

ALESSANDRA COSTA PANUNTO

**GENOTIPAGEM UTILIZANDO A SEQUÊNCIA
DE INSERÇÃO IS6110 E “SPOLIGOTYPING” DE
Mycobacterium tuberculosis ISOLADOS DE PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV, EM MOÇAMBIQUE, ÁFRICA**

CAMPINAS

2007

ALESSANDRA COSTA PANUNTO

**GENOTIPAGEM UTILIZANDO A SEQUÊNCIA
DE INSERÇÃO IS6110 E “SPOLIGOTYPING”
DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADOS DE PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV, EM MOÇAMBIQUE, ÁFRICA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de concentração em Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO DE CARVALHO RAMOS

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P196g Panunto, Alessandra Costa
Genotipagem utilizando a seqüência de inserção IS6110 e
“spoligotyping” de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes
infectados pelo HIV, em Moçambique, África / Alessandra Costa
Panunto. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Marcelo de Carvalho Ramos
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. *Mycobacterium tuberculosis* - Moçambique. 2. Tuberculose.
I. Ramos, Marcelo de Carvalho. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em ingles: Genotyping using of insertion sequence IS6110 and
“spoligotyping” of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV – infected
patients in Mozambique, Africa**

Keywords: • *Mycobacterium tuberculosis* - Mozambique
• Tuberculosis

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora: Prof Dr Marcelo de Carvalho ramos
Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli
Profa. Dra. Mariângela Ribeiro Resende
Profa. Dra. Mônica Jacques de Moraes

Data da defesa: 06 - 07 - 2007

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador(a): *Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos*

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) Lucilaine Ferrazoli *Lucilaine*
2. Prof(a). Dr(a). Elsa Masae Mamizuka *Elsa*
3. Prof(a). Dr(a). Mônica Jacques de Moraes *Mônica*
4. Prof(a). Dr(a). Mariângela Ribeiro Resende *Mariângela*
5. Prof(a). Dr(a). Marcelo de Carvalho Ramos *Marcelo*

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/07/2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãs, que possibilitaram minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos pela orientação e conhecimento.

Ao Prof. Dr. Phillip Suffys pela atenção, conhecimento e colaboração no projeto.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular - FIOCRUZ/RJ, Diogo dos Santos Netto, Atina Elias e Harrison pela disponibilidade, paciência, atenção e presteza na colaboração para análise dos experimentos.

A Dra. Elizabete Alves Nunes pela gentileza em ceder as cepas de Moçambique estudadas nesse trabalho.

Ao Dr. Eduardo de Mello Capitani pelo apoio financeiro e colaboração no projeto..

Aos colegas do Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular da FCM/UNICAMP, em especial à Eliane, Patricia e Audrey pelo apoio e auxílio nesse trabalho, o meu muito obrigado.

Aos funcionários do Laboratório de Micobactérias do Setor de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do HC/UNICAMP, em especial, Aparecida, Wagner e Dalva.

Aos colegas da pós-graduação pelas trocas de conhecimentos e materiais de laboratório.

Aos membros da banca pela participação.

Ao Euler, em especial, que esteve presente nos momentos mais difíceis.

Aos pacientes.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para esse trabalho.

O meu profundo agradecimento!

INSTITUIÇÕES EXECUTORAS E COLABORADORAS



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas



LPBBM

Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular



Fundação Oswaldo Cruz/ Rio de Janeiro

Laboratório de Biologia Molecular de Micobactérias

INSTITUIÇÕES FINACIADORAS



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

“As grandes coisas não se realizam sem grandes dificuldades”.

Voltaire (François-Marie Arouet) (1694-1778)

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xvi</i>
ABSTRACT.....	<i>xviii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	20
1.1- Aspectos microbiológicos.....	21
1.2- Epidemiologia da tuberculose.....	22
1.3- Tuberculose na África Subsaariana.....	23
1.4- Tuberculose e a co-infecção pelo HIV.....	24
1.5- Métodos moleculares aplicados à epidemiologia da tuberculose.....	25
2-OBJETIVOS.....	31
3- METODOLOGIA.....	33
3.1- Caracterização do local de obtenção das cepas.....	34
3.2- Local de execução das atividades.....	34
3.3- Casuística.....	35
3.3.1- Critérios de inclusão.....	36
3.3.2- Critérios de exclusão.....	36
3.4- Identificação das micobactérias.....	36
3.4.1- Amplificação do <i>hsp65</i>	36
3.4.2- Digestão do produto amplificado do gene <i>hsp65</i>	37
3.4.3- Análise da digestão do gene <i>hsp65</i>	37
3.5- Genotipagem por RFLP.....	37
3.5.1- Preparação do DNA micobacteriano.....	38

3.5.2- Digestão do DNA genômico por enzima de restrição.....	39
3.5.3- eletroforese em gel de agarose.....	39
3.5.4- Transferência do DNA digerido em membrana de náilon.....	39
3.5.5- Construção da sonda do elemento de inserção IS6110 por PCR.....	39
3.5.6- Hibridização.....	40
3.5.7- Detecção por quimioluminescência.....	40
3.5.8- Análise das membranas.....	40
3.6- Genotipagem por “Spoligotyping”	41
3.6.1- Amplificação do spacer DNA “ <i>in vitro</i> ” por PC.....	42
3.6.2- Hibridização com produtos de PCR e detecção.....	42
3.6.3- Análise das membranas.....	43
4- RESULTADOS.....	44
4.1- Identificação dos isolados.....	45
4.2- Perfil genotípico dos isolados por RFLP.....	46
4.3- Perfil genotípico dos isolados por “Spoligotyping”	52
5- DISCUSSÃO.....	58
6- CONCLUSÃO.....	65
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
8- ANEXOS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<i>A</i> /uI	Endonuclease de restrição <i>A</i> /uI
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
<i>Bst</i> EII	Endonuclease de restrição <i>Bst</i> EII
C	Citosina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CTAB	Brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil amônio
DCM	Departamento de Clínica Médica
DR	“Direct Repeat” - Repetições diretas
16SrRNA	Ácido ribonucléico ribossomal 16S
DNA	Ácido Dexorribonucléico
dNTP	Desoxi nucleotídeos tri-fosfato
DPC	Departamento de Patologia Clínica
DRE	“Direct repetitive Element” - elemento repetitivo direto
DVR	“Direct variable Repeat” - Repetições Diretas Variáveis
ETR	“Exact tandem repeat”
FAPESP	Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FIOCRUZ-RJ	Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro
G	Guanina
H37Rv	Cepa de referência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Hae</i> III	Endonuclease de restrição <i>Hae</i> III
HC	Hospital de Clínicas
HCM	Hospital central de Maputo
HCl	Ácido Clorídrico

HGM	Hospital central de Machava
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>IS</i>	Seqüência de Inserção
<i>IS</i>	Seqüência de Inserção 6110
LPBBM	Laboratório de Patogênese Bacteriana e Biologia Molecular
L-J	Löwenstein-Jensen
M	Molar
<i>M. avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
mb	Mega bases
MDR-TB	Multirresistentes à Tuberculose
MIRU	Mycobacterium Interspersed Repetitive Units
MIRU-VNTR	Mycobacterium Interspersed Repetitive Units and Variable Numbers of Tandem Repeats
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
min	Minutos
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
NAP	p-nitro- α -acetil-amino- β -hidroxipropionofenol
NTCP	“National Tuberculosis Control Programme”
NTM	Nontuberculous mycobacteria” - Micobactérias não pertencente ao CMTB
OADC	Ácido oléico, albumina, dextrose e catalase
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase chain reaction” - Reação em cadeia da Polimerase
PGRS	Seqüência repetida rica em guanina e citosina

PRA-PCR	“PCR-restriction enzyme analysis”
RFLP	“Restriction Fragment lenght polymorphism”- Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição
RFLP-PCR	“Restriction Fragment lenght polymorphism-Polymerase chain reaction” ou PRA-PCR
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
<i>PvuII</i>	Endonuclease de restrição <i>PvuII</i>
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Solução salina de citrato
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris 89mM, ácido bórico 89mM e EDTA 2,5mM
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPGMA	“Unweighted pairs group method arithmetic”
UV	Ultra violeta
V	Volts
VNTR	“Variable numbers of tandem repeats” - Número Variável de seqüências de DNA repetidas em “Tandem” (uma seqüência de DNA se repete em Tandem quando as cópias estão em seguida, uma após a outra, em um dado ponto do genoma)
Vol	Volume
WHO	“World Health Organization”- Organização Mundial da Saúde
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Comparação entre as técnicas de IS6110-RFLP, "Spoligotyping" e MIRUs.....	29
Tabela 2- Local e execução das atividades.....	35
Tabela 3- Perfis agrupados de IS6110-RFLP presentes no estudo.....	50
Tabela 4- Perfis agrupados de "Spoligotyping" presentes no estudo.....	53
Tabela 5- "Spoligotypes" mais freqüentes no estudo.....	54
Tabela 6- Famílias mais prevalentes no estudo.....	54

	PÁG.
Figura 1- Taxa de incidência (/100.000hab.) de todas as formas de tuberculose em diversos países do mundo.....	23
Figura 2- Estimativa mundial de co-infecção TB-HIV.....	24
Figura 3- Mapa do elemento de inserção IS6110 do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com 1355pb. Estão demonstradas posições de corte de outras enzimas de restrição. A enzima PvuII corta o elemento de inserção na posição 461pb. As linhas, à direita e à esquerda, representam DNA cromossômico.....	27
Figura 4- Desenho esquemático dos procedimentos realizados na tipagem do <i>M. tuberculosis</i> por RFLP-IS6110.....	38
Figura 5- Desenho esquemático da genotipagem por “Spoligotyping” (Barnes, et al 2003).....	41
Figura 6- População de estudo.....	46
Figura 7- Distribuição dos isolados, segundo o número de seqüências IS6110 encontradas.....	47
Figura 8- Exemplo de perfis genotípicos obtidos no estudo.....	48
Figura 9- Distribuição dos agrupamentos por IS6110-RFLP.....	49
Figura 10- Perfis genotípicos obtidos através da técnica de IS6110-RFLP de isolados de <i>M. tuberculosis</i> de pacientes pertencentes ao agrupamento IX (A) e XXI (B).....	51
Figura 11- Dendrograma mostrando os 79 “spoligotypes” analisados por BioNumerics® 4.50.....	55

Figura 12-	Matriz de similaridade e perfis de IS6110 - RFLP de cepas de <i>M.tuberculosis</i> isoladas de pacientes com tuberculose pertencentes ao agrupamento genotípico da família Beijing por “Spoligotyping”.....	56
Figura 13-	Dendrograma mostrando os 13 agrupamentos dos 70 isolados por “spoligotyping” analisados por BioNumerics® 4.50.....	57

RESUMO

A tuberculose é a principal causa de morte no mundo entre as doenças infecciosas, produzindo 2 milhões de óbitos ao ano. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, ou seja, 1,7 bilhões de pessoas. Em países africanos, o problema da tuberculose e da aids adquiriu proporções de grande magnitude. Em Moçambique, o coeficiente de incidência é de 460 casos/100.000 habitantes/ano, com mortalidade de 129 casos/100.000 habitantes/ano. Este estudo documenta a relevância desse problema. Duzentos e trinta e sete isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* foram caracterizados por IS6110-RFLP e “Spoligotyping”, com o objetivo de avaliar a biodiversidade do bacilo da tuberculose na cidade de Maputo, Moçambique, África, onde há uma elevada incidência de tuberculose. Os resultados obtidos com o uso da técnica IS6110-RFLP exibiram uma considerável variabilidade genotípica, ou seja, cerca de 70,5% dos exemplares analisados corresponderam a genótipos únicos. A interpretação desse achado deveria ser feita juntamente com o estudo epidemiológico clássico, bem como a ampliação do número de casos analisados. Porém, a grande variabilidade genotípica nesse cenário em que a transmissão da doença é intensa, dado o número elevado de casos, indica, provavelmente, a situação endêmica em si, bem como o tempo prolongado em que isso se dá. Além disso, a grande mobilidade interna, ocorrida depois das intensas guerras civis, trazendo para a cidade indivíduos de diversos outros locais, pode também ter contribuído para essa diversidade. Encontramos também uma alta frequência de cepas com baixo número de cópias (20,2% da IS6110). Todos os isolados foram também submetidos ao “Spoligotyping”. Essa técnica foi mais discriminatória para os isolados com menos de 6 cópias da IS6110 do que o RFLP e menos discriminatório para os isolados com mais de 6 cópias da IS6110. As famílias mais frequentemente encontradas no conjunto das cepas foram: LAM, EAI, T e Beijing, distribuídas entre os 35 agrupamentos, com 193 isolados. Em ambos os agrupamentos, tanto os derivados da técnica “IS6110-RFLP”, quanto o “Spoligotyping”, não houve nenhuma correlação com a resistência à isoniazida, e mesmo com os isolados multirresistentes.

ABSTRACT

Tuberculosis is the leading cause of death among infectious diseases in the world, with approximately two million deaths each year. Among Sub-Saharan African countries, tuberculosis and AIDS represents an enormous problem. In Mozambique, the incidence of tuberculosis is as high as 460 cases/100,000 inhabitants/year, with a mortality rate of 129 people/100,000 inhabitants/year. The present study re-enforces the importance of this problem. A sample of 237 clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from HIV-infected patients, living in the city of Maputo, Mozambique, was genotypically characterized by IS6110-RFLP and Spoligotyping. IS6110-RFLP showed a considerable variability (70.5%) corresponding only to genotypes. Limitations in sampling, and scarce epidemiological data, may account for lack of definition of risk factors for TB transmission in this study. A high frequency of strains exhibiting low IS6110 copy number (n=20,2%) was observed. These strains were further genotyped by Spoligotyping. The most frequently found families, characterized with the use of this technique were: LAM, EAI, T and Beijing. These isolates (n=193) could be grouped in 35 clusters. Spoligotyping was more discriminatory for isolates exhibiting less than six IS6110 copies than RFLP. No correlation was found between resistance to INH, or even multidrug-resistance and clustering.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos microbiológicos

As micobactérias estão posicionadas taxonomicamente na Ordem Actinomycetales, Família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* (Runyon et al, 1967)¹.

O gênero *Mycobacterium* é constituído por bacilos imóveis, não esporulados, não encapsulados, medindo de 1-10 micrômetros de comprimento e 0,2-0,6 micrômetros de largura. Possuem alto teor de lipídios em sua parede celular. Apresentam propriedade morfotintorial álcool-ácido resistente e coloração fracamente Gram positiva. O tamanho do seu genoma é em torno de 4,4 mb, com alto teor de G-C 962-70%.

O crescimento da maioria das espécies do gênero *Mycobacterium* é lento e seu tempo de duplicação varia de 18 a 48 horas, o que torna a tuberculose uma doença de evolução lenta e muitas vezes crônica (Veronesi e Focaccia, 1996; Murray et al., 1999). As colônias do *M. tuberculosis* desenvolvem-se na superfície do meio de cultura de Löwenstein-Jensen e não alteram cor desse meio, têm coloração creme e aspecto rugoso. A temperatura ótima de crescimento é 37°C (Brasil, 1994).

O *M. tuberculosis*, responsável pela tuberculose humana, foi descoberto em 1882, por Robert Koch. Ele pertence ao “Complexo *Mycobacterium tuberculosis*” (CMTB), sendo constituído por outras espécies, como: *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. caprae*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* (subtipos I and II), *M. microti*. O *M. canetti*, não se encontra na lista as bactérias com nomenclatura padronizada².

Recentemente, um novo membro desse complexo, o *M. pinnipedii*, foi proposto por Cousins et al. (2003). Fenotipicamente, todos os membros do CMTB são semelhantes (van Soolingen et al., 1997; Brosch et al, 2002; Mostowy et al, 2002) e apresentam 99% de similaridade genética nos níveis de nucleotídeos e idênticas seqüências 16SrRNA (Brosch et al, 2002).

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=1760&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlo>

² <http://www.bacterio.cict.fr/>

1.2- Epidemiologia da tuberculose

A tuberculose é a principal causa de morte entre as doenças infecciosas, ocorrendo aproximadamente mais de 2 milhões de óbitos ao ano. Anualmente, surgem 8 a 10 milhões de casos no mundo. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo MTB, ou seja, 1,7 bilhões de pessoas (World Health Organization, 2006).

Calcula-se que em 2004 houve 8,9 milhões de casos novos de tuberculose (Incidência = 140/100.000 habitantes). Desses, 3,9 milhões (62/100.000) eram bacilíferos e em 741.000 casos também eram infectados com HIV. A prevalência, no mesmo período, foi de 14,6 milhões (229/100.000), dos quais 6,1 milhões eram bacilíferos (95/100.000). Mais de 80% do total de novos casos de tuberculose em 2004 eram pacientes africanos e de regiões do Oeste do Pacífico e Sudeste asiático. Estima-se, também, que 1,7 milhões de pessoas (27/100.000) morreram de tuberculose em 2004, incluindo aquelas co-infectadas com HIV (248.000) (World Health Organization, 2006).

Com o desenvolvimento de drogas eficazes para o tratamento da tuberculose nas décadas de 1950 e 1960 e o rápido declínio do número de casos novos em países desenvolvidos, chegou a ser considerada a sua erradicação. Com isso, houve paulatina negligência nos programas de controle da doença.

Associada à pandemia da Aids, a partir de 1981, houve o aumento das taxas de incidência da doença, inclusive com o desenvolvimento de isolados resistentes às drogas empregadas no seu tratamento (van Soolingen, 2001). Esse cenário extremamente desfavorável atingiu mais fortemente os países em desenvolvimento, devido às precárias condições sanitárias, às deficientes políticas de controle das epidemias, e ao acesso deficitário aos serviços de saúde.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (World Health Organization, 2006a), a Índia lidera a lista dos países com maior carga de tuberculose, seguido pela China (A OMS classifica os países com alta carga de tuberculose pelo número absoluto de novos casos da doença no país, sem o ajuste pelo tamanho da população). Moçambique ocupa o 19º lugar nessa lista com a detecção de novos casos e o sucesso no tratamento permanecendo deficientes.

1.3- Tuberculose na África subsaariana

Em países africanos, o problema da tuberculose e da Aids adquiriu proporções de grande magnitude, com resultados devastadores para a população, especialmente na África subsaariana (a África subsaariana corresponde à região do continente africano a sul do Deserto do Saara, ou seja, aos países que não fazem parte do Norte da África)³. A incidência da doença nessa área é de mais de 400 casos por 100.000 habitantes⁴ (World Health Organization, 2004) (figura 1).

Nos países africanos de língua portuguesa, como Moçambique, a incidência é de 460 casos/100.000 habitantes/ano, com mortalidade de 129 pessoas/100.000 habitantes/ano (Moçambique tem uma população de 19.424 milhões de habitantes). A prevalência da infecção pelo HIV em casos de indivíduos portadores de tuberculose é de 48% (Nunes et al, 2005; World Health Organization, 2006a).

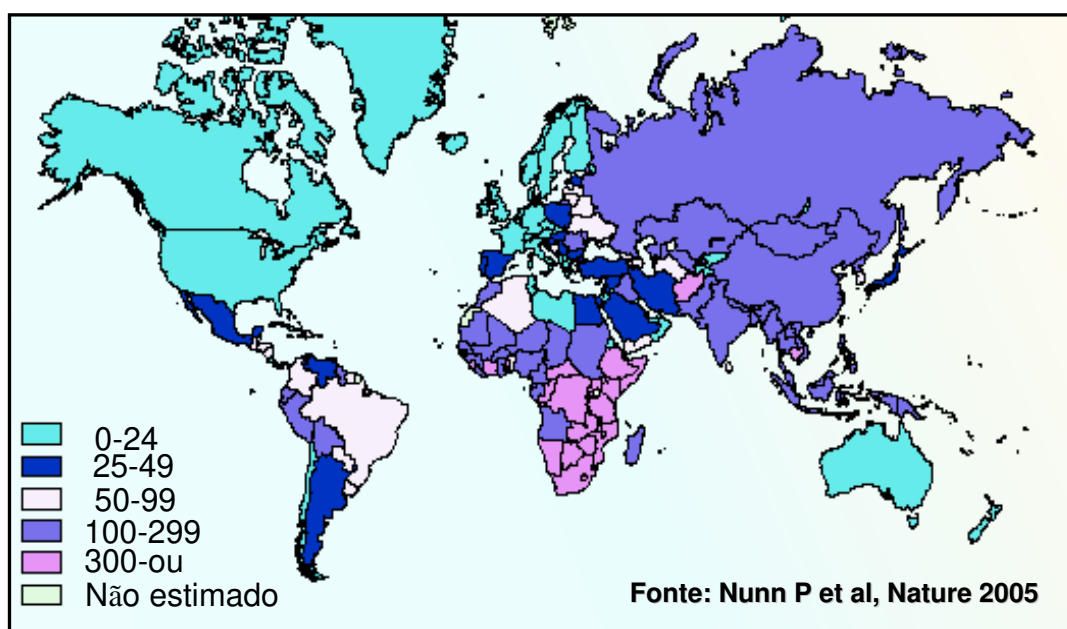


Figura 1- Taxa de incidência (/100.000hab.) de todas as formas de tuberculose em diversos países do mundo.

³ http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81frica_subsaariana

⁴ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

1.4- Tuberculose e a co-infecção pelo HIV

A tuberculose é a principal causa de morte nos pacientes infectados pelo HIV. Houve, sem dúvida, um agravamento do panorama da tuberculose devido à epidemia da Aids. Estima-se que haja, no mundo, cerca de 15 milhões de casos de TB associados ao HIV infecção (figura 2).

Em alguns países com alta prevalência de infecção pelo HIV, até 80% dos pacientes com tuberculose apresentam-se infectados pelo vírus. Parece que o agravamento do quadro da tuberculose nessa região é devido ao descontrole da transmissão do HIV na população⁵. Na África subsaariana, estima-se que cerca de 8 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *M. tuberculosis* e, anualmente, 5 a 10% desses indivíduos desenvolvem tuberculose. Desse total de co-infectados, 37% vivem nos seguintes países: Botsuana, Tanzânia, Malauí, Zimbábue e Moçambique (Moçambique, Ministério da Saúde, 1994).

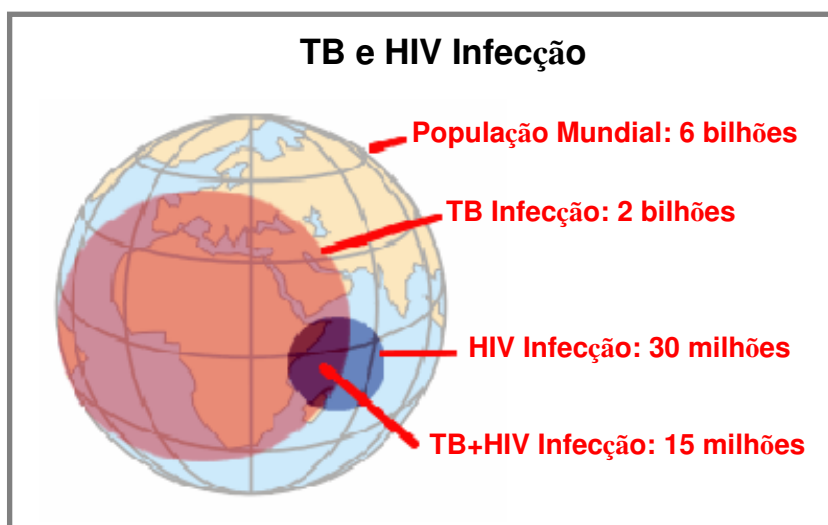


Figura 2- Estimativa mundial da co-infecção TB-HIV.

⁵ <http://www.who.int/hiv/topics/tb/en/>

Em Moçambique, a morbidade por tuberculose e Aids aumentou nos últimos anos, apesar do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (NTCP - National Tuberculosis Control Programme). Isto talvez seja explicado pelas óbvias dificuldades econômicas e sociais encontradas durante o período da recente guerra civil e a larga disseminação do HIV. Pouco se conhece sobre a dinâmica dessa doença tanto na população infectada quanto não infectada pelo HIV (Nunes et al, 2005).

1.5- Métodos moleculares aplicados à epidemiologia da tuberculose

Até o final da década de 80, apenas a fagotipagem, sorotipagem e a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos permitiam a diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*. Além desses, os testes bioquímicos (Chiodini, 1986) foram, por muito tempo, utilizados na sua identificação. São métodos muito trabalhosos e com baixo poder de diferenciação, tornando o seu uso limitado (Hopewell et al, 1992).

Diversas técnicas moleculares têm sido aplicadas na diferenciação das cepas de micobactérias, revolucionando a investigação epidemiológica no mundo. Os trabalhos que empregaram tais técnicas são conhecidos como “Estudos de epidemiologia molecular” (Maslow et al., 1993).

A epidemiologia molecular consiste na integração de técnicas moleculares utilizadas para rastrear cepas específicas de patógenos com abordagens epidemiológicas convencionais, na tentativa de entender a distribuição e a fonte primária da doença nas populações (de forma simplificada é baseada na suposição de que pessoas infectadas com cepas genotipicamente idênticas apresentam uma relação epidemiológica, enquanto, cepas de diferentes perfis genéticos não apresentam uma relação). No entanto, a validade desta suposição depende de propriedades evolucionárias dos marcadores genéticos utilizados. Eles devem ser suficientemente polimórficos para distinguir cepas não relacionadas e estáveis suficientes para identificar o mesmo clone em diferentes amostras (Savine et al, 2003).

Cada método produz um perfil genético que é específico para a cepa examinada e esses perfis são referidos como impressões digitais ou “fingerprints”. Quando duas ou mais cepas tem idênticos ou “fingerprints” muito similares, eles são referidos como do mesmo agrupamento ou “cluster”. Assim, cepas isoladas de diferentes pacientes, mas pertencentes ao mesmo “cluster”, podem estar epidemiologicamente relacionadas, por exemplo, poderia refletir uma recente transmissão entre os pacientes (Moström et al, 2002).

Os testes moleculares tornaram-se importantes quando foram detectados e caracterizados elementos repetitivos no genoma de bactérias pertencentes ao complexo MTB (Thierry et al, 1990).

As enzimas de restrição genômica foram utilizadas primeiramente por Collins e de Lisle (1984), entretanto, a análise visual era de difícil discriminação devido ao grande número de fragmentos obtidos. Na tentativa de melhorar o poder discriminatório dessas técnicas foram empregadas sondas de ácidos nucleicos dirigidas a regiões variáveis do genoma, denominadas seqüências de inserção (IS), resultando na produção de fragmentos limitados, facilitando a análise.

A seqüência de um desses elementos, a *IS6110*, encontrada no complexo *M. tuberculosis*, foi descrita por Thierry et al (1990). Em relação a essa seqüência é considerado o alto polimorfismo gerado, porém com uma estabilidade suficiente para investigações epidemiológicas (van Soolingen et al, 1991).

A *IS6110* possui 1.355 pb (figura 3) e o número de cópias de *IS6110* no genoma do MTB varia, geralmente, entre 0 a 25 bandas e sua posição no cromossomo é variável entre diferentes isolados (van Embden et al., 1993; Mostrom et al., 2002).

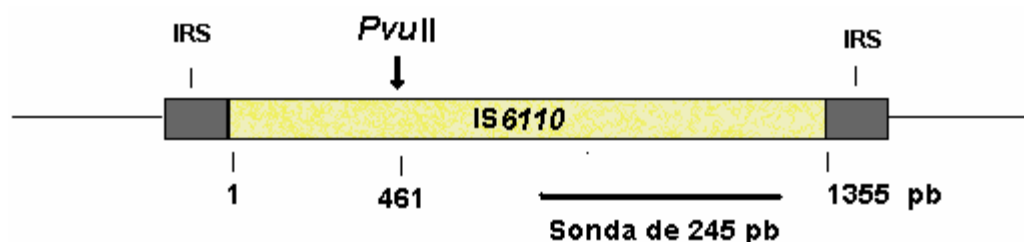


Figura 3- Mapa do elemento de inserção IS6110 do *Mycobacterium tuberculosis* com 1355pb. Estão demonstradas posições de corte de outras enzimas de restrição. A enzima PvuII corta o elemento de inserção na posição 461pb. As linhas, à direita e à esquerda, representam DNA cromossômico.

A identificação de micobactérias através da análise de fragmentos de restrição de produtos de PCR (PCR-Restriction Enzyme Analysis-PRA-PCR ou PCR-RFLP) do gene *hsp65* (Telenti et al, 1993), por sua vez, permitiu a caracterização de padrões de restrição típicos de diversas espécies de micobactérias. A diferenciação dos membros do CMTB pode ser realizada por PCR-RFLP do gene *gyrB* (Kasai et al, 2000).

O uso da técnica baseada na detecção de polimorfismos dos comprimentos dos fragmentos de restrição (IS6110-RFLP), a tipagem pelo oligonucleotídeo espaçadores (“Spoligotyping”) e a combinação de unidades repetitivas intercaladas nas micobactérias (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units and Variable Numbers of Tandem Repeats-MIRU-VNTR) são as técnicas mais utilizadas para estudos epidemiológicos em larga escala (Suffys et al, 2000).

Apesar de existirem diferentes métodos, cada qual possuindo diferentes alvos genômicos, a análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição utilizando a sequência de inserção IS6110 (IS6110-RFLP) é considerada a referência para estudos epidemiológicos moleculares, seja pela sua melhor reprodutibilidade ou sensibilidade (van Embden et al, 1993). Ela apresenta um excelente poder discriminatório, mas em cepas com baixo número de cópias da IS6110 esse poder discriminatório é baixo, havendo a necessidade de métodos de genotipagem complementares (Braden et al, 1997; Burman et al, 1997; Yeh et al, 1998). Outra desvantagem dessa técnica é o trabalho

excessivo e a necessidade de uma grande quantidade de DNA purificado (van Embden et al, 1993; Kremer et al, 1999).

O “Spoligotyping” é uma técnica baseada no polimorfismo das Repetições Diretas (DR - “Direct Repeat”) presentes no “locus” do DNA do MTB. Esse “locus” contém múltiplas cópias de seqüências bem conservadas de 36 pares de bases (pb), intercaladas por seqüências curtas não repetitivas, denominadas espaçadores, que variam de 34 a 41 pb de tamanho (Kamerbeek et al, 1997). A associação de uma DR e um espaçador é denominada Repetições Diretas Variáveis (DVR - “Direct variable Repeat”) e as cepas podem consequentemente se diferenciar por uma ou mais DVRs, criando um padrão para cada cepa quando analisado pelo “Spoligotyping” (Groenen et al, 1993).

A técnica de “Spoligotyping” tem sido utilizada nos estudos dos agrupamentos das cepas de MTB aplicados à epidemiologia molecular (Kamerbeek et al, 1999) e estudos genéticos evolucionários (Sola et al, 2001).

Recentemente, foram criados bancos de dados com perfis genotípicos de MTB denominados: “spoligotypes”. Esses bancos de dados contêm uma distribuição global e filogenética dos “spoligotypes” mundiais (Sola et al, 2001). A criação desses bancos de dados proporcionou a comparação dos perfis genotípicos encontrados nas diferentes regiões do mundo, permitindo a melhor compreensão da dinâmica da doença (Filliol et al, 2002). A última versão do banco de dados, denominado SpolDB4 foi atualizada por Brudey et al (2006) e está disponível no endereço eletrônico: http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html

O “Spoligotyping” apresenta duas vantagens sobre o IS6110-RFLP: primeiro permite subtipar os isolados utilizando pequenas quantidades de DNA e a partir de amostra clínica e segundo os resultados pode ser expressos em formato digital, o que permite a montagem de bancos de dados e a comparação interlaboratorial (Dale et al, 2001).

A desvantagem dessa técnica é o seu baixo poder discriminatório em relação ao IS6110-RFLP. Ela é menos discriminatória em isolados com alto número de cópias de IS6110. Entretanto, ela é superior nos isolados com menos de cinco cópias de IS6110 (Kamerbeek et al, 1997; Bauer et al, 1999; Kremer et al, 1999).

O “MIRU-VNTR” utiliza como marcador genético um VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) específico encontrado no MTB, os MIRUs (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) estão distribuídos nos loci do genoma bacteriano. Inicialmente a tipagem por MIRU era limitada, incluindo poucos conjuntos de loci, o que o tornava insuficientemente discriminatório (Kremer, 1999). Atualmente, mais “loci” foram incluídos totalizando um conjunto de 12, tornando a técnica mais discriminatória (Supply et al, 2000). Cada um “locus” possui de 2 a 8 elementos repetitivos em sequência, com 56 a 71 pb.

O uso do MIRU-VNTR (em associação ou não com o spoligotyping) tem sido cada vez mais utilizado para tipar MTB, substituindo o IS6110-RFLP com a vantagem de ser mais rápido, de fácil execução, considerável poder discriminatório (Cowan et al, 2005) e facilmente adaptável ao processo automatizado em larga escala em sequenciador automático (Supply et al, 2001). A genotipagem por MIRU pode ainda ser aplicada diretamente em culturas, sem a purificação do DNA. Futuramente, poderá substituir o IS6110-RFLP. (Mazars et al, 2001).

A comparação entre as três metodologias citadas é resumida na tabela 1.

Tabela 1- Comparação entre as técnicas de IS6110-RFLP, "Spoligotyping" e MIRUs

	RFLP - IS6110	Spoligotyping	MIRUs
Microrganismo	CMTB	CMTB	CMTB
Poder discriminatório	Elevado >5 cópias de IS6110	Baixo	Elevado
Comparação Interlaboratorial	Não é possível	Possível	Possível
Tempo/Trabalho	Demorado/Trabalhoso	Menos Demorado/Trabalhoso	Menos demorado/Automatizado-Menos trabalhoso

CMTB: complexo *M. tuberculosis*; IS: sequência de inserção; MIRU: Unidades micobacterianas repetidas interseptadas

Existem poucos trabalhos na África subsaariana, especialmente em Moçambique, sobre a caracterização molecular do *M. tuberculosis*. Moçambique é um país endêmico e necessita de dados epidemiológicos clássicos e moleculares para o controle da doença. Dessa forma, o presente trabalho visa o fornecimento de dados moleculares ao país Africano referentes à caracterização molecular dos isolados com tuberculose.

Para caracterizar o perfil genético dos isolados, utilizamos as técnicas de genotipagem, tais como: técnica de IS6110-RFLP (padrão ouro) em associação com “Spoligotyping”.

2- OBJETIVOS

- Caracterizar o genótipo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos no período de Fevereiro de 2002 a Agosto de 2004 de pacientes infectados pelo HIV, atendidos no Hospital Central de Maputo e Hospital Geral de Machava em Moçambique, África, utilizando a técnica de IS6110-RFLP e “Spoligotyping”.

3- METODOLOGIA

3.1- Caracterização do local de obtenção das cepas

As cepas de micobactérias foram provenientes do Hospital Central de Maputo e Hospital Geral da Machava da cidade de Maputo - Moçambique.

O Hospital Central de Maputo (HCM) é um hospital de ensino de referência do País, com capacidade para 1.493 leitos, para onde são transferidos pacientes provenientes das unidades de saúde periféricas da cidade e das restantes províncias do País.

O Hospital de Geral da Machava (HGM) é a unidade periférica da cidade de Maputo com capacidade de 243 leitos, onde são internados os doentes com TB que moram longe dos centros de saúde, sem condições de fazerem o tratamento ambulatorial, os que apresentem mal estado geral com complicações decorrentes da sua doença ou ainda doentes com tuberculose multirresistentes (MDR-TB).

3.2- Local de execução das atividades

Para alcance do objetivo proposto houve necessidade de um estudo interdisciplinar e interinstitucional, que contou com a participação de diversas instituições cujas atividades são listadas na Tabela 2.

Tabela 2- Local e execução das atividades

Atividade	Laboratório	Instituição
Processamento das amostras clínicas - baciloscopia e cultura em Löwenstein-Jensen	Laboratório Nacional de Referência à Tuberculose situado na cidade de Maputo/Moçambique	Faculdade Mondlane
Extração de DNA	Laboratório de Micobactérias/DPC/HC/FCM	UNICAMP
Cultura		
Identificação Molecular por PRA-PCR	Laboratório de Patogêneses Bacteriana e Biologia Molecular/FCM/UNICAMP.	UNICAMP
RFLP-IS6110		
Análise das membranas obtidas por RFLP-IS6110	Laboratório de Hanseníase	FIOCRUZ-RJ
“Spoligotyping”	Laboratório de Hanseníase	FIOCRUZ-RJ

DPC: Departamento de Patologia Clínica; FCM: Faculdade de Ciências Médicas; FIOCRUZ-RJ: Fundação Osvaldo Cruz/Rio de Janeiro; HC: Hospital das Clínicas; UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas.

3.3- Casuística

Foram estudadas 332 culturas de micobactérias provenientes de 502 pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids), originadas de material pulmonar. Essas culturas foram isoladas, inicialmente, em meio de cultura de Löwenstein-Jensen no Laboratório Central de Maputo/Moçambique, Universidade Mondlane, coletadas no período de Fevereiro de 2002 a Agosto de 2004.

Essas culturas foram mantidas em meio Souton (Jones et al, 1991) para conservação, transporte e posterior identificação.

3.3.1- Critérios de inclusão

Cepas positivas para *Mycobacterium tuberculosis* originadas de material pulmonar (escarro, lavado bronco-alveolar, aspirado de pulmão) de pacientes HIV positivos, sem restrição de sexo e maiores de 14 anos de idade.

3.3.2- Critérios de exclusão

Foram excluídas as cepas positivas para o grupo NTM (“Non-tuberculous mycobacteria” - micobactérias não pertencentes ao “complexo *Mycobacterium tuberculosis*”).

3.4- Identificação das micobactérias

As culturas em meio Souton foram enviadas, sob refrigeração, ao Laboratório de Patogêneses Bacteriana e Biologia Molecular da FCM/UNICAMP para sua identificação.

Os microrganismos foram então semeados em meio de cultura de Löwenstein – Jensen (L-J) e incubados a 37° durante 21 dias para a observação das características fenotípicas das colônias e a obtenção de células jovens para a identificação definitiva.

As culturas em L-J foram identificadas por PCR-RFLP para o gene *hsp65* (Telenti et al, 1993; Steingrube et al, 1995; Devallois et al, 1997; da Silva Rocha et al, 1999). O DNA foi extraído a partir do lisado bacteriano por choque-térmico, utilizando o protocolo descrito por Kasai et al. (2000).

3.4.1- Amplificação do *hsp65*

A amplificação foi feita de acordo com o protocolo descrito por Telenti et al. (1993), com modificações. Cinco microlitros do lisado obtido na etapa anterior foram adicionados a cada tubo.

Para a reação de amplificação foram utilizados os seguintes volumes/concentração de reagentes para um volume final de 50 µL de reação: 200µM dNTP, 1,25U/µL Taq Polimerase, Glicerol puro, 1,5mM MgCl₂ e 100pmol dos iniciadores Tb11 (5'- CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') e Tb12 (5'- CTTGTCGAACCGCATACCCT-3').

O programa de amplificação usado no termociclador: 94°C – 5'; 45 ciclos com 94°C – 1', 65°C – 1', 72°C – 1' e extensão final com 72°C – 10', amplificando um fragmento de 439pb entre as posições 398 e 836 no gene *hsp65*

3.4.2- Digestão do produto amplificado do gene *hsp65*

Cerca de 10µL dos produtos amplificados foram digeridos com 5U das enzimas *Bst*EII e *Hae*III num volume total de 25µL e incubados nas temperaturas apropriadas de acordo com o fabricante por 90 minutos.

3.4.3- Análise da digestão do gene *hsp65*

Os fragmentos digeridos foram visualizados em gel de agarose a 4% corados por brometo de etídio a 0,1µg/mL e analisados com o auxílio do programa Kodak Digital Science[®] - 1D Image Analyses Software Windows V 3.0 (New Jersey – U.S.A.). As análises dos fragmentos de restrição se basearam num diagrama proposto por Telenti et al. (1993), disponível no endereço eletrônico: <http://app.chuv.ch/prasite>

3.5- Genotipagem por RFLP

A técnica (RFLP - “Restriction Fragment Length Polymorphism”) baseia-se no polimorfismo de DNA gerado pelo *IS6110* que está presente em seqüências repetidas em diferentes números de cópias (4-20) apenas nas cepas do complexo *M. tuberculosis* (van Soolingen et al, 1999).

Um desenho esquemático de todo o procedimento para IS6110-RFLP é apresentado na Figura 4 seguindo o protocolo de padronização internacional (van Embden et al, 1993).

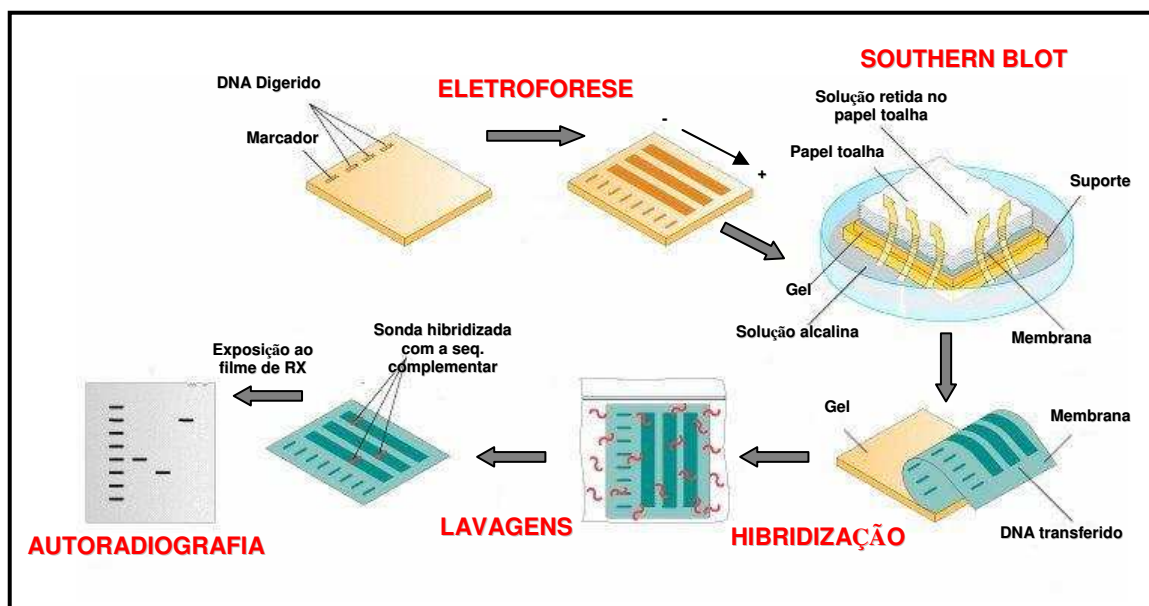


Figura 4- Desenho esquemático dos procedimentos realizados na tipagem do *M. tuberculosis* por IS6110-RFLP

Fonte: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/southernblot.jpg>

3.5.1- Preparação do DNA micobacteriano

A micobactéria foi inativada pelo calor a 80°C e tratadas com lisoizima (10mg/mL) para ruptura da parede celular e o DNA será extraído por CTAB e clorofórmio/álcool-isoamílico e precipitado com isopropanol e ressuspendido em TE 1X a 4°C por 24 horas. O DNA extraído será quantificado em espectrofotômetro Gene - Quant II (Pharmacia Biotech®).

3.5.2- Digestão do DNA Genômico por enzima de restrição

Após quantificação do DNA, cerca de 4 µg foram digeridos com *PvuII* (Life Technologies®) conforme protocolo da enzima. A mistura foi incubada a 37 °C por 4 horas. A digestão completa dos DNAs foi observada por corrida eletroforética (utilizando-se 5µL do DNA digerido) em gel de agarose 1%, com brometo de etídio (0,5µg/ml) (80v por 40 minutos em tampão TBE 1X) .

3.5.3- Eletroforese em agarose

Os fragmentos obtidos da digestão com a *PvuII* foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio (0,5µg/mL) para coloração e tampão de corrida TBE, 32V por 22 horas, em cuba eletroforética horizontal no tamanho de 20x25cm (Life Technologies®). Utilizou-se o marcador externo MT14323.

3.5.4- Transferência do DNA digerido em membrana de náilon

Os fragmentos de DNA micobacteriano separados em gel de agarose foram desnaturados com HCl 0,25 M por 10 min. O gel foi posteriormente submetido à solução de NaOH 0,4 M, 20 min. A transferência dos fragmentos foi feita para membrana de nitrocelulose, durante 12 horas, por capilaridade. Após transferência, a membrana foi lavada com SSC 5x.

3.5.5- Construção da sonda do elemento de inserção IS6110 por PCR

Para a reação de amplificação foram utilizados os seguintes volumes/concentração de reagentes para um volume final de 50 µL de reação: 30 µL DNA alvo extraído, 2,5mM de cada dNTP, 50 ng/µL dos iniciadores INS-1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3') e INS-2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3') e 5U/µL Taq polimerase.

O programa de amplificação usado no termociclador foi 3 minutos a 96°C para a desnaturação inicial, 30 ciclos de 1 minuto a 96°C para a desnaturação, 1 minuto a 65°C para anelamento dos “primers” e 1 minuto a 72°C para extensão da fita síntese de DNA, e extensão final dos produtos por 6 minutos a 72°C.

3.5.6- Hibridização

A membrana de nylon (Hybond+, Amersham Pharmacia Biotech®) foi pré-hibridada a 42 °C por 1 hora e posteriormente incubada a 42°C, com a sonda previamente marcada (5-10 ng de sonda/mL de tampão) durante 12 horas.

A membrana foi lavada 2 vezes com 50 mL do tampão primário de lavagem e SSC2X.

3.5.7- Detecção por quimioluminescência

Para a detecção utilizou-se o Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech®), contendo os reagentes de detecção 1 e 2. Misturou-se volumes iguais de cada reagente de detecção e os colocou sobre a membrana. A membrana foi exposta a filme radiográfico (Hyperfilm - Kodak®) por 10-120 minutos. O filme foi revelado com solução reveladora (Kodak®) até a visualização das bandas e, posteriormente, fixado.

3.5.8- Análise das membranas

Os autorradiogramas foram escaneados e analisados usando o programa BioNumerics® versão 4.50 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Após análise das bandas em relação ao marcador externo MT14323 foi gerado uma matriz de similaridade usando um intervalo de tolerância de 1,10%.

3.6- Genotipagem por “Spoligotyping”

A genotipagem por “Spoligotyping” (tipagem dos oligonucleotídeos espaçadores) se baseia na presença do DNA polimórfico em um locus cromossomal particular, as regiões "Direct Repeat" (DR), as quais estão presentes no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Kamerbeek et al 1997; Kremer et al, 2002). (Figura 5).

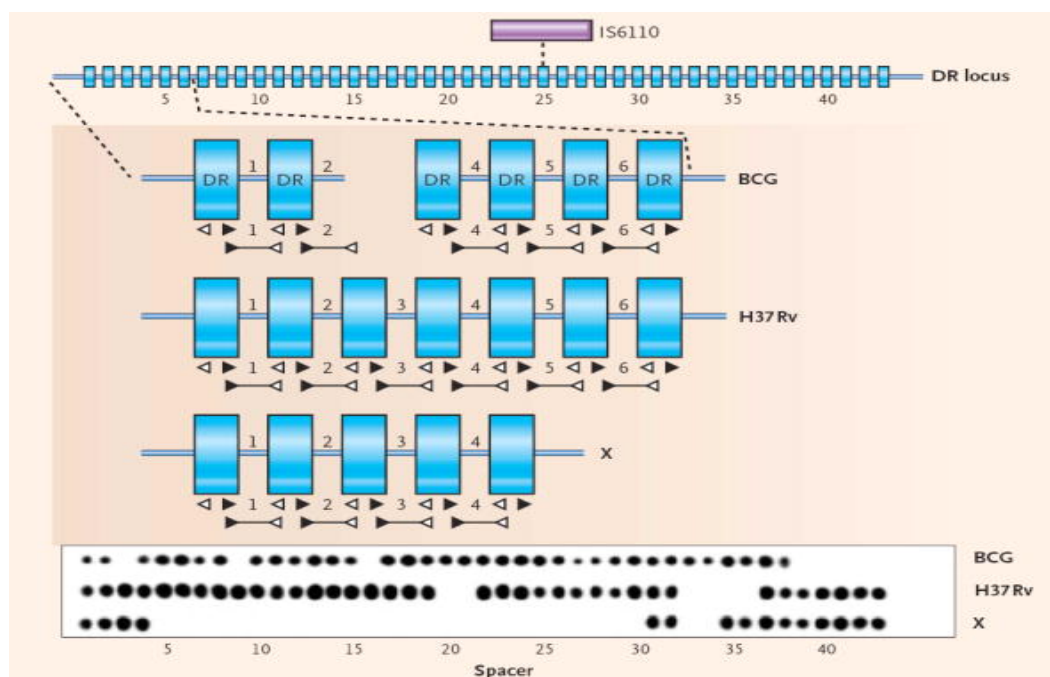


Figura 5- Desenho esquemático da genotipagem por “Spoligotyping” (Barnes, et al 2003).

A tipagem por esse método envolve a amplificação do locus DR, seguido pela hibridização dos produtos marcados na membrana que contém oligonucleotídeos ligados covalentemente correspondendo aos 43 espaços. O resultado é dado em sinal positivo ou negativo para cada espaço.

Para a realização do método de “Spoligotyping” foi utilizado o protocolo descrito por Kremer et al (2002).

O “Kit” utilizado no procedimento contendo a membrana com os oligonucleotídeos fixados e reagentes foram fabricados pela ISOGEN Bioscience® BV.

3.6.1- Amplificação do spacer DNA “*in vitro*” por PCR

Foi usado como controle positivo o *M.tuberculosis* H37Rv e o *M. bovis* BCG e como controle negativo a água.

Para a reação de amplificação foram utilizados os seguintes volumes/concentração de reagentes para um volume final de 50 µL de reação: 10 ng de DNA, 2,5mM de cada dNTP, 20 pmol dos iniciadores DRa (5'-GGTTTGGGTCTGACGAC-3') e DRb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'), e 5U/µl de Taq Polimerase.

O programa usado de amplificação no termociclador foi 3 minutos a 96°C para a desnaturação inicial, 20 ciclos de 1 minuto a 96°C para a desnaturação, 1 minuto a 55°C para anelamento dos “primers” e 30 segundos a 72°C para extensão da fita síntese de DNA, e extensão final dos produtos por 5 minutos a 72°C.

3.6.2- Hibridização com produto PCR e detecção

Foram adicionados 30 µL dos produtos da amplificação em 150 µL 2X SSPE/0,1% SDS, ferveu por 10 minutos a 99°C e resfriado no gelo imediatamente. A membrana foi lavada por 5 minutos a 60°C com 250 mL 2X SSPE/0,1% SDS. E seguida montou-se o “miniblotter” removendo por aspiração o tampão residual.

Preencheu as canaletas do “miniblotter” com o produto amplificado e incubou por 60 minutos a 60°C no forno de hibridização.

As amostras foram removidas do “miniblotter” por aspiração e retirou-se a membrana. A membrana foi lavada duas vezes em solução de SSPE/0,5% SDS por 5 minutos a 60°C. Adicionou-se estreptavidina-peroxidase conjugada (500U/mL) 10 µL para 10 mL de 2XSSPE/0,5% SDS por 60 minutos a 42°C. Após, lavou a membrana por duas vezes com solução de 2XSSPE/0,5% SDS por 10 minutos a 42°C e 2XSSPE por 5 minutos a temperatura ambiente. A detecção da hibridização do DNA foi realizada por quimiluminescência, incubando a membrana por 1 minuto em 14 mL de ECL e exposta ao filme de raios-X por uma hora e meia.

3.6.3- Análise das membranas

Os resultados obtidos nos autorradiogramas foram convertidos para números binários e montada uma planilha no programa Excel-Microsoft®. A presença do espaçador foi codificada como “1” e a ausência como “0”. Os resultados foram comparados no banco de dados SpolDB4 disponível do endereço eletrônico: http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html

Utilizou-se o programa BioNumerics® versão 4.50 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) para confecção do dendrograma Dice UPGMA, utilizando um intervalo de tolerância de 1,10%.

4- RESULTADOS

4.1- Identificação dos isolados

Das 332 culturas analisadas, 312 foram identificadas com o auxílio do PRA-PCR. Um número considerável de isolados (n=20) não pôde ser identificado ou genotipados (n=72) em virtude de problemas com o armazenamento e transporte das amostras.

Das 312 isolados identificados, 309 foram caracterizados como do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e três como micobactérias não pertencentes ao CMTB (NMT), a saber: dois *Mycobacterium avium* e um *Mycobacterium simiae*, que foram excluídas do estudo. Os 309 isolados do complexo *M. tuberculosis* foram posteriormente analisadas por PCR-RFLP utilizando a sequência do gene *gyrB* (Niemann et al, 2000; Chimara et al, 2004) para a caracterização das espécies. Todos os isolados foram caracterizados como *Mycobacterium tuberculosis*. Nenhuma outra espécie do Complexo *M. tuberculosis* foi encontrada. A figura 6 mostra o número de pacientes, culturas e isolados analisados.

Os 237 exemplares de *M. tuberculosis* considerados genotipáveis foram obtidos de 235 pacientes, sendo que 147 (62,02%) pacientes eram do sexo masculino e 88 (37,98%) do sexo feminino. Em dois pacientes (denominados como A e B) foram analisados dois exemplares de cada, obtidos em ocasiões diferentes.

Foram também coletados dados desses isolados relativos à pesquisa de sensibilidade a antimicrobianos utilizados no seu tratamento. Esses testes de sensibilidade foram realizados no Laboratório Nacional de Referência à Tuberculose situado na cidade de Maputo, Moçambique, África. As drogas testadas foram: isoniazida (INH), estreptomicina (SM), rifampicina (RMP) e etambutol (EMB), seguindo o protocolo descrito pela Organização mundial a saúde (World Health Organization, 1997). Trinta isolados (12,7%) eram resistentes à isoniazida e 11 (4,6%) à rifampicina e isoniazida concomitantemente, pelo menos (MDR) (Anexo 1).

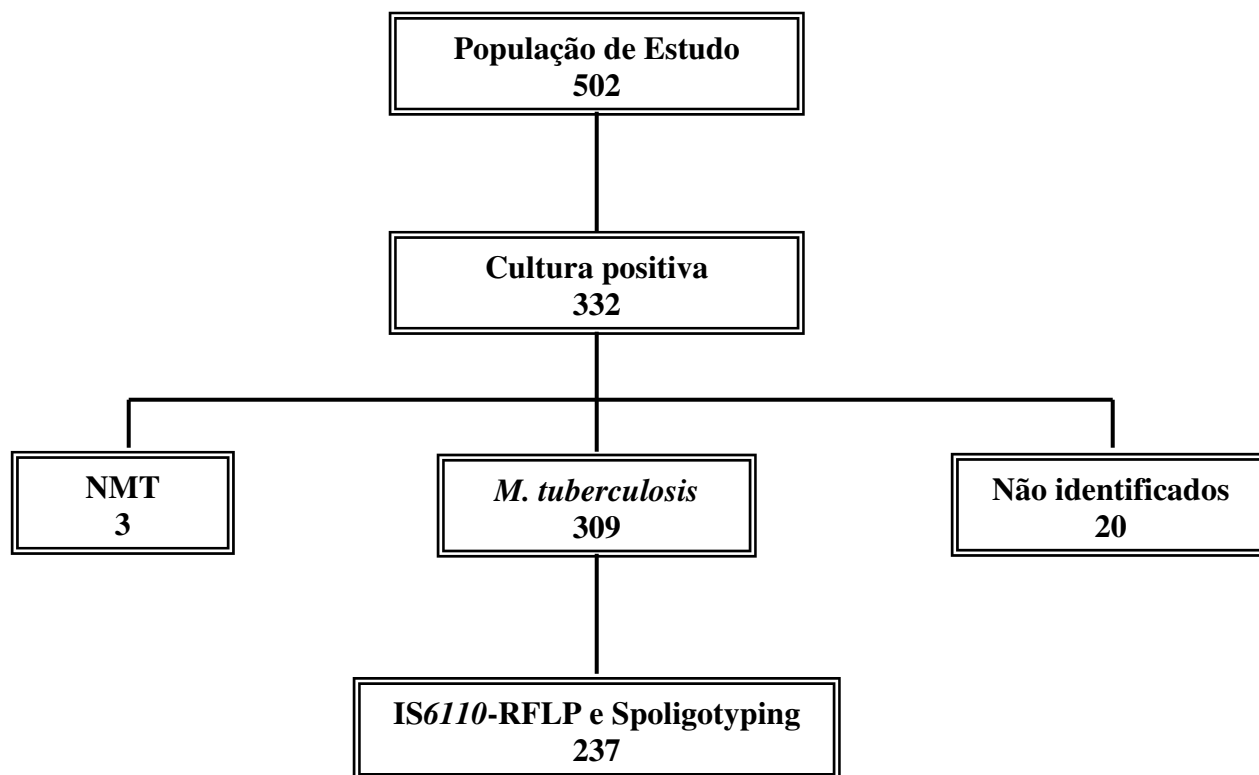


Figura 6- População de estudo.

4.2- Perfil genotípico dos isolados por IS6110-RFLP

O genótipo, determinado conforme a técnica IS6110-RFLP pode ser estabelecido nas 237 cepas (Anexo 1). O número de seqüências nessas cepas genotipadas variou de 1 a 20 cópias da IS6110 com um número médio igual a 10. A maioria dos isolados analisados (31 casos) apresentou 10 cópias.

Quarenta e oito isolados (20,2%) apresentaram menos de 6 cópias da IS6110. Desses, 28 pertenciam a 8 agrupamentos (Tabela 3), quando analisados através da técnica de IS6110-RFLP.

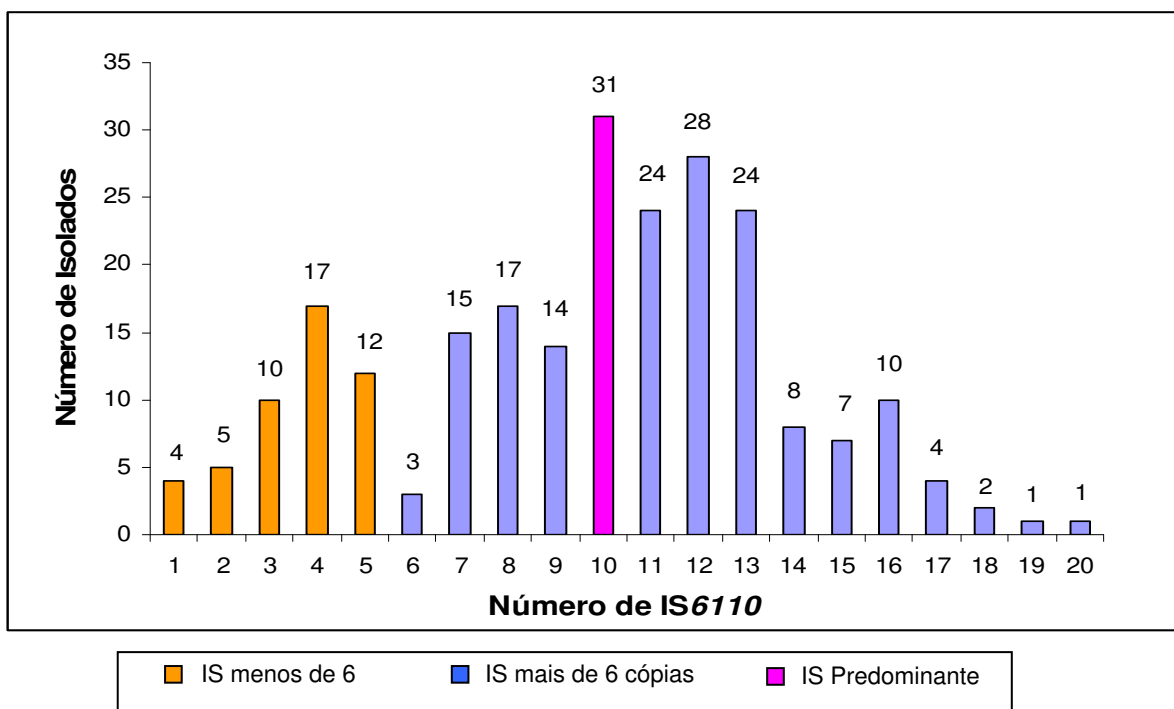


Figura 7- Distribuição dos isolados, segundo o número de seqüências IS6110 encontradas.

De acordo com a análise de similaridade e a confecção do respectivo dendrograma, encontramos 191 (80,6%) perfis genotípicos diferentes dentre os 237 isolados analisados (Figura 8). Desses perfis obtidos, 167 corresponderam a genótipos únicos e 70 isolados estavam distribuídos em 24 agrupamentos. Destes 24 agrupamentos, 6 casos (VIII, X a XXIV) com 42 isolados, apresentavam mais de 6 cópias da IS6110, caracterizando-se como “clusters” (Tabela 3).

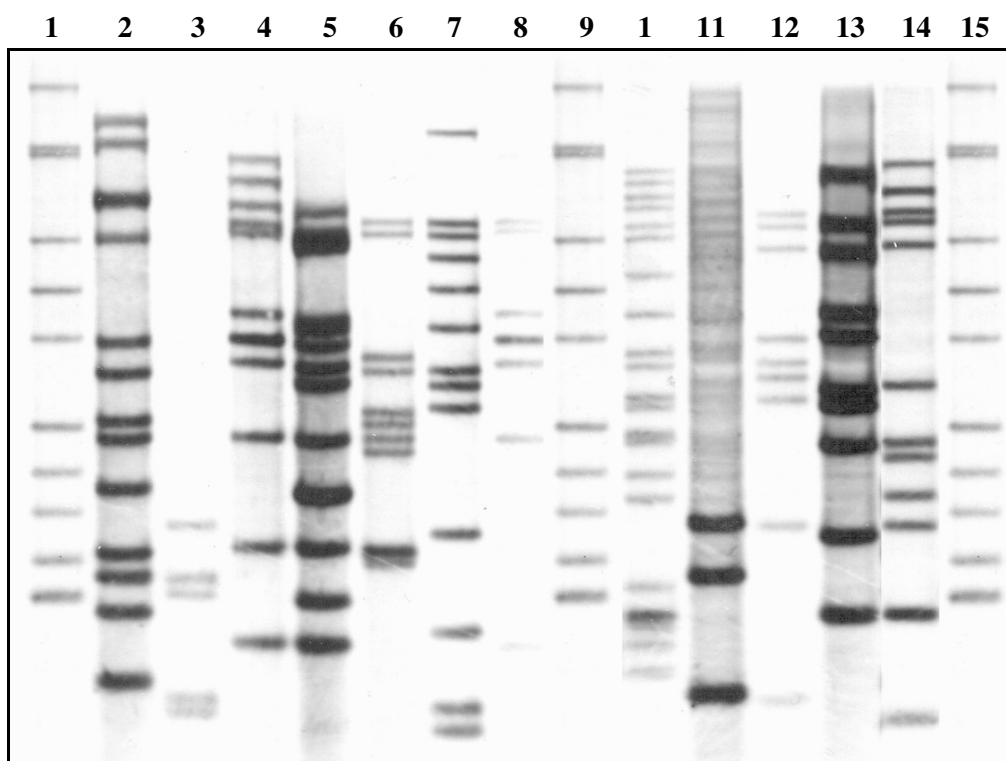


Figura 8- Exemplo de perfis genotípicos obtidos no estudo. Canaleta 1, 9 e 15: cepa de referência (MT 14323). Canaleta 2-8 e 10-15 isolados estudados.

No paciente A, em que foram obtidos dois exemplares, esses exibiram padrões genotípicos diferentes (Anexo 1 e 2, números 316 e 495,^{*}) e no paciente B ambos os isolados exibiram o mesmo padrão genotípico (Anexo 1 e 2, números 396 e 424,^{**}). O isolados obtidos do paciente B não foram considerados um agrupamento, dada a proximidade das datas de coleta dos materiais clínicos.

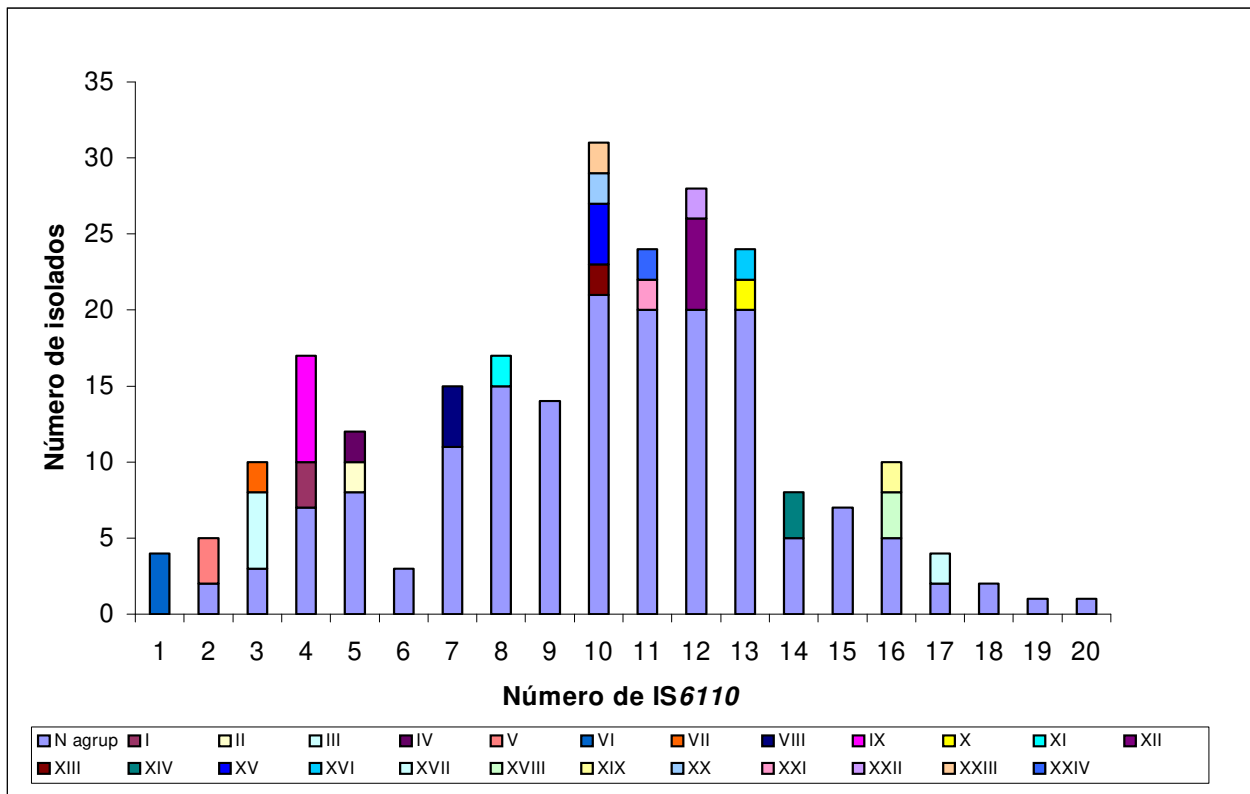


Figura 9- Distribuição dos agrupamentos por IS6110-RFLP. N agrup: não agrupado.

Tabela 3- Perfis agrupados de IS6110-RFLP presentes no estudo.

Agrupamentos	Número de cópias	
	IS6110	Número de Isolados
I	4	3
II	5	2
III	3	5
IV	5	2
V	2	3
VI	1	4
VII	3	2
IX	4	7
Total		28
VIII	7	4
X	13	2
XI	8	2
XII	12	6
XIII	10	2
XIV	14	3
XV	10	4
XVI	13	2
XVII	17	2
XVIII	16	3
XIX	16	2
XX	10	2
XXI	11	2
XXII	12	2
XXIII	10	2
XXIV	11	2
Total		42

A distribuição dos agrupamentos pode ser observado no anexo 2 através do dendrograma confeccionado pelo programa computacional BioNumerics®4.50. A figura 10 mostra os perfis genotípicos obtidos nos isolados pertencentes aos agrupamentos IX e XXI.

Entre os 42 isolados analisados pertencentes aos 16 agrupamentos com mais de 6 cópias da IS6110, não houve nenhuma correlação com o perfil de resistência. Na sua maioria, os agrupamentos eram compostos por isolados sensíveis às drogas testadas, com exceção do agrupamento XV, com quatro isolados, em que havia um isolado multiresistente (MDR-TB) (Anexo5).

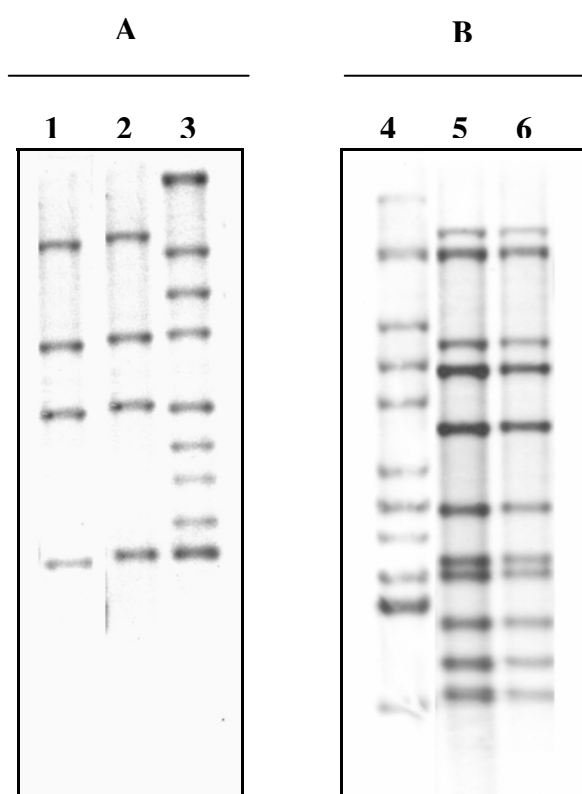


Figura 10- Perfis genotípicos obtidos através da técnica de IS6110-RFLP de isolados de *M. tuberculosis* de pacientes pertencentes ao agrupamento IX (A) e XXI (B). Canaleta 3 e 4: cepa de referência (MT 14323); Canaleta 1-2 e 5-6 isolados estudados.

4.3- Perfil genotípico dos isolados por “Spoligotyping”

De acordo com a técnica proposta, observamos 79 perfis diferentes entre os 237 isolados analisados (Figura 11 e Anexo 3). Quarenta e quatro (18,6%) perfis corresponderam a apenas um isolado e 193 isolados (81,4%) estavam distribuídos em 35 grupos, contendo de 2 a 19 isolados (Tabela 5).

A consulta ao banco de dados SpolDB4 (Brudey et al, 2006) mostrou que dos isolados com padrão único (44 casos), em 23 deles não havia um tipo de perfil compartilhado com isolados já depositados naquele banco de dados, embora pudessem ser alocados a uma família. (Anexo 4).

Foram identificados, também através da consulta ao banco de dados citado, oito perfis genotípicos novos, apresentados na Figura 11. Seis desses perfis correspondiam a um único isolado e dois outros perfis tinham agrupados dois e três isolados, respectivamente. (Tabela 5, agrupamento III e XXXI). Dois outros perfis encontrados (44 e 506) foram classificados como órfãos, ou perfis registrados no banco de dados uma única vez (Anexo 3 e 4).

Em relação aos membros do complexo *M. tuberculosis*, os resultados foram confirmados aos obtidos na identificação pelo PCR-RFLP utilizando a sequência do gene *gyrB*, ou seja, não foram encontrados *M. bovis* ou outra espécie pertencente ao complexo.

De acordo com a distribuição geográfica dos perfis agrupados encontrados a maioria deles (n=20) são endêmicos, com exceção dos tipos 1873, 1076, 815, 811, 806, 794, 719, 707 e 70 que tem a sua localização limitada (Tabela 4).

Tabela 4- Perfis agrupados por “Spoligotyping” presentes no estudo.

Agrupamento	Classificação	Tipo	Distribuição Geográfica	Total Isolados
I	LAM3	4	Universal	2
II	BEIJING	1	Universal	19
III	**	NC		2
IV	LAM11_ZWE	815	BEL,MWI, USA, ZWE	2
V	LAM 4	811	MOZ, USA, ZAF, ZWE	9
VI	LAM11_ZWE	1873	USA, ZWE	3
VII	H1	62	Universal	2
VIII	H1	47	Universal	4
IX	T2	52	Universal	2
X	T1	53	Universal	17
XI	H3	50	Universal	2
XII	T5	44	Universal	4
XIII	X1	119	Universal	3
XIV	T2-T3	73	Universal	4
XV	S	707	ARG,IDN, NLD	2
XVI	S	34	Universal	8
XVII	T	NC		2
XVIII	S	71	Universal	3
XIX	T1	719	ARG, NLD, USA, ZAF	2
XX	LAM3	33	Universal	9
XXI	LAM9	42	Universal	18
XXII	LAM4	60	Universal	5
XXIII	LAM	NC		2
XXIV	LAM1	20	Universal	2
XXV	LAM9	1076	IDN, MOZ, RUS, USA	2
XXVI	EAI5	236	Universal	3
XXVII	EAI_1SOM	48	Universal	18
XXVIII	EAI_1SOM	806	MOZ, NOR, USA, ZWE	11
XXIX	EAI	SC		2
XXX	EAI5	702	CUB, GUF, MWI	16
XXXI	**	NC		3
XXXII	X3	70	GBR, GLP, GUF, HTI, MEX, PHL, USA	2
XXXIII	X3	92	Universal	3
XXXIV	CAS1_DELHI	794	GBR, PAK, USA	3
XXXV	CAS1_DELHI	25	Universal	2
Total				193

** Perfis novos; NC: ao compartilham ao tipo de perfil depositado no banco de dados SpolDB4; ARG: Argentina; BEL: Bélgica; CUB: Cuba; IDN: Indonésia; GBR: Grã-Bretanha; GLP: Guadalupe; GUF: Guiana Francesa; HTI: Haiti; MEX: México; MOZ: Moçambique; MWI: Malauí; NLD: Holanda; NOR: Noruega; PAK: Paquistão; PHL: Filipinas; RUS: Rússia; USA: Estados Unidos; ZAF: África do Sul; ZWE: Zimbábue.

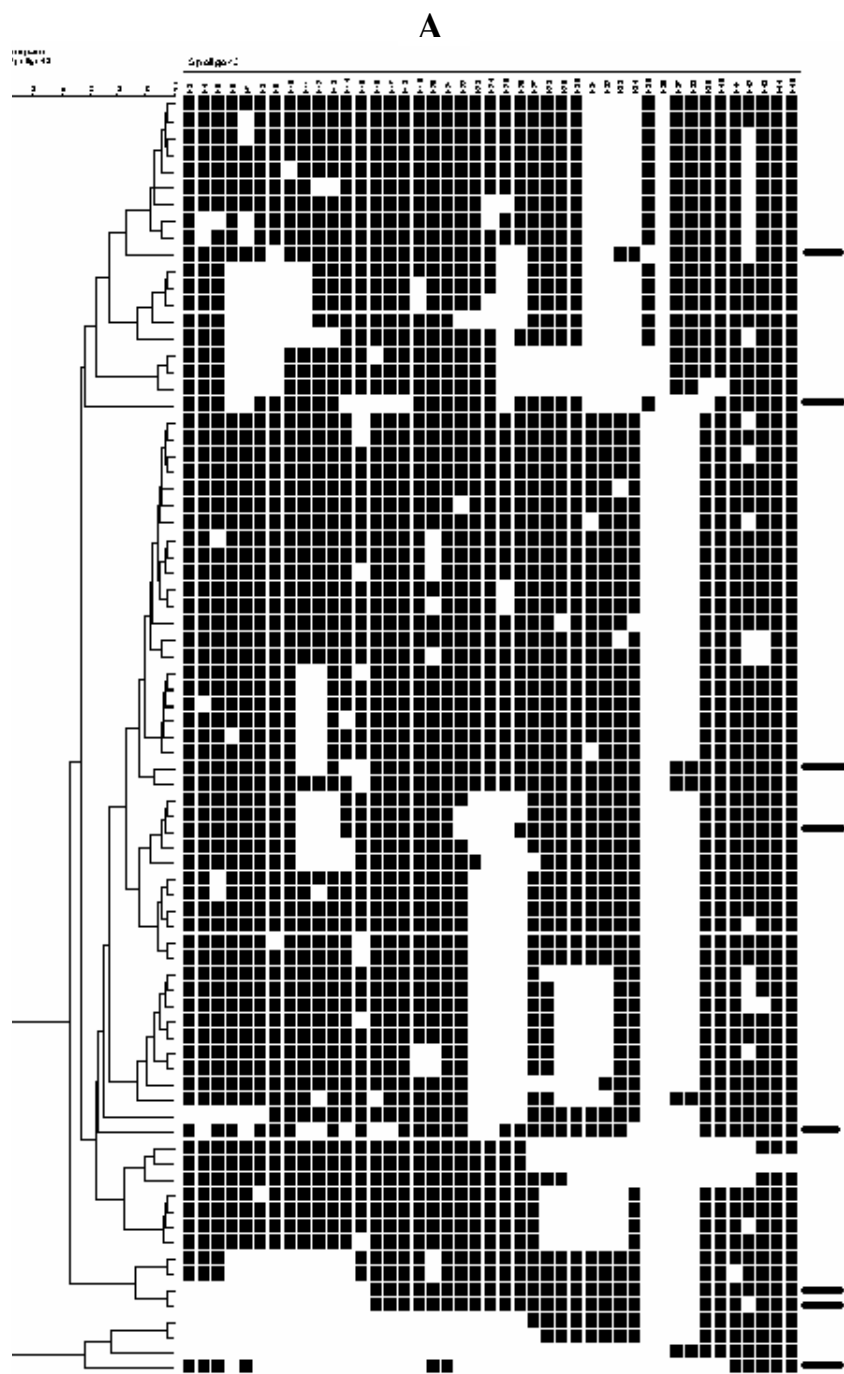


Figura 11- Dendrograma mostrando os 79 "Spoligotypes" analisados por BioNumerics® 4.50. A: Spoligotypes; Traço em negrito: perfis novos.

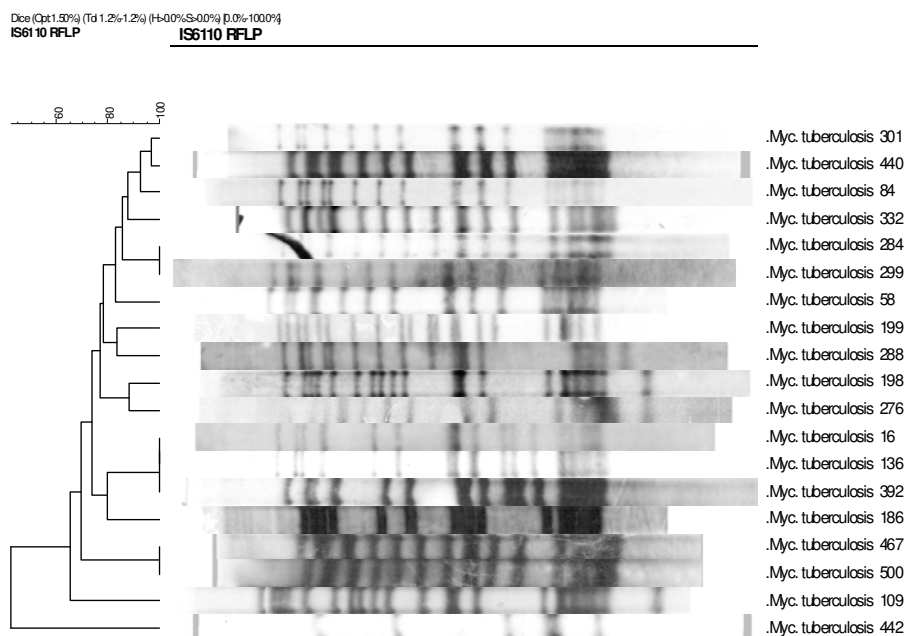


Figura 12- Matriz de similaridade e perfis de IS6110 - RFLP de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes com tuberculose pertencentes ao agrupamento genotípico da família Beijing por “Spoligotyping”.

Os 70 isolados distribuídos em 24 agrupamentos pelo IS6110-RFLP foram agrupados pelo “spoligotyping” em 13 agrupamentos com 54 isolados, excluindo a amostra 396 do agrupamento VIII com 2 amostras (396 e 424) do mesmo paciente pelo mesmo motivo na análise por IS6110-RFLP (proximidade da data de isolamento das culturas). Os “Spoligotypes” mais freqüentes foram: 1 (Beijing) com 8 isolados, 48 (EAI_1SOM) com 8 isolados, 53 (T1) com 6 isolados, 42 (LAM 9) com 6 isolados, 806 (EAI_1SOM) com 5 isolados e 702 (EAI5) com 5 isolados (Figura 13).

Entre os 193 isolados analisados pertencentes aos 35 agrupamentos por “Spoligotyping”, não houve nenhuma correlação com o perfil de resistência. A maioria dos agrupamentos eram compostos por isolados sensíveis as drogas testadas, com exceção dos agrupamentos XI e XXVI (com 2 isolados cada) apresentando perfil MDR-TB (Anexo 6). O agrupamento composto por membros da família Beijing, somente 1 dos 19 isolados foram MDR-TB.

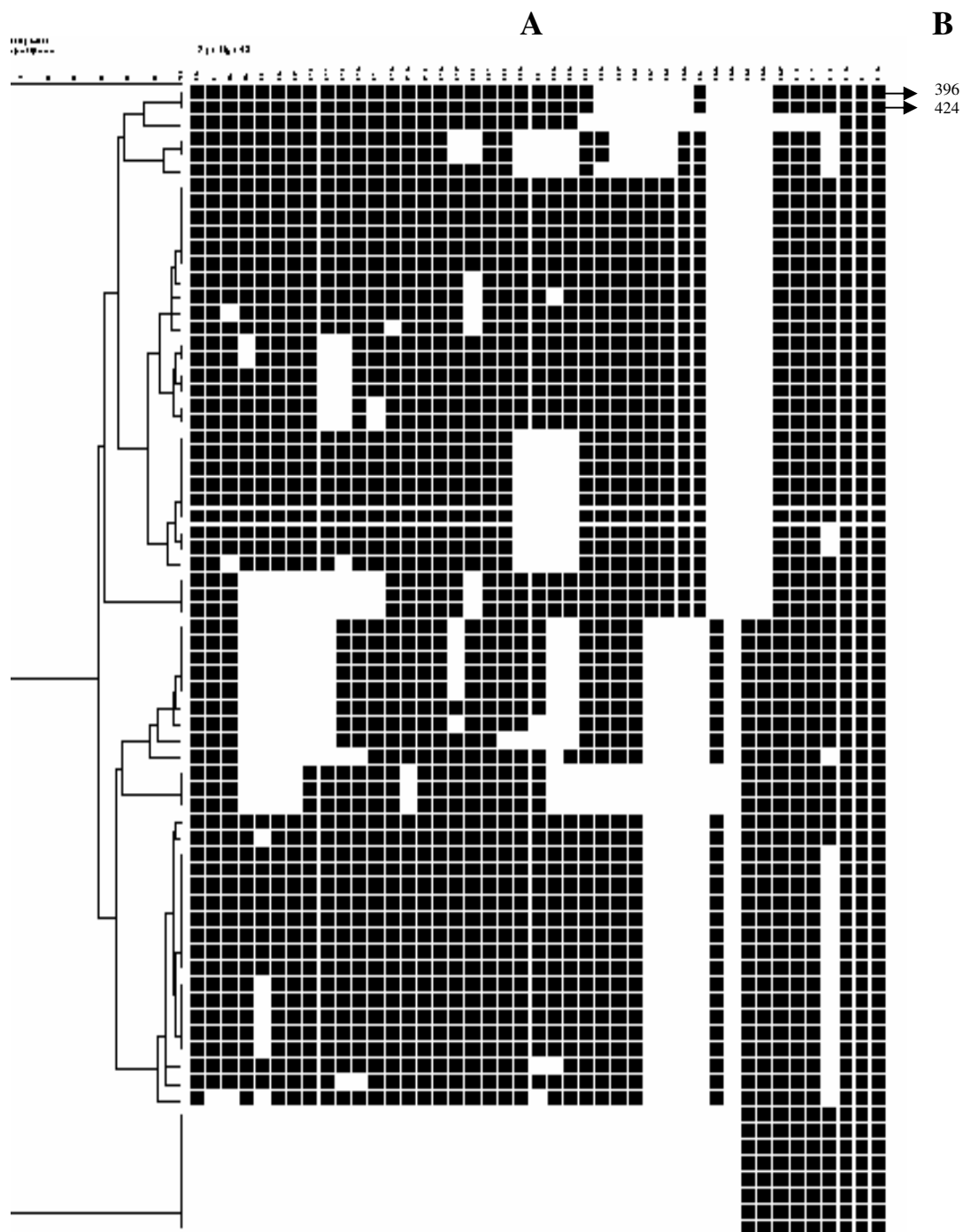


Figura 13- Dendrograma mostrando os 13 agrupamentos dos 70 isolados por “spoligotyping” analisados por BioNumerics® 4.50. A: spoligotypes; Seta em negrito: Agrupamento excluído - mesmo paciente; B: Número das amostras.

5- DISCUSSÃO

5.1- Identificação dos isolados

A aplicação de técnicas moleculares para a identificação e diferenciação dos isolados bacterianos tem-se revelado uma poderosa ferramenta da microbiologia, que auxilia decisivamente as investigações epidemiológicas (Maslow et al, 1993).

No presente trabalho, foi utilizado o método de identificação molecular através da análise de fragmentos de restrição de produtos de PCR (PRA-PCR ou PCR-RFLP) do gene *hsp65*. Essa técnica é rotineiramente usada em laboratórios clínicos e de pesquisa para a uma rápida identificação de todos os níveis das espécies das micobactérias (Telenti et al, 1993; Devallois et al, 1997; da Silva Rocha et al, 1999; da Silva et al, 2001; Leão et al, 2005).

Os resultados aqui obtidos através do PCR-RFLP do gene *hsp65*, demonstraram que 309 isolados obtidos de cultura positiva de 502 pacientes, foram identificados para o complexo *M. tuberculosis* e 3 isolados para micobactérias não tuberculose, sendo 2 *M. avium* e 1 *M. simiae*.

A Aids estabelece condições para o desenvolvimento da tuberculose em Moçambique, sendo, portanto o *M. tuberculosis* o agente mais freqüente encontrado em nossas culturas. Em somente 3 casos o agente não *M. tuberculosis* foi recuperado de amostras de escarro. Esses dados estão de acordo com outros dados provenientes de países em desenvolvimento, sendo a tuberculose é altamente prevalente e o isolamento de outras micobactérias é baixo. (Nunn et al, 1992; Morrissey et al, 1992; Gilks et al, 1995; Godfrey-Faussett et al, 2000; Holmes et al, 2003).

O *Mycobacterium simiae* foi isolado em apenas um caso, dessa forma poucos casos são descritos na literatura ocasionada por esse agente em pacientes com HIV infecção (Vandercam et al, 1998; AL-Abdely et al, 2000; Carriere et al, 2005). Embora a associação do *M. simiae* com doenças humanas não seja freqüente, as infecções pulmonares derivadas desse microrganismo foram descritas em treinadores de macacos e pessoas em contato com estes animais (Sampaio et al, 2001, Karassova et al, 1965) e em pacientes com doença pulmonar pré-existente como tuberculose cavitária, carcinoma e doença pulmonar crônica obstrutiva (Vandercam et al, 1998). Além desses fatores de risco, a imunossupressão é outro fator considerável. Presume-se que a transmissão seja aérea e oral-fecal.

5.2- Perfil genotípico das cepas por IS6110-RFLP

O presente estudo descreve a epidemiologia molecular do *M. tuberculosis* na cidade de Maputo, Moçambique, África, sendo uma região com uma alta incidência de tuberculose.

A análise do polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (RFLP) utilizando a IS6110 se baseia na detecção das diferenças em número e localização dos elementos de inserção no genoma da micobactéria.

De acordo com a metodologia proposta para genotipagem do MTB por IS6110-RFLP pode conter de uma a várias cópias da sequência de inserção IS6110 sendo normalmente encontradas pelo menos quatro (Thierry et al, 1990) e raramente as amostras que não contenha tal sequência (van Soolingen et al, 1991).

Os resultados observados através dessa metodologia demonstraram duas principais características: uma considerável variabilidade (70%) e a presença de uma alta frequência de cepas com baixo número de cópias (20,2%). Estes dados concordam com outras análises observadas em outros países em desenvolvimento como Etiópia e Índia (Bruchfeld et al, 2002; Narayanan S et al, 2002).

Os isolados agrupados representaram 29,5% neste estudo, o que também está em concordância com dados na literatura, os quais demonstram que os casos genotipados em áreas urbanas, cerca de 20 a 50% indicam uma recente transmissão ou isolados agrupados (Small et al, 1994; Barnes et al, 1997; Weis et al, 2002). Os nossos agrupamentos foram mais baixos que os níveis de 31 a 48% descrito por alguns pesquisadores em diferentes partes do mundo (Wilkinson et al, 1997; Das et al, 2005) e um nível muito menor que 51 a 72% descritos em outros países africanos, como África do Sul, Zâmbia e Cidade do Cabo (Godfrey-Faussett et al, 2000; Verver et al, 2004).

Os resultados obtidos com o uso da técnica IS6110-RFLP exibiram uma considerável variabilidade genotípica, ou seja, 71% dos exemplares analisados corresponderam a genótipos únicos. Porém, a grande variabilidade genotípica nesse cenário em que a transmissão da doença é intensa, dado o número elevado de casos, indica,

provavelmente, uma situação endêmica em si, bem como o tempo prolongado em que isso se dá. Além disso, a grande mobilidade interna, ocorrida depois das intensas guerras civis, trazendo para a cidade indivíduos de diversos outros locais, pode também ter contribuído para essa diversidade.

De acordo com Alland et al. (1994) e Small et al. (1994) a variabilidade nos genótipos de *M. tuberculosis* indica uma doença não relacionada epidemiologicamente. Assim, os genótipos distintos representam uma reativação de infecção adquirida no passado. Em contraste, a ocorrência de isolados idênticos é indicativo de uma transmissão recente. Portanto, baseado nessas observações indicam que a disseminação da doença se deu principalmente pela reativação da infecção adquirida.

Para concretizar esse fato são necessárias duas hipóteses sobre esse conceito: primeiro, os dados genotípicos deveriam ser interpretados juntos com as informações epidemiológicas, tais como coleta de dados preferivelmente quando a tuberculose é diagnosticada. Segundo, a identificação correta sobre os casos “clusterizados” necessita de uma avaliação de uma grande porcentagem de casos de tuberculose na população por longo período, pois poderíamos perder alguns casos “clusterizados” numa genotipagem realizada em um número pequeno de casos (Glynn et al, 1999). Em adição, os casos “clusterizados” poderiam não ser detectados se a genotipagem fosse realizada sob um período curto, pois dessa forma a tuberculose provavelmente ainda não se desenvolveu em algumas pessoas infectadas.

5.3- Perfil genotípico das cepas por “Spoligotyping”

O “spoligotyping” é uma técnica baseada na detecção dos espaçadores entre as repetições diretas em um locus DR no cromossomo do *M. tuberculosis* e utilizado em adição à análise da IS6110-RFLP. É uma técnica simples e altamente reprodutível para distinguir entre os isolados com padrões altamente similares ao IS6110-RFLP ou entre os isolados com poucas cópias da IS6110.

De acordo com os resultados observados, dos 237 isolados analisados, 79 perfis diferentes (32,3%) foram observados, 193 isolados estavam agrupados em 35 grupos. A diversidade clonal dos isolados *M. tuberculosis* dentro da região estudada pode estar relacionada com a alta incidência de tuberculose em Moçambique. Embora, o número de isolados coletados na população com tuberculose pode também ter alguma influência. Um estudo incluindo todos os casos de tuberculose dentro de um período maior poderia confirmar essa hipótese. Hipótese também levantada na análise pelo IS6110-RFLP.

O “spoligotyping” foi mais discriminatório para os isolados com menos de 6 cópias da IS6110 do que o RFLP, os quais 32 isolados foram agrupados em 5 grupos por spoligotyping contrastando com 28 isolados agrupados em 8 grupos por RFLP esses dados são concordantes com outros autores (Kamerbeek et al, 1997; Bauer et al, 1999; Kremer et al, 1999).

Os nove mais frequentes “spoligotypes” (classificação de acordo com o banco de dados) agrupados neste estudo (1, 33, 34, 42, 48, 53, 702, 806 e 811), incluíram mais da metade (54,4%) de todos os isolados. Estes tipos também já foram descritos em outros estudos e no banco de dados do “spoligotypes” SpolDB4 (Chan-Yeung et al, 2001; Sola et al, 2001; Duchêne V et al, 2004; Borsuk et al, 2005; Brudey et al, 2006).

Além desses tipos encontrados em vários locais do mundo, outros tipos de localização geográfica restrita e tipos novos (n=8) também foram encontrados no presente trabalho. A maioria desses “spoligotypes” ou famílias inicialmente são endêmicas dentro de uma área geográfica específica, permanecendo em regiões particulares ou tornando-se onipresente.

O “spoligotype” 1, classificado como “Família Beijing” foi um dos mais frequentes encontrado em nosso estudo com 19 isolados. Essa família é um exemplo pertencente ao grupo de localização inicial restrita e hoje é encontrada em várias regiões. Essa família foi identificada pela primeira vez em pacientes com tuberculose na província de Beijing na China e designada como genótipo Beijing. Esta família é definida pela ausência dos espaços 1-34 (van Soolingen et al, 1995). Este genótipo tornou-se onipresente e prevalente na Ásia Leste e recentemente foi encontrado em outros países fora da Ásia,

como por exemplo, Estados Unidos, África do Sul e Rússia (van Soolingen, 2001; Tounghousova et al, 2002).

A prevalência das cepas da Família Beijing em Moçambique pode estar relacionada com a BCG-vacinação, onde a prática da vacinação é freqüente. Suspeita-se que as cepas de Beijing são mais prevalentes entre os indivíduos vacinados do que entre os não vacinados em uma população os quais uma fração significativa não está protegida pelo BCG. Dessa forma, a vacinação favorece a seleção de cepas de *M. tuberculosis* que resiste a imunidade induzida pelo BCG (van Soolingen et al, 1995).

O genótipo da família Beijing tem se mostrado associado a uma elevada incidência de resistência às drogas tuberculostáticas (van Soolingen et al, 1995; Diaz et al, 1998; Marttila et al, 1998; Tounghousova et al, 2002). Em nosso trabalho, os 19 isolados classificados como pertencentes à Família Beijing não apresentaram correlação com os fatores de resistência e em concordância com o trabalho de Glynn et al. (2005) no nordeste do Malauí. Dos 19 isolados, apenas 1 isolado foi MDR-TB (16), 1 isolado (332) resistente a rifampicina e 1 isolado (58) resistente à isoniazida (Anexo 1).

A superfamília “LAM” ou América Latina e Mediterrâneo (e suas variantes) foi a família mais prevalente neste trabalho seguido da família EAI (Leste-Africano-Indiano). A família LAM tem sido definida simultaneamente pela ausência dos espaços 21-24 e 33-36 e a família EAI definida pela ausência dos espaços 29-32 e 34 simultaneamente (Sola et al, 2001b).

De acordo com Sola et al. (2001b) essas famílias foram batizadas como LAM e EAI de acordo com a origem das cepas estudadas para definir essas famílias. Assim, os ancestrais dessa família não necessariamente são encontrados nesses locais, por exemplo, foram descritos cepas de EAI na Guiné-Bissau por Källenius et al. (1999). Esses autores sugerem que esta família (designada grupo C neste estudo) pode ter sua origem na África ocidental. Em relação à origem e a disseminação da família EAI, provavelmente esses isolados foram endêmicos na Ásia ou África e se espalharam recentemente com a migração humana e/ou mais tarde através do comércio Indiano-Muçulmano da Índia para África Oriental ou com a colonização Portuguesa.

Dessa forma essa família (EAI) pode ter sido introduzida em Moçambique através da colonização portuguesa entre os séculos XV e XX.

A família LAM foi introduzida nas Américas através de gados infectados e pela migração humana (Fanning 1994). Provavelmente, essa família também foi introduzida em Moçambique com a colonização Portuguesa, esta família também foi encontrada em outros países de colonização portuguesa, como o Brasil bem como o “spoligotype” representando a família T (Borsuk et al, 2005). Em nosso trabalho, esse “spoligotype” também foi predominante. Ele foi isolado pela primeira vez em múmias egípcias indicando a sua presença desde muito tempo (Zink et al, 2003).

Embora os perfis genotípicos obtidos por spoligotyping fossem menos polimórficos que aqueles obtidos por IS6110-RFLP, no total houve uma correlação entre os “spoligotypes” e os padrões de RFLP, mesmo para os isolados com poucas cópias da IS6110, confirmando a relação genética dos isolados identificados pela análise do IS6110-RFLP.

Nos isolados agrupados por spoligotyping e IS6110-RFLP não foram encontradas nenhuma associação em relação à resistência à isoniazida ou multirresistência. Estes achados indicam provavelmente que a resistência a essa droga é um fenômeno muito expansivo nesta comunidade, e é causada principalmente pelos tratamentos prévios inapropriados, sendo necessária a implantação de programas de controle para tuberculose na comunidade dos hospitais estudados (Nunes et al, 2005).

6- CONCLUSÃO

- Na população estudada, os genótipos de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* exibiram um elevado polimorfismo, com um número de isolados agrupados em cluster menor do que em estudos similares feitos no continente africano.
- Nos isolados portadores de menos de seis cópias IS6110, o “spoligotyping” foi mais discriminatório, a exemplo de outros estudos.
- Foram encontradas famílias, baseado na técnica de “spoligotyping”. As mais freqüentes foram: LAM, EAI, T e Beijing.
- Não houve correlação entre resistência à Isoniazida e, mesmo, a multirresistência com os isolados agrupados nas duas metodologias.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Abdely HM, Revankar SG, Graybill JR. Disseminated *Mycobacterium simiae* Infection in patients with AIDS. *J Infect* 2000; 41: 143-7.

Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, et al. Transmission of Tuberculosis in New York City: an Analysis by DNA Fingerprinting and Conventional Epidemiologic Methods. *N Engl J Med* 1994; 330: 1710-6.

Barnes PF, Yang Z, Preston-Martin S, Pogoda JM, Jones BE, Ota M, et al. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *Jama* 1997; 278(14): 1159-63.

Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miorner. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2602-06.

Borsuk S, Dellagostin MM, Madeira SG, Lima C, Boffo M, Mattos I, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. *Microbes Infect* 2005; 7(13):1338-44.

Braden CR, Templeton GL, Cave MD, Valway S, Onoratto IM, Castro KG et al. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis* 1997; 175: 1446-52.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro (RJ); 1994. 115p.

Brosch RS, Gordon V, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:3684–9.

Bruchfeld J, Aderaye G, Palme IB, Bjorvatn B, Ghebremichael S, Hoffner S, Lindquist L. Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopian pulmonary tuberculosis patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1636–43

Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international Spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006; 6: 6-23.

Burman WJ, Reves RR, Hawkes AP. DNA fingerprinting with two probes decrease clustering of Mycobacterium tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 1140-6.

Carriere C, Godreuil S, Gouby A, Vincent V, Marchandin H, Terru D, et al. Mycobacterium simiae infections: about two cases. Pathol Biol (Paris) 2005; 53(6): 324-7.

Chan-Yeung M, Borgdorff M, Yip CW, Haas PEW, Wong WS, Kam KM, van Soolingen D. Seventy percent of the Mycobacterium tuberculosis isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype. Epidemiol Infect 2001; 127: 169-71.

Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC. Mycobacterium tuberculosis Complex differentiation using gyrB-restriction fragment length polymorphism analysis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(7): 745-8.

Chiodini RJ. Biochemical characteristics of various strains of Mycobacterium paratuberculosis. Am J Vet Res 1986; 47(7): 1442-5.

Collins DM, de Lisle GW. DNA restriction endonuclease analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. J Gen Microbiol 1984; 130: 1019-21.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S et al. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53: 1305-14.

Cowan LS, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig TV, Crawford JT. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in the United States. J Clin Microbiol 2005; 43: 688-95.

da Silva CF, Ueki SYM, Geiger DCP, Leão SC. hsp65 PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. Rev Inst Med Trop São Paulo 2001; 43 (1): 25-8.

da Silva Rocha A, Leite CC, Torres HM, Miranda AB, Lopes MQP, Degraive WM, Suffys PN. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *J Microbiol Methods* 1999; 37: 223-9.

Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, Cousins D, Crawford JT, Driscoll J, et al. spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 216-9.

Das SD, Narayanan S, Hari L, Hoti SL, Thangathurai RK, Charles N, Jaggarajamma K, Narayanan PR. Differentiation of highly prevalent IS6110 single-copy strains of *M. tuberculosis* from a rural community in South India with an ongoing DOTS programme. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 67-77.

Devallois A, Goh K.S, Rastogi N. Rapid identification of *Mycobacterium* to species level by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2969-73.

Diaz R, Kremer K, de Haas PE, Gomez RI, Marrero A, Valdivia JA, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998 2(9):743-50.

Duchêne V, Ferdinand S, Filliol I, Guégan JF, Rastogi N, Sola C. Phylogenetic reconstruction of *Mycobacterium tuberculosis* within four settings of the Caribbean region: tree comparative analysis and first appraisal on their phylogeography. *Infect Genet Evol* 2004; 4(1):5-14.

Fanning EA. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. In: Davies PDO. *Clinical tuberculosis*. London: Chapman e Hall; 1994. p. 361-5.

Filliol I, Ferdinand S, Sola C, Thonnon J, Rastogi N. Spoligotyping and IS6110-RFLP typing of *Mycobacterium tuberculosis* from French Guiana: a comparison of results with international databases underlines interregional transmission from neighboring countries. *Res Microbiol* 2002; 153: 81-8.

Gilks CF, Brindle RJ, Mwachari C, Batchelor B.; Bwayo J, Kimari J, et al. Disseminated Mycobacterium avium Infection Among HIV-Infected Patients in Kenya. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviral 1995; 8(2):195-8.

Glynn JR, Vynnycky E, Fine PEM. Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of Mycobacterium tuberculosis derived from DNA fingerprinting techniques. Am J Epidemiol 1999 ; 149 : 366-71.

Glynn JR, Crampin AC, Traore H, Yates MD, Mwaungulu FD, Ngwira M, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype, Northern Malawi. Emerg Infect Dis 2005; 11(1): 150-3.

Groenen PMA, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JDA. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol 1993; 10:1057-65.

Godfrey-Faussett P, Sonnenberg P, Shearer SC, Bruce MC, Mee C, Morris L, Murray J. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold-mining community. Lancet 2000; 356: 1066-71.

Holmes CB, Losina E, Walensky RP, Yazdanpanah Y, Freedberg K. Review of Human Immunodeficiency Virus Type 1 related Opportunistic Infections in Sub-Saharan Africa. Clinical Infect Dis 2003; 36: 652-62.

Hopewell, PWM. Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features, management and control of tuberculosis. Clin Infect Dis 1992; 15: 540-7.

Jones D, Pell PA, Sneath PHA. Maintenance of Bacteria on Glass Beads at -60°C to -76°C . In: Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. 2nd ed. Academic Press Limited; 1991.

Källénus G, Koivula T, Ghebremichael S, Hoffner SE, Norberg R, Svensson E, et al. Evolution and clonal traits of Mycobacterium tuberculosis in Guinea-Bissau. J Clin Microbiol 1999; 37: 3872-8.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper A, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.

Karassova V, Weissfeiler J, Krasznay E. Occurrence of atypical mycobacteria in *Macacus rhesus*. *Acta Microbiol Ac Sci Hung* 1965; 12:275-82.

Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 301-8.

Kremer K, van Soolingen D, Frethingham R, Haas WH, Hermans LW, Martin C et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8): 2607-18.

Kremer K, Bunschoten A, Schouls L, van Soolingen D, van Embden J. Nacional Institute of Public Health and Environmental, Bilthoven, The Netherlands, version November 2002.

Leão SC; Bernardellib A, Cataldic A, Zumarragac M, Robledod J, Realped T, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 193-9.

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Home Page. [acesso em 16 de jan de 2007]. Disponível em: URL: <http://www.bacterio.cict.fr>

Marttila HJ, Soini H, Eerola E, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV, Viljanen MK. A Ser315Thr substitution in *KatG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(9):2443-5.

Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993; 17:153-64.

- Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *PNAS* 2001; 98(4): 1901-06.
- Moçambique. Ministério da Saúde. Programa Nacional DST/SIDA, 1994.
- Morrissey AB, Aisu TO, Falkinham III JO, Eriki, PP, Ellner JJ, Daniel TM. Absence of *Mycobacterium avium* Complex Disease in Patient with AIDS in Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5(5): 477-8.
- Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(11): 694-704.
- Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* 2002; 186:74–80.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology; 1999. p.400-30.
- Narayanan S, Das S, Garg R, Hari L, Rao VB, Frieden TR, Narayanan PR. Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in South India: implications for disease control and prevention. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4785–8.
- Niemann S, Harmsen D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by *gyrB* DNA Sequence Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol* 2000; 38(9): 3231-4.
- Nunes EA, Capitani EM, Coelho E, Joaquim OA, Figueiredo RO, Cossa AM, Panunto AC, et al. Patterns of anti-tuberculosis drug resistance among HIV-infected patients in Maputo, Mozambique, 2002-2003. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; 9(5): 494-500.
- Nunn P, Gicheha C, Haeyes R, Gathua S, Brindle R, Kibuga D, et al. Cross-sectional survey of HIV infection among patients with tuberculosis in Nairobi, Kenya. *Tuber Lung Dis*, 1992; 73(1): 45-51.
- Sampaio JL, Artiles N, Pereira RM, Souza JR, Leite JP. *Mycobacterium simiae* infection in patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Brazil J Infect Dis* 2001; 5(6): 352-5.

Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Locht C, Supply P. Stability of variable-number tandem repeats of Mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of Mycobacterium tuberculosis J Clin Microbiol 2002; 40(12): 4561-6.

Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med 1994; 330:1703-9.

Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, Mokrousov I, Vincent V, Rastogi N. Spoligotype database of Mycobacterium tuberculosis: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. Emerg Infect Dis 2001; 7: 390-6.

Sola C, Filliol I, Legrand E, Mokrousov I, Rastogi N. Mycobacterium tuberculosis phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. J Mol Evol 2001 b; 53(6):680-9.

Southern Blotting. Home Page. [acesso em 23 de maio de 2007]. Disponível em: URL: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/southernblot.jpg>

SpolDB4. Home Page. [acesso em 23 de maio de 2007]. Disponível em URL: http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html

Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, et al. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-Kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 1995; 33: 149-53.

Suffys PN, de Araújo MEI, Rossetti ML, Zaha A, Barroso EW, Barreto AMW, et al. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of Mycobacterium tuberculosis and comparison with an international fingerprint database. Res Microbiol 2000; 151: 343–51.

Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. Molec Microbiol 2000; 36(3): 762-71.

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3563-71.

Taxonomy browser. Home Page. [acesso em 08 de ago de 2007]. Disponível em: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=1760&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlo>

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid Identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175-8.

Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequences, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2668-73.

Toungoussova OS, Sandven P, Mariandyshev AO, Nizovtseva NI, Bjune G, Caugant DA. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Rússia. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 1930-7.

Tuberculosis. Home Page. [acesso em 23 de maio de 2007]. Disponível em URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

Tuberculosis and HIV. Home Page. [acesso em 23 de maio de 2007]. Disponível em URL: <http://www.who.int/hiv/topics/tb/en/>

Vandercam B, Gala J L, Gerain J, Degraux J, Bourlond A, Colebunders B, et al. About two cases of *Mycobacterium simiae* infection in AIDS: review of the pathogenicity. *Acta Clin Belg* 1998; 53(3): 206-12.

van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Giequel B, Hermans P, Martin C, McAdam r, Shinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-9.

van Soolingen D, Hermans PWM, Haas PEW, Sool DR, van Embden JDA. The occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains; evaluation of IS-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1991; 29(11): 2578-86.

van Soolingen D, Qian L, de Haas PEW, Douglas JT, Traore H, portaels F, et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of East Asia. J Clin Microbiol 1995; 33(12): 3234-8.

van Soolingen D, Hootenboezem T, Haas PE, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS et al. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetii: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 1236-45.

van Soolingen D, Haas PE, Kremer K. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. Nacional Institute of Public Health and Environmental, Bilthoven, The Netherlands, version September 1999.

van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: mains methodologies and achievements. J Intern Med 2001, 249: 1-26.

Veronesi R e Focaccia R. Veronesi: Tratado de Infectologia. São Paulo: Ed. Atheneu; 1996. p.915-59.

Verver S, Warren RM, Munch Z, Vynnycky E, van Helden PD, Richardson M, van der Spuy GD, Enarson DA, Borgdorff MW, Behr MA, Beyers N. Transmission of tuberculosis in a high incidence urban community in South Africa. Int J Epidemiol 2004; 33: 351-7.

Weis SE, Pogoda JM, Yang Z, Cave MD, Wallace C, Kelley M. Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant county, Texas. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166(1): 36-42.

Wilkinson D, Pillay M, Crump J, Lombard C, Davies GR, Sturm AW. Molecular epidemiology and transmission dynamics of Mycobacterium tuberculosis in rural Africa. Trop Med Int Health 1997; 2(8):747-53.

Wikipédia. [acesso em 23 de maio de 2007]. Disponível em URL: http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81frica_subsaariana

World Health Organization/Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2004, Geneva, (WHO/HTM/TB/2004.331).

World Health Organization/Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2006a. Geneva, (WHO/HTM/TB/2006.362).

World Health Organization/UNAIDS. AIDS epidemic update. WHO report 2006b. Geneva.

Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, Nerlich AG. Characterization of Mycobacterium tuberculosis Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 359-67.

Yeh RW, Ponce de Leon A, Agasino CB, Hahn JA, Daley CL, Hopewell PC, Small PM. Stability of Mycobacterium tuberculosis DNA genotypes. J Infect Dis 1998; 177: 1107-11.

8- ANEXOS

ANEXO 1 - Pacientes do Estudo representados pelo número de isolados, segundo data de inoculação do material pulmonar em cultura, Baciloscopia, leitura da cultura, teste de sensibilidade frente aos tuberculostáticos, sexo e isolados pertencentes aos agrupamentos por RFLP.

Número Isolado	Data inoculação	Data Leitura	Baciloscopia	Cultura	INH	SM	RIF	EMB	Sexo	Agrupamentos
16	14.11.02	11.12.02	+++	++	R	R	R	S	M	I
21	21.11.02	30.12.02	+	16 colon.	S	S	S	S	M	I
22	21.11.02	18.12.02	+++	+	S	S	S	S	M	I
23	21.11.02	18.12.02	N	4 colon.	S	S	S	S	M	II
27	03.12.02	20.01.03	N	10 colon.	S	S	S	S	M	
29	06.12.02	20.01.03	+	+	S	S	S	S	F	II
44	24.03.03	280403	N	1colon.	S	S	S	S	F	III
45	25.03.03	280403	N	1colon.	S	S	S	S	F	
46	31.03.03	130503	N	6colon.	S	S	S	S	M	
47	31.03.03	120503	N	5colon.	R	R	S	S	M	
48	31.03.03	05.05.03	N	15 colon.	R	R	S	S	M	
49	31.03.03	05.05.03	N	1 colon.	S	S	S	S	M	
54	08.04.03	05.05.03	N	+	S	S	S	S	F	
58	08.04.03	05.05.03	++	+++	R	S	S	S	M	
59	14.04.03	130503	+	10colon.	S	S	S	S	M	
63	15.04.03	260503	+++	+	S	S	S	S	M	
65	18.04.03	130503	+	15colon.	S	S	S	S	F	
67	5.05.03	200603	N	7colon	S	R	S	S	F	
68	05.05.03	200603	++	11colon.	S	S	S	S	F	
71	120503	200603	+	+	S	S	S	S	F	
77	120503	300603	+	8 Colon.	S	S	S	S	M	
79	130503	200603	N	4colon.	S	R	S	S	M	
81	130503	200603	+++	+	S	S	S	S	M	III
82	130503	200603	++	+++	R	S	R	S	M	
83	190503	200603	++	+	S	S	S	S	F	
84	190503	200603	+++	+++	S	S	S	#	F	
85	190503	200603	+	+	S	S	S	S	F	
86	190503	200603	N	5colon.	S	S	S	S	F	III
87	200503	200603	+	++	R	S	S	S	F	
88	220503	200603	++	++	S	S	S	S	M	
90	220503	200603	+	9colon.	S	S	S	S	M	III
94	230503	200603	+++	+++	S	S	S	S	F	
98	270503	200603	+	+	S	S	S	S	F	
100	20603	300603	+	+	S	S	S	S	F	III
109	90603	70703	++	+	S	S	S	S	F	
110	90603	300603	+	++	S	S	S	S	M	
113	160603	140703	N	13Colon.	S	S	S	S	M	
114	160603	140703	+	++	R	R	R	S	F	
115	160603	170703	+++	+++	S	S	S	S	M	
119	160603	280703	N	2 Colon.	S	S	S	S	M	
122	230603	240703	N	+	S	S	S	S	F	IV
124	300603	180703	+++	+	S	S	S	S	F	
126	70703	130803	+	+	S	S	S	S	M	IV
127	70703	60803	++	+	S	S	S	S	M	V
129	180703	60803	+++	++	S	S	S	S	F	V
131	210703	190803	+++	++	S	R	S	S	M	V

132	2100703	190803	N	+	S	R	S	S	F	
135	210703	60803	+++	++	R	S	R	S	F	
136	210703	221003	+	1 Colon.	S	S	S	S	M	VI
138	210703	270803	N	3 Colon.	S	S	S	S	M	
143	290703	190803	+++	++	R	S	R	S	M	
145	120803	160903	++	+	S	S	S	S	F	
146	180803	240903	N	8 Colon.	S	S	S	S	F	
147	180803	160903	N	6 Colon.	S	S	S	S	F	
149	180803	160903	++	+	S	S	S	S	F	
151	180803	300903	N	6 Colon.	S	S	S	S	M	VI
153	190803	160903	+++	+	S	S	S	S	M	
154	250803	240903	+++	+	S	S	S	S	M	
155	250803	160903	N	+	S	S	S	S	M	VI
158	10903	240903	++	++	S	S	S	R	F	
161	10903	240903	+	+	S	S	S	S	M	VI
162	10903	240903	+	+	S	S	S	S	M	
164	10903	240903	+++	+	S	S	S	S	M	VII
165	10903	300903	+++	+	S	S	S	S	M	
166	10903	240903	+++	++	S	S	S	S	M	
168	20903	240903	+++	+++	R	R	R	S	F	VII
169	90903	300903	+++	+++	S	S	S	S	F	VIII
171	90903	71003	N	5 Colon.	S	S	S	S	M	
174	90903	300903	++	+	S	S	S	S	F	
175	170903	71003	N	+	S	S	S	S	F	
176	160903	300903	+++	++	S	S	S	S	M	
177	160903	221003	+	7 Colon.	S	S	S	S	M	
179	160903	71003	N	+	R	R	R	R	F	
180	160903	221003	N	+	S	S	S	S	M	
185	31003	221003	++	++	S	S	S	S	M	VIII
186	31003	291003	++	8 Colon.	S	S	S	S	M	
189	31003	51103	++	+	S	S	S	S	M	VIII
192	131003	51103	+	++	S	S	S	S	F	
194	131003	51103	+++	+++	S	S	S	S	F	VIII
195	131003	121103	++	+	S	S	S	S	M	
198	131003	31203	++	+	S	S	S	S	M	
199	201003	31203	++	+	S	S	S	S	F	
201	201003	31203	+	10 Colon.	S	S	S	S	M	
202	201003	121103	+	10 Colon.	S	S	S	S	M	
203	201003	121103	+++	++	S	S	S	S	F	IX
207	201003	31203	+	+	S	S	S	S	M	IX
208	201003	111203	N	2 Colon.	S	S	S	S	F	
209	201003	171103	N	+	S	S	S	S	F	
211	271003	171103	+++	+++	S	S	S	S	F	
213	271003	121103	+++	+++	S	S	S	S	M	
214	271003	171203	+	+	S	S	S	S	F	
216	271003	111203	N	2 Colon.	S	S	S	S	F	
218	131003	51103	+	+	S	S	S	S	M	IX
222	241103	221203	+	+	S	S	S	S	F	
224	241103	220104	N	4 Colon	S	S	S	S	M	

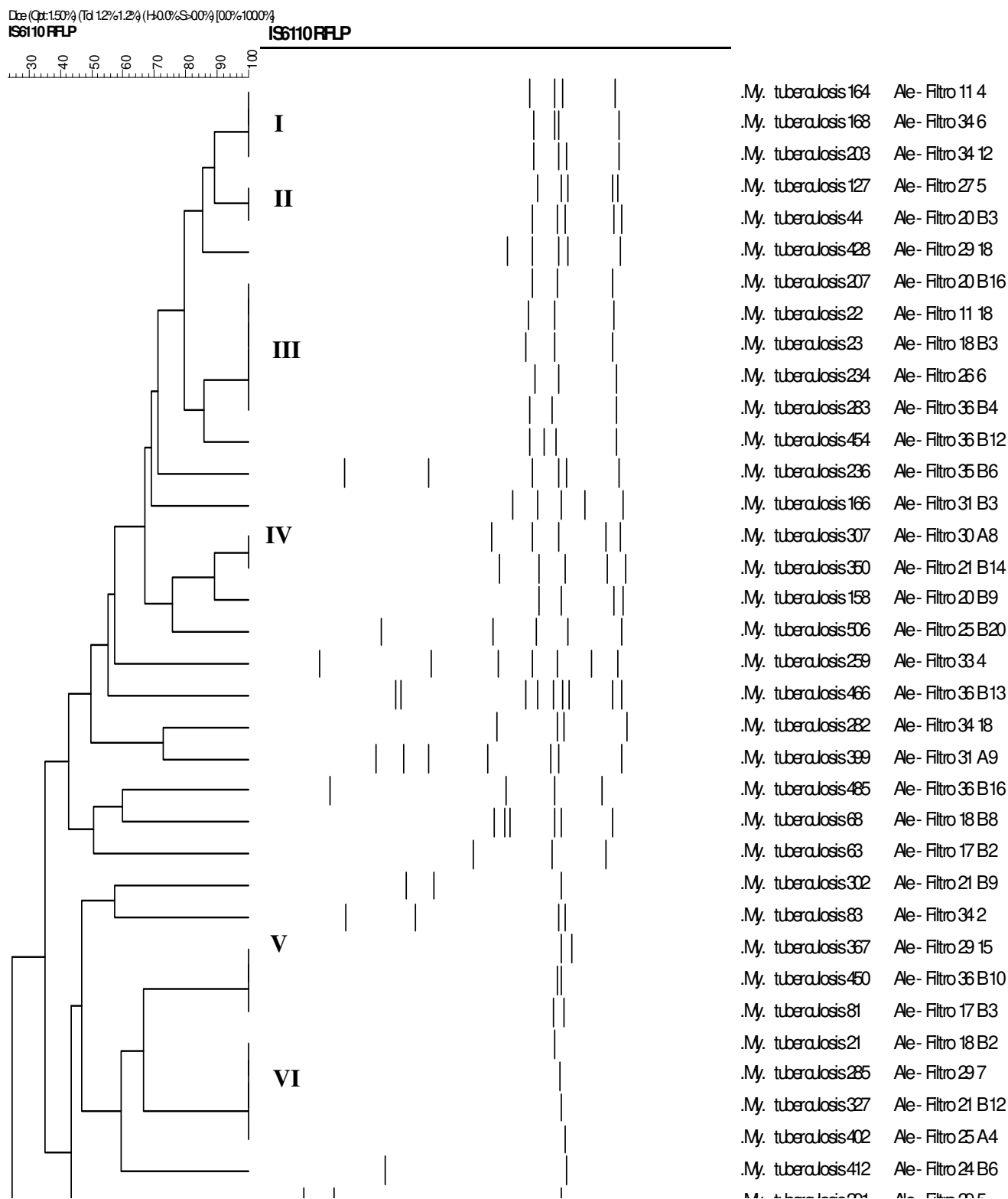
225	241103	280104	N	15 Colon	S	S	S	S	M	
226	251103	111203	+++	++	S	S	S	S	M	
227	251103	221203	++	++	S	R	S	S	M	
232	11203	60104	++	+	S	S	S	S	F	
234	11203	60104	++	+	S	S	S	S	M	IX
236	11203	60104	+	18 Colon	S	S	S	S	F	
238	11203	60104	N	11 Colon	S	S	R	S	M	
239	11203	21203	++	+	S	S	S	S	M	
240	31203	60104	N	12 Colon	S	S	S	S	M	
243	161203	80104	+++	11 Colon	S	S	S	S	M	IX
249	161203	80104	+	+	S	S	S	S	M	
250	161203	80104	+	+	S	S	S	S	F	
251	221203	280104	+	+	S	S	S	S	M	
252	221203	280104	++	+++	S	S	S	S	M	
257	221203	280104	+++	+++	S	S	S	S	M	
259	221203	110204	N	+	R	S	S	S	F	
261	291203	280104	+	++	S	S	S	S	M	IX
262	291203	120204	+	+	S	S	S	S	M	
265	291203	110204	+	+	S	S	S	S	F	IX
266	291203	110204	N	+	R	R	S	S	F	
267	291203	120204	N	+	S	S	S	S	M	
269	291203	120204	N	12 Colon.	S	S	S	S	M	
270	291203	120204	+++	+++	S	S	S	S	F	
274	160104	120204	N	7 Colon.	S	S	S	S	M	X
275	190104	250204	+	+	S	S	S	S	M	
276	190104	250204	N	9 Colon.	S	S	S	S	M	
277	190104	120204	+++	++	S	S	S	S	F	
282	190104	120204	N	+	S	S	S	S	M	
283	190104	120204	+++	+	R	R	R	R	F	X
284	190104	250204	+	5 Colon.	S	S	S	S	F	XI
285	190104	220304	N	10 Colon.	S	S	S	S	M	XI
287	260104	250204	+	+	S	S	S	S	F	XII
288	260104	250204	+++	+++	S	S	S	S	M	
289	260104	220304	N	7 Colon.	S	S	S	S	M	XII
290	260104	250204	++	+	S	S	S	S	M	
291	260104	270404	N	3 Colon.	S	S	S	S	M	
294	20204	140404	++	+	R	S	S	S	M	XII
296	20204	220304	++	++	S	S	S	S	M	
298	20204	250204	N	+++	S	S	S	S	F	
299	90204	220304	+	+	S	S	S	S	F	XII
301	90204	220304	+	+	S	S	S	S	F	
302	90204	220304	N	++	S	S	S	S	F	
307	90204	220304	+	+	S	S	S	S	F	XII
311	160204	220304	++	++	S	S	S	S	M	
312	160204	220304	+	++	S	S	S	S	M	XII
313	160204	220304	+++	++	R	S	S	S	M	
316*	160204	220304	N	6 Colon.	R	S	S	S	M	
317	160204	270404	N	3 Colon.	S	S	S	S	M	
320	170204	220304	++	+	S	S	S	S	M	XIII

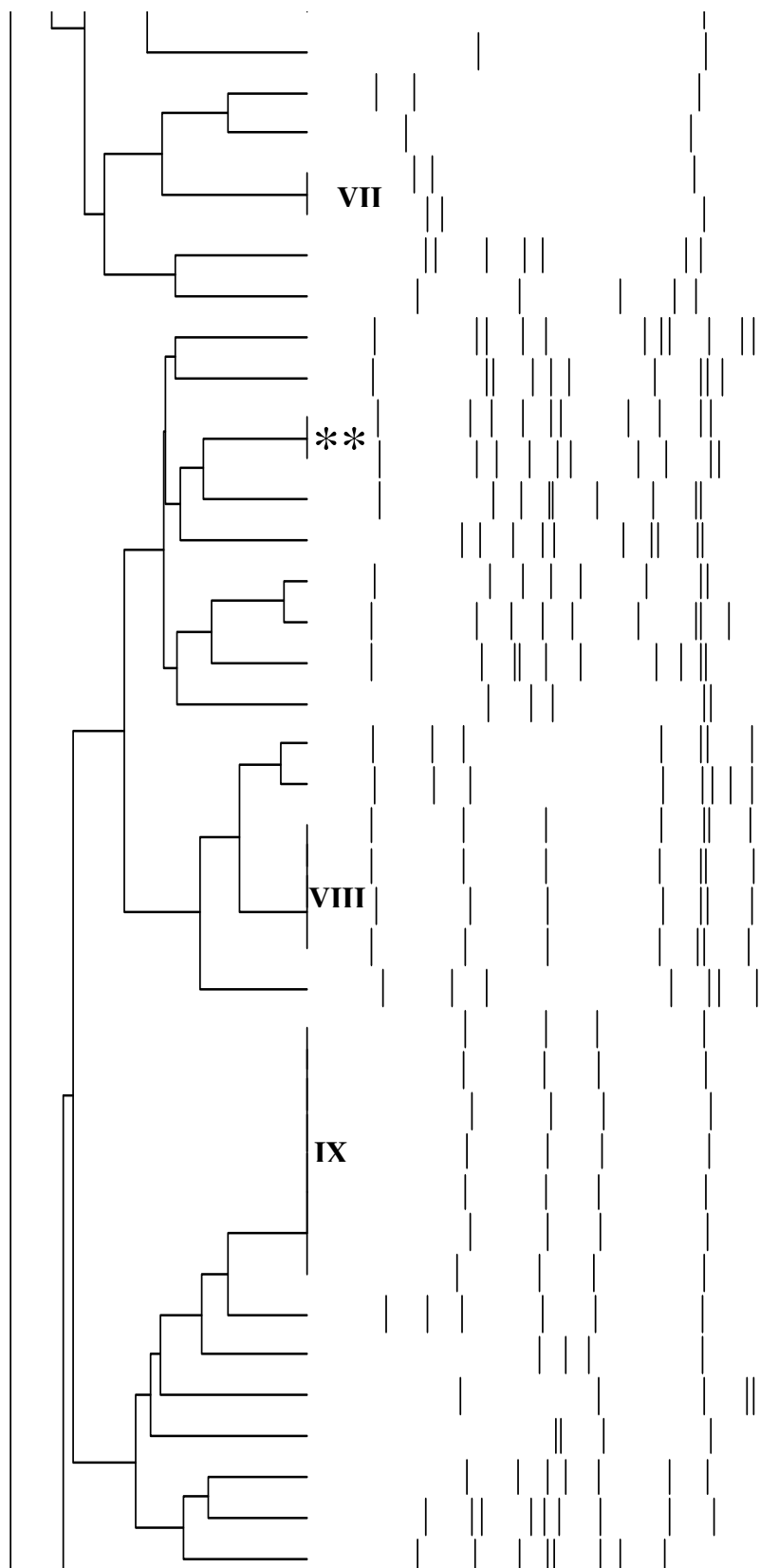
321	170204	130404	N	2 Colon.	S	S	S	S	M	XIII
324	170204	130404	+	+	S	S	S	S	M	
325	170204	130404	N	14 Colon.	S	S	S	S	M	
327	170204	270404	+	15 Colon.	S	S	S	S	M	XIV
328	170204	220304	+	14 Colon.	R	S	R	S	F	XIV
330	10304	220304	+++	+++	S	S	S	S	M	XIV
332	10304	220304	+++	+++	S	S	R	S	M	
333	10304	140404	+	16 Colon.	S	S	S	S	M	XV
336	40304	220304	+++	++	S	S	S	S	M	
337	80304	140404	+++	++	S	S	S	S	F	
338	80304	140404	+	++	S	S	S	S	M	
339	80304	140404	+	+	S	S	S	S	M	XV
340	80304	140404	+++	+++	R	S	R	S	F	
342	80304	140404	+	++	S	S	S	S	M	
344	80304	180504	+	5 Colon.	S	S	S	S	M	
346	90304	140404	++	+	S	S	S	S	F	
347	100304	140404	++	+	S	S	S	S	M	XV
350	150304	140404	+	+	S	S	S	S	F	XV
352	180304	140404	++	+	S	S	S	S	M	
355	220304	180504	N	4 Colon.	S	S	S	S	F	
360	220304	140404	+++	++	S	S	S	S	M	
363	220304	140404	+++	++	S	S	S	S	M	XVI
364	290304	70604	N	+	#	#	#	#	M	
365	290304	180504	N	2 Colon.	R	S	S	S	F	
366	290304	270404	+	+	S	S	S	S	M	
367	290304	190404	++	++	S	S	S	S	F	XVI
370	290304	190404	+	++	S	S	S	S	M	
373	50404	270404	++	+	R	S	S	S	F	
374	50404	270404	+++	++	R	S	S	S	F	
376	50404	270404	+++	+	R	S	S	S	M	XVII
380	60404	120504	+	+	S	S	S	S	F	
382	90404	120504	N	+	S	S	S	S	F	
383	90404	40504	+	++	S	S	S	S	M	
389	200404	120504	+++	+	S	S	S	S	M	
392	200404	180504	++	+	S	S	S	S	M	XVII
393	200404	70504	N	+	S	R	S	S	M	XVIII
395	220404	180504	N	8 Colon.	S	S	S	S	F	XVIII
396**	230404	180504	+++	+	S	S	S	S	M	
398	260404	170604	N	7 Colon.	S	S	S	S	M	
399	260404	180504	++	++	S	S	S	S	M	
400	260404	180504	++	++	S	S	S	S	M	
401	260404	180504	+++	++	S	S	S	S	M	
402	260404	170604	+	+	S	S	S	S	M	XVIII
405	260404	170604	+	+	S	S	S	S	F	
409	30504	170604	+	++	S	S	S	S	M	
411	100504	170604	+++	+++	R	R	R	S	M	
412	100504	170604	++	+++	S	S	S	S	F	
413	100504	170604	+	+	S	S	S	S	M	

420	170504	170604	++	++	R	S	S	S	M	
421	170504	170604	++	+	S	S	S	S	M	
422	200504	170604	N	12 Colon.	S	S	S	S	F	
424**	240504	170604	+	+	S	S	S	S	M	
425	240504	170604	++	+	S	S	S	S	M	
426	240504	170604	++	+	S	S	S	S	M	XIX
427	240504	170604	+++	+	S	S	S	S	F	XIX
428	240504	170604	++	++	S	S	S	S	M	
429	240504	170604	++	+	S	S	S	S	M	
432	310504	300604	+	+	S	S	S	S	M	
433	310504	300604	+	15 Colon.	R	S	S	S	M	XX
438	70604	140704	N	+	S	S	S	S	M	
440	140604	140704	+	+	S	S	S	S	M	
441	140604	170804	+	2 Colon.	S	S	S	S	M	XX
442	140604	140704	N	+	S	S	S	S	F	XXI
444	140604	140704	+	+	S	S	S	S	M	XXI
450	210604	280704	+++	++	S	S	S	S	F	XXII
452	210604	280704	N	15 Colon.	S	S	S	S	M	
453	290604	280704	++	++	S	S	S	R	F	
454	290604	280704	++	++	S	S	S	#	M	
456	290604	280704	+	11 Colon.	S	S	S	S	M	
457	290604	170804	N	8 Colon.	S	S	S	S	M	
459	290604	20804	N	5 Colon.	S	S	S	S	M	
460	290604	20804	N	+	S	S	S	S	M	
461	20704	20804	+	+	S	S	S	S	M	XXII
462	20704	280704	+	++	S	S	S	S	M	
463	50704	280704	++	+	R	S	S	S	M	
466	80704	20804	+	+	R	S	R	S	M	
467	90704	170804	+	+	S	S	S	S	M	XXIII
469	130704	170804	+	++	S	S	S	S	M	XXIII
472	270704	170804	+++	+++	S	S	S	S	F	XXIV
473	270704	170804	+++	+	S	S	S	S	F	
474	20804	170804	N	4 Colon.	S	S	S	S	M	
476	20804	30904	+	10 Colon.	S	S	S	S	F	
477	20804	30904	+++	+++	S	S	S	S	F	
480	20804	200904	N	1 Colon.	S	S	S	S	F	
483	40804	30904	++	++	S	S	S	S	M	
485	50804	30904	++	+++	#	#	#	S	M	
489	90804	200904	+	4colon.	S	S	S	S	F	
490	90804	30904	+	+	S	S	S	S	F	
495*	160804	200904	+++	+++	S	S	S	#	M	
500	230804	200904	++	+	S	S	S	S	F	XXIV
501	230804	200904	++	+++	S	S	S	S	F	
503	230804	200904	++	+	R	R	S	S	M	
506	230804	200904	++	+++	R	S	S	S	M	

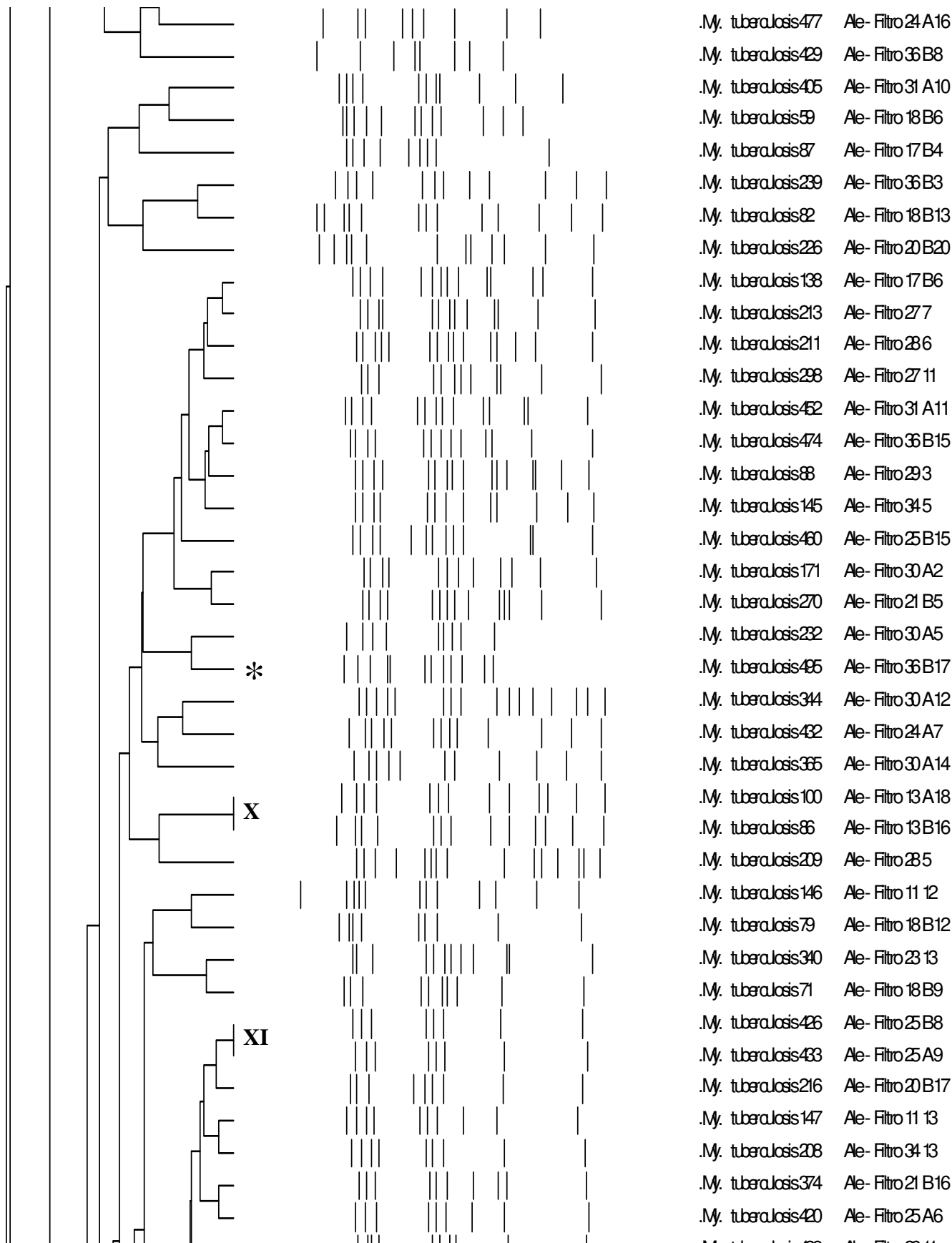
*: Paciente A; **: Paciente B; #: dados não obtidos; N: negativo; S; sensível; R: resistente; Colon: colônias; F: feminino; M: masculino; INH: isoniazida; SM:estreptomicina; RIF:rifampicina; EMB: etambutol.

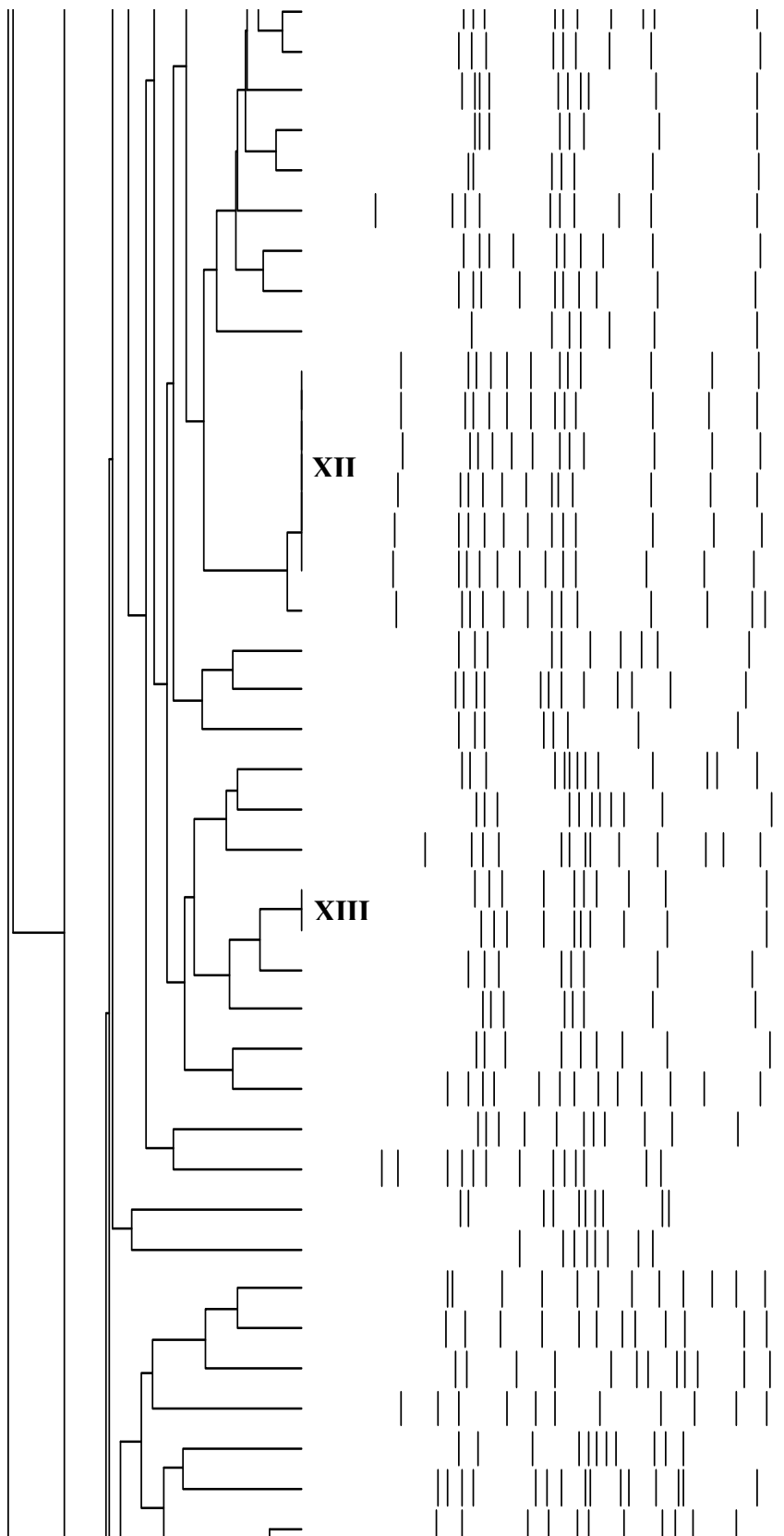
ANEXO 2 - Dendrograma evidenciando a similaridade entre perfis de cepas obtidos por RFLP-IS6110 analisados por analisados por BioNumerics® 4.50. O dendrograma mostra os agrupamentos I a XXIV. UPGMA, 1,10% de tolerância.



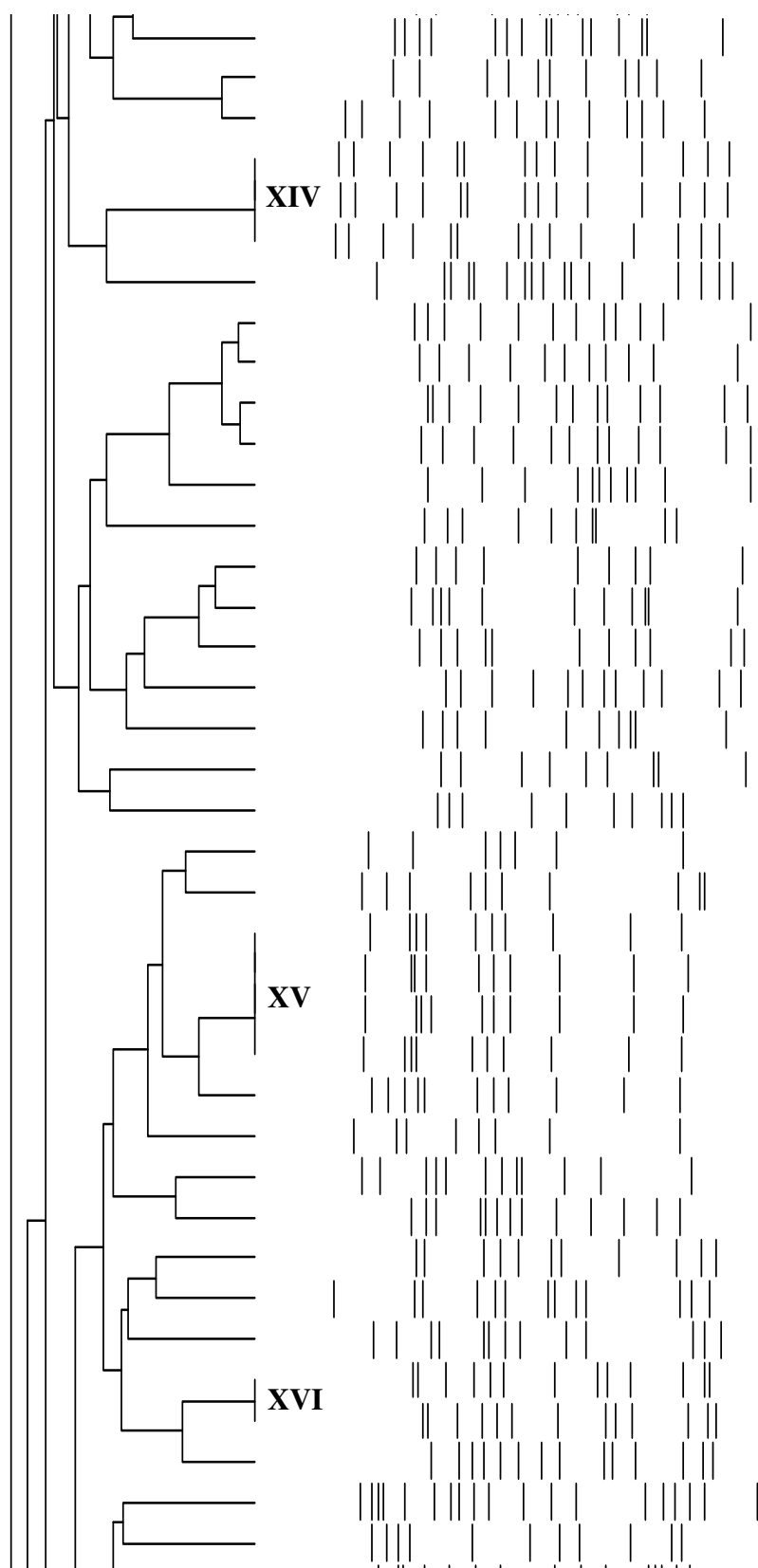


.My. tuberculosis 412	Ale- Filtro 24 B6
.My. tuberculosis 201	Ale- Filtro 29 5
.My. tuberculosis 421	Ale- Filtro 36 B7
.My. tuberculosis 243	Ale- Filtro 34 14
.My. tuberculosis 363	Ale- Filtro 35 B10
.My. tuberculosis 225	Ale- Filtro 33 3
.My. tuberculosis 463	Ale- Filtro 26 12
.My. tuberculosis 257	Ale- Filtro 35 B7
.My. tuberculosis 291	Ale- Filtro 30 A7
.My. tuberculosis 336	Ale- Filtro 21 A9
.My. tuberculosis 424	Ale- Filtro 35 B12
.My. tuberculosis 398	Ale- Filtro 24 A5
.My. tuberculosis 249	Ale- Filtro 34 15
.My. tuberculosis 114	Ale- Filtro 27 3
.My. tuberculosis 135	Ale- Filtro 11 7
.My. tuberculosis 251	Ale- Filtro 30 A6
.My. tuberculosis 179	Ale- Filtro 28 3
.My. tuberculosis 176	Ale- Filtro 34 7
.My. tuberculosis 324	Ale- Filtro 24 B3
.My. tuberculosis 129	Ale- Filtro 34 4
.My. tuberculosis 194	Ale- Filtro 34 9
.My. tuberculosis 442	Ale- Filtro 24 B9
.My. tuberculosis 444	Ale- Filtro 25 B10
.My. tuberculosis 366	Ale- Filtro 28 12
.My. tuberculosis 161	Ale- Filtro 20 B10
.My. tuberculosis 169	Ale- Filtro 27 6
.My. tuberculosis 289	Ale- Filtro 23 5
.My. tuberculosis 333	Ale- Filtro 23 10
.My. tuberculosis 339	Ale- Filtro 28 11
.My. tuberculosis 393	Ale- Filtro 21 B17
.My. tuberculosis 472	Ale- Filtro 31 A12
.My. tuberculosis 459	Ale- Filtro 25 B14
.My. tuberculosis 269	Ale- Filtro 33 5
.My. tuberculosis 153	Ale- Filtro 31 B2
.My. tuberculosis 480	Ale- Filtro 25 A18
.My. tuberculosis 355	Ale- Filtro 25 B3
.My. tuberculosis 477	Ale- Filtro 24 A16
.My. tuberculosis 429	Ale- Filtro 36 B8

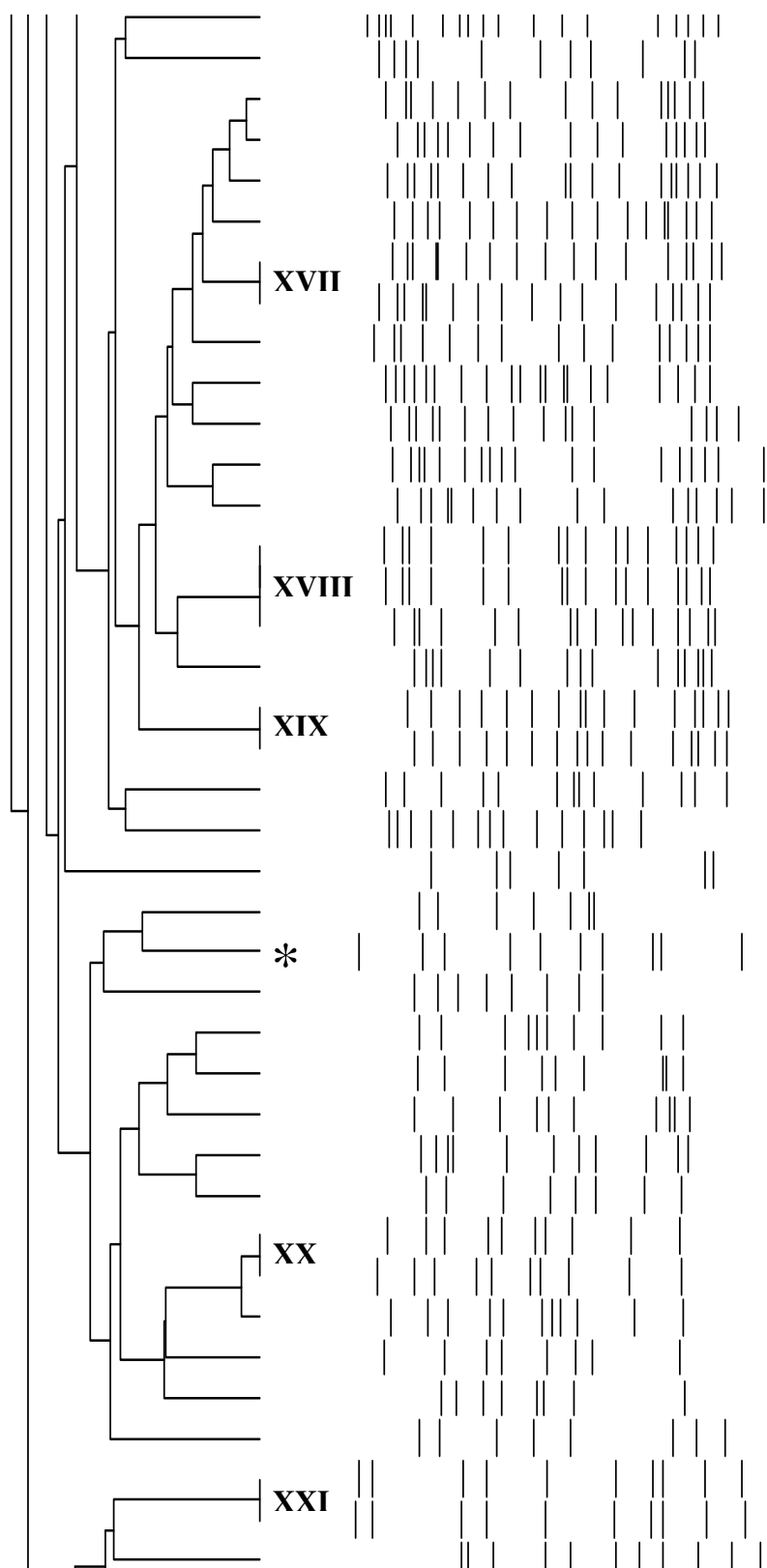




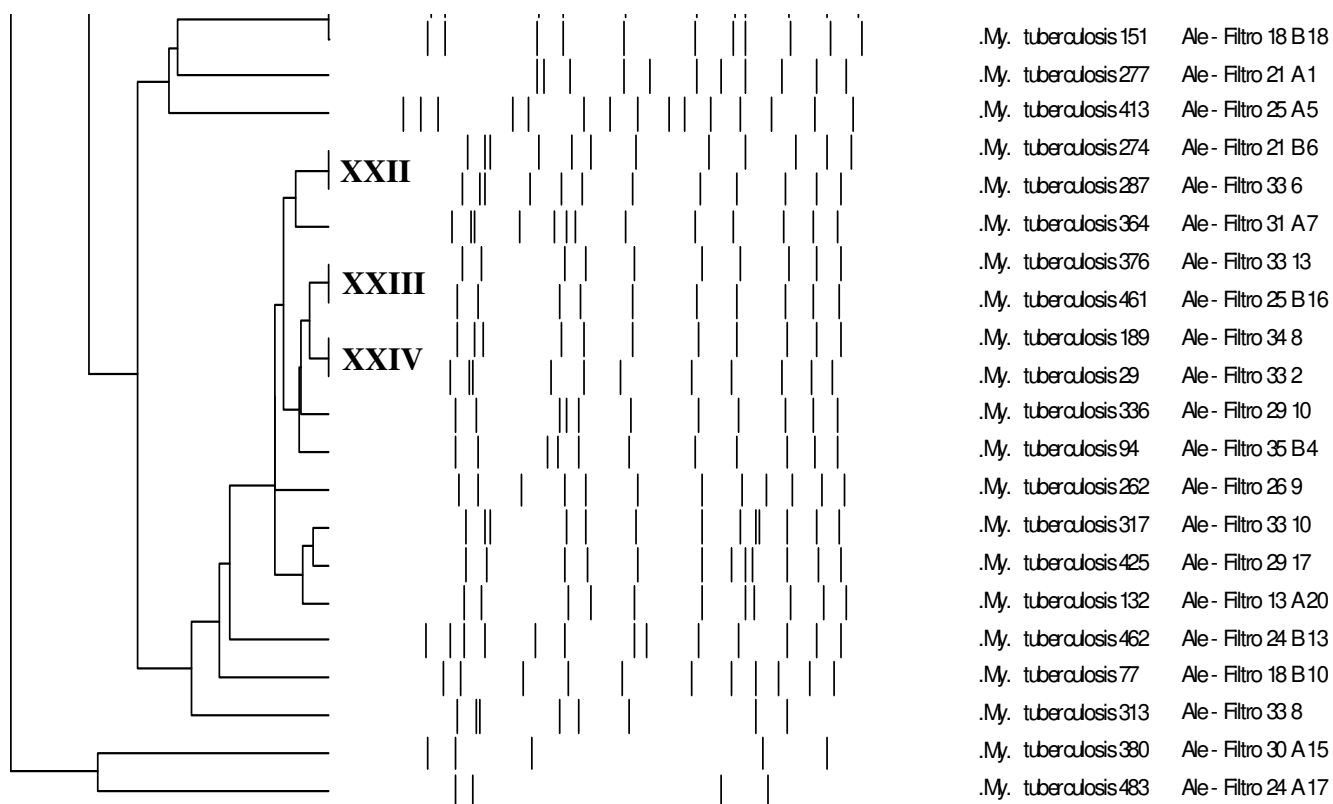
.My. tuberculosis 374	Ale- Filtro 21 B10
.My. tuberculosis 420	Ale- Filtro 25 A6
.My. tuberculosis 438	Ale- Filtro 26 11
.My. tuberculosis 195	Ale- Filtro 29 4
.My. tuberculosis 401	Ale- Filtro 21 B19
.My. tuberculosis 346	Ale- Filtro 29 13
.My. tuberculosis 389	Ale- Filtro 29 16
.My. tuberculosis 49	Ale- Filtro 13 A7
.My. tuberculosis 47	Ale- Filtro 13 A5
.My. tuberculosis 122	Ale- Filtro 27 4
.My. tuberculosis 155	Ale- Filtro 17 B11
.My. tuberculosis 265	Ale- Filtro 28 7
.My. tuberculosis 395	Ale- Filtro 24 B4
.My. tuberculosis 427	Ale- Filtro 21 A11
.My. tuberculosis 90	Ale- Filtro 18 B14
.My. tuberculosis 119	Ale- Filtro 20 B7
.My. tuberculosis 192	Ale- Filtro 17 A7
.My. tuberculosis 473	Ale- Filtro 24 A14
.My. tuberculosis 457	Ale- Filtro 24 A12
.My. tuberculosis 202	Ale- Filtro 28 4
.My. tuberculosis 382	Ale- Filtro 35 A7
.My. tuberculosis 227	Ale- Filtro 26 5
.My. tuberculosis 185	Ale- Filtro 31 B4
.My. tuberculosis 261	Ale- Filtro 26 7
.My. tuberculosis 85	Ale- Filtro 29 2
.My. tuberculosis 400	Ale- Filtro 28 13
.My. tuberculosis 174	Ale- Filtro 30 A3
.My. tuberculosis 360	Ale- Filtro 30 B4
.My. tuberculosis 476	Ale- Filtro 24 A15
.My. tuberculosis 501	Ale- Filtro 17 B10
.My. tuberculosis 110	Ale- Filtro 20 B6
.My. tuberculosis 266	Ale- Filtro 23 3
.My. tuberculosis 149	Ale- Filtro 11 14
.My. tuberculosis 67	Ale- Filtro 18 B7
.My. tuberculosis 224	Ale- Filtro 20 B19
.My. tuberculosis 480	Ale- Filtro 30 A17
.My. tuberculosis 325	Ale- Filtro 23 8
.My. tuberculosis 45	Ale- Filtro 18 B4
.My. tuberculosis 252	Ale- Filtro 34 17



.My. tuberculosis45	Ale- Filtro 18 B4
.My. tuberculosis252	Ale- Filtro 34 17
.My. tuberculosis27	Ale- Filtro 20 B2
.My. tuberculosis126	Ale- Filtro 28 2
.My. tuberculosis330	Ale- Filtro 33 11
.My. tuberculosis469	Ale- Filtro 36 B14
.My. tuberculosis115	Ale- Filtro 21 B2
.My. tuberculosis238	Ale- Filtro 21 B4
.My. tuberculosis489	Ale- Filtro 24 B19
.My. tuberculosis214	Ale- Filtro 25 A2
.My. tuberculosis290	Ale- Filtro 23 6
.My. tuberculosis337	Ale- Filtro 35 A5
.My. tuberculosis311	Ale- Filtro 35 A4
.My. tuberculosis180	Ale- Filtro 31 A2
.My. tuberculosis250	Ale- Filtro 34 16
.My. tuberculosis373	Ale- Filtro 21 B15
.My. tuberculosis240	Ale- Filtro 27 8
.My. tuberculosis453	Ale- Filtro 24 A10
.My. tuberculosis267	Ale- Filtro 23 4
.My. tuberculosis409	Ale- Filtro 33 14
.My. tuberculosis124	Ale- Filtro 13 B19
.My. tuberculosis342	Ale- Filtro 29 12
.My. tuberculosis294	Ale- Filtro 33 7
.My. tuberculosis312	Ale- Filtro 30 A9
.My. tuberculosis328	Ale- Filtro 21 B13
.My. tuberculosis347	Ale- Filtro 31 A5
.My. tuberculosis48	Ale- Filtro 20 B4
.My. tuberculosis98	Ale- Filtro 18 B15
.My. tuberculosis411	Ale- Filtro 35 B11
.My. tuberculosis65	Ale- Filtro 20 B5
.My. tuberculosis113	Ale- Filtro 35 B5
.My. tuberculosis456	Ale- Filtro 25 B13
.My. tuberculosis338	Ale- Filtro 35 A6
.My. tuberculosis320	Ale- Filtro 30 B2
.My. tuberculosis321	Ale- Filtro 21 B10
.My. tuberculosis275	Ale- Filtro 29 6
.My. tuberculosis109	Ale- Filtro 18 B16
.My. tuberculosis175	Ale- Filtro 18 B19



.My. tuberculosis 105	Ale- Filtro 16 B 10
.My. tuberculosis 175	Ale- Filtro 18 B 19
.My. tuberculosis 301	Ale- Filtro 31 A 6
.My. tuberculosis 440	Ale- Filtro 24 B 8
.My. tuberculosis 84	Ale- Filtro 34 3
.My. tuberculosis 332	Ale- Filtro 23 9
.My. tuberculosis 284	Ale- Filtro 31 A 4
.My. tuberculosis 299	Ale- Filtro 36 B 5
.My. tuberculosis 58	Ale- Filtro 18 B 5
.My. tuberculosis 199	Ale- Filtro 20 B 15
.My. tuberculosis 288	Ale- Filtro 35 B 8
.My. tuberculosis 198	Ale- Filtro 34 11
.My. tuberculosis 276	Ale- Filtro 21 B 7
.My. tuberculosis 136	Ale- Filtro 11 9
.My. tuberculosis 16	Ale- Filtro 35 B 2
.My. tuberculosis 392	Ale- Filtro 30 B 5
.My. tuberculosis 186	Ale- Filtro 20 B 14
.My. tuberculosis 467	Ale- Filtro 25 A 17
.My. tuberculosis 500	Ale- Filtro 25 A 19
.My. tuberculosis 165	Ale- Filtro 11 5
.My. tuberculosis 333	Ale- Filtro 31 A 8
.My. tuberculosis 296	Ale- Filtro 35 A 3
.My. tuberculosis 162	Ale- Filtro 11 3
.My. tuberculosis 316	Ale- Filtro 29 9
.My. tuberculosis 154	Ale- Filtro 26 4
.My. tuberculosis 222	Ale- Filtro 30 A 4
.My. tuberculosis 503	Ale- Filtro 24 B 20
.My. tuberculosis 46	Ale- Filtro 35 B 3
.My. tuberculosis 177	Ale- Filtro 20 B 13
.My. tuberculosis 370	Ale- Filtro 26 10
.My. tuberculosis 218	Ale- Filtro 20 B 18
.My. tuberculosis 441	Ale- Filtro 36 B 9
.My. tuberculosis 352	Ale- Filtro 33 12
.My. tuberculosis 422	Ale- Filtro 25 B 7
.My. tuberculosis 54	Ale- Filtro 36 B 2
.My. tuberculosis 143	Ale- Filtro 11 10
.My. tuberculosis 131	Ale- Filtro 18 B 17
.My. tuberculosis 151	Ale- Filtro 18 B 18
.My. tuberculosis 277	Ale- Filtro 21 A 1



*: Paciente A; **: Paciente B

ANEXO 3 - 79 padrões genotípicos diferentes.

Perfis Genotípicos	Amostra	Tipo	Classificação
AAA#####	16	1	BEIJING
####A#####	21	806	EAI 1 som
#####	22	48	EAI 1 som
#####	27	25	CAS1_DELHI
#####	29	129	EAI5
#####	44	NC	U (órfão)
#####	45	33	LAM 3
#####	46	46	U (H)
#####	47	811	LAM 4
#####	48	71	S
#####	49	NC	LAM
#####	54	52	T2
#####	59	NC	LAM
#####	65	1211	S
#####	67	NC	Novo
#####	71	42	LAM 9
#####	77	702	EAI5
#####	81	NC	EAI5
#####	82	60	LAM 4
#####	85	NC	Novo
#####	87	20	LAM 1
#####	98	34	S
#####	110	53	T1
#####	114	50	H3
#####	126	794	CAS1_DELHI
#####	127	NC	EAI 1 som
#####	138	NC	LAM
#####	143	NC	Novo
#####	147	1873	LAM11_ZWE
#####	151	NC	EAI
#####	154	44	T5
#####	161	92	X3
#####	165	NC	Novo
#####	166	NC	EAI 1 som
#####	169	449	X1
#####	171	NC	Novo
#####	174	1076	LAM 9
#####	179	NC	HAARLEM
#####	180	73	T2-T3
#####	189	NC	EAI
#####	192	4	LAM3 and S/convergent
#####	208	815	LAM11_ZWE
#####	214	NC	Novo
#####	226	33	LAM3
#####	232	1202	T1
#####	249	47	H1
#####	251	62	H1
#####	257	524	H3
#####	266	NC	Novo
#####	269	70	X3
#####	270	719	T1
#####	283	236	EAI5
#####	294	NC	T
#####	298	1685	LAM 9
#####	307	NC	EAI 1 som
#####	320	707	S
#####	325	37	T3
#####	327	NC	EAI 1 som
#####	333	NC	T1
#####	337	93	LAM 5
#####	339	119	X1
#####	360	NC	Novo
#####	365	NC	EAI
#####	367	NC	EAI5
#####	370	120	T1
#####	374	1471	LAM11_ZWE
#####	383	583	MANU 2
#####	393	217	X1
#####	399	218	H1
#####	400	59	LAM 11_ZWE
#####	409	74	T1
#####	412	352	X1
#####	413	26	CAS1_DELHI
#####	420	1873	LAM11_ZWE
#####	422	NC	T1
#####	426	NC	LAM
#####	429	NC	T
#####	463	NC	EAI5
#####	506	NC	U (órfão)

NC: não compartilharam ao tipo de perfil depositado no banco de dados SpolDB4.

ANEXO 4 - 44 perfis genotípicos únicos

[illegible]

NC: não compartilharam ao tipo de perfil depositado no banco de dados SpolDB4.

ANEXO 5 – 16 agrupamentos por IS6110-RFLP e perfil de resistência

Agrupamento	Total	IS6110	Isolado	INH	SM	RIF	EMB
VIII	4	7	129	S	S	S	S
			194	S	S	S	S
			442	S	S	S	S
			444	S	S	S	S
X	2	13	86	S	S	S	S
			100	S	S	S	S
XI	2	8	426	S	S	S	S
			433	R	S	S	S
XII	6	12	90	S	S	S	S
			122	S	S	S	S
			155	S	S	S	S
			265	S	S	S	S
			395	S	S	S	S
			427	S	S	S	S
XIII	2	10	185	S	S	S	S
			261	S	S	S	S
XIV	3	14	126	S	S	S	S
			330	S	S	S	S
			469	S	S	S	S
XV	4	10	294	R	S	S	S
			312	S	S	S	S
			328	R	S	R	S
			347	S	S	S	S
XVI	2	13	320	S	S	S	S
			321	S	S	S	S
XVII	2	17	284	S	S	S	S
			299	S	S	S	S
XVIII	3	16	16	R	R	R	S
			136	S	S	S	S
			392	S	S	S	S
XIX	2	16	467	S	S	S	S
			500	S	S	S	S
XX	2	10	218	S	S	S	S
			441	S	S	S	S
XXI	2	11	131	S	R	S	S
			151	S	S	S	S
XXII	2	12	274	S	S	S	S
			287	S	S	S	S
XXIII	2	10	376	R	S	S	S
			461	S	S	S	S
XXIV	2	11	29	S	S	S	S
			189	S	S	S	S
42							

INH: isoniazida; SM: estreptomicina; RIF: rifampicina; BEM: etambutol; S: sensível; R: resistente

ANEXO 6 – 34 agrupamentos por “Spoligotyping” e perfil de resistência

Agrupamento	Total	Isolado	Classificação	Tipo	INH	SM	RIF	EMB
I	2	192	LAM3	4	S	S	S	S
		275	LAM3	4	S	S	S	S
II	19	16	BEIJING	1	R	R	R	S
		58	BEIJING	1	R	S	S	S
		84	BEIJING	1	S	S	S	S
		109	BEIJING	1	S	S	S	S
		136	BEIJING	1	S	S	S	S
		186	BEIJING	1	S	S	S	S
		198	BEIJING	1	S	S	S	S
		199	BEIJING	1	S	S	S	S
		276	BEIJING	1	S	S	S	S
		284	BEIJING	1	S	S	S	S
		288	BEIJING	1	S	S	S	S
		299	BEIJING	1	S	S	S	S
		301	BEIJING	1	S	S	S	S
		332	BEIJING	1	S	S	R	S
		392	BEIJING	1	S	S	S	S
		440	BEIJING	1	S	S	S	S
		442	BEIJING	1	S	S	S	S
		467	BEIJING	1	S	S	S	S
		500	BEIJING	1	S	S	S	S
III	2	266	Novo	NC	R	R	S	S
		495	Novo	NC	S	S	S	S
IV	2	208	LAM11_ZWE	815	S	S	S	S
		346	LAM11_ZWE	815	S	S	S	S
V	9	47	LAM 4	811	R	R	S	S
		79	LAM 4	811	S	S	S	S
		146	LAM 4	811	S	S	S	S
		195	LAM 4	811	S	S	S	S
		389	LAM 4	811	S	S	S	S
		401	LAM 4	811	S	S	S	S
		433	LAM 4	811	R	S	S	S
		438	LAM 4	811	S	S	S	S
		457	LAM 4	811	S	S	S	S
VI	3	147	LAM11_ZWE	1873	S	S	S	S
		185	LAM11_ZWE	1873	S	S	S	S
		261	LAM11_ZWE	1873	S	S	S	S
VII	2	251	H1	62	S	S	S	S
		291	H1	62	S	S	S	S
VIII	4	249	H1	47	S	S	S	S
		396	H1	47	S	S	S	S
		398	H1	47	S	S	S	S
		424	H1	47	S	S	S	S
IX	2	54	T2	52	S	S	S	S
		503	T2	52	R	R	S	S
X	17	110	T1	53	S	S	S	S
		129	T1	53	S	S	S	S

		149	T1	53	S	S	S	S
		175	T1	53	S	S	S	S
		176	T1	53	S	S	S	S
		177	T1	53	S	S	S	S
		194	T1	53	S	S	S	S
		218	T1	53	S	S	S	S
		222	T1	53	S	S	S	S
		224	T1	53	S	S	S	S
		238	T1	53	S	S	R	S
		296	T1	53	S	S	S	S
		324	T1	53	S	S	S	S
		352	T1	53	S	S	S	S
		366	T1	53	S	S	S	S
		441	T1	53	S	S	S	S
		444	T1	53	S	S	S	S
XI	2	114	H3	50	R	R	R	R
		135	H3	50	R	S	R	R
XII	4	154	T5	44	S	S	S	S
		162	T5	44	S	S	S	S
		267	T5	44	S	S	S	S
		316	T5	44	R	S	S	S
XIII	3	339	X1	119	S	S	S	S
		355	X1	119	S	S	S	S
		459	X1	119	S	S	S	S
XIV	4	180	T2-T3	73	S	S	S	S
		250	T2-T3	73	S	S	S	S
		373	T2-T3	73	R	S	S	S
		453	T2-T3	73	S	S	S	S
XV	2	320	S	707	S	S	S	S
		321	S	707	S	S	S	S
XVI	8	98	S	34	S	S	S	S
		113	S	34	S	S	S	S
		312	S	34	S	S	S	S
		338	S	34	S	S	S	S
		347	S	34	S	S	S	S
		411	S	34	R	R	R	S
		456	S	34	S	S	S	S
XVII	2	477	S	34	S	S	S	S
		294	T	NC	R	S	S	S
XVIII	3	328	T	NC	R	S	R	S
		48	S	71	R	R	S	S
XIX	2	124	S	71	S	S	S	S
		342	S	71	S	S	S	S
		270	T1	719	S	S	S	S
XX	9	473	T1	719	S	S	S	S
		45	LAM 3	33	S	S	S	S
		88	LAM 3	33	S	S	S	S
		115	LAM 3	33	S	S	S	S
		145	LAM 3	33	S	S	S	S
		211	LAM 3	33	S	S	S	S

		213	LAM 3	33	S	S	S	S
		452	LAM 3	33	S	S	S	S
		460	LAM 3	33	S	S	S	S
		474	LAM 3	33	S	S	S	S
XXI	18	71	LAM 9	42	S	S	S	S
		90	LAM 9	42	S	S	S	S
		119	LAM 9	42	S	S	S	S
		122	LAM 9	42	S	S	S	S
		155	LAM 9	42	S	S	S	S
		202	LAM 9	42	S	S	S	S
		209	LAM 9	42	S	S	S	S
		227	LAM 9	42	S	R	S	S
		265	LAM 9	42	S	S	S	S
		277	LAM 9	42	S	S	S	S
		311	LAM 9	42	S	S	S	S
		340	LAM 9	42	R	S	R	S
		344	LAM 9	42	S	S	S	S
		382	LAM 9	42	S	S	S	S
		395	LAM 9	42	S	S	S	S
		427	LAM 9	42	S	S	S	S
		476	LAM 9	42	S	S	S	S
		489	LAM 9	42	S	S	S	S
XXII	5	82	LAM 4	60	R	S	R	S
		86	LAM 4	60	S	S	S	S
		100	LAM 4	60	S	S	S	S
		239	LAM 4	60	S	S	S	S
		432	LAM 4	60	S	S	S	S
XXIII	2	426	LAM	NC	S	S	S	S
		501	LAM	NC	S	S	S	S
XXIV	2	87	LAM 1	20	R	S	S	S
		405	LAM 1	20	S	S	S	S
XXV	2	174	LAM 9	1076	S	S	S	S
		216	LAM 9	1076	S	S	S	S
XXVI	3	283	EAI5	236	R	R	R	S
		302	EAI5	236	S	S	S	S
		466	EAI5	236	R	S	R	S
XXVII	18	22	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		23	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		68	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		83	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		153	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		158	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		164	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		168	EAI_1 Som	48	R	R	R	S
		203	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		207	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		225	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		234	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		259	EAI_1 Som	48	R	S	S	S
		282	EAI_1 Som	48	S	S	S	S

		350	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		425	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		450	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
		454	EAI_1 Som	48	S	S	S	S
XXVIII	11	21	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		63	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		201	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		243	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		380	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		285	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		363	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		402	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		421	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		483	EAI_1 Som	806	S	S	S	S
		485	EAI_1 Som	806	#	#	#	#
XXIX	2	127	EAI_1 som	NC	S	S	S	S
		236	EAI_1 som	NC	S	S	S	S
XXX	16	77	EAI5	236	S	S	S	S
		94	EAI5	236	S	S	S	S
		131	EAI5	236	S	R	S	S
		132	EAI5	236	S	R	S	S
		262	EAI5	236	S	S	S	S
		274	EAI5	236	S	S	S	S
		287	EAI5	236	S	S	S	S
		313	EAI5	236	R	S	S	S
		317	EAI5	236	S	S	S	S
		336	EAI5	236	S	S	S	S
		364	EAI5	236	#	#	#	#
		376	EAI5	236	R	S	S	S
		428	EAI5	236	S	S	S	S
		461	EAI5	236	S	S	S	S
		462	EAI5	236	S	S	S	S
		490	EAI5	236	S	S	S	S
XXXI	3	67	Novo	NC	S	R	S	S
		240	Novo	NC	S	S	S	S
		290	Novo	NC	S	S	S	S
XXXII	2	269	X3	70	S	S	S	S
		480	X3	70	S	S	S	S
XXXIII	3	161	X3	92	S	S	S	S
		289	X3	92	S	S	S	S
		472	X3	92	S	S	S	S
XXXIV	3	126	CAS1_DELHI	794	S	S	S	S
		330	CAS1_DELHI	794	S	S	S	S
		469	CAS1_DELHI	794	S	S	S	S
XXXV	2	27	CAS1_DELHI	25	S	S	S	S
		252	CAS1_DELHI	25	S	S	S	S

193

INH: isoniazida; SM: estreptomicina; RIF: rifampicina; EMB: etambutol; S: sensível; R: resistente; NC: não compartilharam ao tipo de perfil depositado no banco de dados SPOLDB4; #: dados não obtidos.

ANEXO 8 – Aprovação Comitê de ética



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1801/2005

Registro CONEP: 12366 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 1512.0.146.000-05

Processo nº 25000.150953/2005-61

Projeto de Pesquisa: "Epidemiologia molecular e genética evolucionária do *Mycobacterium tuberculosis* isolados em São Paulo, Brazil e Maputo – Moçambique, correlação com fatos históricos."

Pesquisador Responsável: Dr^a. Alessandra Costa Panunto.

Instituição: UNICAMP.

Área Temática Especial: pesquisa com cooperação estrangeira.

Objetivos/justificativa

A pesquisa tem como objetivo geral verificar a filogenia das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* entre cepas do Estado de São Paulo e Maputo/Moçambique. Como objetivos específicos destacam-se: a) caracterizar os perfis genéticos das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* nas populações em estudo; b) detectar a presença de cepas multiresistentes circulantes nas regiões estudadas; c) correlacionar os dados obtidos com dados publicados utilizando as mesmas ferramentas moleculares, mesmos microorganismos e dados históricos para elucidar a disseminação da TB no Brasil.

A justificativa do estudo encontra-se no fato de Moçambique ser um país endêmico da AIDS e da tuberculose e não dispor de informações para efetuar o controle da Tuberculose. Os achados da pesquisa contribuirão para traçar uma possível filogenia entre as cepas do Estado de São Paulo e de Moçambique, podendo fornecer informações inéditas sobre a disseminação da tuberculose e conseqüentemente possibilitará o controle da doença, pois são poucos os dados que caracterizam geneticamente o MTB no Brasil.

Sumário

Trata-se de um estudo analítico sobre epidemiologia de micobactérias, sem envolvimento de sujeitos. Serão estudados três grupos de amostras de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de diversos materiais clínicos, sendo um pertencente à África: **Grupo A:** 300 cepas positivas para *Mycobacterium tuberculosis* sem restrição de sexo e idade, provenientes do Laboratório Central de Maputo/Moçambique, Universidade Mondlane, coletadas no período de 2002 a 2004 e dois grupos pertencentes ao Brasil. **Grupo B:** 87 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, sem restrição de sexo e idade, resistentes a Isoniazida provenientes do Instituto Adolfo Lutz, setor de micobactérias coletadas no período de 1999 a 2000 e **Grupo C:** 153 cepas positivas de *Mycobacterium tuberculosis*, sem restrição de sexo e idade, provenientes do Laboratório de Patologia Clínica da UNICAMP, setor de micobactérias coletadas no período de 1999 a 2004.

Em todos os materiais clínicos foram realizados baciloscopia corando-se as lâminas pela técnica de Ziehl-Neelsen e descontaminação das amostras (com exceção dos líquidos estéreis e sangue) pelo método de Petroff modificado. Todas as cepas foram

Cont. Parecer CONEP nº 1801/2005.

identificadas por PCR-RFLP do gene *hsp65* (STEINGRUBE *et al.*, 1995; DEVALLOIS *et al.* 1997; Rocha *et al.* 1999), onde o DNA foi extraído a partir do lisado bacteriano por choque-térmico, utilizando o protocolo descrito por Kasai *et al.* 2000. O programa computacional a ser utilizado será o Kodac Digital Science – ID Image Analyse Software Windows V. 3.0 (New Jersey – USA) para análise do PRA-PCR. A análise dos RFLP será no programa computacional Gel Compar e a análise estatística será realizada pela Comissão de Pesquisa – Estatística da UNICAMP.

O cronograma estabelece o período de outubro de 2005 a julho de 2007 para a realização do Estudo.

Consta o orçamento financeiro da pesquisa tendo como fonte dos recursos a UNICAMP. Consta também do protocolo o modelo do requerimento de isenção da apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE por tratar-se de pesquisa com microrganismos (cepas), previamente isoladas a partir de procedimentos de rotina para fins de diagnósticos realizados em laboratórios.

Comentários

A presente pesquisa é relevante sob o ponto de vista científico, considerando a sua casuística, os métodos utilizados e a perspectiva de achados inéditos que poderão contribuir para o controle da disseminação da tuberculose. Portanto, apesar de não envolver diretamente sujeitos de pesquisa, o conhecimento produzido trará benefícios para o ser humano e sua qualidade de vida. No que se refere aos aspectos éticos a pesquisa atende as exigências da Resolução CNS nº. 196/96, mas com relação à Resolução CNS nº 292/99 constatamos que o protocolo não contemple as exigências previstas no item II.2 da Resolução CNS nº. 292/99, qual seja explicitar as responsabilidades, os direitos e obrigações, mediante acordos entre as partes, considerando o envolvimento da África no estudo.

Recomendação:

A pesquisadora deverá esclarecer as condições e responsabilidades decorrentes do recebimento de materiais biológicos provenientes da África.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo com a recomendação acima descrita.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 22 de novembro de 2005.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS