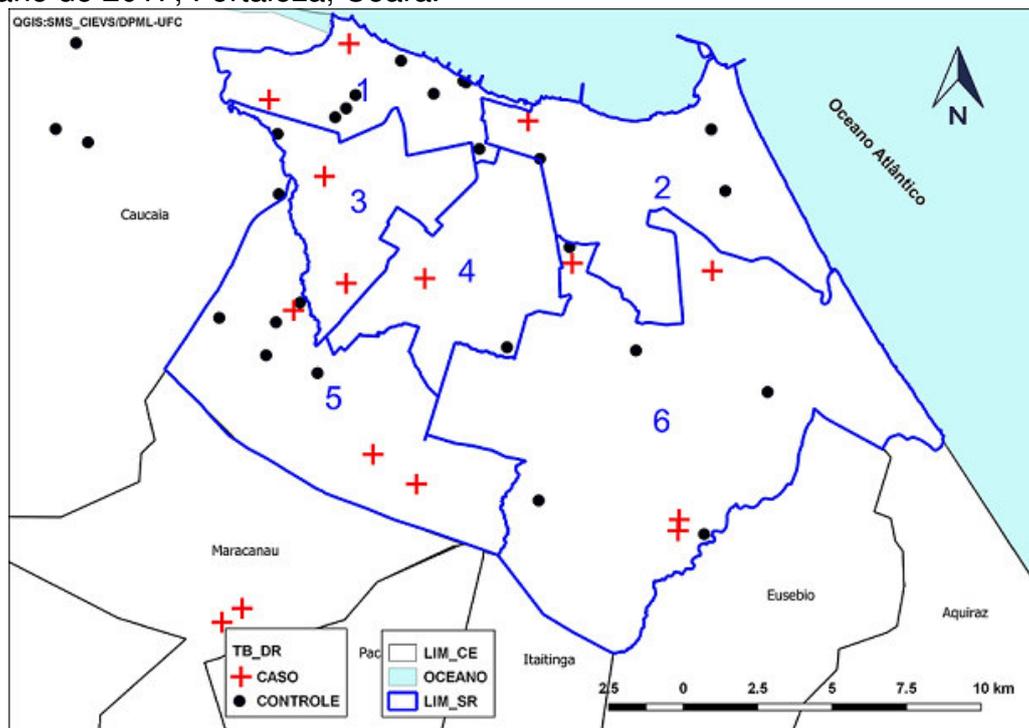
	BACTEC MGIT			p	k	S
	Total	Positivo	Negativo			
MAS PCR						
Rifampicina						
Mutação	30	28	2	0,09445	0,22222	0,93333
Sem mutação	19	14	5			
Isoniazida						
Mutação	43	40	3	0,00050	0,67062	0,90000
Sem mutação	6	4	2			
Sequenciamento						
Rifampicina						
Mutação	35	33	2	0,10540	0,28392	0,93023
Sem mutação	6	2	4			
Isoniazida						
Mutação	35	32	3	0,08046	0,32961	0,96970
Sem mutação	6	4	2			

Fonte: Próprio autor (2018). Abreviações: p, Qui-quadrado; K, índice disconcordância (kappa); S, sensibilidade.

5.6 Geoprocessamento de pacientes com tuberculose pulmonar

Os endereços dos 49 participantes do estudo foram georreferenciados em Fortaleza (N=40) e em municípios do interior do estado (N=6): Sobral, Uruburetama, Barroquinha, Redenção, Marco e Quixadá. Como mostrado na Figura 18, os 40 participantes localizados em Fortaleza são distribuídos nas cinco regionais, porém com maior concentração na regionais 1 e 5.

Figura 18 - Distribuição geográfica dos casos e controles de tuberculose no ano de 2017, Fortaleza, Ceará.

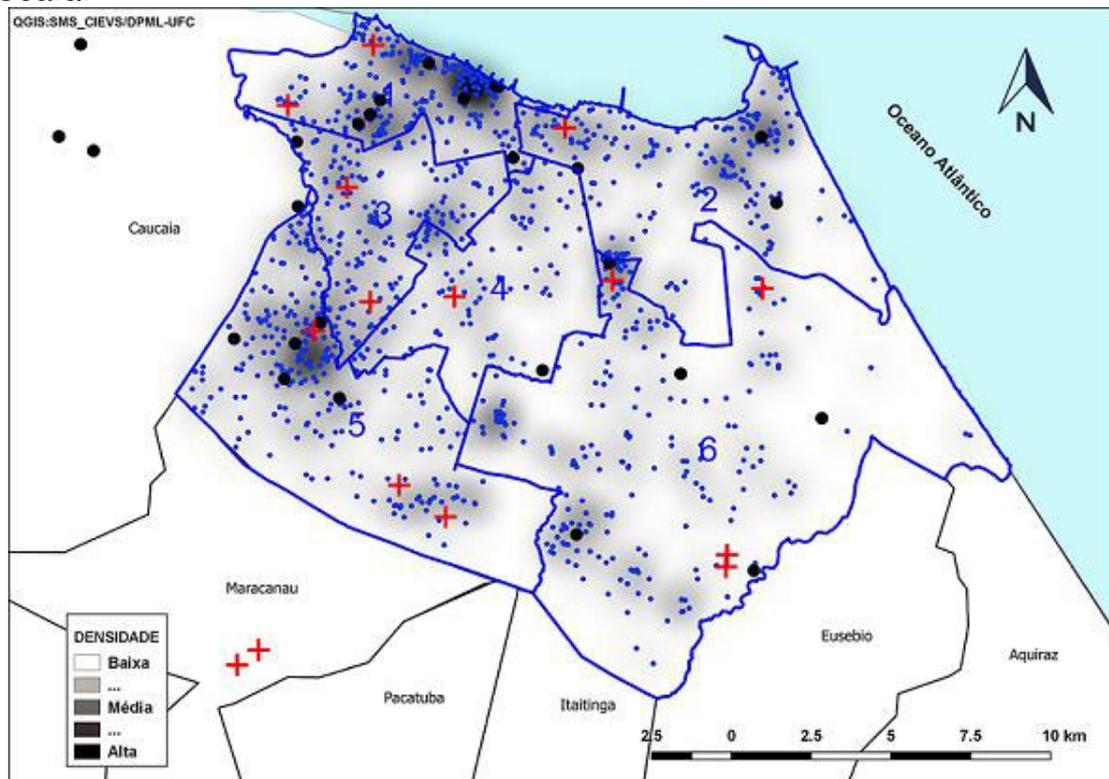


Fonte: Próprio autor (2018).

(+) 15 casos ($R \geq 3$ fármacos) e (●) 25 controles (≤ 2 fármacos).

Visando observar a proximidade de localização das residências dos casos e dos controles, e as notificações de TB pulmonar realizadas pelo SINAN no de 2017, foi elaborado um mapa com análise espacial com estimativa de densidade de Kernel (FIGURA 19). No estado do Ceará no ano de 2017, foram reportados e georreferenciados no SINAN 1.601 casos de TB, incluindo as formas clínicas pulmonar ($N = 1270$) e extra pulmonar ($N=331$). Contudo, somente 1.245 casos de TB pulmonar se encontram dentro da área delimitada de Fortaleza. O ANEXO C mostra o mapa com a distribuição da frequência das notificações pelo SINAN e os ANEXOS D e E mostram as frequências por bairro e regional no ano de 2017 em Fortaleza. Ainda de acordo com o mapa da Figura 19, foi verificada a presença de agrupamentos (“pontos quentes”) geograficamente próximos entre casos e controles do nosso estudo e as notificações do SINAN. As regionais administrativas 1, 5 e 3 foram responsáveis, em ordem decrescente, pela maior concentração de notificações de casos de TB.

Figura 19 - Distribuição geográfica de casos e controles de tuberculose e densidade de Kernel georreferenciados no SINAN no ano de 2017, Fortaleza-Ceará.

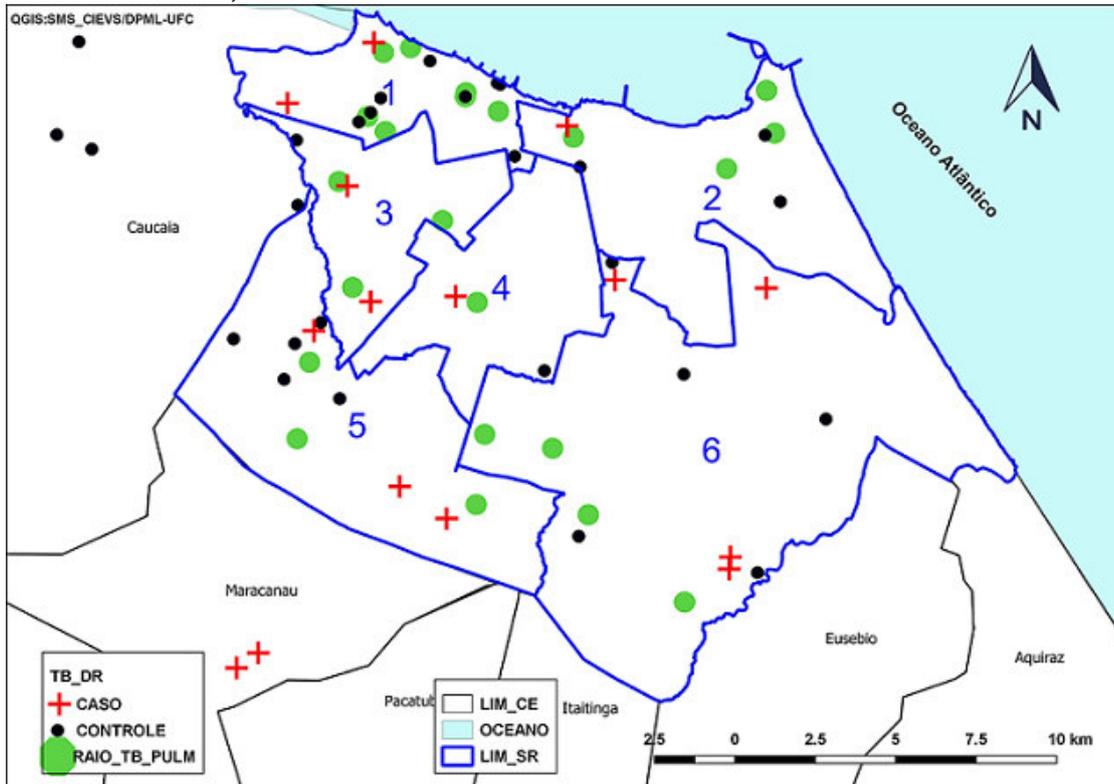


Fonte: Próprio autor (2018).

(+) 15 casos ($R \geq 3$ fármacos); (•) 25 casos ($R \leq 2$ fármacos); (•) 1.245 casos de TB pulmonar notificados pelo SINAN; algarismos 1 a 6: respectivas regionais administrativas; Densidade de kernel: baixa intervalo de 0 a 3 casos; média: 7 casos; alta: 17 casos.

Na Figura 20, é observado um padrão espacial dos casos, controles e agrupamentos de TB. Estes agrupamentos correspondem a três ou mais notificações de TB em um raio de até 10 metros, incluindo amostras do nosso estudo e do SINAN. Novamente, é observado que as regionais 1, 5 e 3 concentram uma grande quantidade de agrupamentos.

Figura 20 - Distribuição geográfica de casos e controles e notificações do SINAN de TB no ano de 2017, Fortaleza-Ceará.

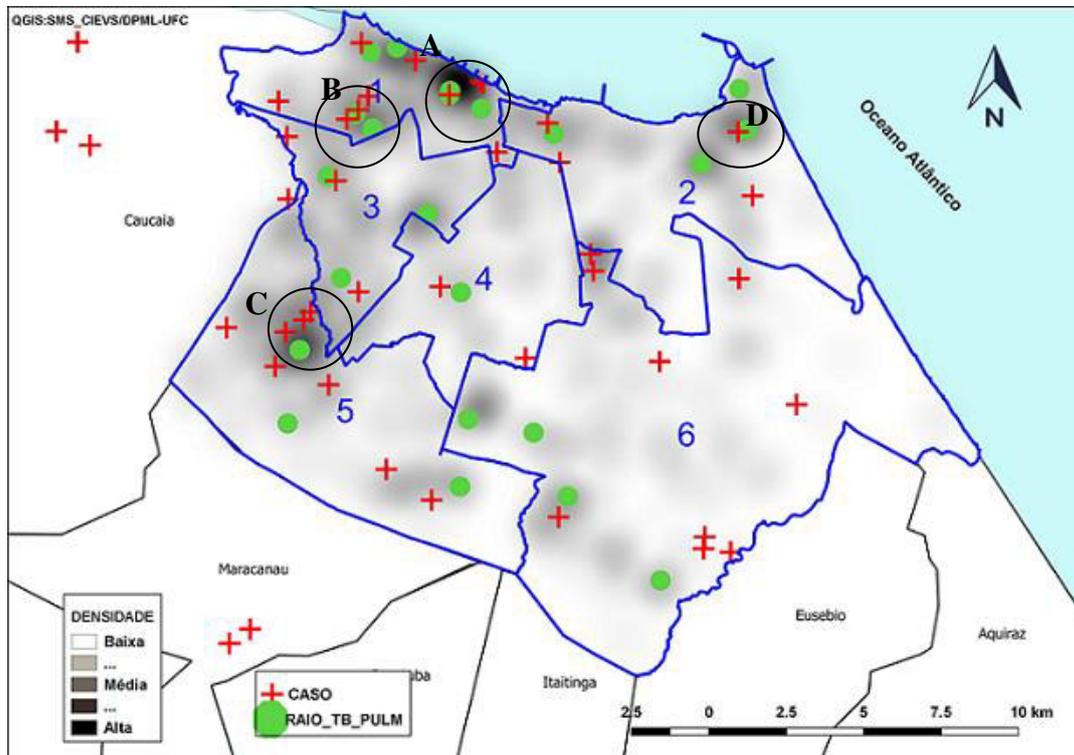


Fonte: Próprio autor (2018).

(+) 15 casos ($R \geq 3$ fármacos); (•) 25 casos ($R \leq 2$ fármacos); (•) agregados de casos de TB pulmonar notificados pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) em raio de até 10 metros; algarismos 1 a 6: respectivas regionais administrativas.

A figura 21, de modo semelhante à figura 20, mostra os agrupamentos acrescidos da distribuição de Kernel, evidenciando quatro “zonas quentes” de agrupamentos, identificadas pelas letras A, B, C e D (FIGURA 21). As “zonas quentes” são formadas por agrupamentos de TB com distancia inferior ou igual a 10 metros de raio.

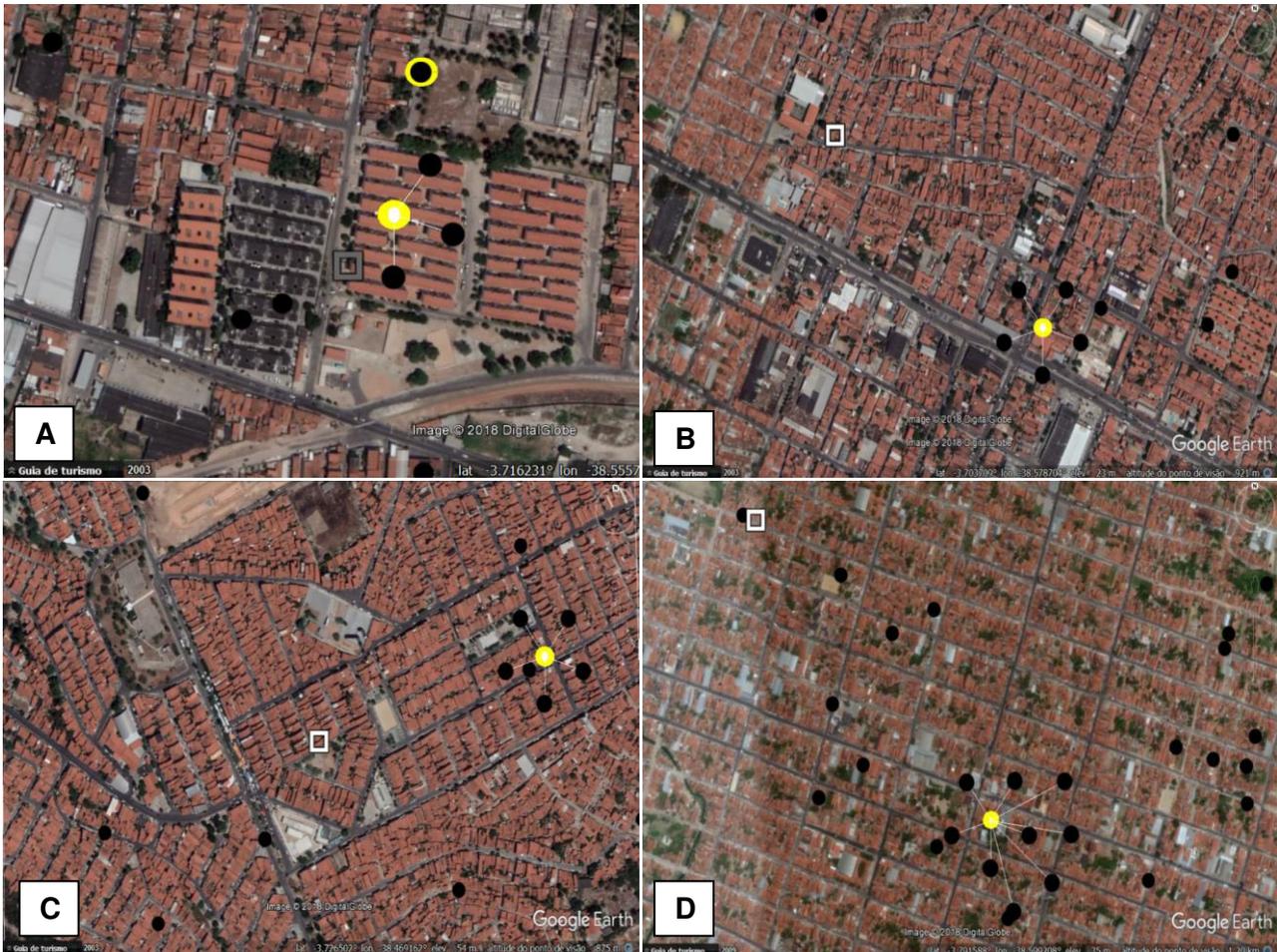
Figura 21 - Distribuição geográfica de casos e controles, densidade de Kernel georreferenciados no SINAN no ano de 2017 e regiões de “zonas quentes” de agrupamentos, Fortaleza-Ceará.



Fonte: Próprio autor (2018).

(+) 40 isolados de TB participantes do estudo; (●) agrupamentos de casos de TB pulmonar notificados pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação); algarismos 1 a 6: respectivas regionais administrativas; (○) conjunto de isolados em raio inferior ou igual a 10 metros.

Figura 22 - Distribuição geográfica das residências dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* participantes do estudo e dos isolados pelo SINAN em 2017, Fortaleza-Ceará.



Fonte: Próprio autor (2018).

□ Isolados de *Mycobacterium tuberculosis* do estudo; ● Agrupamentos de *M. tuberculosis*; ● Isolados de *M. tuberculosis* referenciados pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação).

A - Distância de 59 m entre os isolados do estudo e aglomerados referenciados pelo SINAN. Bairro: Barra do Ceará, regional 1.

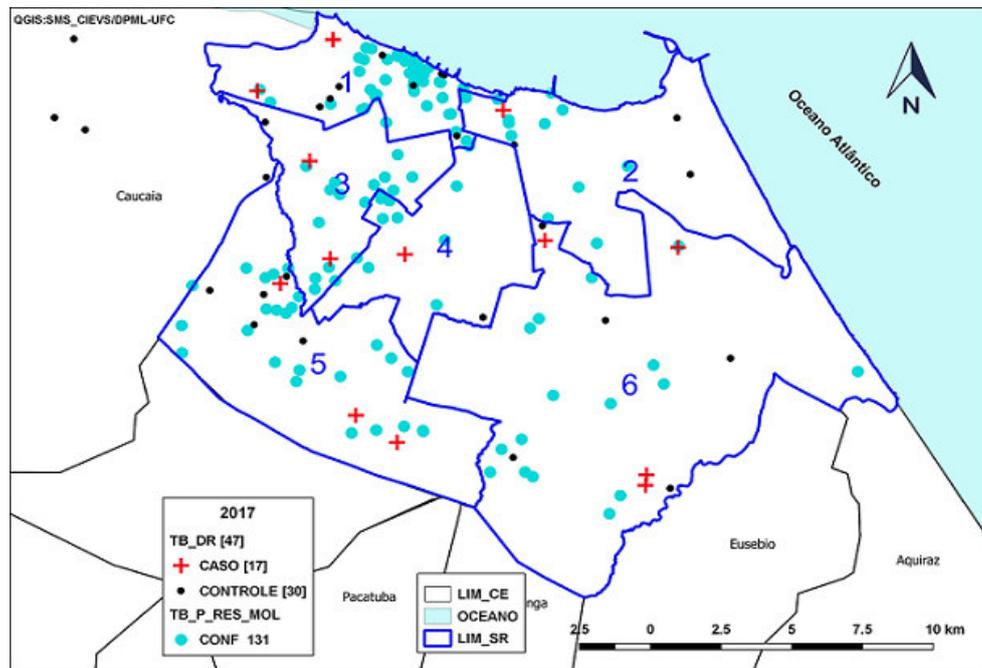
B - Distância de 178 m entre os isolados do estudo e aglomerados referenciados pelo SINAN. Bairro: Barra do Ceará, regional 1.

C - Distância de 350 m entre os isolados do estudo e aglomerados referenciados pelo SINAN. Bairro: Bom Jardim, regional 5.

D - Distância de 736 m entre os isolados do estudo e aglomerados referenciados pelo SINAN. Bairro: Vicente Pinzon, regional 2.

Em 2017 foram georreferenciados 107 notificações pelo SINAN de TB pulmonar resistente diagnosticados por Gene Xpert™ MTB/Rif em Fortaleza. Deste modo, a Figura 23, mostra as notificações de TB-DR do SINAN e nossos casos e controles. É observado que as regionais com baixo desenvolvimento econômico, regionais 1, 5 e 3 são responsáveis pela maioria das notificações de TB-DR.

Figura 23 - Distribuição geográfica de casos, controles e isolados de TB resistentes no ano de 2017, Fortaleza –Ceará.



Fonte: Próprio autor (2018).

(+) 15 casos ($R \geq 3$ fármacos); (●) 25 casos (≤ 2 fármacos); (●) 131 casos de TB resistente no ano de 2017.

6. DISCUSSÃO

Analisando o perfil sócio demográfico, observamos que a maioria dos participantes pertenciam a faixa etária menor que 30 anos, com mediana de idade de 44 anos. Este dado está de acordo com estudos realizados por Ferreira *et al.* (2011) e Jacobs *et al.* (2018), e em termos nacionais, com Luiz *et al.* (2013) e com Amaral (2015) em seus estudos realizados em Fortaleza, Ceará. Esses resultados caracterizam uma população economicamente ativa, a qual se ausenta do trabalho seja por conta das incapacidades geradas pela doença ou tratamento, levando a um prejuízo social e econômico para a família.

Com relação a distribuição dos participantes entre os casos e controles, ocorreu um predomínio dos casos na faixa etária superior aos 50 anos. Esse comportamento foi relatado por Gupta *et al.* (2008), que verificaram uma maior prevalência de algumas condições mórbidas, como diabetes, hipertensão e doenças obstrutivas crônicas, que poderiam facilitar o desenvolvimento de TB-DR. Vendramini *et al.* (2003) relataram que países em transição demográfica, com conseqüente aumento da população acima de 50 anos, associado a dificuldades no diagnóstico precoce, na adesão do tratamento e a presença de comorbidades, levariam a um aumento de casos de TB-DR na faixa etária correspondente.

No nosso estudo, foi observado que 53,1% dos participantes pertenciam ao sexo masculino, semelhante ao descrito em pesquisas realizadas no âmbito nacional em que associam uma maior incidência da TB-DR a esse gênero (BARROSO *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2011; BRAGA *et al.*, 2012). Entretanto, ao analisarmos essa variável em relação aos casos e controles, verificamos uma diferença significativamente estatística ($p=0,0213$), com uma maior prevalência do sexo masculino nos casos (73,7%). Dentro desse contexto, alguns estudos demonstram um aumento da resistência a fármacos anti-TB associada a maior exposição do homem a fatores de riscos relacionados a TB-DR como: uso de bebidas alcoólicas, drogas ilícitas e tabagismo. Outro fator relacionado é a baixa adesão do gênero masculino no tratamento de TB-DR. Viana *et al.* (2018), em um estudo realizado no Rio de Janeiro, constataram que 75,8% dos pacientes que abandonaram o tratamento pertenciam ao sexo masculino.

O nível de escolaridade da população acometida por TB é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de TB-DR (ARCÊNIO *et al.*, 2011; HECK *et al.*,

2011). Segundo estes autores, o baixo nível escolar dificulta o acesso aos serviços de saúde e aumenta a chance de abandono ao tratamento. Com relação aos participantes da pesquisa, 73,5% apresentavam quatro anos ou mais de estudo. Vale ressaltar que o nosso estudo deveria ter estratificado mais à variável nível escolar, pois uma população com quatro anos ou mais de estudo pode não significar um alto grau de escolaridade.

Com relação a ocupação, foi observado que a maioria dos participantes (77,5%) estavam desempregados e, de modo semelhante, esta variável não apresentou significância estatística entre os casos e controles. Em acordo com este resultado, estudos realizados em João Pessoa (NOGUEIRA *et al.*, 2008) e no Espírito Santo (FREGONA *et al.*, 2017), verificaram que mais de 64% dos pacientes com TB-DR possuíam renda de até um salário mínimo ou não possuíam qualquer fonte de renda. É importante ressaltar que os baixos níveis socioeconômicos imprimem uma maior vulnerabilidade a TB-DR, ao refletir o acesso desigual a informação, aos bens de consumo e aos serviços de saúde.

Analisando os hábitos sociais observamos que o alcoolismo teve um predomínio com significância estatística nos casos (73,7%; $p < 0,021$). Além disso, foi evidenciado uma razão de chance quatro vezes maior para pessoas que fazem uso de bebida alcoólicas a desenvolverem resistência a três ou mais fármacos, do que aqueles que não fazem uso. Esses achados foram relatados em pesquisas realizadas no âmbito nacional, onde o uso abusivo de álcool esteve presente em 27,6% dos casos de TB-DR em um município paulista (PEDRO *et al.*, 2015), em 22,9% de TB-MDR no estado de São Paulo (FERREIRA *et al.*, 2011) e em 59,5% de TB-MDR no Espírito Santo (VIEIRA *et al.*, 2007). Sinha *et al.* (2017) realizaram um estudo, na Índia, em que evidenciaram uma associação de 60,8% de casos de TB-MDR com o uso de álcool. Sabe-se que o uso do álcool é uma das principais causas que favorecem a não adesão ao tratamento e, por conseguinte, o abandono. Rabahi *et al.* (2007) destacaram que o abandono ao tratamento foi considerado como um dos principais fatores para a resistência aos fármacos de primeira linha. Além disso, um estudo realizado por Merino *et al.* (1997), demonstrou que o álcool altera a absorção de fármacos de segunda linha para o tratamento anti-TB e por consequência causava mudanças na concentração sérica dos fármacos no seu local de ação.

Com relação ao tabagismo verificamos que 63,3% dos participantes não apresentavam o hábito de fumar. Embora no presente estudo não tenhamos encontrado que o tabagismo seja um fator de risco para TB-DR, a literatura descreve uma forte

relação entre esses fatores. Menezes *et al* (2007) verificaram que o tabagismo aumentou o risco em 4 vezes para o desenvolvimento de TB-DR.

Analisando as comorbidades foi evidenciada uma associação significativamente estatística entre DM e desenvolvimento de resistência a três ou mais fármacos (52,6%; $p=0,017$). Estes resultados dão suporte a uma potencial relação entre a infecção pela TB-DR e DM. Nesse estudo, a razão de chance para portadores de DM desenvolverem resistência a três ou mais fármacos foi treze vezes maior quando comparado aos que não tem. Da mesma forma, um estudo conduzido em Shanghai (China) observou uma taxa de 20,7% de DM associada a TB-MDR (WANG *et al.*, 2015). Em uma revisão sistemática e meta-análise, Restrepo (2016) relatou que pacientes com DM apresentaram um risco quatro vezes maior de desenvolverem TB-DR do que aqueles somente com TB. Além disso, um estudo realizado por Micheletti *et al.* (2014) relatou uma prevalência de 17,7% de DM em casos de TB-MDR. Contudo, outros estudos não demonstraram um risco aumentado de TB-DR e DM (SUBHASH *et al.*, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2016). A disparidade de resultados obtidos e uma baixa quantidade de trabalhos justifica a necessidade de mais estudos sobre a frequência de TB-DR em diabéticos.

É praticamente consenso entre os estudiosos que o abandono ao tratamento é um fator de risco para o desenvolvimento de resistência bacteriana. No nosso estudo, verificamos que 30,6% dos participantes não realizaram tratamento anterior para TB-DR. Em acordo com esta observação, estudos realizados na Arábia Saudita (ASAAD *et al.*, 2012) e na Etiópia (HAMUSSE *et al.*, 2016) evidenciaram resistência primária de 26,5% e 38,2% em pacientes com TB-DR, respectivamente. Luiz *et al.* (2013) encontraram uma frequência de resistência primária de 14,9% em pacientes com TB-MDR; não obstante, em um estudo realizado no Rio de Janeiro, Barroso *et al.* (2003) relataram que 16,4% dos pacientes apresentaram resistência primária a pelo menos um dos fármacos anti-TB. Esse quadro emergente, do aumento da prevalência da resistência primária, demonstra a transmissão de cepas resistentes na comunidade e uma possível falha nos programas de controle de TB-DR.

Analisando a relação TB-DR e o número de contatos intradomiciliares verificamos uma significância estatística em que 68,4% ($p=0,0165$) dos casos residiam com quatro ou mais pessoas. Da mesma forma, um estudo realizado no Rio de Janeiro verificou uma média de quatro contatos para cada caso de TB-MDR (KRITSKI; RABAHI, 1996). Além disso, estes pesquisadores demonstram que 8% dos contatos de pacientes com TB-MDR desenvolveram TB e que nove dos trezes isolados de *M. tuberculosis*

apresentavam um padrão de susceptibilidade semelhante aos casos índices. Em um estudo mais recente, Garrido *et al.* (2014) verificaram que pacientes com TB-DR apresentavam uma média de cinco contatos familiares. Este padrão também foi observado em pesquisas internacionais, onde uma meta análise de 25 estudos constatou uma média de quatro contatos familiares para cada caso de TB-DR. Ademais, o mesmo estudo verificou que 7,8% dos contatos domiciliares de TB-MDR desenvolveram TB em um período de 3 anos (SHAH *et al.*, 2017).

Com relação a análise dos exames laboratoriais observamos um predomínio de lesão cavitária bilateral em 67,3% dos participantes. Este resultado também foi observado em uma pesquisa realizada no Rio de Janeiro, com amostras de oriundas das cidades de Belém e São Paulo, onde identificou uma frequência de 92,8% dos pacientes com TB-DR apresentaram lesão cavitária bilateral (DALCOMO *et al.*, 1999). Em um estudo mais recente (DALTON *et al.*, 2014) foi identificado um predomínio de lesões bilaterais cavitária em 29% das amostras com TB-XDR. Na literatura, existe uma hipótese que a presença de cepas mutantes, são favorecidas pela rápida multiplicação dos bacilos dentro das cavidades pulmonares devido a um ambiente de alta oxigenação e a proteção dos bacilos através de paredes espessas que diminuem a concentração inibitória das drogas, levando assim ao desenvolvimento de TB-DR (BARROSO *et al.*, 2003; YODER *et al.*, 2004). De fato, outras pesquisas mais recentes parecem dar suporte a essa hipótese. Marfina *et al.* (2018) verificaram que a cirurgia torácica poderia melhorar significativamente o tratamento de pacientes com TB-XDR que apresentam lesões cavitária bilaterais. Kemper *et al.* (2017) verificaram uma resistência adicional em 37% das amostras provenientes de lesões cavitárias comparadas a amostras de escarro.

No presente estudo avaliamos o perfil de resistência fenotípico de 49 amostras aos principais fármacos utilizados no tratamento da TB. Analisando os resultados, verificamos que a monorresistência a R é menos frequente do que a I (8,2% e 14,3% respectivamente). Este dado é relevante pois ocorreu uma adição de uma quarta droga, E, no esquema de primeira linha para tratamento de TB em virtude do aumento de resistência a I. Segundo Kritski *et al.* (2010) os dados do II inquérito nacional de resistência a fármacos anti-TB justificam a introdução do E devido a constatação, na última década, do aumento da resistência primária à I de 4,4% para 6,0% e resistência primária à I associada à R de 1,1 para 1,4%.

Estudos internacionais revelam uma variabilidade significativa quanto à resistência isolada a I. Gupta *et al.* (2013), em um estudo realizado na Índia, verificaram

que 18,3% das amostras apresentavam monorresistência a I. Migliori *et al.* (2010b) reportaram uma frequência resistência primária a I de 42,4% e 40,8% nos países Uzbequistão e Azerbaijão respectivamente. Meriki *et al.* (2013) verificam uma frequência de 3,9% de resistência a I nas regiões nordestes e sul de Camarões. Por outro lado, no Brasil foi verificado resultados semelhantes por Coelho *et al.* (2012) com 8,1% em Santos/SP e de 10,9% no Rio de Janeiro no estudo de Aguiar *et al.* (2009) com. Quanto ao nordeste do país, Barroso *et al.* (2001), em estudo realizado no Estado do Ceará, encontraram 24,3% de resistência a I.

A TB-MDR foi verificada em 30,6% dos participantes da pesquisa. Este resultado está acima dos estudos realizados no Pará (LOPES *et al.*, 2012) e em Mina Gerais (MENDES *et al.*, 2014), que relataram uma frequência de TB-MDR de 26,3% e 13,20%, respectivamente. Entretanto, menor que uma pesquisa realizada na Paraíba onde encontrou uma prevalência de 68,1% de caso de TB-MDR (MEDEIROS *et al.*, 2015). Da mesma forma, Jacobs *et al.* (2018) realizaram um estudo descritivo de série de casos de TB-DR notificados no Brasil no ano de 2014 e encontraram uma padrão de resistência de TB-MDR em 50,9% dos casos. Quanto ao estado do Ceará, Luiz *et al.* (2013) relataram uma frequência de 47,1% de casos de TB-MDR. Estes resultados reforçam a problemática da TB-MDR no estado, o que pode demandar a necessidade de reformulações das ações do Programa Estadual de Controle da TB.

O perfil de polirresistência mais comum foi a de R+I+E+S com 22,4% dos casos, seguida da R+I+S com 16,2%. Essas combinações diferem do estudo de Becerril-Montes *et al.* (2013), com 0,72% e 2,16%, respectivamente. Contudo, aproximam-se dos dados de Daniel;Osman (2011), que apontaram 18,2% e 16,4%. Nogueira *et al.* (2008) em um estudo realizado na Paraíba, evidenciaram que 23% das amostras possuíam resistência a combinação R+I+S e 36% apresentaram resistência para R+I+S+E. Chama atenção o número de casos de resistência associada a estreptomicina. No nosso estudo, observamos um caso de monorresistência, contudo em associação com os outros fármacos foram 39,1% dos casos de resistência. Barroso *et al.* (2001), verificaram uma padrão de polirresistência associada a estreptomicina de 3,9%. Em um estudo mais atual, Luiz *et al.* (2013) verificaram 23,2% de casos de resistência associadas a estreptomicina. Estes resultados evidenciam um aumento de casos de resistência a estreptomicina no estado do Ceará.

A resistência aos antimicrobianos é resultado de uma sequência de mutações nos diferentes genes envolvidos no mecanismo de ação dos fármacos (Zimenkov *et al.*, 2014). Estudos demonstram que a demora na identificação da resistência aos fármacos e no início do tratamento efetivo contribui para altas taxas de mortalidade (50-80%) com um curto período entre o diagnóstico e a morte (SHARMA *et al.*, 2014; SOTGIU *et al.*, 2015). Nesse sentido, o desenvolvimento de técnicas moleculares e caracterização das mutações relacionadas aos principais fármacos anti-TB, podem reduzir o tempo para a obtenção da informação referente à sensibilidade e, assim, auxiliar na escolha de uma terapia adequada.

No nosso estudo verificamos, através da técnica PCR-MAS, 59 mutações pontuais em 49 isolados de *M. tuberculosis*. Analisando os genes relacionados a resistência ao fármaco I, observamos que 75,6% dos isolados apresentaram resistência ao gene *katG*, com predomínio de todas as mutações encontradas corresponde ao *katG* S315T. Silva *et al.* (2003) relataram que as mutações podem variar de acordo com a região demográfica. De fato, estudo realizados em São Paulo (CARDOSO *et al.*, 2004) e em Minas Gerais (CLEMENTE *et al.*, 2008) verificaram uma frequência de mutação no códon S315T de 61,9% e 70%. Da mesma forma, Costa *et al.* (2009) analisaram amostras de *M. tuberculosis* provenientes do estado do Ceará, São Paulo, Rio de Janeiro e Pará, e verificaram que 98,3% dos isolados analisados apresentaram mutação no códon S315T. Em um estudo mais recente, De Freitas *et al.* (2014), evidenciaram que 82,8% dos isolados apresentaram mutação no códon *katG*315, com predomínio de substituição S315T.

Estudos no Brasil demonstram um percentual de mutação no gene *katG* próximo ao de pesquisas realizadas no âmbito internacional. Em Myanmar, Aung *et al.* (2015) encontram uma frequência 93,2% da mutação S315T. Zignol *et al.* (2018) realizaram uma pesquisa em hospitais e clínicas de sete países, Azerbaijão, Bangladesh, Bielorrússia, Paquistão, Filipinas, África do Sul e Ucrânia, e verificaram uma prevalência de 92,1% da mutação S315T.

As mutações nos genes *katG* e *mabA*, são responsáveis por aproximadamente 70% a 80% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à I (Cardoso *et al.*, 2004). Pesquisas recentes mostram uma grande variabilidade geográfica da frequência das mutações do gene *mabA*. Estes resultados foram verificados na Etiópia com 0,8%, Polônia com 9,6% e nas Filipinas com 22% (HERRERA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2011;

JAGIELSKI *et al.*, 2015). Neste estudo, evidenciamos que 19,5% das amostras apresentaram mutação no gene *mabA-15*, com predomínio de todas amostras na substituição nucleotídica C→T. Estudos nacionais corroboraram com esta observação, uma pesquisa realizada no Rio Grande do Sul (ESTEVES *et al.*, 2018) e em São Paulo (BOLLELA *et al.*, 2016) encontraram a mutação no gene *mabA-15* em 6,25% e 40,9% das amostras, respectivamente.

Existe uma argumentação consistente na literatura associando a mutação do gene *KatG* 315 com uma maior concentração inibitória mínima (CIM) quando comparada a região promotora *mabA-inhA*, por isso alguns pesquisadores consideram esta mutação como um dado clínico mais relevante (VAN DOORN *et al.*, 2006). De fato, a mudança de único nucleotídeo C→G, na posição *katG*315, levaria a uma mudança no aminoácido SER→THR. Esta troca inibe a ativação da I endogenicamente devido a diminuição da atividade da enzima catalase-peroxidase (CARDOSO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2005).

A análise do sequenciamento do gene *rpoB* revelou mutações em três códons: 531, 516 e 526. Destes, a mutação S531L foi a mais frequente com 45,8%, seguida da mutação D516V e H526S. A alta frequência da mutação no códon S531L é relatada em pesquisas realizadas em diferentes países (THIRUMURUGAN *et al.*, 2015; ZAW *et al.*, 2017; KIGOZI *et al.*, 2018). Siu *et al.* (2010), em um estudo realizado na China, verificaram uma predominância da mutação S531L em 52,2% das amostras. Muthaiah *et al.* (2017) encontram uma proporção maior (55,6%) de casos de resistência a R associada a mutação S531L. Semelhante aos dois estudos mencionados acima, Ravidran *et al.* (2016) também relataram uma frequência de 84,6% da S531L.

Considerando as dimensões de um país continental como o Brasil, pesquisas nacionais demonstram que a frequência de mutações nos códons acima citados varia bastante entre as regiões demográficas, no entanto, sempre mantém a ordem de constância de 531, 516 e 526 (PERIZZOLO *et al.*, 2012; HOFLING *et al.*, 2005). DE FREITAS *et al.* (2014) analisaram noventa e nove isolados de TB-DR provenientes de 12 estados brasileiros. Estes autores descreveram que 44,4%, 9% e 3% dos isolados possuíam mutações nos códons S531L, H526S e D516V respectivamente. Da mesma forma, um estudo realizado no Rio Grande do Sul, verificou uma maior frequências das mutações S531L, H526S e D516V em amostras com resistência R (ESTEVES *et al.*, 2018).

Embora muitas pesquisas descrevam que as mutações relacionadas a R estejam relacionadas a um sítio denominado de “região determinante de resistência à R” (RDRR), algumas mutações são descritas na literatura fora dessa região *hot spot*. Siu *et al.* (2011) encontram duas mutações fora da região RDRR: V146F e I572F. Heep *et al.* (2001), em um estudo realizado na Índia, verificaram diferentes mutações ocorridas no códon 516, 526 e 531 e uma mutação fora da região *hot spot*.

No nosso estudo verificamos que ocorreu uma discrepância dos resultados do códon 531 entre as técnicas de MAS-PCR e sequenciamento. Na MAS-PCR não foi identificado nenhuma alteração genética na região 531. Este resultado tem que ser analisado com cautela pois analisamos um número pequeno de amostras. Behdani *et al.* (2017) em um estudo realizado no Irã, verificaram uma baixo nível de sensibilidade da PCR-MAS com relação a mutação S531L. Mokrousov *et al.* (2003) relataram a importância do uso do sequenciamento genético com uma forma de diminuir os resultados falsos-negativos. Não obstante, pesquisas relatam a importância da utilização de DNA polimerases que possuam uma baixa taxa de incorporação incorreta de nucleotídeos, bem como a presença de exonucleases que permitam a remoção de nucleotídeos mal incorporados no processo de polimerização do DNA (STEIZ *et al.*, 1999; HOLLAND *et al.*, 1991)

Nos últimos anos tem se observado o aumento da resistências aos fármacos de segunda linha usados para o tratamento da TB. No Brasil, existem poucas pesquisas relatando a prevalência dos principais genes relacionados com a resistência da FQ e AG. No nosso estudo observamos que as mutações relacionadas a FQ estiveram presentes nos códons 89, 90, 94 e 95 do gene *gyrA*. Destes, a mutação S95N foi a mais frequente com 29%, seguida da mutação A90V (19%) e D94V (12%). É importante ressaltar dois aspectos. O primeiro é que o HM não realiza o teste fenotípico para FQ, sendo assim, o tratamento para TB-XDR é feito empiricamente. O segundo é que os dados relatados não estão de acordo com os resultados reportados na literatura. Oudghiri *et al.* (2018), em um estudo realizado em Marrocos, verificaram que a mutação mais registrada foi a A90V com 47,6%, seguida da mutação D94V com 7%. Da mesma forma, um estudo de revisão sistemática demonstrou que a frequência cumulativa das mutações associadas a FQ teve uma maior prevalência para mutação A90V, variando de 21 a 32% de acordo com o tipo de FQ testado (AVALOS *et al.*, 2015). De fato, estudos realizados na África do Sul (STREICHERM *et al.*, 2012), na Rússia (MOKROUSOV *et al.*, 2008) e na China (LAU *et*

al., 2010) verificaram uma maior frequência na mutação A90V em 26,4%, 27,2% e 17,8% das amostras, respectivamente. Esses dados demonstram uma variação nas frequências da mutação do gene *gyrA* e reforçam a importância da detecção global aos principais fármacos utilizados no tratamento da TB-XDR.

Com relação aos aminoglicosídeos verificamos que os testes PCR-MAS e sequenciamento genético não evidenciaram nenhuma mutação com relação a essa classe de fármacos. Algumas hipóteses podem ser feitas a respeito desse resultado. A primeira é que estudos relatam diferentes genes relacionados a mutação dos AG. Jnawali *et al.* (2013), em um estudo realizado na Coreia, evidenciaram que a mutação no gene *rpsL* foi a mais frequente, com 56,6% das amostras, seguida da mutação no gene *gidB* (20,8%). CORDOBA *et al.* (2013) verificaram que 46% das amostras apresentaram resistência ao gene *rpsL*. Em termos nacionais, uma estudo realizado no Rio Grande do Sul, evidenciou que as mutações no gene *gidB* apareceram em 27% das cepas resistentes à estreptomicina, que não continham mutações nos genes *rpsL* ou *rrs*, e estavam associadas à baixa resistência à estreptomicina (SPIES *et al.*, 2011). Outras pesquisas postulam a resistência do AG com a presença de bombas de efluxos. Reeves *et al.* (2013) identificaram oito mutações associadas ao regulador transcricional *whiB7*. Estes mesmos autores identificaram que as mutações levaram a um aumento de 23 a 145 vezes do gene *Rv1258c*, codificador da bomba de efluxo TAP. Sowajassatakul *et al.* (2018) verificam um aumento da expressão do gene *whiB7* em amostras resistentes a estreptomicina. Além disso, identificaram a expressão de dois genes de bomba de efluxo, o *Rv1877* e o *Rv2846*. Estes resultados demonstram a necessidade de avaliar as mutações relacionadas aos AG em regiões fora do consenso natural da literatura em que reportam como mutação mais prevalente a do gene *rrs* A1401G.

Segundo Queiroga *et al.* (2012) a análise do georreferenciamento além de permitir a visualização dos casos da doença distribuídos por territórios, identificando grupos populacionais vulneráveis e áreas de sub-registros noticiados pelo SINAN, também propicia uma visualização da taxa de TB por região ou bairro, contribuindo assim com o serviço de vigilância epidemiológica. Em nosso estudo, foram encontrados casos de TB-S e TB-R em todas as regiões de Fortaleza, apresentando uma concentração maior em bairros de menor IDH.

Analisando as taxas de incidência de TB por bairro, observou-se que, nos bairros do Bom Jardim, Barra do Ceara, Carlito Pamplona, Pirambu, Pedras e Centro foram responsáveis por uma grande número de notificações desta doença. Estes bairros estão situados nas regionais administrativas com menores índices de IDH, regional 1, 3 e 5. LIMA *et al.* (2017), em um estudo realizado no Pará, evidenciaram que o padrão de localização da TB estava presente em regiões da periferia e centrais, devido as baixas condições socioeconômicas das famílias, dificuldade de acesso aos serviços de saúde e migrações internas, esta, principalmente nos centros da cidade, por apresentar uma maior fluxo de pessoas, contribuindo assim para propagação da doença.

Analisando a localização geográfica dos isolados de TB, observamos a presença de quatro “zonas quentes” de agrupamentos de *M. tuberculosis* nos bairros Barra do Ceará, Vicente Pizon e Bom Jardim. Este resultado corrobora com um estudo realizado por Viera *et al.* (2008), que avaliando a implantação de sistema de vigilância baseado em informações geográfica e censitárias no município de Vitória, Espírito Santo, verificaram uma importante associação entre o baixo nível socioeconômico e a ocorrência de aglomerados de TB. Da mesma forma, estudos realizados em Fortaleza (LUIZ *et al.*, 2013) e Ribeirão Preto (HINO *et al.*, 2011) relataram a presença de aglomerados de TB nos bairros que apresentaram os piores IDH. Taís resultados sugerem o risco de adoecimento de TB em regiões que apresentem clusters de *M. tuberculosis*. Estudos tem demonstrado que a transmissão de TB pode ocorrer em contatos casuais e a localização da exposição é um fator a ser considerado (ANDREW *et al.*, 2008; LOPEZ –CALLEJA *et al.*, 2009).

Quanto as limitações do presente estudo pôde-se citar a dificuldade de se obter informações completas sobre os pacientes uma vez que alguns questionários não continham todas as informações necessárias. Outra limitação se refere ao tamanho da amostra, pois, em alguns momentos, o HM não tinha o insumo necessário para realização do TSA nas amostras de pacientes suspeitos de TB-DR e com isso dificultava a captação de participantes para a pesquisa.

7 CONCLUSÃO

Os participantes incluídos no estudo tinham uma mediana de idade de 44,0 anos, sem diferença entre os grupos com resistência aos fármacos antimicobacterianos. O sexo masculino foi significativamente o mais frequente entre os casos, apresentando 5,2 vezes mais chance de ter TB-DR a três ou mais fármacos. A diabetes e o etilismo foram mais frequentes nos casos apresentando 4,3 e 13,25 vezes mais chance de ter TB-DR a três ou mais fármacos, respectivamente. O número elevado de contatos intradomiciliares foi fator de risco, apresentando 4,3 vezes mais chance para TB com resistência a três fármacos ou mais.

Em relação ao teste fenotípico de sensibilidade aos fármacos I, R, S e E, os 49 pacientes apresentaram isolados com resistência a três ou mais fármacos, seguido de resistência a dois ou mais fármacos e com menor frequência a somente um fármaco. A resistência do tipo MDR foi a mais frequente.

Quanto a análise por PCR-MAS, foram detectadas mutações nos genes *katG*, *rpoB*, *mabA* e *gyrA*. A técnica não detectou mutações nos genes *e* e *rrs*.

Quanto ao sequenciamento, este foi capaz de identificar mutações nos genes *katG*, *mabA*, *rpoB* e *gyrA*, confirmando mutações identificadas pela PCR-MAS e identificando outras não detectadas. Contudo, a metodologia de sequenciamento apresentou uma maior sensibilidade e acurácia da detecção da mutação. Também identificou mutações não silenciosas em isolados com perfil fenotípico sensível.

A análise espacial dos participantes incluídos no estudo mostrou uma concentração de casos de TB na regional administrativa I, na qual também possui maior concentração de casos notificados pelo SINAN. Também foi observado agrupamentos (“clusters”) de casos em raios igual ou inferior a 10 metros. A análise mostrou que os agrupamentos são formados por casos de TB-DR e casos de TB sensível aos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ANDREW, J.R. *et al.* Exogenous reinfection as a cause of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in rural South Africa. **J Infect Dis**, v.198, n.11, p.1582-1597, 2008.
- AHAMAD, S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Dev Immunol**, v.7, n.2, 2011.
- AGUIAR, F.; *et al.* Prevalence of anti-tuberculosis drug resistance in an HIV/AIDS reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Int. J. Tuberc. Lung Dis**, v. 13, n. 1, p. 54-61, 2009.
- AI, J.W. *et al.* Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. **Emerg Microbes Infect**, v.5, n.2, 2016.
- AJBANI, K.; SHETTY, A.; MEHTA, A.; RODRIGUES, C. Rapid diagnosis of extensively drug-resistant tuberculosis by use of a reverse line blot hybridization assay. **J Clin Microbiol**, v.49, n.7 p.2546-2551, 2011.
- ALLEGUI, Z. *et al.* Detection of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. **Int J Mycobacteriol**, v.1, n.1, p.34-39, 2012.
- ALMEIDA, S.; PALOMINO, J.C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.7, p.1417-1430, 2011.
- AMARAL, H.E.G. **Mortes evitáveis por tuberculose em residentes no município de Fortaleza no período 2006 a 2013**. 2015.107f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará, Departamento de Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Fortaleza, 2015.
- ARCÊNIO R.A, *et al.* Barreiras econômicas na acessibilidade ao tratamento da tuberculose em Ribeirão Preto. **Rev. Esc. Enferm USP**, v. 45, n.5, p.1121-1127, 2011.
- ASAAD, A.M. *et al.* Primary anti-tuberculous drugs resistance of pulmonary tuberculosis in Southwestern Saudi Arabia. **J Infect Public Health**, v.5, n.4, p.281-287, 2012.
- AUNG, W.W. *et al.* Phenotypic and Genotypic Analysis of Anti-Tuberculosis Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Myanmar. **Ann Lab Med**, v.35, n.5, p.494-499, 2015.
- AVALOS, E, *et al.* Frequency and Geographic Distribution of *gyrA* and *gyrB* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates: A Systematic Review. **PLoS ONE**, v.10, n.3, 2015
- BARREIRA, D. G. A. Avaliação das estratégias de controle da TB no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v.41, n.1, p.15-36, 2007.

- BARRETO, L. B. P. F, *et al.* Utilização do amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test em amostras respiratórias de pacientes HIV positivos no Brasil. **J Bras Pneumol**, v.40, n.2, 2014
- BARROSO, E.C *et al.* Risk factors for Acquired Multidrug-Resistant. **Tuberculosis J Pneumol**, v.29, n.2, p.89-97, 2003.
- BARROSO, E.C *et al.* Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. **J Bras Pneumol**, v.27, n.6, p. 310-4, 2001.
- BASABARA, R. J; HUNTER, R. L. Pathology of Tuberculosis: How the Pathology of Human Tuberculosis Informs and Directs Animal Models. **Microbiology spectrum**, v.5, n.3, 2017.
- BELO, C.; NAIDOO S. Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among healthcare workers in Nampula Central Hospital, Mozambique. **BMC Infectious Diseases**, v.17, n.408, 2017.
- BECERRIL-MONTES, *et al.* A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States border. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** .2013, vol.108, n.2,2013
- BEHDANI, M *et al.* Evaluation of Sensitivity of Molecular Methods for Detection of Rifampin-Resistant Strains Amongst Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. **Arch Pediatr Infect Dis**, v.5, n.3, 2017.
- BOLLELA, V.R, *et al.* Detection of katG and inhA mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis, **Int J Tuberc Lung Dis**, v.20, n.8, p.1099–1104, 2016.
- BOTHA, L.; VAN PITTIUS, N. C.; VAN HELDEN, P. D. Mycobacteria and disease in southern Africa. **Transbound Emerg Dis**, v.60, n.1, p.147-56, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 3ª Ed. Edição comemorativa. Rio de Janeiro: 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da TB e outras Micobactérias**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Controle de TB**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BRAGA, J. U.; *et al.*, Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose nos serviços de atenção básica em dois municípios brasileiros, Manaus e Fortaleza, 2006 a 2008. **Cad Saúde Colet**, v. 20, n.2, p. 225-33, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **"Manual de recomendações para o controle da tuberculose**

no Brasil", 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**: TB. Brasil, mar. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/26/2018-009.pdf>. Acesso em: mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. "**Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**". 2018

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano nacional pelo fim da tuberculose** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. **Immunol Rev**, v.264, n.1, p.6-24, 2015.

BURKE, S. D. A. Tuberculosis: Past and Present. **Rev Anthropol**, v.40, n.1, p.2007-2013, 2011.

BROSCH, R. *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc Natl Acad Sci**, v.19, n.99, p.3684-3689, 2002.

CARDOSO, R.F. *et al.* Screening and Characterization of Mutations in IsoniazidResistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.9, p.3373-3381, 2004.

CARDOSO, R.F. *et al.* Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p.59-61, 2007.

CEARÁ. Secretaria de Saúde. **Boletim epidemiológico**: TB. Fortaleza, mar. 2018. Disponível em: www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins. Acesso em: mar. 2015.

CEARÁ. Secretaria de Saúde. **Boletim epidemiológico**: TB. Fortaleza, mar. 2018. Disponível em: www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins. Acesso em: mar. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.55, n.11, p.301-305, 2006.

CHIA *et al.* Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama. **PloS One**, v.7, n.7, p.1-7, 2012.

CHIMARA, E *et al.* Molecular characterization of *Mycobacterium kansasii* isolates in the State of São Paulo between 1995-1998. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V.99,n.7, p.739-743, 2004.

CLEMENTE, W.T *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 62, p.199-204, 2008.

- COLE, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v.393, n.6685, p.537-44, 1998.
- COELHO, A. G. V., *et al.* Study of multidrug-resistant tuberculosis in risk groups in the city of Santos, São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.107, n.6, p.760-6, 2012.
- CORDOBA, B. *et al.* *rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. **J.MICROBIOL IMMUNOL**, v. 46, n.6, p.30-34.2013.
- COSTA, E.R. *et al.* Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. **BMC Microbiology**, v.9, n.39, 2009.
- DALCOLMO, M.P.*et al.* Estudo de efetividade de esquemas alternativos para o tratamento da tuberculose multirresistente no Brasil. **J Pneumol**, v.25, n.2, p.70-77, 1999.
- DANIEL, O.; OSMAN, E. Prevalence and risk factors associated with drug resistant TB in South West, Nigeria. **Asian Pac J Trop**, v.4, n.2, p.148-151, 2011.
- DALTON, T.*et al.* Prevalence of and risk factors for resistance to second-line drugs in people with multidrug-resistant tuberculosis in eight countries: a prospective cohort study **Lancet**, v.380, p.1406–1417, 2012.
- DE FREITAS, F.A.D. *et al.* Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: A Retrospective *katG* and *rpoB* Mutation Profile Analysis in Isolates from a Reference Center in Brazil. **PLOS One**, v.9, n.8, p.1-11, 2014.
- DIRIBA, G. *et al.* Performance of Mycobacterium Growth Indicator Tube BACTEC 960 with Lowenstein–Jensen method for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* at Ethiopian National Tuberculosis Reference Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. **BMC Res Notes**, v.10. n.4, 2017.
- DUARTE, R. *et al.* Tuberculosis treatment and management of some problems related to the medication. **Rev. Port. Pneumol**, v.16, p.559-572, 2010.
- ESTEVES, L.S. *et al.* Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid monoresistant and multidrug-resistant in Rio Grande do Sul, a tuberculosis high-burden state in Brazil. **Tuberculosis (Edinb)**, v.10, n.5, p 36-43, 2018.
- EUZÉBY, J. P.: List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 47, 590-592, 1997. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>). Disponível em: < Referência: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>Acesso em:10/abril/18.
- FERREIRA, K. R. *et al.* Portadores de tuberculose multirresistente em um centro de referência: perfil sócio-demográfico e clínico-epidemiológico. **Rev Esc Enferm USP**, v. 45, p.1685–1689, 2011.
- FORRELLAD, M. A. *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v.4, n.1, p.60-66, 2013.

- FISHER, S.P. *et al.* Type 2 diabetes and multidrug-resistant tuberculosis. **Scand J Infect Dis**, v.40, p.888-893, 2008.
- FOX, G.J. *et al.* Preventing the spread of multidrug-resistant tuberculosis and protecting contacts of infectious cases. **Clin Microbiol Infect**, v.23, n.3, p.147-153, 2017.
- FREGONA *et al.* Risk factors associated with multidrug-resistant tuberculosis in Espírito Santo, Brazil. **Rev Saude Publica**, v.6, n.41, p.50-56, 2017.
- GARRIDO, S. *et al.* Primary drug resistance among pulmonary treatment-naïve tuberculosis patients in Amazonas State, Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.18, n.5, p.559-563, 2014.
- GERDES, S.R. *et al.* Multicenter Laboratory Validation of the BACTEC MGIT 960 Technique for Testing Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to Classical Second-Line Drugs and Newer Antimicrobials. **J Clin Microbiol**, v.44, n.3, p.688-692, 2006.
- GUPTA, D. *et al.*, Manifestations of pulmonary tuberculosis in the Elderly: A prospective observational study from North India. **Indian J Chest Dis Allied Sci**, v. 50, n.3, p.263-67, 2008.
- GUPTA, D. *et al.*, Initial drug resistance pattern among pulmonary tuberculosis patients. **Indian J Tuberc**, v.60, p.154-161, 2013.
- GUPTA, R.S. *et al.* Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**. v.13, p.67-108, 2018.
- HAMUSSE, A.M. *et al.* Primary and secondary anti-tuberculosis drug resistance in Hitossa District of Arsi Zone, Oromia Regional State, Central Ethiopia. **BMC Public Health**, v.16, n.1, 2016.
- HECK, M.A. *et al.* Prevalência de abandono do tratamento da tuberculose e fatores associados no município de Sapucaia do Sul (RS), Brasil, 2000-2008. **Rev. Bras. Epidemiol**, v.14, n.3, p.478-485, 2011
- HEEP, M.N. *et al.* Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J Clin Microbiol**, v.39, p.107-110, 2001.
- HENSON *et al.*, Next generation sequencing and large genome assemblies. **Pharmacogenomics**. j, v.13, n.8, p.901-915, 2012.
- HERSHBERG *et al.* High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. **PLoS Biol**, v.6, n.12, 2008.
- HERRERA, L. *et al.* Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in the Philippines. **Int J Antimicrob Agents**, v. 23, n. 6, p. 572-6, 2004.
- HINO, P. *et al.* Distribuição espacial de doenças endêmicas no município de Ribeirão Preto (SP). **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n.1, p.1289-1294, 2011.

HOLLAND, P.M. *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.15, n.88 1991

HOFLING, C.C. *et al.* Prevalence of katG Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 9, n. 1, p. 87- 93, 2005.

JACOBS *et al.*, Factors associated with the drug-resistant tuberculosis incidence rate in Brazil. **IJTLD**, v.22, n.6, p.675-680, 2018.

JAGIELSKI, T. *et al.* Mutation profiling for detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J Antimicrob Chemother**, v.70, n.12, p.743-751, 2015.

JAGIELSKI, T. *et al.* Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other *Mycobacteria*. **Clin Microbiol Rev**, v.29, n.2, p.239-90, 2016.

JNAWALI, H.N. *et al.* .Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea. **World J Microbiol Biotechnol**, v.29. n.6, p 975-982, 2013.

KALOKEH, A. S. *et al.* Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing: a review of the literature. **Am J Med Sci**, v.345, n.2 p.143–148, 2014.

KAUFMANN, S.H *et al.* 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus.**Trends Microbiol.** v.13, n.10, p 469-475, 2005.

KEMPER, R.R. *et al.* Additional Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates From Resected Cavities Among Patients With Multidrug-Resistant or Extensively Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis **Clin Infect Dis**, v.54, n.6, p.51–54, 2017.

KIGOZI, E. *et al.* Prevalence and patterns of rifampicin and isoniazid resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Uganda. **PLoS ONE**, v.13,n.5,p 52-54, 2018.

KIVI, M. *et al.* Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis* **J Clin Microbiol**, v.40 n.6, p.2192-8, 2002.

KRITSKI, A. L, Rabahi, M. F. Transmission of tuberculosis to close contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v.153, n.1, p.331-335, 1996.

KUMARI, R .*et al.* Molecular detection of drug resistance to ofloxacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* by using multiplex allele-specific PCR. **J Infect Public Health**, v.11, n.1, p.54-58, 2017.

LAU, R.W *et al.* Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of *gyrA* mutation at position 74. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.2, p.608-614, 2011.

- LEHMANN, K. B.; NEUMANN, R. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: Genus *Mycobacterium***. 2016. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html> >. Acesso em: 08 mar. 2018.
- LIU, L. *et al.* Comparison of next generation, sequencing systems. **J Biomed Biotechno**, v.12, n.2, p.1-12, 2012.
- LIMA, S.S. *et al.* Análise espacial da tuberculose em Belém, estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v.8, n.2, p.55-63, 2017.
- LOMAN, N. J. *et al.* Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nat Biotechnol**, v. 30, n. 5, p. 434-439, 2012.
- LOPES, M.L. *et al.* Annual frequency and distribution of tuberculosis resistance in the public health laboratory network of Pará State, Brazil. **Rev Pan-Amazônica de Saúde**, v.3, n.4, p. 27-32, 2012.
- LÓPEZ-CALLEJA, A.I. *et al.* Unsuspected and extensive transmission of a drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strain. **BMC Pulm Med**, v.1, n.9, 2009.
- LUIZ R.S, *et al.* Genotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.17, n.3, p.337-345, 2013.
- MAHOMED, S. *et al.* Failure of BACTEC™ MGIT 960™ to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex within a 42-day incubation period. **Afr J Lab Med**, v.6, n.1, 2017.
- MARFINA, G.Y Bilateral cavitory multidrug- or extensively drug-resistant tuberculosis: role of surgery. **Eur J Cardiothorac Surg**.v.53, n.3,p. 618-624. 2018
- MARK, S. *et al.* High-throughput mass spectrometric analysis of 1400-year-old mycolic acids as biomarkers for ancient tuberculosis infection. **J Archaeol Sci**, v.37, n.2, p.302-305, 2010.
- MAURYA, A. K. *et al.* Detection of 123 bp fragment of insertion element IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **Indian J Med Microbiol**, v.30, n.2, p.182-186, 2012.
- MCEVOY C.R.*et al.* , The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Edinb)**, v.8, n.5, 2007.
- MEDEIROS, N.M.P. *et al.* Caracterização da tuberculose resistente no estado da Paraíba entre 2003 e 2013. 2015. **Dissertação (Mestrado)**. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2015.
- MENDES, N.M.J. *et al.* Profile of resistance to antituberculosis drugs in a reference hospital in the State of Minas. **Rev Med Minas Gerais**, v.24, n.5, p.43-46, 2014.
- MENEZES, A.M. *et al.* Tuberculosis and airflow obstruction: evidence from the PLATINO study in Latin America. **Eur Respir**, v.30, n.6, p.1180-1185, 2007.

- MERINO, A. *et al.* Effects of ethanol on intestinal absorption of drugs. I. in situ studies with ciprofloxacin analogs in normal and chronic alcohol-fed rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, 326–333, 1997.
- MERIKI, H.D. *et al.* Drug Resistance Profiles of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Factors Associated with Drug Resistance in the Northwest and Southwest Regions of Cameroon. **PLoS ONE**, v.8, n.10, 2013.
- MICHELETTI, V. C. D. TB resistente em pacientes incluídos no II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos AntiTB realizado em Porto Alegre, Brasil. **J Bras Pneumol**, v.40, n.2, p.220-227, 2014.
- MIGLIORI, G. B. *et al.* Review of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB: global perspectives with a focus on sub-Saharan Africa. **Trop Med Int Health**, v.15, n.9, p.1052-1066, 2010.
- MIGLIORI, G. B.; *et al.* Emerging epidemic of drug-resistant tuberculosis in Europe, Russia, China, South America and Asia: current status and global perspectives. **Curr Opin Pulm Med**, v.16, n.3, p.171-9, 2010b.
- MOKROUSOV, I. *et al.* Detection of Ethambutol-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by a Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting emB306 Mutations. **J Clin Microbiol Infect**, v.40, n.5, p.1617–1720, 2002a.
- MOKROUSOV, I. *et al.* Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by a Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting *katG* Codon 315 Variation. **J Clin Microbiol Infect**, v.40, n.7, p.2509–2512, 2002b.
- MOKROUSOV, I. *et al.* Allele-specific *rpob* PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Smears. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.7, p.2231–2235, 2003.
- MOKROUSOV, I. *et al.* Molecular Characterization of Ofloxacin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from Russia **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n.8, p.2937-2939, 2008.
- MORGAN, M.A *et al.* Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear negative specimens. **J Clin Microbiol**, v.18, n.9, p 689–696, 1999.
- MUTHAIAH, M. *et al.* Prevalence of mutations in genes associated with rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J. Clin Tuberculosis**, v.8, n.3, p.19-25, 2017.
- MUÑOZ, H. *et al.* Diabetes is Associated with Severe Adverse Events in Multidrug-Resistant Tuberculosis. **Arch Bronconeumol**, v.53, n.5, p.245-250, 2016.
- NARASIMHAN, P. *et al.* D. Risk Factors for Tuberculosis. **BMC pulm. med.**, v.14, n.4, 2013.
- NIERMAN, W. C. *et al.* Genome data: what do we learn? **Curr Opin Struct Biol**, v.10, p. 343-348, 2000.

NOGUEIRA, J.A *et al.* Caracterização clínico epidemiológica dos pacientes com diagnóstico de Tuberculose resistente às drogas em João Pessoa, PB. **Rev. Eletr. Enf**, v.10, n.4, p.979-989, 2008.

OUZGHIR, A. *et al.* Molecular characterization of mutations associated with resistance to second-line tuberculosis drug among multidrug-resistant tuberculosis patients from high prevalence tuberculosis city in Morocco. **BMC series**, v.18, n. 98. p.979-989, 2018.

PARISH, T; STOKER, N.G. *Mycobacterium tuberculosis* Protocols. Methods in Molecular Medicine **J Antimicrob Chemother**, v.49, n.1, 2001.

PASESCKIK, O. *et al.* Molecular e genetic characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the southern part of West Siberia. **Indian J Med Res**, v.46, n.1, p.2008-2013, 2017.

PEDRO, H. S. P. *et al.* Clinical and epidemiological profiles of individuals with drug-resistant tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 10, n.2, p. 235–241, 2015

PFYFFER, G.E, *et al.* *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a swiss patient exposed in Africa. **Emerg Infect Dis**, v.4, n.4, p.631-634, 1998.

PICHAT, C. *et al.* Combined Genotypic, Phylogenetic, and Epidemiologic Analyses of *Mycobacterium tuberculosis* Genetic Diversity in the Rhône Alpes Region, France. **PLoS one**, v.11, n.4, p 620-634, 2016.

PERIZZOLO, P. F. *et al.* Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. **Tuberculosis (Edinb)**, v.92, n.1, p.56-9, 2012.

PROZOROV, A. A. *et al.* The virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*: Genetic control, new conceptions. **Russ. J. Genet.**, v.50, n.8, p.775-797, 2014.

QUEIROGA, *et al.* Distribuição espacial da tuberculose e a relação com condições de vida na área urbana do município de Campina Grande - 2004 a 2007. **Rev. Bras. Epidemiol**, v.15, n.1, 2012.

RABAHI, M.F. *et al.* Tratamento da tuberculose **J Bras Pneumol**, v.43, n.5, p.472-486, 2017.

RADHIKA, A. G. *et al.* Comparison of diagnostic accuracy of PCR and BACTEC with Lowenstein-Jensen culture and histopathology in the diagnosis of female genital tuberculosis in three subsets of gynaecological conditions. **J Obstet Gynaecol**, v.36, n.7, p.940-945, 2016.

RAVIDRAN, C. *et al.* Prevalence of initial drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in northern Kerala. **Lung India**, v.23, p.106-108, 2006.

RESTREPO, B.I Diabetes and tuberculosis. **Microbiol Spectr**, v.4, n.6, 2016.

REEVES, A *et al.* Aminoglycoside Cross-Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Due to Mutations in the 5' Untranslated Region of *whiB7*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.4, p.1857–1865, 2013.

SALES, M. L. *et al.* Validation of a real-time PCR assay for the molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis*. **Braz J Microbiol**, v.45, n.4, 2014.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Cell Biol Mol Sci**, London, v. 94, n.3, p. 441-448, 1975.

São Paulo.Secretária de Saúde.**Micobacterioses**: recomendações para o diagnóstico e tratamento.São Paulo, 2005

SANGER, F.*et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.74, n.12 p.5463–5467, 1977.

SCHUMACHER, S. G. *et al.* Impact of Molecular Diagnostics for Tuberculosis on Patient-Important Outcomes: A Systematic Review of Study Methodologies. **Plos ONE**, v.11, n.3, 2016.

SCRIBA, T. J.; COUSSENS, A. K.; FLETCHER, H. A. Human Immunology of Tuberculosis .**Microbiol Spectrum**, v.5, n.1, 2017.

SHAH, S.N *et al.* Yield of Contact Investigations in Households of Patients With Drug-Resistant Tuberculosis: Systematic Review and Meta-Analysis. **Clin Infect Dis**, v.58, n.3 p.381–391, 2014.

SHARMA, S. *et al.* Genotype MTBDR plus assay for molecular detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Indian J Pathol Microbiol**, v.57, n.3, p. 423-6, 2014, 2014.

SEUNG, K.J. *et al.* Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.9, n.5, 2015.

SIU, G. K. H. *et al.* Direct detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.69, n.1, p.51-58, 2010.

SIU, G.K. *et al.* Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.4, 730-43, 2011.

SIMON, G.G. *et al.* Impacts of neglected tropical disease on incidence and progression of HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **Int J Infect Dis**, v.42, p.54-57, 2016.

SINHA *et al.*, Association of Risk Factors and Drug Resistance Pattern in Tuberculosis Patients in North India. **J Glob Infect Dis**, v.42 n.9, p.139-145, 2017.

SILVA, M.S.N. *et al.* Mutations in *katG*, *inhA* and *ahpC* genes of Brazilian Isoniazid-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Microbiol Infect**, v. 41, n.9, p.4471-74, 2003.

- SOTGIU, G. *et al.* Therapeutic drug monitoring: how to improve drug dosage and patient safety in *tuberculosis* treatment. **Int J Infect Dis**, v.32, p.101-4, 2015.
- SOWAJASSATAKUI, A. *et al.* Overexpression of *eis* without a mutation in promoter region of amikacin- and kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strain. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.17, n.33, 2018.
- SLAYDEN, R. A., BARRY, C. E. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect**, v.2, n.6, p.659-669, 2000.
- SOWAJASSATAKUI, A. *et al.* Overexpression of *eis* without a mutation in promoter region of amikacin- and kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strain. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.17, n.33, 2018.
- SPIES, S.P. *et al.* Streptomycin Resistance and Lineage-Specific Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis gidB* Gene. **J Clin Microbiol Infect**, v.49, n.7, p.2625–2630, 2011.
- SREEVATSAN, S. *et al.* Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, n.18, p.9869–9874, 1997.
- STEIZ, T. *et al.* DNA Polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms. **J Biol Chem**, v.274, n.25, 1999.
- STREICHERM, E.M. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Population Structure Determines the Outcome of Genetics-Based Second-Line Drug Resistance Testing. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, n 5, p. 2420-2427, 2012.
- SUBHASH, H.S. *et al.* Clinical characteristics and treatment response among patients with multidrug-resistant tuberculosis: a retrospective study. **Indian J Chest Dis Allied Sci**, v.45, n.2 , p. 97-103, 2003.
- TANG, J. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. **Tuberculosis (Edinb)**, v.98, p.30-41, 2016.
- TESSEMA, B. *et al.* First- and second-line anti-tuberculosis drug resistance in Northwest Ethiopia. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.16, n.16, p.805-811, 2012.
- THIRUMURUGAN, R.*et al.* Molecular analysis of *rpoB* gene mutations in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by multiple allele specific polymerase chain reaction in Puducherry, South India. **J Infect Public Health**, v.8, n.6, p.619-625, 2015.
- TORTOLI E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clin Microbiol Rev**, v.16, n.2, p.339-354, 2003.
- TORTOLI, E. *et al.* Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: Many doubts, few certainties **Infect Genet Evol**, v.12, n.4, p.827-831, 2017.
- TSUYUGUCHI, K. *et al.* Performance evaluation of Xpert MTB/RIF in a moderate tuberculosis incidence compared with TaqMan MTB and TRCRapid M.TB. **J Infect Chemother**, v.23, n.2, p.101-106, 2017.

UDWADIA, Z. F. *et al.* Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India. **Clin Infect**, v.6, n.4, p.307-309, 2012.

UNISSA, N. Insights into RpoB clinical mutants in mediating rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Mol Graph Model**, v.67, p.20-32, 2016.

VAN DOORN, H.R. *et al.* Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of katG: a decade of experience in The Netherlands. **Clin Microbiol Infect**, v.12, n.8, p.769-775, 2006.

VADWAI, V., Shetty, A., Rodrigues, C., 2012. Multiplex allele specific PCR for rapid detection of extensively drug resistant tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v.92, n.3, p.236-242, 2012.

VALIM, A.R.M. *et al.* Mutations in the *rpoB* Gene of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brazil. **J Clin Microbiol**, v.38, n.8, p.3119–3122, 2000.

VAN EMBDEN, J.D.A. *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J Clin Microbiol**, v.31, p.406-409, 1993.

VENDRAMINI, S.H. *et al.*, Tuberculosis in the elderly: concept analysis. **Rev Latino-Americana Enf**, v.11, n.1, p. 96-103, 2003.

VIANA, P.V *et al.*, Factors associated with loss to follow-up and death in cases of drug-resistant tuberculosis (DR-TB) treated at a reference center in Rio de Janeiro, Brazil. **Reports in public Health**, v.34, n.5, 2018.

VIEIRA, R.D.C.A. *et al.* Distribuição espacial dos casos novos de tuberculose em Vitória, Estado do Espírito Santo, no período entre 2000 e 2005. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.41, n.1, p.82-86, 2008.

ZAW, M.T. *et al.* Mutations inside rifampicin-resistance determining region of *rpoB* gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Public Health**, v.11, n.5, p.605-610, 2018.

ZECA, A. N. *et al.* Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF Assay for Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Rifampin Resistance in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. **J Clin Microbiol**, v.49, n.12, p.4138-4141, 2011.

ZHANG, M. *et al.* Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. **J Clin Microbiol**, v.43, n.11, 2005.

ZHANG, J. *et al.*, The impact of next-generation sequencing on genomics. **J Genet Genomics**, v.38, n.3, p 95-109, 2011.

ZIGNOL, M.D. Genetic sequencing for surveillance of drug resistance in tuberculosis in highly endemic countries: a multi-country population-based surveillance study. **The Lancet Infectious Diseases**. v.18.n.6,p 675-683,2018

ZIMENKOV, D. V. *et al.* Analysis of genetic determinants of multidrug and extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* using oligonucleotide microchip. **Mol Biol (Mosk)**, v.48, n.2, p.251-64, 2014.

ZMAK, L.; JANKOVIC, M. Evaluation of Xpert MTB/RIF assay for rapid molecular diagnosis of tuberculosis in a two-year period in Croatia. **Int J Mycobacteriol**, v.2, n.3, p.179-82, 2013.

ZUMLA, A. *et al.* Tuberculosis treatment and management—an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. **Lancet Respir Med**, v.3, n.3, p.220-234, 2015.

WANG, F. *et al.* Molecular characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in China by multilocus PCR and electrospray ionization mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v.49, n.7, p.2719-21, 2011,

WANG, W. *et al.* Tuberculosis-associated mortality in Shanghai, China: a longitudinal study. **Bull World Health Organ**. v.93; n.12, p.826-833, 2015.

WORLD HO. **Global tuberculosis report 2015**. Who Press. Geneva. 2015.

WHO. **Global tuberculosis report 2017**. Who Press. Geneva. 2017.

YANG, Z., *et al.* Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. **Diagn Microbiol Infect** , v.53, n.4, p.201-208, 2005.

YODER, M.A. *et al.* Cavitary pulmonary tuberculosis: The Holy Grail of disease transmission. **Curr Sci**, v.86, n.1, 2004.

APÊNDICE A- INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS QUESTIONÁRIO

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA

FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE CASO DE TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE

1. Nome da unidade de saúde de origem:		4. Nome da unidade de saúde de tratamento (UST):										
2. UF: <input type="text"/> 3. Município: <input type="text"/>		5. UF: <input type="text"/> 6. Município: <input type="text"/>										
7. N° de Notificação TBMR <input type="text"/>		9. N° de SINAN <input type="text"/>										
8. Data de início do tratamento: <input type="text"/>		10. N° do Cartão SUS <input type="text"/>										
11. Nome do paciente: <input type="text"/>												
12. Nome da mãe: <input type="text"/>												
12. Data de nascimento <input type="text"/>	15. Sexo <input type="checkbox"/> 1- Masculino 2- Feminino	16. Cor / Etnia <input type="checkbox"/> 1- Branca 2- Negra 3- Amarela 4- Parda 5- Indígena 9- Ignorada	17. Escolaridade <input type="checkbox"/> (em anos de estudo concluídos) 1- Nenhuma 2- De 1 a 3 3- De 4 a 7 4- De 8 a 11 5- De 12 e mais 9- Ignorada									
14. Idade <input type="text"/> (em anos)	18. Ocupação <input type="checkbox"/> 1- Profissional de saúde 2- Profissional do sistema penitenciário 3- Profissional asilo/albergue/casas apoio Aids 4- Outros profissionais autônomos /assalariado 5- Profissional do sexo 6- Ambulante 7- Doente(a) 8- Aposentado(a) 9- Dona de casa 10- Desempregado(a) 11- Outros											
19. Endereço (Rua, Av., ...): <input type="text"/> N° <input type="text"/> Complemento: <input type="text"/>												
20. Bairro: <input type="text"/>		21. CEP: <input type="text"/>	22. UF: <input type="text"/>									
23. Município: <input type="text"/>												
24. Telefone fixo: (<input type="text"/>) <input type="text"/> - Telefone celular: (<input type="text"/>) <input type="text"/>												
25. Tratamento anterior para TB <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não → passe a 27.1, 28 e depois a 31		26. Número de tratamentos anteriores para TB <input type="checkbox"/> 1- 1 tratamento 2- 2 tratamentos 3- 3 ou + tratamentos										
27. Descrição dos tratamentos anteriores para TB												
Ano de início	Medicamentos (marcar um "X" nos medicamentos utilizados)										Nome de outros medicamentos utilizados	Resultado do tratamento 1- Cura 2- Abandono 3- Falência 4- Mudança de esquema
	R	H	Z	E	S	Et	Ofx	Trd / Cs	Cfx	Am		
1º												
2º												
3º												
4º												
5º												
6º												
7º												
8º												
9º												
10º												
R = rifampicina E = etambutol Ofx = ofloxacino Cfx = clofazmina H = isoniazida S = estreptomicina Trd = terizidona Am = ampicilina Z = pirazinamida Et = etionamida Cs = cicloserina 0												
27.1. Tipo de resistência <input type="checkbox"/>				1- TBMR Primária 2- TBMR Adquirida								
28. Peso atual (no início do tratamento) <input type="text"/> Kg, <input type="text"/> g		29. Está em uso de esquema III? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não → passe a 31		30. N° de meses de tratamento em que se verificou a falência <input type="text"/>		31. Está hospitalizado(a)? <input type="checkbox"/> 1- Sim 2- Não						

32. Local do provável contágio 5- Albergue 33. Número de contatos identificados 34. HIV

1- Intradomiciliar 6- Hospital psiquiátrico 1- Positivo
2- Instituição de saúde 7- Outro local extradomiciliar 2- Negativo
3- Presidência A- Em andamento
4- Asilo 9- Ignorado 4- Não realizado

35. Comorbidades 1- Aids 35.a- Se SIM, qual? 1- Diabetes Mellitus tipo I (insulino-dependente)
2- Diabetes 2- Diabetes Mellitus tipo II que usa hipoglicemiantes oral
3- Sífilose 3- Diabetes Mellitus tipo II que não usa hipoglicemiantes oral
4- Neoplasia
5- Corticoterapia prolongada
6- Transplantado de órgão
7- Hemodiálise
8- Alcoolismo
9- Drogas ilícitas 35.b- Se SIM, qual? 1- Injetável
2- Não injetável
10- Transtornos mentais 3- Ambas
11- Outros
Qual? _____

36. Baciloscopia de escarro 37. Cultura de escarro 38. Data da coleta da cultura de escarro

0- Negativa 0- Negativa → não responder a 41 1- + 2- ++ 3- +++ ou mais 4- Em andamento → não responder a 40 e 41 5- Não realizada → passe a 42 6- Contaminada → não responder a 41

39. Laboratório onde foi feita a cultura UF Nome: _____

40. Método 41. Padrão de resistência (TS): 0- Sensível 1- Resistente 2- Não realizado

1- LJ 2- BACTEC 460 3- MGIT 960 4- MB BACT 5- Outro Qual? _____

41. Padrão de resistência (TS): 0- Sensível 1- Resistente 2- Não realizado

Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Etambutol
 Etionamida Estreptomicina Amicacina Kanamicina
 Capreomicina Ciprofloxacino Ofloxacino Levofloxacino
 Moxifloxacino Terizidona/Cicloserina Outros: _____

42. Caso de TBMR 43. Forma clínica 44. Radiografia do tórax 45. Se extrapulmonar 46. Cultura de soro

1- Confirmado 1- Pulmonar (não responder a 45) 1- Unilateral cavitária 1- Pleural 1- Positiva
2- Provável (repetir cultura e TS) 2- Pulmonar + Pleural (não responder a 45) 2- Unilateral não cavitária 2- Ganglionar periférica 2- Negativa
3- Extrapulmonar 3- Bilateral cavitária 3- Bilateral não cavitária 3- Genito-urinária 3- Em andamento
4- Disseminada 4- Bilateral não cavitária 4- Normal 4- Óssea 4- Milar 4- Não realizada
5- Outras 5- Meningite 5- Contaminada

47. Medicamentos prescritos (preencher todos os campos) 1- Amicacina 2- Etambutol 3- Ofloxacino 4- Pirazinamida 5- Terizidona
1- Sim A- 500mg B- 1000mg 2- Não B- 1200mg 3- 400mg B- 800mg 4- A- 1000mg B- 1500mg 5- A- 500mg B- 750mg

6- Clofazimina 7- Estreptomicina 8- Rifampicina 9- Isoniazida 10- Etionamida
A- 50mg B- 100mg A- 500mg B- 1000mg A- 300mg B- 600mg A- 200mg B- 300mg A- 250mg B- 500mg C- 750mg

48. Outros medicamentos e doses para TBMR: _____ 49. Tratamento supervisionado

1- Sim → 49.1. Nome da unidade de supervisão _____
2- Não

50. Outros procedimentos:

Nome do procedimento 1 Resultado 1 _____
Nome do procedimento 2 Resultado 2 _____

1. Outras informações: _____
 2. Preenchido por: _____
 Nome: _____ Função: _____

ANEXOS

ANEXO A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Esclarecimento

Você está sendo convidado a participar do estudo de *Mycobacterium tuberculosis* Multidrogra (MDR) e Extensivamente Resistente (TB-XDR) em pacientes com história de tratamento anterior em serviço de referência no Estado do Ceará”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é: Determinar e compreender as variáveis da frequência de TB XDR e TB MDR relacionadas ao ambiente domiciliar e da comunidade, frente às características genéticas do hospedeiro e do bacilo, visando melhorar as metodologias empregadas no controle e prevenção da TB resistente. Caso você participe, será necessário a *coleta de escarro e respostas de perguntas relacionadas a TB*. Serão realizados exames de tipagem genética a partir da cultura da bactéria e teste de sensibilidade às drogas anti-tuberculoese.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer tipo de pagamento, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias à realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento no estudo, pois você será identificado com um número (registro do laboratório). Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores são: Dr^a *Cristiane Cunha Frota* que pode ser encontrada no endereço *Divisão de Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado, S/N. Rodolfo Teófilo, Fortaleza. Telefone (085) 3366-8303*. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Messejana; telefone (085) 3101-4162.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li e/ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Mycobacterium tuberculosis Multidrogra (MDR) e Extensivamente Resistente (TB-XDR) em pacientes com história de tratamento anterior em serviço de referência no Estado do Ceará.”.

Eu,....., li e/ou ouvi o esclarecimento acima e ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e entendo que sou livre para interromper meu consentimento a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

----- Assinatura do paciente

Data ____/____/____

----- Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

----- Assinatura da testemunha

ANEXO B. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – via Plataforma Brasil

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTIDROGA E EXTENSIVAMENTE RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERENCIA

Pesquisador: THALES ALVES CAMPELO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62835016.1.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.956.894

Justificativa de Ausência	toa_.pdf	07/10/2016 11:01:25	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Carta_de_apreciacao.jpg	31/10/2016 15:37:53	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_concordancia.jpg	31/10/2016 15:19:02	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	30/10/2016 14:43:36	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	21/10/2016 16:04:36	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Questionario.pdf	18/10/2016 10:48:06	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Termo_de_Fiel_Depostario.pdf	16/10/2016 10:04:30	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Termo_de_Anuencia_Ambulatorio_de_Tisiologia.pdf	16/10/2016 09:58:45	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	confirmacao_do_cadastro_na_pesquisa_clinica.pdf	16/10/2016 09:54:31	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_laboratorio_de_analise_clinicas.pdf	16/10/2016 09:40:46	THALES ALVES CAMPELO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

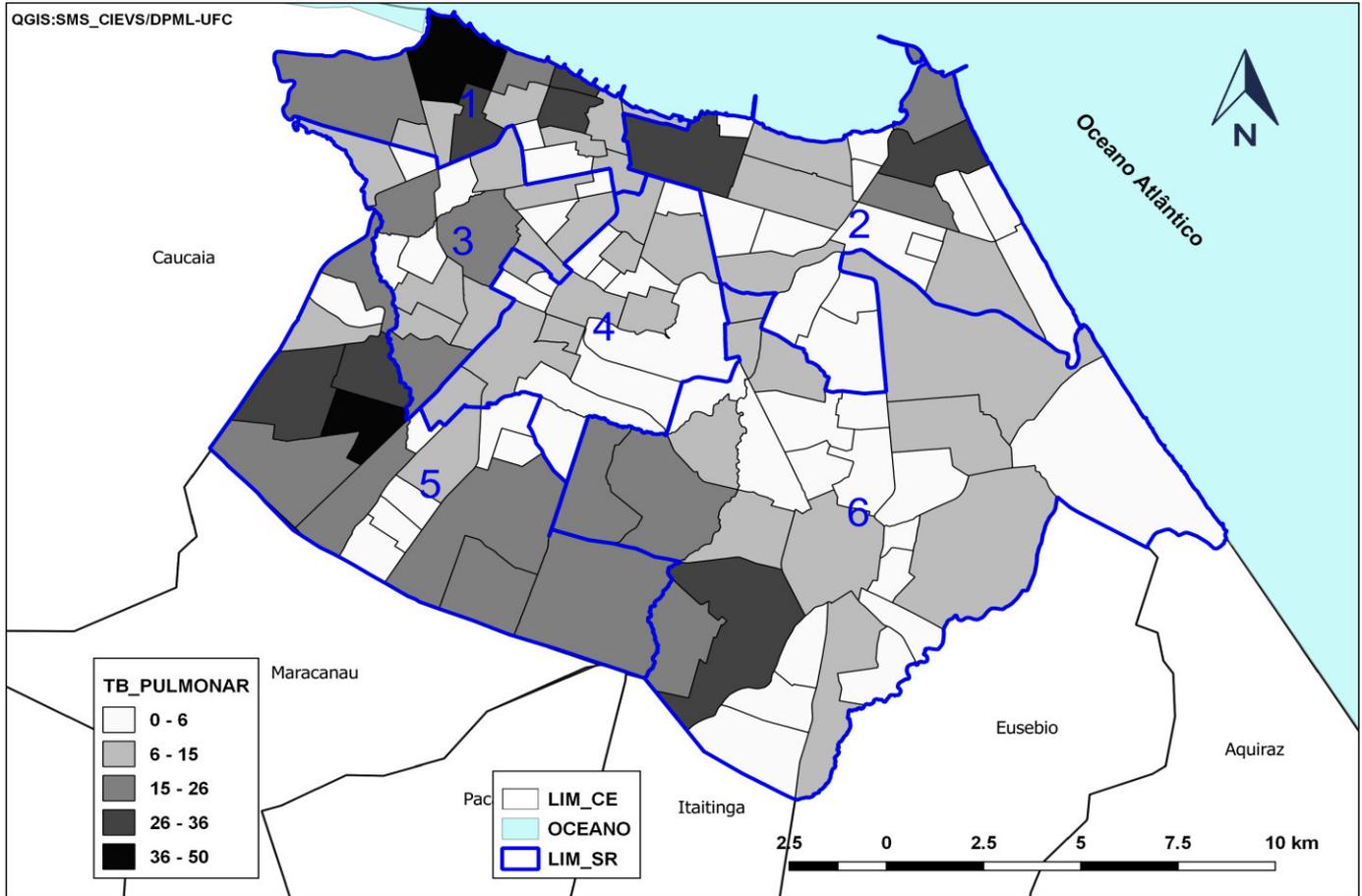
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 09 de Março de 2017

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

ANEXO C - Mapa da distribuição dos casos de tuberculose por regional e por bairro na cidade de Fortaleza –Ceará, no ano de 2017.



ANEXO D - Frequência de casos de tuberculose nos bairros de Fortaleza, Ceará, no ano de 2017.

Bairro	População	TB pulmonar	Índice	IDH
Mondubim	81480	24	29,5	0,232
Manuel Dias Branco	1549	7	451,9	0,491
Farias Brito	12925	10	77,4	0,499
Benfica	13881	10	72,0	0,517
Monte Castelo	14160	8	56,5	0,435
Boa Vista	13123	7	53,3	0,313
Edson Queiroz	23798	13	54,6	0,351
Cajazeiras	15513	5	32,2	0,304
Aeroporto	9234	0	0,0	0,176
Pici	45531	22	48,3	0,218
Canindezinho	44148	17	38,5	0,136
Joao XXIII	19713	8	40,6	0,283
Messejana	44669	13	29,1	0,375
Quintino Cunha	37630	13	34,5	0,222
Antônio Bezerra	27693	21	75,8	0,348
Cidade 200	8864	5	56,4	0,561
Olavo Oliveira	13027	6	46,1	0,212
Itaperi	24176	6	24,8	0,368
Dias Macedo	12978	5	38,5	0,271
Alto da Balança	13731	12	87,4	0,347
Mucuripe	14730	4	27,2	0,793
Democríto Rocha	11779	4	34,0	0,369
Genibaú	43218	25	57,8	0,138
Praia do Futuro I	7104	1	14,1	0,291
Parque Santa Rosa	13705	0	0,0	0,243
Lagoa Redonda	29946	7	23,4	0,252
Jose de Alencar	17147	2	11,7	0,376
Carlito Pamplona	31155	30	96,3	0,299
Parque Iracema	9011	2	22,2	0,504
Bonsucesso	44143	22	49,8	0,262
Cambeba	8169	5	61,2	0,517
Pirambu	19046	31	162,8	0,299
Parque Santa Maria	14296	1	7,0	0,214
Passaré	54581	20	36,6	0,224
Parangaba	33160	13	39,2	0,418
Sapiranga Coite	34457	9	26,1	0,337
Conjunto Palmeiras	39215	19	48,5	0,119
Pan Americano	9446	8	84,7	0,373

ANEXO D - Frequência de casos de tuberculose nos bairros de Fortaleza, Ceará, no ano de 2017.

Bairro	População	TB pulmonar	Índice	IDH
Padre Andrade	13862	4	28,9	0,361
Siqueira	36034	23	63,8	0,148
Centro	30580	36	117,7	0,566
Praia de Iracema	3355	3	89,4	0,722
Guajeru	7143	3	42,0	0,288
Paupina	15713	13	82,7	0,284
Aldeota	45390	15	33,0	0,866
Luciano Cavalcante	16654	5	30,0	0,522
Guararapes	5642	1	17,7	0,767
Damas	11486	3	26,1	0,517
Salinas	4604	2	43,4	0,491
Parque Dois Irmãos	29182	23	78,8	0,251
São Joao do Tauape	29572	13	44,0	0,491
Cais do Porto	23981	20	83,4	0,233
Dionísio Torres	16751	3	17,9	0,859
Curio	8183	3	36,7	0,188
Joaquim Tavora	25127	5	19,9	0,662
Jardim das Oliveiras	31684	12	37,9	0,273
Conjunto Ceara I	20594	5	24,3	0,359
Varjota	9023	4	44,3	0,712
Aerolandia	12171	12	98,6	0,313
Parque Presidente Vargas	7706	3	38,9	0,138
Moura Brasil	4033	9	223,2	0,284
Planalto Ayrton Senna	42266	18	42,6	0,168
Pedras	1438	2	139,1	0,263
Sao Gerardo	15542	4	25,7	0,596
Itaoca	13368	7	52,4	0,373
Vila Ellery	8424	2	23,7	0,415
Jardim Guanabara	15985	8	50,0	0,325
Presidente Kennedy	24648	8	32,5	0,428
Floresta	30961	28	90,4	0,223
Serrinha	30826	4	13,0	0,282
Alvaro Weyne	25384	13	51,2	0,364
Manoel Satiro	40666	9	22,1	0,292
Vila Velha	66022	19	28,8	0,217
Prefeito Jose Walter	35818	17	47,5	0,395
Barra do Ceara	77600	50	64,4	0,215
Amadeu Furtado	12539	4	31,9	0,587
Jangurussu	54087	32	59,2	0,172
Cidade Funcionarios	19562	4	20,4	0,571

ANEXO D - Frequência de casos de tuberculose nos bairros de Fortaleza, Ceará, no ano de 2017.

Bairro	População	TB pulmonar	Índice	IDH
Jardim Cearense	10825	4	37,0	0,318
Ancuri	7210	5	69,3	0,204
Parque Sao Jose	11236	2	17,8	0,284
Cristo Redentor	28627	23	80,3	0,253
Coco	21956	4	18,2	0,762
Maraponga	10882	2	18,4	0,394
Sao Bento	12819	1	7,8	0,198
Bom Jardim	40457	41	101,3	0,232
Granja Lisboa	55761	32	57,4	0,169
Joquei Clube	20712	8	38,6	0,406
Granja Portugal	42487	33	77,7	0,191
Sabiaguaba	2268	3	132,3	0,267
Couto Fernandes	5636	3	53,2	0,361
Dende	6040	1	16,6	0,181
Parque Araxa	7196	0	0,0	0,587
Jose Bonifacio	9480	1	10,5	0,0643
Vila Uniao	16477	8	48,6	0,467
Montese	27826	8	28,8	0,418
Parque Manibura	8067	0	0,0	0,578
Jardim Iracema	24841	12	48,3	0,299
Bom Futuro	6862	1	14,6	0,505
Vila Pery	22121	10	45,2	0,341
Parreao	11864	1	8,4	0,573
Fatima	24975	7	28,0	0,694
Meiros	39625	15	37,9	0,953
Jacarecanga	15219	13	85,4	0,458
Jardim America	13140	8	60,9	0,443
Vicente Pinzon	48772	34	69,7	0,331
Papicu	19685	26	132,1	0,591
Rodolfo Teofilo	20479	10	48,8	0,481
Praia do Futuro II	12812	3	23,4	0,162
Bela Vista	17951	10	55,7	0,375
Henrique Jorge	28924	13	44,9	0,344
Autran Nunes	22724	4	17,6	0,181
Conjunto Ceara II	25366	9	35,5	0,361
Barroso	31981	10	31,3	0,186
Coacu	7702	1	13,0	0,255
Dom Lustosa	14087	3	21,3	0,321
De Lourdes	3611	0	0,0	0,641
Parquelandia	15465	8	51,7	0,628

ANEXO E - Frequência dos casos de tuberculose por regional administrativa em Fortaleza, Ceará no ano de 2017.

Regional	Quantidade de casos	IDH
Regional 1	260	0,343
Regional 2	206	0,583
Regional 3	164	0,377
Regional 4	103	0,431
Regional 5	268	0,247
Regional 6	244	0,304

ANEXO E – Banner apresentando no 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 02 a 05 de setembro de 2018, Recife- Pernambuco



Thales Alves Campelo

+55 85 99991-9818

@thaleslab23@gmail.com

TUBERCULOSE DROGA RESISTENTE EM HIV NEGATIVOS: AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO NA REGIÃO METROPOLITANA DE FORTALEZA - CEARÁ

Thales Alves Campelo¹; Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima²; Caroliny Soares Silva¹; Soraya de Oliveira Sancho¹; Francisco Gustavo Silveira Correia³; Cristiane Cunha Frota¹.

¹Laboratório de Micobactérias, Universidade Federal do Ceará-UFC, Fortaleza-Ceará;

²Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas, Belém-Pará;

³Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade Federal do Ceará-UFC, Ceará.

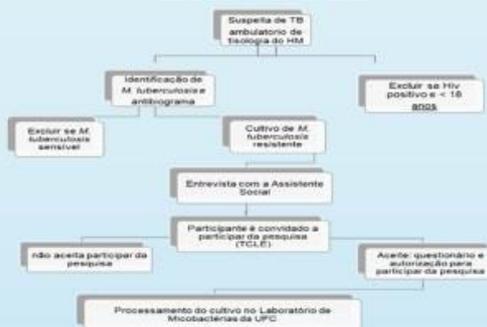
INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa tratável que afeta a humanidade a milhares de anos, sendo considerada a doença infecciosa que mais causa óbito no mundo. A TB multidroga resistente (MDR) é definida como a resistência à isoniazida (INH) e rifampicina (RIF), constituindo assim um problema grave para o controle da doença. De acordo com a OMS, em 2016 foi estimado que ocorreram 490 000 casos de TB-MDR no mundo. Em 2017, foram notificados 3.078 casos de TB no Ceará, dos quais 1.847 foram notificados apenas em Fortaleza o que representa uma taxa de incidência de 83,8 casos novos por 100 mil habitantes. OBJETIVO: Identificar variáveis socioeconômicas, ambientais, comportamentais (dados clínicos) e presença de comorbidades associadas à TB-droga resistente (DR) no âmbito intradomiciliar e na comunidade

METODOLOGIA

Foram incluídos 49 participantes com diagnóstico de TB-DR em HIV negativos. A entrevista dos pacientes foi realizada nos ambulatórios do Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes. Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo controle, composto por pacientes com resistência até dois fármacos e grupo caso constituído por indivíduos com resistência a três ou mais fármacos.

FLUXOGRAMA DE ANÁLISE:



Baciloscopia: As culturas com crescimento visível e em fase exponencial de crescimento (entre 10-15 dias de cultivo), foram confirmadas por BAAR através da coloração de Ziehl-Neelsen e visualização em microscopia óptica.



Figura 1. Coloração de Ziehl-Neelsen (aumento de 1000x). Bacilos *Mycobacterium tuberculosis* complex (BAAR) em vermelho.

RESULTADOS

A resistência à INH e RIF foi encontrada em 81,2% (30/49) das amostras analisadas. Diabetes (52,8%) e etilismo (73,7%) foram encontrados como fatores de risco relacionados a resistência a três ou mais fármacos ($p < 0,05$). Também foi observado o predomínio do sexo masculino (73,7%, $p = 0,021$) e no maior número de contatos intradomiciliares (32,7%, $p = 0,0165$) no grupo caso.

Tabela 1. Fatores de riscos associados ao fenótipo de resistência obtido pelo sistema BACTEC MGIT 960 dos 49 pacientes diagnosticados com Tuberculose resistente atendidos no Hospital de Messejana no período de março de 2017 a março de 2018, Fortaleza, Ceará-Brasil.

Variáveis	Total N = 49 (%)	≥ 3 fármacos N= 19 (%)	≤ 2 fármacos N= 30 (%)
Sexo			
Masculino	26 (53,1)	14 (73,7)	12 (40,0)
Feminino	23 (46,9)	5 (27,3)	18 (60,0)
Diabetes			
Sim	16 (32,2)	10 (52,6)	6 (20,0)
Não	33 (67,8)	9 (47,4)	24 (80,0)
Etilismo			
Sim	26 (53,1)	14 (73,7)	12 (40,0)
Não	23 (46,9)	5 (27,3)	18 (60,0)

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os fatores de risco encontrados são semelhantes ao da TB. Encontramos também uma resistência primária em 89,4% dos participantes, muito superior ao descrito na literatura.

CONCLUSÃO: Foi verificado que fatores como o estilo de vida, comorbidades e o sexo masculino estão associados ao desenvolvimento de resistência aos fármacos anti-TB.

REFERÊNCIAS

- FORRELLAD, M. A. *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, v.4, n.1, p.60-68, 2013.
- FREGONA *et al.* Risk factors associated with multidrug-resistant tuberculosis in Espírito Santo, Brazil. *Rev Saude Publica*, v.8, n.41, p.50-56, 2017.
- GERDES, S. R. *et al.* Multicenter Laboratory Validation of the BACTEC MGIT 960 Technique for Testing Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to Classical Second-Line Drugs and Newer Antimicrobials. *Journal of clinical microbiology*, v.44, n.3, p.688-692, 2006.
- HERSHBERG *et al.* High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol*, v.6, n.12, 2008.

AGENCIA DE FOMENTO

SPU Nº 178638234. Edital 05/2017 Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

ANEXO F – Resumo apresentado no XXIV Congresso Latino-Americano de Microbiologia, 13 a 16 de novembro de 2018, Santiago – Chile.



DETERMINANTES MOLECULARES E ESPACIAIS DA TUBERCULOSE RESISTENTE EM FORTALEZA, NORDESTE DO BRASIL.

Campelo Thales A.¹, Silva Caroliny S.¹, Lima Luana N.G.C.², Lima Karla V.B.², Sancho Soraya O.¹, Frota Cristiane C.¹

(1) Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, BR

(2) Seção de Bacteriologia, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, BR

Introdução: O município de Fortaleza, capital do estado do Ceará, concentra 81% dos casos de tuberculose (TB) e apenas 56% dos indivíduos tratados evoluem para cura. O estudo tem como objetivo determinar e compreender as variáveis da frequência da TB resistente aos fármacos anti-TB, relacionando com a mutação nos genes *rpoB*, *katG*, *mabA*, *gyrA* e *rrs*, com as características comportamentais, do ambiente domiciliar e da comunidade relacionadas ao hospedeiro, assim como analisar espacialmente as residências dos participantes na região metropolitana de Fortaleza, Ceará-Brasil. **Métodos:** Estudo prospectivo, do tipo caso-controle, realizado no período de fevereiro de 2017 a janeiro de 2018. Foram incluídos 49 pacientes com TB pulmonar e com diagnóstico fenotípico de resistência a pelo menos um fármaco anti-TB. Os pacientes foram atendidos no hospital de referência estadual no acompanhamento de TB resistente. Um questionário semiestruturado contendo informações demográficas, socioeconômicas, comportamentais e laboratoriais foi aplicado a todos os participantes. A detecção da mutação foi realizada por MAS-PCR, seguido de sequenciamento genético. As coordenadas geográficas das residências de cada paciente foram georreferenciadas. **Resultados:** Dos 49 isolados de *M. tuberculosis*, 12 (25%) eram resistentes a um fármaco, 18 (37%) a dois fármacos e 19 (39%) a três ou mais fármacos. A média de idade dos pacientes foi de 40,4 anos, 39 (80%) não tinham história de tratamento anterior e 33 (67%) tinham padrão radiográfico de cavitação bilateral. Foram detectadas mutações no códon 315 do gene *katG* em 36 (92%) isolados, e em três (8%) isolados na região determinante de resistência a quinolona (códon 90, 91 e 94) do gene *gyrA*. A análise espacial mostrou que casos de TB resistente residem em regiões da cidade com menor condição socioeconômica e de moradias. **Conclusão:** Os pacientes com TB, em particular a elevada frequência de indivíduos com TB primária, apresentam distribuição geográfica na cidade de Fortaleza relacionados com o padrão demográfico e social. A técnica de MAS-PCR permite a detecção de mutações em genes relacionados a resistência a fármacos que não são cotidianamente empregados nos testes fenotípicos.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, Brasil (Edital N° 05/2017, SPU N° 178638234), Capes.



Santiago, Julio 2018

Estimado/a Sr./Srta.:

En nombre del Comité Científico del XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, nos complace informar que su trabajo:

DETERMINANTES MOLECULARES E ESPACIAIS DA TUBERCULOSE RESISTENTE EM FORTALEZA, NORDESTE DO BRASIL.

Campelo Thales A., Silva Carolyn S., Lima Luana N.G.C., Lima Karla V.B., Sancho Soraya O., Frota Cristiane C.

Ha sido aceptado en formato Comunicación Libre Panel. Le esperamos entre el 13 y 16 de noviembre en el Centro de Eventos y Convenciones Centroparque, Santiago, Chile.

Dra. Claudia Saavedra

Dr. Renato Chávez

Comité Organizador
XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología