

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/40640
IB/81495

INSTITUTO DE BIOLOGIA

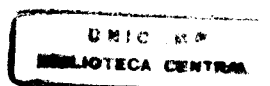
T/UNICAMP

OL4

MARIA SILEUDA MOREIRA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Mycobacterium tuberculosis OBTIDOS DE INTERNOS EM
INSTITUIÇÕES CORRECIONAIS DE CAMPINAS, SP, E A
TRANSMISSÃO DA TUBERCULOSE NESSAS INSTITUIÇÕES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CAMPINAS-SP
1999



MARIA SILEUDA MOREIRA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Mycobacterium tuberculosis OBTIDOS DE INTERNOS EM
INSTITUIÇÕES CORRECIONAIS DE CAMPINAS, SP, E A
TRANSMISSÃO DA TUBERCULOSE NESSAS INSTITUIÇÕES**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Maria Sileuda Moreira
de Oliveira
aprovada pela Comissão Julgadora.
07/12/99 *[assinatura]*

Dissertação apresentada ao Curso de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na Área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CAMPINAS-SP
1999

UNIDADE	I.B
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	40640
PROC.	278700
C	☐
D	☒
PREÇO	511,00
DATA	18/03/00
N.º CPD	

CM-00139029-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Oliveira, Maria Sileuda Moreira de

- OL4c** Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos de internos em Instituições correcionais de Campinas, SP, e a transmissão da tuberculose nessas Instituições/Maria Sileuda Moreira de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n.] 1999.
136f: illus.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

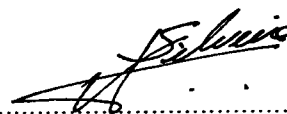
1.Tuberculose. 2.Biologia molecular. 3.Genetica molecular.
4.Genetica microbiana. I.Silveira, Wanderley Dias da. II.Universidade
Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 07/12/1999.

Banca Examinadora

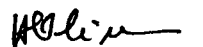
Titulares:

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
(Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Helenice Bosco de Oliveira



Assinatura

Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci



Assinatura

Suplente:

Profa. Dra. Maria Luiza Moretti Brancchini

Assinatura

**Ao meu marido, José Uilo
e à minha filha Amanda,**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho e, em especial, às seguintes pessoas e instituições:

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (Departamento de Microbiologia e Imunologia - IB/UNICAMP), pela orientação e apoio na realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Helenice Bosco de Oliveira (Departamento de Medicina Preventiva e Social – FCM/UNICAMP), pelo empenho, co-orientação e apoio para a realização do presente trabalho.

À Dra. Marilu Moscardini Mendes Rocha (Departamento de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz de Campinas), por nos permitir acesso às instalações e equipamentos daquele Instituto durante a fase de obtenção das culturas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizadas no presente trabalho.

À Dalva Cristina Girello Aily (Depto. de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz de Campinas) pela organização, dedicação e ajuda, na obtenção das culturas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Ao Dr. Thomaz Celidonio Gomes dos Reis, Diretor Geral da antiga Casa de Detenção (Penitenciária III), por nos permitir o acesso às instalações daquela Instituição.

Agradeço também às seguintes pessoas da Casa de Detenção: Maria Luiza da Costa Gabriel, Luiz Fernando Paulo da Silva, Maria Amélia Moreno Manarini, Telma Barbosa de Moura e às pessoas do Departamento de Cadastro, pela inestimável ajuda durante a fase de coleta dos dados (cadastrais e epidemiológicos) de todos os presidiários.

Aos agentes de saúde de todos os presídios participantes do presente trabalho, agradecemos a colaboração no envio de amostras ao Instituto Adolfo Lutz de Campinas, bem como pela atenção durante nossos contatos.

Aos colegas do Laboratório de Genética Bacteriana do Depto. de Microbiologia e Imunologia da Unicamp, Marcelo Lancelloti e Alessandra Ferreira, pela ajuda e apoio durante a realização do presente trabalho.

À FAPESP, pela concessão da Bolsa de Estudo.

Ao CNPq e à FAEP pelo apoio financeiro.

Sumário

	Página
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	11
Resumo	13
1 - Introdução	15
2 - Objetivos	18
3 - Revisão Bibliográfica	19
3.1 - Caracterização de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
3.2 - A Tuberculose	20
3.3 - Medidas da Tuberculose	22
3.4 - Co-Infecção por HIV e <i>M. tuberculosis</i>	27
3.5 - A Tuberculose em Instituições Correcionais	30
3.6 - Epidemiologia Molecular e Identificação de <i>Mycobacterium</i>	33
3.6.1 - Histórico	33
3.6.2 - Marcador Molecular <i>IS6110</i>	36
3.6.3 - Tuberculose e Técnicas de PCR, RFLP e DRE-PCR	40
4 - Material e Métodos	45
4.1 - Amostras utilizadas	45
4.2 - População Estudada	47
4.3 - Levantamento Epidemiológico	47
4.4 - Obtenção de Culturas de <i>M. tuberculosis</i>	47
4.5 - Obtenção do DNA Genômico	49
4.5.1 - Concentração do DNA genômico	51
4.5.2 - Eletroforese do DNA extraído	51
4.6 - Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	52
4.7 - DRE-PCR	55
4.8 - Eletroforese do DNA amplificado	56
4.9 - Digestão do DNA genômico	57
4.10- Southern blotting	57
4.10.1 - Eletroforese Gel de Agarose	57
4.10.2 - Transferência do DNA	58
4.10.3 - Construção da sonda molecular	60
4.10.4 - Hibridização	61
4.11- Análise dos Resultados	61

4.11.1 - Análise do RFLP	62
4.11.2 - Análise do DRE-PCR	62
4.11.3 – Análise do Levantamento Epidemiológico	63
5 - Resultados	64
5.1 - Culturas de <i>M. tuberculosis</i>	64
5.2 - Reação de Polimerização em Cadeia-PCR	64
5.3 - Hibridização e DRE-PCR	66
5.4 - Levantamento Epidemiológico	74
5.4.1 - Características clínicas e epidemiológicas.....	74
5.4.2 - História de Vida carcerária dos detentos	81
6 - Discussão	83
7 - Conclusão	95
Abstract	96
8 - Referências Bibliográficas	98
 Anexo I - Ficha de Notificação da Tuberculose	 119
 Anexo II - História de vida carcerária dos detentos	 122
 Anexo III - Recomendações para controle da tuberculose nas prisões	 124
 Anexo IV – Soluções utilizadas	 128

Lista de Figuras:

Figura 1 – Sequências de DNA do elemento <i>IS6110</i> com sinalização dos locais para síntese dos iniciadores <i>IS1</i> , <i>IS2</i> e <i>IS3</i>	53
Figura 2 - Eletroforese gel de agarose 1,8% do DNA e amostras de <i>M. tuberculosis</i> amplificadas através da técnica de PCR com o uso dos iniciadores <i>IS1</i> com <i>IS3</i> (2) ou <i>IS2</i> com <i>IS3</i> (3, 4, 5 e 6)	65
Figura 3 - Dendrograma apresentando os grupos de linhagens obtidos pela técnica de RFLP	69
Figura 4 - Perfil de Bandas de fragmentos de DNA genômico amplificados com o uso da técnica de DRE-PCR: Grupos de Linhagens obtidos	70
Figura 5 - Perfil de Bandas de fragmentos de DNA genômico amplificados com o uso da técnica de DRE-PCR: Grupos de Linhagens obtidos	71
Figura 6 - Dendrograma apresentando os grupos de linhagens obtidos pela técnica de DRE-PCR	73

Lista de Tabelas

Tabela I - Linhagens de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizadas	45
Tabela II - Perfil de Bandas obtido com o uso da Técnica RFLP	67
Tabela III - Padrão de Bandas obtido segundo a Técnica de RFLP	68
Tabela IV - Padrão de Bandas obtido segundo a técnica DRE-PCR	72
Tabela V - Presidiários com Tuberculose, segundo a unidade prisional ...	74
Tabela VI - Presidiários com Tuberculose, segundo a faixa etária	75
Tabela VII - Presidiários com Tuberculose, segundo a escolaridade	76
Tabela VIII - Presidiários com Tuberculose, segundo tratamento anterior	76
Tabela IX - Presidiários com Tuberculose, segundo o início dos sintomas ao tratamento	77
Tabela X- Presidiários com Tuberculose, segundo o intervalo da primeira consulta ao tratamento	78
Tabela XI - Presidiários com Tuberculose, segundo a unidade prisional e doenças associadas	79

Tabela XII – Presidiários com Tuberculose, segundo a forma clínica diagnosticada e o Anti-HIV.....	79
Tabela XIII – Presidiários com Tuberculose, segundo o exame de Raio X de tórax e a Baciloscopia de escarro	80
Tabela XIV - Presidiários com Tuberculose, segundo a Hospitalização....	81
Tabela XV - Histórico de Vida Carcerária dos pacientes fornecedores de amostras formadoras dos “cluster patterns”.....	82

Resumo

Com o objetivo de se detectar linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* causadoras de tuberculose dentro de Penitenciárias de Campinas, SP, Brasil, bem como a transmissão desta doença entre os detentos, foram analisadas, usando-se restriction fragment length polymorphism (RFLP) e também a técnica double-repetitive-element (DRE-PCR), 52 amostras desta espécie bacteriana, isoladas de escarros de 40 presidiários com sintomas clínicos de tuberculose, no período de fevereiro/97 a setembro/98. Realizou-se levantamento epidemiológico utilizando-se informações contidas nas Fichas de Notificação da Tuberculose e também dados cadastrais dos presos, com o intuito de se relacionar esses dados com os resultados obtidos através das técnicas de Biologia molecular.

A técnica de RFLP, onde usou-se como sonda molecular a sequência de inserção *IS6110*, revelou 30 padrões de restrição. Destes, 12 grupos apresentaram-se com distribuição idêntica de bandas, sendo que os demais apresentaram padrões de bandas únicos. Entre os 12 grupos que apresentaram idêntica distribuição de bandas, oito são “cluster patterns”. A técnica de DRE-PCR classificou as amostras em 25 padrões de

agrupamento, estando aí inclusos 12 grupos com a mesma distribuição de bandas e sendo que, destes, 10 são “cluster patterns”.

A existência de linhagens de *M. tuberculosis* idênticas, em detentos diferentes, associada aos achados através do levantamento epidemiológico, indicam a transmissão da doença tuberculose entre os mesmos.

1 - Introdução

A tuberculose é uma doença altamente contagiosa que é transmitida principalmente de pessoa a pessoa (Hermans *et al.*, 1990a) e que voltou a apresentar grande importância epidemiológica (Kolk *et al.*, 1992).

A fala, o espirro e, principalmente, a tosse de um doente de tuberculose pulmonar, lançam no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados. As gotículas mais pesadas se depositam rapidamente e as mais leves permanecem em suspensão no ar, ou porque são pequenas ou porque sofrem evaporação. Somente os núcleos secos das gotículas (núcleos de Wells) com diâmetros de até 5μ e com um a dois bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos pulmonares e aí iniciar a multiplicação. As gotículas médias são, na sua maioria, retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios através do mecanismo muco-ciliar. Os bacilos assim removidos são deglutidos e inativados pelo suco gástrico. Os bacilos que se depositam nas roupas, lençóis, copos e outros objetos dificilmente se dispersarão em aerossóis, e por isto, não desempenham papel importante na transmissão (Brasil, Ministério da Saúde, 1994a).

É estimado que um bilhão e setecentos milhões de pessoas estejam infectadas com *Micobacterium tuberculosis*, o que representa um

terço da população mundial, além de ser este microorganismo o responsável por cerca de três milhões de mortes ao ano, o que representa um quarto de todas as mortes preveníveis (Ross *et al.*, 1992).

A tuberculose permanece um problema de saúde nas prisões onde o ambiente, devido a condições como a superlotação e ausência de ventilação adequada, se torna favorável à transmissão da infecção pelo ar, entre seus habitantes: presidiários e funcionários de repartições e também para os visitantes (Stead, 1978; Snider & Hutton, 1989).

Como é considerada a doença de maior problema de saúde mundial, várias e recentes estatísticas sugerem que, em muitos países, medidas para seu controle foram ineficientes (Ross *et al.*, 1992). Nesse sentido, sua detecção precoce é de grande importância para o controle uma vez que é a doença infecciosa que mata mundialmente mais pessoas do que qualquer outra doença infecciosa sozinha (Bloom & Murray, 1992; Tala & Kochi, 1991).

Estudos epidemiológicos com técnicas que diferenciem rapidamente linhagens de *M. tuberculosis*, são importantes pois contribuem limitando a disseminação da doença uma vez que diagnósticos convencionais da tuberculose dependem de isolamento, identificação e testes bioquímicos da

bactéria, com procedimentos que requerem de quatro a oito semanas (Otal *et al.*,1991).

2 - Objetivos

1 - Determinar, através de técnicas de Biologia Molecular (PCR, RFLP e DRE-PCR), a variabilidade existente entre diferentes isolados de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos a partir de material (escarro) proveniente de pacientes das Instituições Correcionais de Campinas-SP, no período de fevereiro/97 a setembro/98.

2 - Descrever as características clínicas e epidemiológicas destes pacientes.

3 - Averiguar a ocorrência da transmissão da doença tuberculose dentro dessas Instituições.

4 - Sugerir medidas epidemiológicas que possam ser utilizadas no controle da tuberculose dentro das prisões.

3 – Revisão Bibliográfica

3.1 – Caracterização do *Mycobacterium tuberculosis*

As micobactérias pertencem à Ordem *Actinomicetales*, Família *Mycobacteriaceae*, sendo a *Mycobacterium tuberculosis* a espécie-tipo do gênero (Brasil, Ministério da Saúde, 1994b). O gênero *Mycobacterium* é constituído por bacilos aeróbicos, com tempo de crescimento normalmente lento, mas variável de acordo com a espécie, sendo que *Mycobacterium tuberculosis* juntamente com *Mycobacterium avium-intracellulare* tem crescimento muito lento (três a oito semanas de incubação); exceção a esta característica de crescimento é o *Mycobacterium leprae* que não cresce “in vitro”. Outras características do gênero: são patógenos intracelulares, não formadores de esporos, imóveis e com tamanho variando de 0,2-0,6 x 1-10 µm. A parede celular destes bacilos é rica em lipídios, o que faz com que a sua superfície seja hidrófoba e os mesmos resistentes a muitos desinfetantes e aos corantes da coloração de Gram, usualmente utilizados em laboratórios. Uma vez corados (coloração de Ziehl-Neelsen), os bacilos são refratários à descoloração com soluções ácidas e alcoólicas o que originou a denominação de **Bacilos Alcool-Ácido Resistentes**. Dentro deste gênero,

41 espécies foram descritas, sendo que pelo menos 27 delas são espécies que foram originalmente isoladas a partir de material clínico humano. Apesar do grande número de espécies, mais de 95% de todas as infecções humanas são causadas por seis espécies ou grupos: *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansaii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. leprae*. Entre estas, *M. tuberculosis* é a principal espécie patogênica, sendo responsável pela tuberculose em humanos (Murray *et al.*, 1994).

3.2 - A Tuberculose

A tuberculose, causada pela espécie *M. tuberculosis*, é a doença humana clássica causada por micobactérias. A destruição de tecidos e fibrose características observadas são causadas pela resposta imune do hospedeiro à infecção. A rota de infecção é a inalação dos aerossóis infectados, os quais alcançam as terminações das vias respiratórias. Após o englobamento por macrófagos alveolares, estes patógenos intracelulares replicam-se livremente no interior das células por serem capazes de se evadirem da destruição fagocitária através da inibição da fusão entre o fagossomo e o lisossomo. Os fagócitos infectados são destruídos e as bactérias liberadas são, novamente, englobadas por novos macrófagos, o que faz com que o ciclo se repita.

Embora a fagocitose seja iniciada por macrófagos alveolares, macrófagos circulantes e linfócitos são atraídos ao foco infeccioso devido à presença dos bacilos, restos celulares e fatores quimiotáticos dos hospedeiros (p.e., o componente C5a do complemento). A histologia característica deste foco infeccioso mostra a formação de células gigantes, multinucleadas, que resultam da fusão de diferentes macrófagos. Essas células gigantes são denominadas *células de Langerhans*. Macrófagos infectados podem, nesta fase da infecção, alcançar os linfonodos locais, a corrente sanguínea e outros tecidos (p.e., medula óssea, baço, rins, ossos e sistema nervoso central) disseminando-se pelo organismo. Duas a quatro semanas após o processo infeccioso ter-se instalado, citocinas derivadas de células T CD4 ativam os macrófagos circulantes, tornando-os capazes de matar as células bacterianas. Se uma pequena quantidade de antígeno está presente (poucas bactérias) no momento em que os macrófagos são ativados, os bacilos são destruídos com dano tecidual mínimo. Contudo, se um grande número de bacilos está presente no foco infeccioso, a resposta imune celular será muito intensa a ponto de causar no hospedeiro uma necrose tecidual. A efetividade da eliminação da infecção, além de depender do tamanho do foco da infecção, depende de múltiplos fatores do hospedeiro como: toxicidade da citocina liberada, ativação local do sistema complemento, isquemia, exposição a

enzimas hidrolíticas derivadas dos macrófagos e intermediários tóxicos do oxigênio. Os granulomas, isto é, agrupamentos de macrófagos ativados, previnem a disseminação posterior da doença uma vez que os bacilos ficam retidos no seu interior. Diferentes macrófagos podem penetrar em pequenos granulomas (menores do que 3 mm) e matar todos os bacilos. Contudo, granulomas caseosos grandes tornam-se encapsulados por fibrina o que, efetivamente, protege os bacilos de serem mortos pelos macrófagos. Neste estágio, os bacilos podem permanecer quiescentes e serem reativados anos depois quando o estado imunológico do hospedeiro diminui ou devido à idade, doença imunossupressiva ou por causa de terapia (Murray *et al.*, 1994).

3.3 – Medidas da Tuberculose

As micobactérias são causa significativa de morbidade e mortalidade, particularmente em países subdesenvolvidos (Murray *et al.*, 1994) sendo o *M. tuberculosis* a espécie cultivável de maior importância médica por ser o agente etiológico da tuberculose (Brasil, Ministério da Saúde, 1994a); assim como é o principal microorganismo isolado, responsável por mortes em todo o mundo (Dolin *et al.*, 1994).

A transmissão da tuberculose nos países desenvolvidos, era um fenômeno esporádico, usualmente limitado a um pequeno número de famílias ou a pessoas confinadas em associações fechadas (Reves *et al.*, 1981) e até o início da década passada, podia ser usada como um indicador de subdesenvolvimento (Campos, 1996) já que 95% de todos os novos casos e mortes por esta doença ocorriam em países em desenvolvimento (Snider & Hutton, 1993).

No entanto, pouco mais de uma década depois, Rook & Stanford, (1996) já citavam que a tuberculose matava, anualmente, mais de três milhões de pessoas, sendo que o problema estava aumentando rapidamente apesar da resposta imunológica ser perfeitamente capacitada a erradicar este tipo de infecção. Ainda segundo estes autores, antes aparecimento do HIV somente 5% dos indivíduos afetados desenvolviam a tuberculose e talvez outros 5% também, quando estavam comprometidas as funções das células T pelo envelhecimento, estresse ou desnutrição protéica. Portanto, 90% da população deve apresentar resistência em circunstâncias normais.

Por ser a tuberculose, uma doença com profundas raízes sociais sempre foi prevalente em áreas onde havia fome, miséria e más condições de moradia, ao mesmo tempo em que sua magnitude era reduzida

significativamente nas regiões onde estes fatores eram progressivamente extintos (World Health Organization, 1993; Brasil, Ministério da Saúde, 1994a). A partir da década de 80 a disseminação da AIDS pelo mundo alterou essa situação, assim, nos países onde a tuberculose era considerada controlada, como nos países escandinavos e Holanda, passaram a apresentar tendências preocupantes de aumento do número de casos (Selwin *et al.*, 1989). Nos países africanos, onde a tuberculose nunca deixou de ser um grave problema de Saúde Pública, passaram a ocorrer números ainda mais alarmantes (Narain *et al.*, 1992). Na Europa, a incidência desta doença aumentou devido a fatores como: imigração, deteriorização da infraestrutura da saúde pública, acesso limitado aos serviços médicos e à epidemia do HIV (Barnes *et al.*, 1991; Laguna *et al.*, 1991) sendo que amostras de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas emergiu como um dos principais problemas entre pessoas infectadas pelo HIV em Nova York e na Flórida (CDC, 1992). Nos EUA, o aumento do número de casos de tuberculose esteve aliado, também, à desestruturação dos serviços de saúde. Foi verificado por Braun *et al.* (1989) que, de 1985 até aquele ano (1989), ocorreram onze surtos de tuberculose em oito Estados norte americanos e que teria havido um aumento da proporção de tuberculose em certos bolsões

demográficos fazendo com que o declínio na incidência de tuberculose nos EUA parasse.

Segundo Rieder *et al.* (1989a), para os últimos 30 anos, era esperado nos EUA um declínio anual de 8,3% no risco de infecção por *M. tuberculosis*. No entanto, nesse período, houve um declínio de apenas 5% a 6%. Ainda assim, o seu declínio não foi uniforme entre todos os segmentos da população. O maior declínio foi observado em crianças de cinco a 14 anos e o menor declínio foi observado nas pessoas de idade avançada. Entre adultos, o declínio foi maior entre brancos do que entre outros grupos raciais. Em 1980, o risco de infecção anual por tuberculose na população geral nos EUA era estimado ser tão baixo quanto 1:10,000 sendo que ele era sempre maior quando se consideravam pessoas que conviviam em ambientes fechados, com outras pessoas que desenvolveram a doença (Rieder *et al.*, 1989a).

Como a distribuição geográfica da tuberculose guarda íntima relação com os índices sócio-econômicos das diversas nações, suas taxas de incidência são mais baixas nos países desenvolvidos e bem mais altas naqueles cuja população está sujeita à desnutrição e às más condições de habitação. Na maioria dos países desenvolvidos o risco de infecção da tuberculose é da ordem de 0,1 a 0,3% sendo que em alguns desses países é

até menor. No Brasil, em 1990, o risco de infecção da tuberculose, variou de 0,3% a 1,0% nas diversas regiões brasileiras, guardando estreita correlação entre este indicador e as condições sócio-econômicas (Brasil, Ministério da Saúde, 1994a).

A intensidade do contato é uma das condições que fazem com que a tuberculose esteja tão associada à população de baixa renda. Nessa camada social, famílias numerosas convivem muito proximamente em casas pequenas, mal ventiladas e úmidas (Brasil, Ministério da Saúde, 1994a).

Em abril de 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou documento considerando a tuberculose uma emergência global. Segundo essa entidade, a tuberculose é a maior causa de morte entre as doenças infecciosas causadas por um único agente; perto de 30 milhões de pessoas morrerão por tuberculose nesta década sendo que 40% das mortes seriam evitáveis pela implementação de programas de controle efetivos. É uma doença na qual, entre adultos, a relação custo/benefício é das mais baixas; o custo do tratamento é relativamente baixo, cerca de US\$ 30 em muitos países (World Health Organization, 1993). No Brasil, observa-se queda progressiva da qualidade da atenção médica dispensada à população, pela rede pública de saúde nos últimos anos, com conseqüente piora do atendimento ao

paciente apresentando a doença. Com isso, a proporção de curas vem caindo e a de abandonos, subindo (Aiub & Gerhardt 1993).

3.4 - Co-Infecção por HIV e *Mycobacterium tuberculosis*

A infecção pelo HIV, que deprime o Sistema Imunológico do homem, é um importante fator de risco para a progressão da infecção tuberculosa. Existem indícios de que 5% a 10% dos co-infectados pelo *M. tuberculosis* e pelo HIV desenvolvem a tuberculose a cada ano, enquanto o mesmo ocorre em apenas 0,2% dos infectados apenas pelo *M. tuberculosis* (Dolin *et al.*, 1993). Além de facilitar a morbidade, a infecção pelo HIV causa problemas no diagnóstico da tuberculose. Segundo a Organización Mundial de La Salud (1989), a radiografia de tórax desses pacientes pode aparecer como normal ou quase normal por vários dias; a baciloscopia inicialmente aparece como negativa e as formas clínicas extrapulmonares podem apresentar manifestações não habituais como tuberculomas intracranianos. O tratamento também é afetado pelo HIV pois o tempo total da quimioterapia deve ser maior, com conseqüente aumento do custo e dos riscos da toxicidade (Selwyn *et al.*, 1989).

Em adição às implicações clínicas de cuidados ao paciente, o aumento do risco de contrair tuberculose em pacientes HIV soropositivos sugere que pode existir um risco adicional de transmissão horizontal da tuberculose entre membros da família, trabalhadores da saúde e outros contactantes não íntimos (Selwin *et al.*, 1989).

Assim, a cada ano, oito milhões de pessoas são infectadas pelo bacilo da tuberculose em todo o mundo e os co-infectados pelo bacilo e pelo HIV têm 25 vezes mais chances de desenvolver doença potencialmente fatal; cepas resistentes de micobactérias estão surgindo porque não se adotam medidas efetivas para assegurar o cumprimento total e regular do tratamento por parte dos doentes (Selwyn *et al.*, 1989; Brown, 1993).

Várias evidências epidemiológicas sugerem que a epidemia do HIV é uma das importantes causas básicas do ressurgimento da tuberculose (Daley *et al.*, 1992). Em Nova York, cidade com um grande número de pacientes com AIDS, o número de registro de casos de tuberculose aumentou em 68% (de 1514 em 1980 para 2545 em 1989) (Barnes *et al.*, 1991). Segundo Skolnick (1989), de 71 pacientes com tuberculose que apresentaram-se em Miami, Flórida, 31% eram HIV soropositivos. Ainda segundo este autor, um estudo de pacientes não-Asiáticos com tuberculose em São Francisco, Califórnia, demonstrou que 29% dos pacientes que

concordaram ser testados eram HIV positivos. Em Seattle, Washington, 23% de todos os pacientes com tuberculose com idades entre 20 e 50 anos, que concordaram ser testados, eram positivos para HIV e, em Nova York, 42% dos pacientes masculinos com tuberculose que eram admitidos em hospitais públicos, com idades entre 25 e 44 anos eram HIV positivos (Skolnick, 1989).

Enquanto eram registrados 22.436 novos casos de tuberculose em 1988, uma estimativa mostrava que 10 a 15 milhões de pessoas nos EUA estavam infectadas com *M. tuberculosis*. Muitos desses infectados faziam parte de outra estimativa que demonstrava ser de um a cinco milhões o número de pessoas nos EUA infectadas com o HIV. A extensão da sobreposição dessas duas infecções não é conhecida (Skolnick, 1989).

Rieder *et al.* (1989b), demonstraram que a incidência da tuberculose aumenta com a idade entre todas as raças e grupos étnicos. Podem ocorrer diferenças atribuíveis aos riscos da infecção para a tuberculose porque a pessoa, uma vez infectada, tem a mesma probabilidade quanto ao risco da progressão para a tuberculose, independente de raça, sexo ou localização geográfica. Ainda segundo estes autores, o HIV é um fator fortíssimo, capaz de promover a progressão de infecções (por *M. tuberculosis*) até a doença tuberculose. Pacientes com o sistema

imunológico comprometido formam uma população selecionada, com grande probabilidade de adoecerem de tuberculose, já que esta doença pode ser resultante tanto de infecções recentes como passadas (Murray *et al.*, 1994).

3.5 - A Tuberculose em Instituições Correcionais

O número de casos de tuberculose relatados em Instituições Correcionais apresentou um aumento dramático quando comparado com o da década passada. Somente o aumento populacional nessas instituições não explica a incidência altíssima dos casos de tuberculose nas prisões. Outra razão importante que pode determinar esta alta incidência é a transmissão da infecção da tuberculose dentro dessas instituições. Ficou demonstrado um drástico aumento no número de casos, (Braun *et al.*, 1989), onde o paciente apresentava associação com AIDS. O aumento no número de casos pode ser atribuído também aos grupos de risco (Snider & Hutton, 1989) que, nestas instituições são representados por homens com idades entre 18 e 44 anos.

Numa inspeção de casos de tuberculose relatados por 29 repartições de saúde nos EUA, durante 1984 e 1985, a incidência de tuberculose entre os internos de Instituições Correcionais era três vezes

maior do que para pessoas não encarcerados com idades entre 15-64 anos (Stead, 1978; Braun *et al.*, 1989; Snider & Hutton, 1989).

Bergmire-Sweat *et al.*(1996), realizaram estudo em prisão para pessoas com problemas mentais, no Texas, em 1994, na qual estava ocorrendo um grande surto de tuberculose. Embora houvesse controle para prevenir a tuberculose no local, esse controle foi inadequado. Técnicas de Biologia molecular evidenciaram que havia grupos de pacientes com a mesma linhagem de *M. tuberculosis*, o que demonstrou a transmissão da doença dentro da Instituição, embora tenha ficado demonstrado também a ocorrência de infecções recentes.

Segundo Braun *et al.*(1989) entre Complexos do Sistema Presidiário de Nova York, a incidência de tuberculose aumentou de uma média anual de 15,4/100,000 durante 1976 a 1978, para 105,5/100,000 em 1986. Em Nova Jersey, dados obtidos do seu Departamento de Saúde revelaram que, durante 1987, a incidência de tuberculose entre habitantes do sistema correcional era de 109,9/100.000; um índice onze vezes maior do que para a população geral naquele ano (Braun *et al.*, 1989).

Na Califórnia, dados obtidos pelo seu Departamento de Correção, mostraram que a incidência de tuberculose entre seus ocupantes

durante 1987 era de 80,3/100,000, uma proporção equivalente a seis vezes à da população geral da Califórnia para aquele ano (CDC, 1989).

Conforme Skolnick (1989), uma avaliação feita em 1983 pelo CDC (Centro de Controle de Doenças) em Instituições Correcionais constatou que somente 33 Estados separavam presidiários que chegavam e somente seis Estados retestavam periodicamente os infectados por tuberculose, fato que demonstrou a importância de haver uma padronização nas ações que visam a prevenção e controle sobre essa doença.

Em resposta ao alarmante aumento dos índices de tuberculose em muitas das prisões nacionais, o Centro de Controle de Doenças (CDC, 1989), Atlanta, publicou recomendações para a prevenção e controle da tuberculose entre a população desses locais. Conforme Skolnick (1989), essas normas incluem: registros de vigilância com identificação e relato de todos os casos de tuberculose. Recomendações para tratamento apropriado e isolamento, prevenindo-se, assim, transmissões adicionais. As normas evidenciam a importância da colaboração dos diversos setores da Saúde Pública que devem ajudar na instrução de funcionários das prisões e para que façam o acompanhamento de prisioneiros infectados, após sua libertação, assim como de pessoas não encarceradas que tiveram contato com prisioneiros ou funcionários infectados. As recomendações também

ressaltam que as prisões devem reduzir as aglomerações e melhorar seu sistema de ventilação fazendo com que o ambiente não seja favorável à transmissão da tuberculose.

Segundo Oliveira (1997) ocorreram, entre janeiro de 1993 e dezembro de 1996, 165 casos de tuberculose em prisioneiros do sistema carcerário de Campinas, SP, sendo que, destes, 132 são novos casos, que representaram uma incidência de 971/100.000 naquele período.

3.6 - Epidemiologia Molecular e Identificação de *Mycobacterium*

3.6.1 – Histórico:

Nos últimos anos, investigações envolvendo epidemiologia e patogenicidade utilizaram várias técnicas derivadas da imunologia, bioquímica e genética; esses estudos são geralmente referidos coletivamente como *Epidemiologia Molecular* (Maslow *et al.*, 1993).

Embora vários métodos tradicionais de identificação bacteriana tenham sido avaliados no diagnóstico de *Mycobacterium*, entre os quais incluem-se testes bioquímicos (Chiodini, 1986) e cromatografia gasosa (Chiodini & Van Kruiningen, 1985; Tisdall *et al.*, 1982) apenas recentemente

testes moleculares começaram a ser utilizados com esta finalidade. Entre os testes moleculares utilizados na identificação de *Mycobacterium* e determinação da variabilidade intra-específica encontra-se, a análise de fragmentos polimórficos obtidos com enzimas de restrição (RFLP) e a reação da síntese de DNA em cadeia (PCR) de sequências específicas de DNA (Clark-Curtiss & Gerald, 1989; Pineda-Garcia, Ferreira & Hoffner, 1997; Sola *et al.*, 1997, 1998; Tabet *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Kox *et al.*, 1994; Eisenach *et al.*, 1986; Thierry *et al.*, 1990b; Haas *et al.*, 1993; Linton *et al.*, 1994), entre outros. Esses testes moleculares demonstraram ser, além de espécie-específicos para as diferentes espécies estudadas e para diferentes linhagens dentro de uma espécie, mais rápidos, eficientes e confiáveis, sendo utilizados na identificação das vias de transmissão da tuberculose em comunidades (Genewein *et al.*, 1993).

A premissa básica em alguns sistemas de tipagem é que isolados epidemiologicamente relacionados são derivados de uma expansão clonal de um único precursor; consequentemente, separa os não relacionados epidemiologicamente já que esses possuem características diferentes. Os últimos reflexos das divergências evolutivas genéticas surgiram ao acaso; mutações não letais que acumularam-se com o passar do tempo. Assim, mutações são detectáveis se elas ocorrem em posições que podem ser

analisadas (por exemplo num gene codificado por uma enzima metabólica). Com o desenvolvimento de técnicas moleculares altamente sensíveis, a capacidade de detectar variações pequenas aumentou substancialmente (Maslow *et al.*, 1993).

Muitas dessas técnicas são altamente sensíveis e sofisticadas (como a de RFLP), detectando variações genotípicas entre membros do complexo *M. tuberculosis* e *M. avium* subespécie *paratuberculosis* e linhagens *M. leprae* (Clark-Curtiss & Gerald, 1989;).

No passado, as provas de transmissão da tuberculose eram baseadas nas ocorrências de surtos epidêmicos (Nolan *et al.*, 1991), transmissão de linhagens relacionadas com características de resistência e conversão de teste tuberculínico após exposição a um caso ativo (Reves *et al.*, 1981). Mais recentemente, técnicas de Biologia molecular comprovaram precisão na determinação de linhagens de *M. tuberculosis* relacionadas e na avaliação de diferentes surtos epidêmicos (van Embden *et al.*, 1993). Estas técnicas têm sido empregadas não como ferramentas confirmatórias na investigação de surtos epidêmicos, mas como ferramentas sistemáticas para identificar as relações inter-linhagens e transmissão dentro de uma população definida (Genewein *et al.*, 1993).

3.6.2 – Marcador Molecular *IS6110*

Estudos epidemiológicos de tuberculose podem ser facilitados pela detecção de marcadores específicos presentes nas diferentes linhagens. A descoberta de elementos de transposição em *M. tuberculosis* demonstrou que a presença destes elementos específicos poderia ser utilizada na diferenciação de linhagens (van Embden *et al.*, 1993). A existência de elementos DNA-repetitivos em *M. tuberculosis* e seu potencial para uso na identificação dessa micobactéria foi relatada independentemente por Eisenach *et al.* (1988) e por Zainuddin & Dale (1989).

Segmentos repetitivos de DNA são encontrados em virtualmente todos os organismos procarióticos e eucarióticos, portanto não surpreendeu quando foram encontrados em micobactérias (Clark-Curtis & Docherty, 1989; Green *et al.*, 1989 e Grosskinsky *et al.*, 1989).

A determinação da sequência de DNA de um desses elementos, designado *IS6110*, específico do complexo *M. tuberculosis* e que contém 1361pb (Cave *et al.*, 1991) foi primeiro descrita por Thierry *et al.* (1990a) e demonstraram que o mesmo pertence a uma família de sequências relacionadas ao elemento *IS3* descoberto em espécies da família *Enterobacteriaceae*. A efetividade do sistema de tipagem utilizando essa

seqüência de inserção em análises epidemiológicas de isolados de *M. tuberculosis* foi demonstrada em numerosos estudos (Hermans *et al.*, 1990a; Mazurek *et al.*, 1991; Otal *et al.*, 1991; Fomukong *et al.*, 1992; van Soolingen *et al.*, 1991; Edlin *et al.*, 1992).

São referidos também em membros do complexo *M. tuberculosis* as seqüências de inserções *IS986* (Mc Adam *et al.*, 1990 e *IS987* (Hermans *et al.*, 1990a). Ambas seqüências também foram anteriormente designadas como *IS1* por Sekine & Ohtsubo (1989). Como todas as seqüências acima referidas diferem-se entre si por apenas três bases nucleotídeas, foram nomeadas como elementos *iso-IS6110* (Otal *et al.*, 1991 e Van Embden *et al.*, 1993) passando todas a serem denominadas simplesmente *IS6110* (Van Embden *et al.*, 1993), exceto quando uma cópia específica é participante, como por exemplo no caso de *M. bovis* que, segundo Hermans *et al.* (1990a), contém apenas uma cópia da *IS987*, a qual, segundo Kolk *et al.*, 1992, tem esse elemento sempre localizado no mesmo sítio do genoma, mais especificamente no fragmento *PvuII* de 1.7 Kb.

Sobre a utilização do elemento de inserção *IS6110* como agente diferenciador de membros do complexo *M. tuberculosis*, é levado em consideração o polimorfismo gerado pela variabilidade, seja no número de cópias ou na sua posição cromossômica dentro do genoma desses

microorganismos (Zainuddin & Dale, 1989; Mazureck *et al.*, 1991; Otal *et al.*, 1991; Van Soolingen *et al.*, 1991; Edlin *et al.*, 1992).

Quanto ao número de cópias da *IS6110* presentes no genoma de linhagens *M. tuberculosis*, alguns autores citam: poderia ser de quatro a vinte (Thierry *et al.*, 1990a;) de uma a várias (Rastogi *et al.*, 1992; Small *et al.*, 1993, 1994), sendo raramente encontradas linhagens com apenas uma cópia da referida sequência de inserção (Beck-sagué *et al.*, 1992; Cave *et al.*, 1991; Daley *et al.*, 1992; Edlin *et al.*, 1992; Godfrey-Faussett *et al.*, 1992; Hermans *et al.*, 1991; Hermans *et al.*, 1990a; Mazurek *et al.*, 1991; Mendiola *et al.*, 1992; Rastogi *et al.*, 1992; Thierry *et al.*, 1990a; Van Soolingen *et al.*, 1991 e Van Soolingen *et al.*, 1992). Van Soolingen *et al.* (1991) relatam ainda que algumas linhagens de *M. tuberculosis* não contêm a *IS6110*, embora a experiência geral é de que essa espécie micobacteriana possui múltiplos elementos *IS6110*.

Quanto à distribuição da sequência de inserção *IS6110* em linhagens de *M. tuberculosis*, análises de diferentes linhagens advindas de pacientes diferentes (Hermans *et al.*, 1990b) demonstraram um número de cópias e também posições diferentes dentro do genoma; contudo, quando essas sequências foram usadas como sonda para analisar a RFLP de linhagens isoladas de pacientes do mesmo surto epidêmico de tuberculose,

idênticas configurações foram observadas. Ademais, não polimorfismo foi observado em infecções experimentais de cobaias com linhagens de *M. tuberculosis* durante um período de três meses.

Diferentes laboratórios testaram um grande número de linhagens *M. tuberculosis* e os resultados obtidos puderam ser utilizados para comparar linhagens de diferentes áreas geográficas, assim como para o rastreamento da ação de linhagens individuais (van Embden *et al.*, 1993). Segundo os referidos autores, semelhantes dados podem fornecer importantes critérios sobre a transmissão da doença tuberculose bem como de recidivas e reativação exógena onde estariam atuando linhagens com características particulares tais como a alta infectividade, alta virulência, e/ou resistência a medicamentos. Esses autores comentam ainda que a análise de um grande número de isolados pode dar respostas para questões há muito tempo existentes, com respeito a eficácia da vacinação BCG e a frequência de reativação versus infecção, que estão aumentando de importância devido à epidemia da AIDS.

3.6.3 – Tuberculose e Técnicas de PCR, RFLP e DRE-PCR

Técnicas de Biologia molecular são importantes na vigilância da tuberculose pois são capazes de provar as relações inter linhagens (e assim determinar a fonte de infecção e a relativa contribuição de infecções recentes e passadas) o que torna a Epidemiologia Molecular uma ferramenta segura, uma vez que sabe-se que a tuberculose ativa poder resultar de reativação de um foco latente, anos após a infecção inicial, ou de exposição recente (Genewein *et al.*, 1993).

Com o aumento da incidência da tuberculose, um rápido diagnóstico para essa doença é de grande significado em Saúde Pública (Back-Sague *et al.*, 1992; Hopewell, 1992) e o método mais rápido é o de PCR (Claridge *et al.*, 1993), devido esta ser uma técnica extremamente sensível e específica, podendo detectar *M. tuberculosis* em culturas que contenham de um a 1000 organismos, pois picogramas da sequência alvo podem ser amplificadas de forma específica por esta técnica (Mullis & Faloona, 1987; Oste, 1988; Hance, *et al.* 1989; Hermans *et al.*, 1990b; Pao, *et al.* 1990; Boddinhaus *et al.*, 1990; Fries *et al.*, 1991; Manjunath *et al.*, 1991; Piere *et al.*, 1991; Cousins *et al.*, 1991; Fiss *et al.*, 1992; Victor *et al.*, 1992; Shawar *et al.*, 1993).

Cousins *et al.* (1992), realizaram estudos para identificação de *M. tuberculosis* comparando os métodos tradicionais com a técnica da PCR e os resultados sugeriram que este último é altamente específico para a identificação de membros do complexo *M. tuberculosis*, confirmando os achados obtidos em estudo prévio Coussins *et al.* (1991), com *Mycobacterium bovis*.

Tentativas para se distinguir através de RFLP, isolados do complexo *M. tuberculosis* (Collins, 1984; Collins, 1985; Cooper *et al.*, 1989), e isolados de *M. tuberculosis* (Eisenach *et al.*, 1986; Imaeda, 1985; Shoemaker *et al.*, 1986) foram sem sucesso. Naquela época, apenas um desses estudos realizado por Reider *et al.* (1989), foi capaz de demonstrar heterogeneidade entre isolados de *M. tuberculosis* pelo uso da digestão do DNA cromossômico com a enzima *MboI*, seguido de Southern blotting com uma sonda genômica para visualizar fragmentos de alto peso molecular. Este método foi estendido com o uso de outras enzimas de restrição e foi adaptado para uma técnica não radioativa (Ross *et al.*, 1991). Estudos posteriores realizados por Eisenach *et al.* (1988); Hermans *et al.* (1990a); Reddi *et al.* (1988) e por Van Soolingen (1991), demonstraram a existência de sequências de DNA repetitivas dentro do genoma de *M. tuberculosis* e ao

utilizarem essas sequências como sondas no DNA genômico digerido com enzima de restrição, o RFLP demonstrou diferenças entre os isolados.

Análises com o uso da técnica de RFLP baseadas na sequência de inserção *IS6110*, são uma poderosa ferramenta epidemiológica para a diferenciação das linhagens de *M. tuberculosis* (Rappuoli *et al.*, 1987; Eisenach *et al.*, 1988; Fox *et al.*, 1989; Cave *et al.*, 1991; Mazurek *et al.*, 1991; Alland *et al.*, 1994). Nessa técnica, o DNA purificado é restringido com enzimas de restrição, produzindo fragmentos de vários tamanhos, os quais são separados por eletroforese e, a seguir, são hibridizados a um segundo segmento do elemento de inserção para produzir “fingerprinting” (impressões).

As linhagens que não possuem o elemento de inserção *IS6110* ou que possuem apenas uma ou duas cópias não geram suficiente polimorfismo para serem diferenciadas com o uso da técnica RFLP-*IS6110* e, nesse caso, outros tipos de marcadores podem ser utilizados com sucesso (Van Soolingen, 1991), principalmente se forem de casos de tuberculose não relacionados como, por exemplo, surtos ocorridos em localidades geográficas diferentes.

O método RFLP, apesar de sofisticado e seguro, tem algumas limitações, além de apresentar desvantagens, como por exemplo tempo longo

e o trabalho laborioso requeridos para se executar tais procedimentos. (Friedman, *et al.*, 1995). Segundo esses autores, o método de RFLP requer uma quantidade suficiente de DNA extraído e a cultura primária deverá ter crescimento muito grande ou deverá ser repicada para produzir organismos em quantidades suficientes. Após o crescimento da cultura, os procedimentos envolvem a extração do DNA, tratamento com enzimas de restrição, eletroforese e Southern blot, que requer múltiplos reagentes e passos. Por essa razão, o conjunto de procedimento para a realização do RFLP podem levar de três a quatro semanas para se conseguir interpretar os resultados. (Friedman *et al.*, 1995). Esses autores sugerem um novo e rápido método de subtipagem chamado DRE-PCR que é baseado na amplificação por PCR de segmentos de DNA de *M. tuberculosis* localizados entre duas sequências repetitivas do seu genoma: a IS6110 e sequência repetitiva polimórfica rica em G-C (PGRS). Segundo Friedman *et al.* (1995), a sequência polimórfica rica em G-C está presente em número de zero a mais de vinte cópias aleatoriamente distribuídas no cromossomo, tendo esse método um poder de discriminação similar ao método RFLP. O método DRE-PCR pode ser realizado com um crescimento primário de *M. tuberculosis*, eliminando-se a necessidade de subculturas (Montoro *et al.*, 1998). O procedimento dessa técnica é baseado no fato que as distâncias entre os elementos repetitivos e o

número de cópias de *IS6110* e *PGRS* variam de linhagem para linhagem. Essa variação permite diferenciar tamanhos e números de fragmentos de DNA amplificados, produzindo únicos “fingerprintings” para várias linhagens de *M. tuberculosis*.

Montoro *et al.* (1998) realizaram estudo com 41 amostras clínicas de *M. tuberculosis* obtidas em Havana, Cuba durante o ano de 1997. Nesse estudo são comparados os resultados obtidos através das técnicas de DRE-PCR e RFLP, considerando suas capacidades em diagnosticar relações epidemiológicas entre essas linhagens. Como resultado, foram detectados 24 tipos de distribuição das bandas através da técnica de RFLP estando incluído aí cinco diferentes “clusters”. Quanto ao método de DRE-PCR foram detectados 25 “patterns” contendo nesses, quatro “clusters”. Segundo Montoro *et al.* (1998), o DRE-PCR é uma técnica conveniente para a tipagem de *M. tuberculosis* em laboratórios que não estejam equipados para a realização de RFLP.

4 – Material e Métodos

4.1 – Descrição das amostras utilizadas:

Foram utilizadas no presente estudo, 52 amostras abaixo relacionadas, advindas de 40 presidiários diferentes, as quais foram isoladas no Instituto Adolfo Lutz de Campinas, no período de fevereiro/97 a setembro/98.

Tabela I – Amostras de *Mycobacterium tuberculosis* utilizadas no presente trabalho:

Amostra	Paciente	Presídio
1	01	Casa de Detenção
2	02	Casa de Detenção
3	03	Casa de Detenção
4	04	Ataliba Nogueira
5	05	Ataliba Nogueira
6	06	Casa de Detenção
7	07	Penitenciária I
8,9 e 10	08	Ataliba Nogueira
11	09	Casa de Detenção
12	10	Casa de Detenção
13, 14 e 15	11	Casa de Detenção
16 e 17	12	Casa de Detenção

cont.:

Amostra	Paciente	Presídio
18	13	Casa de Detenção
19 a 23	14	Casa de Detenção
24	15	Cadeia São Bernardo
25	16	Ataliba Nogueira
26	17	Casa de Detenção
27 e 28	18	Penitenciária I
29	19	Casa de Detenção
30 e 31	20	Ataliba Nogueira
32	21	Penitenciária I
33	22	Penitenciária I
34	23	Casa de Detenção
35	24	Casa de Detenção
36	25	Ataliba Nogueira
37	26	Ataliba Nogueira
38	27	Penitenciária I
39	28	Ataliba Nogueira
40 e 41	29	Penitenciária I
42	30	Ataliba Nogueira
43	31	Casa de Detenção
44	32	Penitenciária I
45	33	Penitenciária I
46	34	Penitenciária I
47	35	Ataliba Nogueira
48	36	Penitenciária I
49	37	Penitenciária I
50	38	Penitenciária I
51	39	Casa de Detenção
52	40	Penitenciária I

4.2 - População Estudada

Refere-se aos detentos de quatro presídios do Complexo Presidiário de Campinas que, por suspeita de tuberculose, tiveram seu escarro colhido e enviado para exames no Instituto Adolfo Lutz de Campinas: Casa de Detenção, Penitenciária I, Cadeia Pública de São Bernardo (com regime de segurança fechado) e Ataliba Nogueira (com regime de segurança semi-aberto).

4.3 – Levantamento Epidemiológico

Para o levantamento das características clínicas e epidemiológicas foi montado um Banco de Dados onde foram inseridas as informações das notificações oficiais de pacientes com tuberculose. Estes dados constavam originalmente do Banco de Dados para a Vigilância da Tuberculose existentes no Departamento de Medicina Preventiva e Social da FCM – HC – UNICAMP. Foi também reconstituída a história de vida prisional dos detentos. Para esta finalidade, foram obtidas, através da Casa de Detenção, as fichas cadastrais dos presidiários e a seguir traçado um gráfico onde se observou e comparou em qual momento da vida carcerária os mesmos teriam convivido num mesmo presídio.

4.4 - Obtenção das Culturas de *M. tuberculosis*

O material (escarro) utilizado para a pesquisa do bacilo da tuberculose foi colhido dentro dos próprios presídios, por técnicos ligados à Secretaria da Segurança, em procedimentos médicos de rotina e a seguir enviados ao Instituto Adolfo Lutz de Campinas para análise. Esse material foi colocado em tubos de ensaio (de 50 ml e com rosca) e procedida a descontaminação com hidróxido de sódio 4%. Após homogenização, os tubos de ensaio foram levados à estufa (37°C) por 15 minutos e a seguir centrifugados por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento titulado com gotas da solução vermelho de fenol até que o material adquirisse cor rosa forte. A seguir, o material foi acidificado utilizando-se HCl 1N, gota a gota, até adquirir a coloração amarela e depois rosa, indicando a neutralização do pH. Após titulação, esse material foi semeado nos meios Lowestein Jensen (LJ) e PNB (ácido para-nitrobenzóico). Os meios foram, a seguir, colocados em estufa a 37°C. Durante os dois primeiros dias os vidros contendo os meios semeados ficaram semi-abertos para secarem sendo, após esse período, completamente rosqueados e incubados por um período de até 60 dias quando então se procedeu a interpretação dos resultados. Obs.: O Instituto Adolfo Lutz de Campinas

enviou as amostras das cepas positivas para as unidades de São Paulo, ou de Sorocaba-SP, para posterior confirmação da espécie *M. tuberculosis*.

4.5 - Obtenção do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido de acordo com Ausubel *et al.* (1988). Após o crescimento das amostras em meio Lowenstein Jensen, foi retirada uma porção de colônias do mesmo e colocada em tubos de 1,5 ml, contendo 400 µl de Tampão TE (1X). Os tubos contendo a suspensão bacteriana foram agitados em vortex para homogeneização das células bacterianas e, a seguir, centrifugados momentaneamente (12.000g) para que se formasse um sedimento. Depois, os tubos foram aquecidos em banho maria durante uma hora a 80°C (Multi-bloq-Heater da LAB LINE) para que houvesse inativação de *M. tuberculosis* e então esfriados à temperatura ambiente. Foram adicionados aos tubos 50µl de lisozima (10mg/ml), agitados em vortex, invertidos e incubados a 37°C por um período de no mínimo cinco horas e no máximo 14 horas. Na sequência, foram adicionados 75µl de SDS 10%/proteinase K, agitado-se os tubos novamente em vortex e aquecendo-os por 10 minutos a 65°C. A seguir, foram adicionadas às suspensões em preparo, 100µl de NaCl 5M, invertendo-se os tubos por

quatro vezes e a seguir adicionando-se aos mesmos, 100µl de CTAB/NaCl. Os tubos foram, então, agitados em vortex até que o líquido adquirisse um aspecto leitoso sendo depois aquecidos a 65°C por mais 10 minutos. Prosseguindo, foram adicionados 750µl de clorofórmio álcool isoamílico (24:1) e agitando-se os tubos em vortex por pelo menos 10 segundos. A seguir, estes foram centrifugados (12.000g) à temperatura ambiente por cinco minutos. A partir do sobrenadante aquoso, transferiram-se 600µl em volumes de 200µl para outros tubos. A fim de se precipitar o ácido nucléico adicionaram-se aos novos tubos 0,6 vol (360µl) de Isopropanol. As amostras foram mantidas a -20°C por pelo menos 30 minutos e a seguir centrifugadas (12.000g) à temperatura ambiente por cinco minutos, descartando-se o sobrenadante. Por duas vezes, foram adicionados aos tubos 1,4 ml de etanol 70% (-20°C), invertendo-se os mesmos vagarosamente, para homogeneização. A seguir, estes tubos foram centrifugados (12.000g) à temperatura ambiente por cinco minutos, descartando-se o sobrenadante para secagem do precipitado à temperatura ambiente. Por fim, os sedimentos foram ressuspensos utilizando-se 30µl de tampão TE (1X) e os tubos estocados para uso posterior.

4.5.1 - Determinação da concentração do DNA genômico

O DNA extraído das amostras foi diluído 1:100 e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda $\lambda 260$ e $\lambda 280$.

4.5.2 – Eletroforese Gel de Agarose do DNA extraído

Para verificação da integridade do DNA extraído, este foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% conforme segue: a solução de agarose foi aquecida em microondas até sua dissolução e depois levemente esfriada sob água corrente e então despejada sobre cuba de eletroforese horizontal (GIBCO) contendo um pente acrílico para que fossem formadas canaletas no gel. Em seguida, a cuba ficou à temperatura ambiente até que esse gel ficasse consistente quando então foi retirado o pente de acrílico. Depois foi acrescentado à cuba tampão TEB (1X) até que o gel ficasse totalmente coberto por esta solução. No passo seguinte, as amostras foram injetadas em canaletas individuais nas seguintes proporções: 2 μ l de DNA homogeneizado com 5 μ l de tampão de ressuspensão de DNA. A cuba foi ligada inicialmente em corrente de 20 *mA* até que o corante azul do tampão de ressuspensão começasse sua migração no gel. A partir desse momento, a

corrente foi aumentada para 80 *mA* até que o corante azul chegasse ao final da corrida (extremidade do gel oposta às canaletas).

Após o término da corrida eletroforética, o gel de agarose foi transferido para vasilhame contendo água destilada e acrescentado, ao mesmo, brometo de etídio, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989), e mantido por cerca de 20 minutos. A seguir, o gel foi observado em transiluminador de luz ultra-violeta (260nm). As bandas de DNA presentes e coradas no gel foram fotografadas em filme instantâneo da Polaroid.

4.6 - Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Para a realização do método de PCR foram utilizados os seguintes conjuntos de iniciadores fabricados pela GIBCO: 1 - *IS2/IS3* específico para amplificar um fragmento de 158pb localizado entre os pares de bases 718 e 876 da *IS6110* de *M. tuberculosis*. 2 - *IS1/IS3*, específico para amplificar um fragmento de 665pb localizado entre os pares de bases 211 e 876 da referida *IS6110*, conforme Thierry *et al.* (1990b) – Figura 1.

DR INV. REP.

CGCTGAACCG CCCCGGCATG TCCGGAGACT CCAGTCTTG GAAAGGATGG GGTCATGTCA GGTGGTTCAT
 CGAGGAGGTA CCCGCCGAG CTGCGTGAGC GGGCGGTGCG GATGGTCGCA GAGATCCGCG GTCAGCACGA
 TTCGGAGTGG GCAGCGATCA GTGAGGTGCG CCGTCTACTT GGTGTTGGCT GCGCGGAGAC GGTGCGTAAG
 TGGGTGCGCC AGGCGCAGGT CGATGCCGGC GCACGGCCCG GGACCACGAC CGAAGAATCC GCTGAGCTGA
 AGCGCTTAGC GGCGGGACAA CGCCGAATTC CGAAGGGCGA ACGCGATTTT AAAGACCGCG TCGGCTTTCT
 TCGCGGCCGA GCTCGACCGG CCAGCACGCT AATTAACGGT TCATCGCCGA TCATCAGGGC CACCGCGAGG
 GCCCCGATGG TTTGCGGTGG GGTGTCGAGT CGATCTGCAC ACAGCTGACC GAGCTGGGTG TGCCGATCGC
 CCCATCGACC TACTACGACC ACATCAACCG GGAGCCGAGC CGCCGCGAGC TGCGCGATGG CGAACTCAAG
 GAGCACATCA GCCGCGTCCA CGCCGCCAAC TACGGTGTIT ACGGTGCCCG CAAAGTGTGG CTAACCCTGA
 ACCGTCAGGG CATCGAGGTG GCCAGATGCA CCGTCGAACG GCTGATGACC AAATCGGCC TGTCCGGGAC
 CACCCGCGGC AAAGCCCGCA GGACC TCCG ACGAT CGCTGA GCCACAGCCC GTCCCGCCGA TCTCGTCCAG
 CGCCGCTTCG GACCACCAGC ACCTAACC GG CTGTGGGTAG CAGACCTCAC CTATGTGTCG ACCTGGGCAG
 GGTTGCGCTA CGTGGCCTTT GTCACCGAGC CTTACGCTCG CAGGATCCTG GGCTGGCGGG TCGCTTCCAC
 GATGGCCACC TCCATGGTCC TCGACGCGAT CGAGCAAGCC ATCTGGACCC GCCAACAAGA AGGCGTACTC
 GACCTGAAAG ACGTTATCCA CCATACGGAT AGGGGATCTC AGTACACATC GATCCGGTTC AGCGAGCGGC
 GCGCCGAGGC AGGCATCAA CCGTCGGTCG GAGCGGTGCG AAGCTCCTAT GACAATGCAC TAGCCGAGAC
 GATCAACGGC CTATAACAAGA CCGAGCTGAT CAAACCCGGC AAGCCCTGGC GGTCCATCGA GGATGTCGAG
 TTGGCCACCG CGCGCTGGGT CGACTGGTTC AACCATCGCC GCCTTACCA GTACTGCGGC GACGTCCCGC
 CGGTCGAACT CGAGGCTGCC TACTACGCTC AACGCCAGAG ACCAGCCGCC GGCTGAGGTC TCAGATCAGA
 GAGTCTCCGG ACTCACCGGG GCGGTTACGA
 INV. REP. DR

Figura 1 – Sequências de DNA do elemento *IS6110* com sinalização

dos locais para síntese dos iniciadores *IS1*, *IS2* e *IS3*

Cada iniciador foi alicotado em pequenas porções de 50µl e estocados para uso posterior. Levando-se em consideração a porcentagem de CG (*IS1* = 76%; *IS2* = 61% e *IS3* = 61%) foi calculada a temperatura de anelamento para os três iniciadores utilizando-se a seguinte fórmula (Marmur & Doty, 1962).

Temperatura de anelamento = $69,3 + (0,41 \times \% \text{ CG}) - \frac{650}{n}$
 tendo sido encontradas as seguintes temperaturas: $IS1 = 69,51$; $IS2 = 63,36$ e $IS3 = 63,36$. Foi escolhida como temperatura de anelamento, 63°C para as reações envolvendo todos os iniciadores, por ser a mais baixa.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de 0,5 ml num volume total de 100 μl , tendo sido utilizados os seguintes materiais da GIBCO.

Componentes da Reação	Volume
Mistura de dNTPs (10 mM)*	2 μl
MgCl ₂ (50 mM)	3 μl
Conjunto de Iniciadores**	1 μl /cada
Tampão da Enzima (10X)	10 μl
DNA (100 ng) ***	---
Enzima <i>Taq</i> Polimerase (2,5 U)	5 μl
H ₂ O ****	completa volume p/ 100 μl

* desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); ** $IS1$ com $IS3$ ou $IS2$ com $IS3$;

*** purificado e diluído 1:100; **** deionizada e esterilizada

Após adicionarem-se os reativos em tubos individuais, esses foram centrifugados (12.000g) momentaneamente. Em seguida, os tubos foram colocados no Termociclador (Thermal Cycle - PERKIN ELMER) e deixados por dez minutos a 94°C . Após esse período, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente, tendo sido, a seguir, centrifugados (12.000g) momentaneamente. Na sequência, acrescentou-se em cada tubo 5 μl (2,5U) da solução final de enzima *Taq* Polymerase e depois uma gota

de óleo mineral para PCR (SIGMA). Os tubos foram, novamente, colocados no Termociclador programado para executar 25 ciclos conforme a seguinte programação: 94°C - 1 minuto (Denaturação); 63°C - 1 minuto (Anelamento); 72°C - 2 minutos (Extensão).

Terminados os ciclos, os tubos contendo o material amplificado foram retirados do termociclador, o óleo retirado de cada tubo, estocando-se os mesmos a -20°C.

4.7 - Reação de Polimerização em Cadeia de Elementos Duplo-Repetitivos (DRE-PCR)

Todas as amostras utilizadas no presente estudo foram submetidas, à técnica de DRE-PCR. Os iniciadores utilizados (Ris1, Ris2, Pmtb1 e Pmtb2) foram fabricados pela GIBCO conforme descrito por Friedman *et al.* (1995). Esses iniciadores foram alicotados em porções de 50µl e estocados em “freezer” para uso posterior. A temperatura de anelamento foi calculada levando-se em consideração a porcentagem de CG conforme já descrito para a técnica de PCR e levando-se em consideração que esses iniciadores tem a seguinte porcentagem de CG: Ris1 = 57%; Ris2 = 50%; pPmtb1 = 64% e Pmtb2 = 58%.

As reações de DRE-PCR foram realizadas em duplicata, em tubos de 0,5 ml num volume total de 100µl, tendo sido utilizados os seguintes materiais da GIBCO.

Componentes da Reação	Volume
Mistura de dNTPs (10 mM)*	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl
Conjunto de Iniciadores **	2 µl/cada
Tampão da Enzima (10X)	10 µl
DNA (200 ng) ***	---
Enzima <i>Taq</i> Polimerase (2,5 U)	5 µl
Dimetil Sulfoxide (DMSO)	6µl
H ₂ O ****	completa volume p/ 100 µl

* desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); ** Ris1; Ris2; Pmtb1; Pmtb2.

*** purificado e diluído 1:100; **** deionizada e esterilizada

Após serem colocados em tubos individuais as reações foram ao termociclador sendo submetidas a 30 ciclos conforme segue:
Denaturação: 94° C (1 minuto); Anelamento: 54° C (2 minutos); Extensão: 72° C (2 minutos).

4.8- Eletroforese em Gel de Agarose das amostras amplificadas por PCR e por DRE-PCR

O gel de agarose para a eletroforese das amostras amplificadas por PCR foi preparado conforme Sambrook *et al.* (1989).

4.9 - Digestão do DNA genômico para a técnica de RFLP

Foram digeridos com o uso da enzima *Pst*I (Pharmacia), 5 µg de DNA genômico para ser utilizado na técnica de Southern blotting. A digestão foi realizada num volume total de 20 µl nas seguintes condições: 2 µl do tampão (10X) da enzima; 5 µg de DNA; 1 µl da enzima *Pst*I (15U) e completado com água deionizada. A seguir, esses tubos foram levados à centrífuga (12.000g) tendo sido centrifugados momentaneamente e depois as reações colocadas em estufa a 37°C por “overnight”. No dia seguinte, foi adicionado mais 1 µl da enzima *Pst*I e a reação incubada novamente a 37 °C por mais duas horas. Decorrido esse período, os tubos foram centrifugados momentaneamente e conservados em freezer.

4.10 - Southern blotting

4.10.1 - Eletroforese em Gel de Agarose

Depois da digestão, os reagentes do DNA genômico foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Utilizou-se o marcador de peso molecular da GIBCO de 1 Kb (4 µl) com 5 µl de tampão de ressuspensão. Os 20 µl do material da digestão foram homogeneizados com

5 μ l de tampão de ressuspensão e injetados nas canaletas do gel. Os demais procedimentos foram idênticos aos já citados para a eletroforese do DNA extraído. Após a corrida eletroforética o gel de agarose foi corado com Brometo de Etídio, visualizado em luz ultra violeta e fotografado em filme instantâneo da Polaroid.

4.10.2 - Transferência do DNA para membrana de Nitrocelulose

O processo de transferência adotado foi realizado conforme segue: o gel de agarose contendo as amostras digeridas foi colocado em recipiente contendo Solução de Denaturação (NaOH 0,5N/NaCl 0,5M). Foi deixado nessa solução por uma hora, agitando-se o recipiente durante dois minutos a cada dez minutos. Após essa primeira hora, a solução foi desprezada e nova solução foi adicionada, repetindo-se o procedimento por mais meia hora. Enquanto isso, foi cortada uma membrana de nitrocelulose e duas folhas de papéis 3MM (WHATMAN) do mesmo tamanho do gel (11 x 14 cm), que seriam utilizados na transferência do DNA. Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi deixada em água deionizada. Após o período descrito acima, o gel foi retirado da solução de denaturação e colocado em Solução de Neutralização (0,5M Tris/HCl pH

7,5/ 2M NaCl), e permanecendo na mesma por uma hora, com agitações frequentes, conforme já descrito. A Solução SSC (20X) foi diluída para 10X e também para 2X. Após uma hora, o gel foi tirado da solução de neutralização e então montado o “sanduiche” para a transferência de DNA do gel, conforme a sequência a seguir: num recipiente de vidro contendo a solução SSC (10X) foi colocado um suporte para o gel e sobre este um vidro. Sobre o vidro foi estendida uma tira de papel 3MM da mesma largura que o gel, porém de comprimento suficiente para ficar submersa na solução SSC 10X. Sobre o papel 3MM foi colocado o gel. Sobre o gel foi colocada a membrana de nitrocelulose e a seguir 2 pedaços de papel 3MM (do mesmo tamanho do gel) umedecidos previamente em SSC 2X. Por último, foram colocadas várias folhas de papel toalha dobradas e sobre elas um vidro contendo um peso aproximado de 500g. Procedeu-se a transferência do DNA por 48 horas, tendo sido marcado o nível da solução SSC 10X do pirex e repostado o mesmo nível após as primeiras 24 horas quando também foram trocados os papéis toalha.

Passado o período de 48 horas, o “sanduiche” foi desmontado e a membrana de nitrocelulose retirada com o auxílio de uma pinça. Nessa membrana foi marcado com um lápis resistente à água, em qual lado estava contido o DNA. Depois a membrana ficou por uma hora em SSC 4X,

agitando-se de dez em dez minutos para que fossem retirados possíveis fragmentos de agarose. Após esse período, a membrana foi deixada secar sobre papel filtro 3MM e depois colocada entre cartolina dobrada, presa com “clips” grandes nas laterais e incubada a 80°C por, no mínimo, duas horas. Após esse período, a cartolina contendo a membrana foi guardada para uso posterior.

4.10.3- Construção da sonda molecular

A sonda foi obtida com o uso da amostra 24, quando, com a realização de PCR utilizando-se os iniciadores *IS1* e *IS3*, amplificou-se um fragmento da *IS6110* de 665pb. A seguir, 5 µl do material amplificado foi purificado utilizando-se o “Kit Wizard DNA Clean-up System” (PROMEGA), conforme instruções do fabricante. Após purificação, esse material foi avaliado por eletroforese de gel de agarose a 1,8% com a finalidade de se avaliar a amplificação do fragmento.

A marcação radioativa de 50µl desta sonda foi realizada com [α -³²P]dCTP seguindo-se o protocolo fornecido pelo “Oligolabelling Kit - Pharmacia LKB Biotechnology”.

4.10.4 - Hibridização

A membrana de nitrocelulose foi lavada rapidamente em cuba contendo a solução SSPE 6X e sendo, a seguir, colocada em garrafa pré-tratada com o repelente de DNA Repel-Silane (Plusone) em forno de hibridização (Red Roller II - HOEFER). Foi adicionada a esta garrafa a solução de pré hibridização (50 ml) e a mesma foi mantida a 42°C por duas horas. Após este período, a sonda marcada radioativamente foi denaturada por incubação a 100°C durante cinco minutos, centrifugada momentaneamente, colocada imediatamente no gelo e, a seguir, acrescentada à garrafa de hibridização (diretamente na solução de pré-hibridização) a qual foi mantida nesta mesma temperatura por um mínimo de três horas até “overnight”. Depois deste período, a membrana foi retirada, colocada em cuba contendo a solução SSC 2X/SDS 0,5% com agitação por 5 minutos, sendo o procedimento repetido por mais 5 minutos. A seguir, substituiu-se a solução por outra: SSC 2X com SDS 0,1% a qual deixou-se agitando por 15 minutos. A membrana foi transferida para cuba contendo a solução SSC 0,1%/SDS 0,5%. Esta cuba foi mantida a 37 °C por uma hora com agitação ocasional. A seguir, esta membrana foi rapidamente lavada com a solução SSC 0,1X/SDS 0,5%, sendo mantida nesta solução por mais uma hora. Após

este período, a membrana foi retirada e lavada rapidamente com SSC 0,1% X/SDS 0,5% e secada à temperatura ambiente. Após estar seca, foi presa a um suporte, expondo-a em filme radiográfico (Hyperfilm-MP-AMRSHAM), em ausência de luz, por três dias (-70 °C), seguindo-se, após este período, à revelação.

4.11 – Análise dos Resultados

4.11.1 - Análise do RFLP

Os resultados obtidos pela técnica de RFLP foram analisados com o uso do programa Genetic Distance: Method = UPGMA - Modificado de Neighbor da Phylip, versão 3.5.

4.11.2 - Análise do DRE-PCR

O resultado da amplificação foi primeiro analisado visualmente numa primeira eletroforese em gel de agarose e a seguir, esta foi repetida, injetando-se apenas uma amostra representativa de cada grupo obtido. A análise foi completada com a realização de dendrograma

utilizando-se o programa Genetic Distance: Method = UPGMA – Modificado de Neighbor da Phylip, versão 3.5.

4.11.3 – Análise do Levantamento Epidemiológico

Os dados epidemiológicos foram analisados com o programa estatístico EPI-INFO, versão 6.0 (Dean *et al.*, 1997). Foram elaboradas medidas de ocorrência da doença (frequência, média e mediana) e efetuadas as relações entre as variáveis. Quanto à história de vida carcerária dos detentos, observou-se no gráfico traçado previamente, a sobreposição de informações quanto a períodos e presídios onde os mesmos teriam convivido.

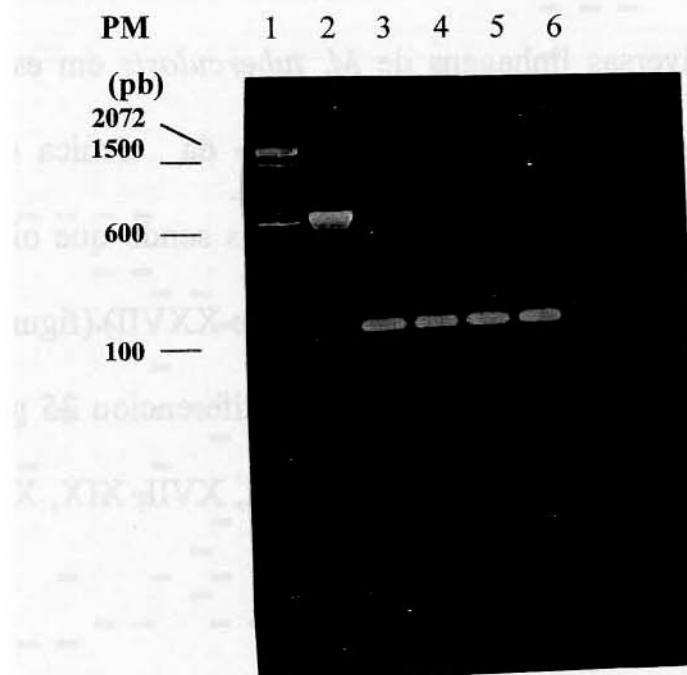
5 - Resultados

5.1 - Culturas de *Mycobacterium tuberculosis*

Durante o período de fevereiro/97 a setembro/98, foram isoladas 52 amostras de *M. tuberculosis*, pertencentes a 40 presidiários das Penitenciárias envolvidas no presente estudo.

5.2 - Amostras submetidas à PCR

Todas amostras utilizadas no presente estudo, foram submetidas à técnica da PCR e após a eletroforese em gel de agarose 1,8% foi constatada a amplificação da sequência de inserção *IS6110* - fragmentos de 158pb (quando utilizado o conjunto de iniciadores *IS2* com *IS3*) e de 665pb (quando utilizado o conjunto de iniciadores *IS1* com *IS3*) (Figura 2).



1 = Marcador de Peso Molecular 100 pb; 2= amostra 39;
3 = amostra 40; 4= amostra 42; 5= amostra 6; 6= amostra 43

Figura 2 — Eletroforese gel de agarose a 1,8% do DNA de amostras de *M. tuberculosis* amplificadas através da técnica de PCR com o uso dos iniciadores *ISI* com *IS3* (2) ou *IS2* com *IS3* (3, 4, 5 e 6).

5.3 - Hibridização e DRE-PCR

Os resultados obtidos com ambas as técnicas permitiram a comparação entre as diversas linhagens de *M. tuberculosis* em estudo. O padrão de migração das bandas obtido com o uso da técnica de RFLP (Tabelas II e III) diferenciou 30 grupos de linhagens sendo que oito destes são “cluster patterns” (I, V, X, XII, XIII, XVIII, XX, e XXVII) (figura 3).

Quanto à técnica de DRE-PCR, esta diferenciou 25 grupos de linhagens sendo que 10 destes (I, IX, XI, XIII, XVI, XVII, XIX, XX, XXII, XXIII), são “cluster patterns” (figuras 4, 5 e 6).

TABELA III - Padrão de Bandas obtido segundo a técnica de RFLP

DISTÂNCIAS																																							
AMOSTRA/PCTE.	2,5	2,7	3,0	3,1	3,2	3,3	3,4	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	4,0	4,1	4,2	4,3	4,4	4,5	4,6	4,7	4,8	4,9	5,0	5,1	5,3	5,4	5,5	5,6	5,7	6,0	6,2	6,6	6,7	7,0	7,3	7,7	8,0	8,3	
33 (22)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
34 (23)	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
22 (14)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
35 (24)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
36 (25)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
37 (26)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
38 (27)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
39 (28)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
52 (40)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1 (01)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	
19 (14)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2 (02)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
3 (03)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
40 (29)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
4 (04)	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
42 (30)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
7 (07)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	
5 (05)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0		
43 (31)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
41 (29)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
44 (32)	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
45 (33)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	
6 (06)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
51 (39)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	
46 (34)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
47 (35)	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8 (08)	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
11 (09)	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12 (10)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13 (11)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
48 (36)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9 (08)	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
23 (14)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
49 (37)	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
50 (38)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 (14)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 (08)	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
16 (12)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
14 (11)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
17 (12)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
15 (11)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
24 (15)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
26 (17)	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18 (13)	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
27 (18)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25 (16)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21 (14)	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
29 (19)	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30 (20)	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
32 (21)	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0								

Legenda: 1=contém a banda; 0=não contém a banda

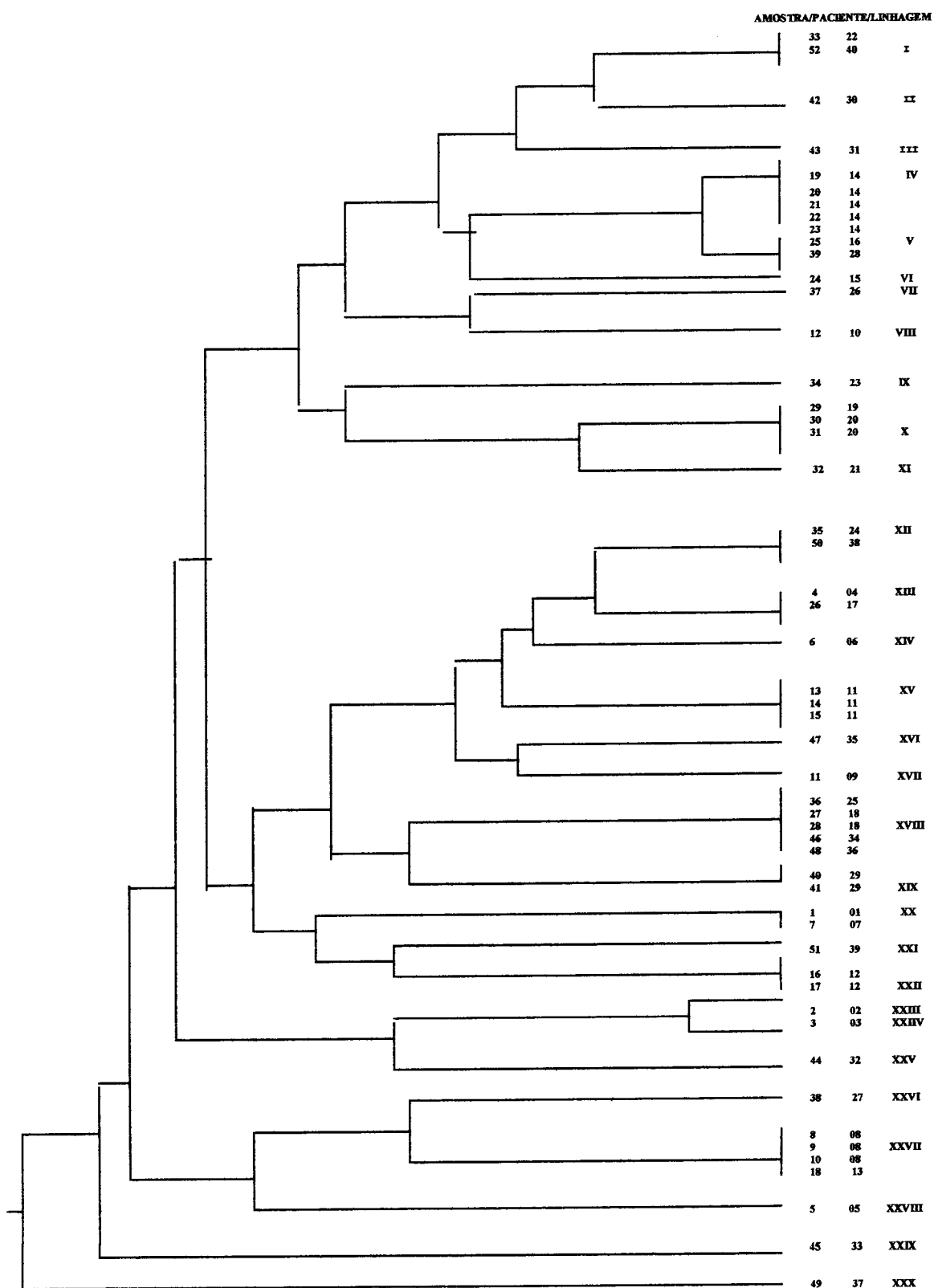


Figura 3 - Dendrograma apresentando os grupos de linhagens obtidos pela técnica de RFLP

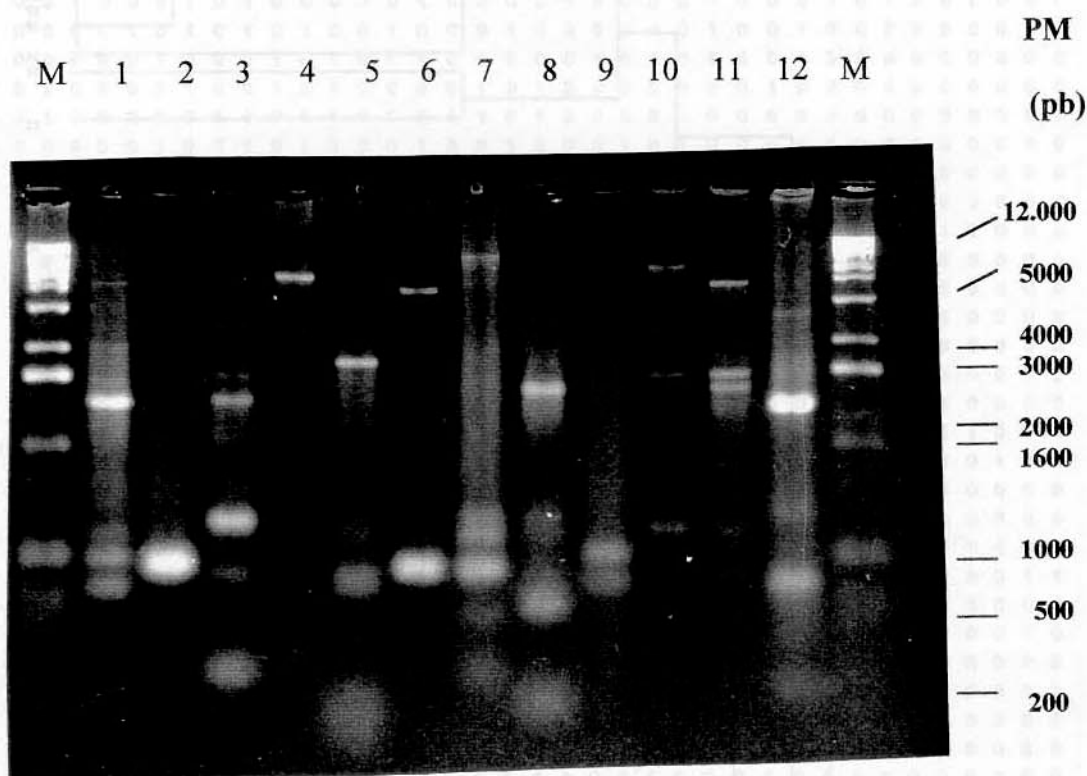


Figura 4 – Perfil de Bandas de fragmentos de DNA amplificados com o uso da técnica de DRE-PCR : grupos de linhagens obtidos

M = Marcador Peso Molecular 1 Kb. 1 – amostra 22 (representante do grupo 20);
 2 – amostra 46 (representante do grupo 9); 3 – amostra 18 (representante do grupo 11);
 4 – amostra 14 (representante do grupo 24); 5 amostra 29 (representante do grupo 19);
 6 – amostra 33 (representante do grupo 1); 7 – amostra 35 (representante do grupo 16);
 8 – amostra 4 (representante do grupo 17); 9 – amostra 41 (representante do grupo 5);
 10 – amostra 7 (representante do grupo 22); 11 – amostra 2 (representante do grupo 23);
 12 – amostra 45 (representante do grupo 13); M – Marcador Peso Molecular 1Kb.

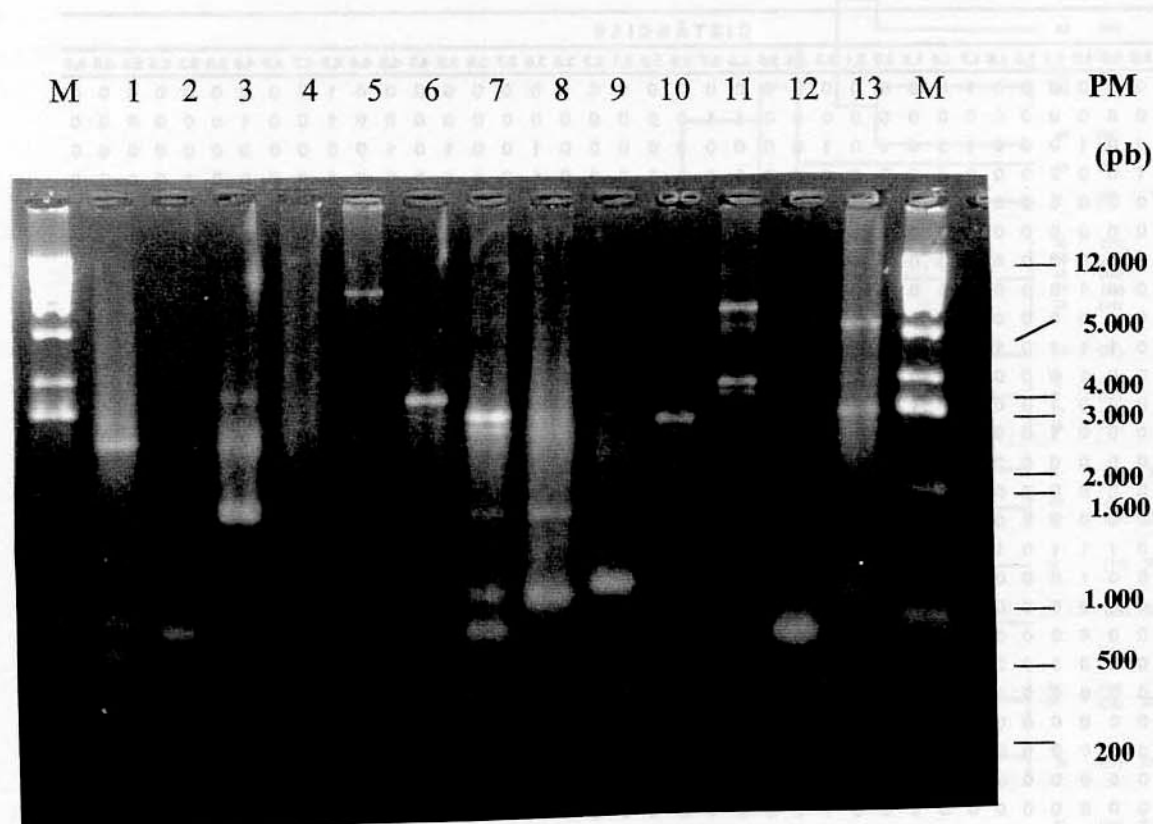


Figura 5 – Perfil de Bandas de fragmentos de DNA amplificados com o uso da técnica de DRE-PCR : grupos de linhagens obtidos

M = Marcador de Peso Molecular 1 Kb. 1 – amostra 34; 2 – amostra 37
 3 – amostra 38; 4 – amostra 42; 5 – amostra 5; 6 – amostra 43; 7 – amostra 6; 8 – amostra 51;
 9 – amostra 47; 10 – amostra 11; 11 – amostra 12; 12 – amostra 24; 13 – amostra 32
 M – Marcador de Peso Molecular 1Kb.

TABELA IV - Padrão de Bandas obtido segundo a técnica de DRE-PCR

[illegible]

Legenda: 1=contém a banda; 0=não contém a banda

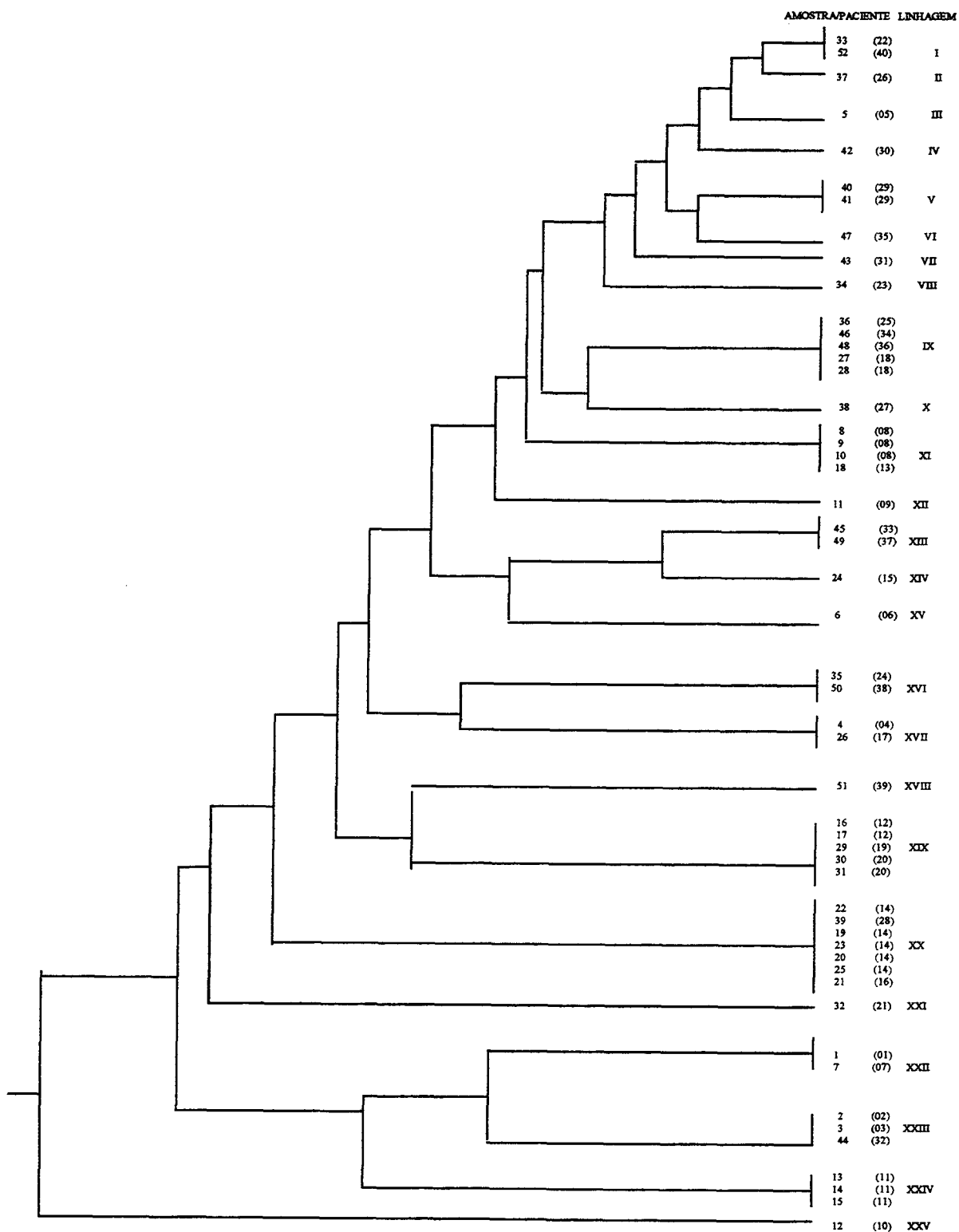


Figura 6 - Dendrograma apresentando os grupos de linhagens obtidos pelo uso da técnica de DRE-PCR

5.4 – Levantamento Epidemiológico

5.4.1 - Características clínicas e epidemiológicas

Participaram do presente estudo, 40 presidiários, sendo que, destes, foram localizadas 29 Fichas de Notificação sugerindo a ocorrência de sub-notificação dos casos de tuberculose aqui identificados.

A distribuição dos presidiários por unidade prisional, apresentada na Tabela V, mostra que, no período referente a este estudo, o maior número de amostras conseguidas (40%), veio de presidiários internos, naquela época, na Casa de Detenção.

Tabela V - Presidiários com tuberculose segundo Unidade Prisional

Unidade Prisional	Nº	%
Casa de Detenção	16	40.0
Penitenciária I	13	32.5
Ataliba Nogueira	10	25.0
Cadeia de São Bernardo	1	2.5
Total	40	100.0

A distribuição dos presidiários por faixa etária, apresentada na Tabela VI, mostra que a faixa de 30-34 anos, concentra a maior proporção de doentes, com uma média e mediana respectivamente de 33 e 31 anos.

Tabela VI - Presidiários com tuberculose, segundo a faixa etária

Faixa Etária	Nº	%
20-24	3	8.1
25-29	9	24.3
30-34	12	32.4
35-39	7	19.0
40-44	2	5.4
45-49	2	5.4
50 ou mais	2	5.4
Total	37*	100.0

* sem informação para 3 presidiários

A Tabela VII mostra a baixa escolaridade entre os presidiários notificados.

Tabela VII – Presidiários com tuberculose, segundo a escolaridade

Escolaridade	No.	%
Não estudou	3	15.7
I Grau Incompleto	13	68.4
I Grau Completo	1	5.3
II Grau Incompleto	1	5.3
Superior	1	5.3
Total	19*	100.0

* s/ informação p/ 21 presidiários

Dos participantes que foram notificados, 79,3% não haviam recebido tratamento específico anterior, conforme demonstrado na Tabela VIII abaixo.

Tabela VIII - Pacientes com tuberculose, segundo tratamento anterior

Tratamento Anterior	Nº	%
Não Tratou	23	79.3
Recidiva	3	10.3
Abandono	3	10.3
Total	29*	100.0

* sem informação p/ 11 presidiários

A demora entre o início dos sintomas e o tratamento foi analisada em 18 pacientes (Tabela IX) e mostra que embora em 39% (7 casos) esta demora tenha sido de 1 a 4 semanas, houve uma média e mediana respectivas de 10 e 8 semanas na demora para o tratamento.

Tabela IX – Presidiários com tuberculose, segundo o início dos sintomas ao tratamento

Início dos Sintomas	Tratamento	
	No.	%
menos de 1 semana	0	0.0
1 - 4 semanas	7	39.0
5 – 8 semanas	5	27.8
9 – 12 semanas	4	22.2
+ 12 Semanas	2	11.1
Total	18*	100.0

* s/informação p/ 22 presidiários

Foi ainda estudado o intervalo entre a primeira consulta e o tratamento, descrito na Tabela X. Nota-se que a maioria dos casos (73.4%) demorou de uma a quatro semanas, com uma média e mediana respectivas de 2.8 e 3.0 semanas para o referido intervalo.

Tabela X – Presidiários com tuberculose, segundo o intervalo da primeira consulta ao tratamento

Primeira Consulta ao Tratamento	Tratamento	
	No.	%
menos de 1 semana	2	13.3
1 - 4 semanas	11	73.4
5 – 8 semanas	2	13.3
Total	15*	100.0

* s/informação p/ 25 presidiários

A distribuição dos presidiários segundo a unidade prisional e as doenças associadas (Tabela XI), mostra que a Penitenciária I foi a unidade que mais apresentou casos positivos de tuberculose associados à AIDS (29,6%). Nota-se também através desta tabela que a epidemia da AIDS é relevante entre os detentos pois 48,1% (13 casos) apresentaram a associação.

Tabela XI - Presidiários com tuberculose, segundo unidade prisional e doenças associadas

Presídio	Doenças Associadas							
	AIDS		Alcoolismo		Nenhuma		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Ataliba Nogueira	1	(3.7)	0	(0.0)	5	(18.5)	6	(22.2)
Casa de Detenção	4	(14.8)	1	(3.7)	7	(25.9)	12	(44.5)
Penitenciária I	8	(29.6)	0	(0.0)	1	(3.7)	9	(33.3)
Total	13	(48.1)	1	(3.7)	5	(48.1)	29	(100.0)

*s/ informação p/ 13 presidiários

A forma clínica predominante foi a pulmonar (93.0%), sendo que em um dos pacientes, além da forma pulmonar foi diagnosticada também a forma pleural. Outros dois pacientes apresentaram a forma ganglionar em conjunto com a pulmonar. A tabela XII mostra as formas clínicas diagnosticadas e sua associação com a sorologia para o HIV.

Tabela XII – Presidiários com tuberculose segundo a forma clínica diagnosticada e o Anti-HIV

Forma Clínica	Anti-HIV							
	Positivo		Negativo		Não Realizado		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Pulmonar	13	(40.6)	11	(34.4)	5	(15.7)	29	(90.7)
Pleural	1	(3.1)	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(3.1)
Ganglionar	2	(6.3)	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(6.3)
Total	16	(50.0)	11	(34.4)	5	(15.7)	32*	(100.0)

* s/ informação p/ 11 presidiários

A Tabela XIII mostra a relação entre a baciloscopia de escarro e RX de tórax. Em 10 casos (34,5%) em que havia suspeita de tuberculose através do exame de RX, todos foram confirmados pela baciloscopia. A mesma proporção é verificada nos casos em que não foi realizado o RX, evidenciando a importância da baciloscopia de escarro como o primeiro exame a ser solicitado no controle da doença.

Embora todas as amostras submetidas ao presente estudo tivessem resultado positivo pela cultura de escarro, verificou-se que em oito casos (27,5%), foi obtido resultado negativo à baciloscopia.

Tabela XIII – Presidiários com tuberculose segundo o exame de RX tórax e a baciloscopia de escarro

RX Torax	Baciloscopia					
	Positivo		Negativo		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Suspeita Tb	10	(34.5)	3	(10.3)	13	(45.0)
Suspeito c/Caverna	1	(3.5)	0	(0.0)	1	(3.4)
Não Realizado	10	(34.5)	5	(17.2)	15	(51.7)
Total	21	(72.5)	8	(27.5)	29*	(100.0)

*s/informação p/ 11 presidiários

Constatou-se que 23,2% dos presidiários foram imediatamente hospitalizados na época do diagnóstico, conforme descrito na Tabela XIV.

Tabela XIV– Presidiários com tuberculose, segundo a hospitalização

Hospitalização	No.	%
Sim	6	23.1%
Não	20	76.9%
Total	26*	100.0

* s/ informação p/ 14 presidiários

5.4.2 – História de vida prisional

Os dados sobre a movimentação carcerária de 38 dos 40 detentos, constam do Anexo II. Para fins de melhor demonstração foi detalhado, em separado (Tabela XV), o período em que os detentos agrupados em linhagens idênticas (“cluster patterns”) permaneceram em períodos coincidentes, nos vários presídios bem como as datas em que suas amostras chegaram para análise no Instituto Adolfo Lutz de Campinas.

Tabela XV – Histórico de vida carcerária dos pacientes fornecedores de amostras formadoras dos “cluster patterns” obtidos

Linhagem/ Técnica	Pacientes	Período Coincidentes dentro dos Presídios	Paciente/Data Cultura IAL
I - RFLP I - DRE-PCR	22, 40	06/97 a 04/99 – PI	22 - 07/98 40 - 03/98
IX - DRE-PCR XVIII – RFLP	18,25,34,36	18 e 25: 02/98 a 07/98 - AN 25 e 36: 12/95 a 08/97-CD e 10/97 a 01/98- CD 34 e 36: 05/98 a 10/98- PI	18 - 09/97 25 - 07/98 36 – 06/98 34 - 06/98
XI - DRE-PCR XXVII - RFLP	08, 13	Sem dados cadastrais para o paciente 13	08 - 06, 07 e 08/98 13 - 09/97
XIII - DRE-PCR XXIX e XXX-RFLP	33, 37	04/98 a 06/98 - PI	33 - 05/98 37 - 07/98
XVI - DRE-PCR XII - RFLP	24, 38	Sem dados cadastrais p/ pcte 38	24 - 01/98 38 - 07/98
XVII - DRE-PCR XIII - RFLP	04, 17	Não localizados períodos coincidentes.	04 - 04/97 17 - 09/97
XIX - DRE-PCR X - XXII - RFLP	12,19, 20	12 e 19: 08/97 a 11/97 – CD 19 e 20: 01/94 a 12/94 – CD e 06/92 a 01/93-SB	12 - 09/97 19 - 11/97 20 - 02/97
XX - DRE-PCR IV e V - RFLP	14, 16, 28	14 e 16: 12/90 a 04/92 - CDSP 16 e 28: 01/97 a 12/97 - AN	14 – 03,07,08,10/97 e 02/98 16 - 09/97 28 - 02/98
XXII- DRE-PCR XX - RFLP	01, 07	Franco da Rocha, em épocas diferentes e anteriores ao exame	01 - 03/97 07 - 04/97
XXIII - DRE-PCR XXIII, XXIV, XXV-RFLP	02, 03, 32	02 e 03: 08/96 a 03/97 - CD 32: não localizados períodos coincidentes	02 - 03/97 03 - 03/97 32 - 05/98

AN-Ataliba Nogueira

CD-Casa de Detenção

CDSP – Casa de Detenção Flaminio Favero (São Paulo)

PI – Penitenciária I

SB – Cadeia Pública de São Bernardo

IAL – Instituto Adolfo Lutz (de Campinas)

6 - Discussão

A aplicação de técnicas moleculares para a identificação e diferenciação de isolados bacterianos mostra-se como uma nova e poderosa ferramenta que pode auxiliar nas investigações epidemiológicas (Maslow *et al.*, 1993).

Shoemaker *et al.* (1985); Drake *et al.* (1987); Roberts *et al.* (1987); Pao *et al.* (1988); Pao *et al.* (1990) utilizaram a PCR e sondas de DNA para identificar sequências específicas em amostras clínicas de *M. tuberculosis*. Esta técnica, por amplificar sequências de DNA alvo de forma exponencial em questão de horas, é usada na rápida amplificação dessas sequências que servirá para a caracterização de muitos microorganismos, incluindo micobactérias (Drake *et al.*, 1987 e Hance *et al.*, 1989). Devido à extrema sensibilidade desta técnica, em numerosos trabalhos a mesma tem sido utilizada para a caracterização de linhagens de *M. tuberculosis* (Brisson-Noel *et al.*, 1989; Boddingtonhaus *et al.*, 1990; Eisenach *et al.*, 1990; Hermans *et al.*, 1990b; Patel *et al.*, 1990; De Wit *et al.*, 1990; Shankar *et al.*, 1990).

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de PCR para amplificar fragmentos da sequência de inserção *IS6110* de todas as amostras utilizadas.

É importante citar que estas amostras, além de terem sido semeadas no meio Lowestein-Jensen(LJ), que é próprio para o cultivo de membros do complexo *M. tuberculosis*, também foram semeadas em ácido para-nitrobenzóico (PNB), que é inibidor para *M. tuberculosis*, o que serviu como indicativo inicial na identificação dessa espécie. Conforme já citado anteriormente, todas as amostras utilizadas neste trabalho foram confirmadas como *M. tuberculosis* através do Instituto Adolfo Lutz.

A literatura refere que o *M. tuberculosis* pode conter de uma a várias cópias da sequência de inserção *IS6110* (Rastogi *et al.*, 1992; Small *et al.*, 1993; Small *et al.*, 1994) sendo normalmente encontradas pelo menos quatro (Thierry *et al.*, 1990a) e sendo raras amostras que não contenham tal sequência (Van Soolingen *et al.*, 1991).

Os resultados aqui obtidos através da técnica de RFLP, utilizando o elemento *IS6110* como sonda molecular, demonstraram que as amostras de *M. tuberculosis* continham de duas a 12 cópias da referida sequência de inserção e apenas uma linhagem apresentou menos de quatro cópias.

Na técnica de RFLP utilizou-se a enzima *Pst*I porque não se encontram sítios para esta enzima dentro da sequência de inserção *IS6110* (Otal *et al.*, 1991). Isto fez com que o número de bandas aqui obtidos, fosse

menor do que o obtido normalmente em vários outros trabalhos (Van Embden *et al.*, 1993; Van Soolingen *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994; Sola *et al.*, 1997), em que os autores utilizaram a enzima PvuII, que cliva internamente essa sequência de inserção.

O dendrograma gerado neste estudo através da técnica de RFLP, diferenciou 30 grupos de linhagens, tendo mostrado, também, que existem 12 grupos de linhagens que apresentaram um mesmo padrão de bandas. Os demais grupos apresentaram um padrão de distribuição de bandas variado. É preciso ser observado que embora o dendrograma apresente 12 “cluster patterns” apenas oito destes foram considerados como tal, já que quatro deles (grupos IV, XV, XIX e XXII) foram formados em função das amostras serem advindas dos mesmos pacientes.

Os demais “cluster patterns” formados, foram obtidos com amostras oriundas de pacientes diferentes. Esses dados indicam que não ocorreram co-infecções com duas amostras diferentes nestes pacientes e também que aqueles portadores de idênticas linhagens de *M. tuberculosis* poderiam ter sido infectados pelos próprios companheiros de presídio.

Conforme citado por Van Soolingen *et al.* (1993) e Friedman *et al.* (1995), as linhagens de *M. tuberculosis* que contem apenas uma ou duas cópias da IS6110 não devem ser diferenciadas pelo uso de RFLP-IS6110 e

que elas seriam melhor diferenciadas com o uso de outros marcadores. Ainda segundo Friedman *et al.* (1995) outras técnicas como a DRE-PCR teriam um poder de diferenciação similar ao da técnica de RFLP além de poder ser realizada em menor tempo e pela maioria dos laboratórios não equipados para realizar a técnica de RFLP .

Utilizou-se, também, neste trabalho, a técnica de DRE-PCR que mostrou-se eficaz na diferenciação das diversas linhagens em estudo. O perfil de bandas representativo de cada grupo de linhagens demonstrou que essa técnica foi suficientemente discriminatória para agrupar as amostras em estudo em 25 grupos diferentes sendo que o dendrograma específico obtido demonstra 12 grupos com o mesmo padrão de bandas e os demais com padrões de bandas únicos. Entre os 12 grupos com idêntico padrão de distribuição de bandas, apenas dez foram considerados como “cluster patterns” (I, IX, XI, XIII, XVI, XVII, XIX, XX, XXII e XXIII) já que dois grupos (V e XXIV) foram formados em virtude das amostras serem advindas do mesmo paciente.

Em análise mais detalhada, comparando-se as duas técnicas, evidenciou-se que a RFLP foi mais sensível e específica pois em alguns casos ela separou linhagens que na técnica de DRE-PCR ficaram juntas.

Assim, o grupo XX obtido pela técnica de DRE-PCR, ficou dividido em dois (IV e V) com a técnica RFLP. Observa-se que estão envolvidas, nesse caso, cinco amostras de um mesmo paciente (paciente 14) e duas amostras de pacientes diferentes (pacientes 16 e 28). A técnica de DRE-PCR juntou-as num único grupo, considerando como linhagens idênticas, enquanto que a técnica de RFLP diferenciou-as em dois grupos. Observando-se a Tabela II (onde constam a disposição das bandas de RFLP) nota-se que esses grupos IV e V, possuem a mesma quantidade e disposição de *IS6110* (bandas), com exceção da banda representada pela migração em 3,7 que a linhagem representativa do grupo V não apresenta. Outros grupos formados como resultado da utilização da técnica de RFLP também foram juntados nos resultados obtidos pela técnica de DRE-PCR. Os dendrogramas, referentes aos resultados obtidos pelas duas técnicas ilustram, de forma clara, a maior especificidade oferecida pela técnica de RFLP que diferenciou, dentre as amostras em estudo, 30 grupos de linhagens, enquanto a técnica de DRE-PCR diferenciou 25 grupos de linhagens.

Para os grupos considerados “cluster patterns” estão envolvidos pacientes diferentes, pertencentes, na época do envio do material para a cultura de escarro, a presídios diferentes. Um exemplo pode ser descrito observando-se o grupo XXVII de RFLP que agrupou em linhagem de

M. tuberculosis idêntica, as amostras advindas dos pacientes números 18, 25, 34 e 36. Conforme constatado nos levantamentos, esses pacientes chegaram a conviver em três presídios diferentes (Ataliba Nogueira, Casa de Detenção e Penitenciária I) em diferentes épocas, anteriores ao envio das amostras para exame, fato que foi gerado devido à alta rotatividade dos detentos entre os presídios.

Esses detentos poderiam já ser portadores do bacilo da tuberculose (infecção) ou mesmo terem sido infectados dentro dos presídios, ocorrendo o adoecimento nestes locais devido a condições que os deixaram mais susceptíveis à doença. Entre essas condições poderia ser citado desde a própria situação estressante que a prisão pode representar, até a ocorrência da AIDS pois foi também constatado, através das Fichas de Notificações, que 48,1% desses detentos apresentaram associação com AIDS.

Apesar da possibilidade desses detentos já terem chegado aos presídios como portadores do bacilo, o fato de existirem linhagens idênticas causando a tuberculose em diferentes presidiários, pode ser uma indicação de que esteja ocorrendo a transmissão da doença tuberculose entre eles, a menos que esses tenham sido infectados, anteriormente, por uma fonte da mesma

cadeia de transmissão das referidas linhagens formadoras dos “cluster patterns” identificados aqui pelas técnicas de RFLP e DRE-PCR.

Em relação à tuberculose é sabido que o grau de proximidade com pessoas doentes é um importante fator de risco para a infecção, sendo esse fator, no caso dos presídios, um item de difícil solução. Para amenizá-lo, sem dúvida, estão envolvidas questões ligadas ao próprio espaço físico, embora outras providências, como a busca ativa de casos de tuberculose já existentes, seu tratamento e até o isolamento dos doentes possa contribuir para evitar a transmissão do bacilo com posterior aparecimento de outros casos. Foram recomendadas, no Anexo III deste trabalho, algumas medidas epidemiológicas, úteis no controle da tuberculose dentro dos presídios.

Segundo Riley *et al.* (1967), o risco de infecção está vinculado com a densidade bacilar no ar que se respira, tendo relatado em estudo realizado em hospital, a correlação existente entre o número de infecções do pessoal da enfermaria, os intervalos em que ocorrem e o número de bacilos da tuberculose presentes no ambiente de atendimento de casos dessa doença (número que se calcula de acordo com o volume de ar respirado por indivíduo). Rouillon *et al.* (1977) afirmam que a transmissão se procede mediante as partículas que formam um aerosol que contém, um ou mais bacilos e se derivam da evaporação das pequenas gotas de “*pflugge*”, sendo

as demais partículas, demasiadamente volumosas para chegar aos alvéolos pulmonares. Ainda segundo estes autores o número de partículas projetadas em torno do paciente, durante a respiração normal é reduzido mas, um simples ato de tossir, projeta no ar 3.500 partículas com capacidade infectante (o que também equivale a cinco minutos de conversação em volume de respiração normal). Um espirro desse paciente dispersa na atmosfera cerca de um milhão de partículas.

Como os doentes de tuberculose pulmonar bacilífera são uma constante fonte de infecção para seus contatos, o rápido início do tratamento é de grande importância e deve ser considerado quando se trata da transmissão do bacilo.

Neste estudo constatou-se que a demora, do início dos sintomas respiratórios até o início do tratamento, apresentou a mediana de oito semanas. O intervalo ocorrido entre a primeira consulta e o tratamento foi de até 30 dias para 86,7% dos detentos. Foi observado também, que 72.5% dos casos de tuberculose apresentaram resultado positivo para o exame de baciloscopia de escarro, o que reforça a urgência para o início do tratamento já que esses doentes são portadores de alta concentração de bacilos (no mínimo 5.000 bacilos/ml de escarro) (Riley *et al.* 1962; Loudon & Roberts, 1967; Loudon & Roberts, 1968; Loudon & Spohn, 1969).

Apesar da tuberculose ser uma doença de notificação compulsória e de terem sido realizadas várias buscas, foram localizadas apenas 72,5% (29 casos) das Fichas de Notificações da Tuberculose. Este fato evidencia a ocorrência de sub-notificação de casos dessa doença, dificultando, sem dúvida, uma avaliação concreta do problema.

Quanto à história de vida carcerária dos detentos, investigou-se possíveis contatos entre os presidiários fornecedores das amostras que, após a utilização das técnicas de Biologia Molecular (RFLP e DRE-PCR) apresentaram-se como sendo portadores de idênticas linhagens de *M. tuberculosis*.

Não serão discutidos aqui os grupos formados em função as amostras serem advindas do mesmo paciente. Os demais “clusters” analisados permitiram estabelecer em qual período poderia ter ocorrido a transmissão do bacilo *M. tuberculosis* entre os detentos ali envolvidos.

Observa-se que, na maioria dos citados “clusters” (Tabela XV), os detentos estiveram num mesmo presídio em períodos coincidentes sendo que em alguns casos (pacientes 25 e 36) conviveram em dois períodos diferentes em presídios diferentes (Casa de Detenção e Penitenciária I); o mesmo ocorreu com os pacientes 19 e 20 (Casa de Detenção e Cadeia São Bernardo).

Na análise da história de vida prisional dos pacientes da linhagem I (22 e 40), nota-se que os períodos em que estiveram presos se interseccionam entre 06/97 a 04/99, quando estavam presos na Penitenciária I. Esse achado reforça os resultados obtidos pelas técnicas laboratoriais referidas, na medida em que sugere ter havido transmissão do bacilo entre esses detentos ou até uma terceira fonte comum, não diagnosticada dentro da prisão. Quanto aos pedidos de exames das amostras desses pacientes (cultura de escarro), os mesmos ocorreram em épocas posteriores ao período.

Quanto aos pacientes 14, 28 e 16, nota-se que teriam permanecido nos mesmos presídios em períodos coincidentes (a exemplo do que aconteceu com os demais já citados) e que nesse caso estão envolvidos, além dos presídios Casa de Detenção e Ataliba Nogueira, a Casa de Detenção Flaminio Favero - CDSP (São Paulo). Os pacientes 14 e 16 permaneceram na CDSP no período de 12/90 a 04/92. Posteriormente, no período de 01/97 a 12/97, os pacientes 16 e 28 permaneceram no presídio Ataliba Nogueira. Ressaltamos que a técnica de RFLP não juntou esses três pacientes num mesmo grupo (tendo separado o paciente 14 dos outros dois), o que aconteceu pela técnica de DRE-PCR. Como pode ser observado, o paciente 14 teve cinco amostras enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para exame e que mostraram resultado positivo tanto para a cultura de escarro

quanto para o exame de baciloscopia. Segundo Rouillon *et al.* (1977), um paciente com resultado positivo na análise direta do escarro (baciloscopia) apresenta os sintomas característicos da doença, principalmente tosse, infectando um número maior de contatos que outros pacientes. Sabe-se que o paciente 14 trata-se de um caso de tuberculose resistente a algumas drogas. Avalia-se que referido paciente só não infectou mais pessoas por estar, naquele período, em Enfermaria e também porque, devido ao seu estado de saúde, estava sendo constantemente medicado.

Verificou-se, ainda, que 20,6% dos presidiários já haviam sido anteriormente tratados, possuindo referências de abandonos de tratamentos ou recidiva da doença, podendo apresentar resistência medicamentosa. Estes pacientes em retratamento, reiteram o abandono, como pode ser constatado em estudo anterior (Oliveira, 1995) onde 76,4% abandonaram o tratamento.

Não foi possível analisar uma possível convivência dos pacientes 13 e 38 com os demais, devido a falta das suas fichas cadastrais. Isso aconteceu porque os pedidos para exame do material destes detentos vieram para o Instituto Adolfo Lutz de Campinas com o nome incompleto e sem o número da matrícula no sistema carcerário. Levantamentos realizados para a localização dos dados, não tiveram sucesso, impossibilitando, inclusive, a localização das fichas de notificação desses dois pacientes.

Para todos os casos de pacientes portadores de idênticas linhagens de *M. tuberculosis* e que permaneceram no mesmo presídio em períodos coincidentes, verificou-se que os exames de suas amostras foram solicitados ao Instituto Adolfo Lutz de Campinas em datas posteriores a essa possível convivência. Embora este fato não possa ser avaliado como confirmatório, foi considerado relevante quanto à ocorrência da transmissão da tuberculose entre os detentos.

É importante ressaltar também que apesar do levantamento epidemiológico ter mostrado que pacientes portadores de idênticas linhagens de *M. tuberculosis* chegaram a fazer parte do mesmo presídio, no mesmo período, não foi possível estabelecer se eles chegaram a conviver, por exemplo, numa mesma cela.

7 - Conclusão

Através dos resultados obtidos pelas técnicas de Biologia molecular utilizadas no presente estudo (RFLP e DRE-PCR) concluimos que existem linhagens diferentes e linhagens idênticas de *M.tuberculosis* causando a tuberculose entre os presidiários.

Aliados a estes resultados, a investigação epidemiológica indicou a ocorrência dos seguintes fatores favorecedores para a transmissão da tuberculose: alta demora entre o início dos sintomas e o tratamento, assim como o grande intervalo entre a primeira consulta e o tratamento; alta porcentagem de pacientes bacilíferos bem como de aidéticos; alta rotatividade dos detentos dentro dos presídios sendo que comprovou-se a passagem, pelos mesmos presídios em épocas coincidentes, de pacientes portadores de idênticas linhagens de *M. tuberculosis*.

Com isso, concluímos que está ocorrendo a transmissão da doença tuberculose entre os presidiários, aqui representados por suas amostras formadoras de “cluster patterns”.

Abstract

Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates, obtained from inmates in different correction institutions of Campinas, SP, Brazil, and the tuberculosis transmission in this institutions.

The aim of this work was to detect *Mycobacterium tuberculosis* strains responsible for causing tuberculosis within Penitentiaries of Campinas, São Paulo, Brazil, as well to verify the possible transmission of this sickness among inmates. We analysed by restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) and double-repetitive-element PCR (DRE-PCR), 52 samples of this bacterial species, isolated from sputum samples of 40 inmates with clinical indication of tuberculosis in the period of february 1997 up to september 1998.

The analysis of the obtained genomic DNA hybridization, digested with *Pst*I enzyme and by the use of the insertion sequence *IS*6110 as a molecular probe, pointed out 30 patterns. From these, eight were cluster patterns, with identical distribution of bands, and the others ones showed unique patterns between them and from the eight clusteres ones. The double-repetitive-element PCR method, classified the 52 clinical isolates as having 25 distinct patterns; ten were cluster patterns. Epidemiological analysis of these inmates showed that in six of these cluster patterns were

involvid patients staying for the same period in the same prison.

The existence of identical *Mycobacterium tuberculosis* strains in distinct inmates, that were kept together at least one time during their prisoner estate, led us to believe the occurrence of horizontal transmission that was due to the communication system that exists between the different penitentiaries.

8 – Referências Bibliográficas

AIUB, M. & GERHARDT F. G. - Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil.
Jornal de Pneum. 19 (1): 4-10, 1993.

ALLAND, D.; KALKUT, G. E.; MOSS, R.A.; McADAM, R. A.; HAHN, J. A.;
BOSWORTH, W.; DRUCKER, E. & BLOOM, B. R. – Transmission of
Tuberculosis in New York City. An Analysis by DNA fingerprinting and
Conventional epidemiologic methods. **N. Engl. J. Med. 330**: 1710-1716, 1994.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D. D.; SMITH, J. A.;
SEIDMAN, J. G. & STRUHL, K. – Current protocols in molecular biology. Greene
Publishing Associates, BROOKLYN, N. Y. - 1988

BECK-SAGUE, C. M.; DOOLEY, S. W.; HUTTON, M. D.; BREEDEN, A.;
CRAWFORD, J. T.; PITCHENIK, A. E.; WOODLEY, C.; CAUTHEN, G. & JARVIS,
W. R. - Hospital outbreak of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **JAMA**,
268: 1280-1286, 1992.

BARNES, P.F.; BLOCH, A.B.; DAVIDSON P.T. & SNIDER D. E. Jr - Tuberculosis in
patients with human immunodeficiency virus infection. **Engl. J. Med. 324** (23): p.
1644-50, 1991.

- BERGMIRE- SWET, D., BARNETT, B. J., HARRIS, S. L., TAYLOR, J. P., MAZURECK, G. H., REDDY, V. – Tuberculosis outbreak in a Texas prison, 1994. **Epid. Infect.** 117(3): 485-492, 1996.
- BLOOM, B. R. & MURRAY, C. J. L. - Tuberculosis: comentary on a reemergent killer. **Science** 257: 1055-1064, 1992.
- BODDINGHAUS, B., ROGALL, T., FLOHR, T. BLOCKER, H.& BOTTGER, E. C., - Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. **J. Clin. Microbiol.** 28 (8): 1751-1759. 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão de Pneumologia Sanitária. Companhia Nacional Contra a Tuberculose. Controle da tuberculose; uma proposta de integração ensino-serviço. Brasília. CNCT/NUTES - 4ª. Ed. 1994a, 155p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2ª. Ed. RJ, 1994b, 115p.
- BRAWN, M.M.; TRUMAN, B.I.; MAGUIRE, B.; DIFERDINANDO,D.T. JR., WORMSER, G.; BROADDUS, R.; & MORSE, D.L. - Increading Incidence of tuberculosis in a Prison Inmate Population. **JAMA.** 261 (3): 393-97, 1989.

BROWN, P. – A disease that is alive and kicking. **World Health**, 4: 4-5, 1993.

BRISSON-NOEL, A.; GICQUEL, B.; LECOSSIER, D.; LEVY-FEBAULT, V.;
NASSIF, X.; & HANCE, A. – Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of
mycobacterial DNA in clinical samples. **Lancet ii**: 1069-1071, 1989

CAMPOS, H. S. - Tuberculose Um Perigo Real e Crescente. **JBM**. 70 (5): 73-105, 1996.

CAVE, M. D.; EISENACH, K. D.; MCDERMOTT, P. F.; BATES, J. H. &
CRAWFORD, J. T. – IS6110: conservation of sequence in *Mycobacterium*
tuberculosis complex and its utilization in DNA fingerprinting. **Mol. Cell Probes** 5: 73-
80, 1991.

CHIODINI, R.J. - Biochemical characteristics of various strains of *Mycobacterium*
paratuberculosis. **Am. J. Vet. Res.** 47 (7): 1442-1445, 1986.

CHIODINI, R.J. & KRUININGEN, H.J. - Characterization of *Mycobacterium*
paratuberculosis of bovine, ovine, and caprine origin by gas-liquid chromatographic
analysis of fatty acids in whole cell extract. **Am. J. Vet. Res.** 46 (9): 1980-89, 1985.

CDC Centers for Disease Control. - Prevention and Control of Tuberculosis in
Correctional Institutions: Recommendations for the Advisory Committee for the
Elimination of Tuberculosis. **MMWR**. 38: 315-25, 1989.

CDC Centers for Disease Control . – Transmission of multidrug resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system. New York 1991. **MMWR** 41: 507-509, 1992.

CLARK-CURTISS, J. E., GERALD, P. N. - Conservation of Genomic sequences among isolates of *Mycobacterium leprae*. **J. Bacteriol.** 171 : 4844-4851, 1989.

CLARK-CURTISS, J. & DOCHERTY, M. A. – A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. **J. Infect. Dis.** 159: 7-15, 1989.

CLARIDGE, J. E.; SHAWAR, R. M.; SHINNICK, T. M. & PLIKATIS, B. B. - Large-Scale Use of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a Routine Mycobacteriology Laboratory. **J. Clin. Microbiol.** 31 (8: 2049-2056, 1993.

COLLINS, D. M. – DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* BCG. **J. Gen. Microbiol.** 130: 1019-1021, 1984.

COOLINS, D. M. – DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. **J. Clin. Microbiol.** 21(2): 562-564, 1985.

COOPER, G. L., MCGREGOR, J.A. & McFADEN – The potential use of DNA probes to identify and type strains within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Lett. Appl. Microbiol.** 8:127-130, 1989.

- COUSINS, D. V., WILTON, S. D., FRANCIS, B. R. & GOW B. L. - Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** **30** (1): 255-258. 1992.
- COUSINS, D. V., WILTON, S. D. & FRANCIS, B. R. - Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. **Vet. Microbiol.** **27**: 187-195, 1991.
- DALEY, C. L., SMALL, P. M., SCHECTER, G. F. SCHOOLNIK, G. K. McADAM, R.A., JACOBS, W. R. & HOPEWELL, P. C. – Na outbreak of tuberculosis with accelerated progression among infected with human immunodeficiency virus: na analysis using restriction fragment length polymorphism. **N. Engl. J. Med.** **326**: 231-235, 1992.
- DEAN, A. G., DEAN, J. A., BURTON, A ., DICHER, R.C. – Epi-Info version 6: a word processing database and statistics program for epidemiology on microcomputers.USD, Incorporated, Stone Montain, Georgia, 1997.
- De WIT, D., STEYN, L., SHOEMAKER, S. & SOGIN, M. – Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. **J. Clin. Microbiol.** **28** (11): 2437-2441, 1990.
- DOLIN, P.J., RAVIGLIONE, M.C. & KOCHI, A. - A review of current epidemiological data and estimations of current and future incidence and mortality from tuberculosis. Geneve, World Health Organization. Tuberculosis Program, 1993.

- DOLIN, P.J., RAVIGLIONE, M.C. & KOCHI, A. – Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. **Bull. WHO.** 77 (2): 213-20, 1994.
- DRAKE, T. A., HINDLER, J. A., BERLIN, O. G.W. & BRUCKNER, D. A. – Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. **J. Clin. Microbiol.** 25 (8): 1442-1445, 1987.
- EDLIN, B.R., TOKARS, J.I., GRIECO, M.H., CRAWFORD, J.T., WILLIAMS, J., SORDILLO, E.M., ONG, K.R., KILBURN, J.O.; DOOLEY, S.W., CASTRO, K.G., JARVIS, W.R., & HOLMBERG, S.D. - An outbreak multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.** 326 (23: 1514-1521, 1992.
- EISENACH, K.D., CRAWFORD, J.T., & BATES, J.H. – Genetic relatedness among strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Analysis of restriction fragment heterogeneity using cloned DNA probes. **Am. Rev. Respir. Dis.** 133: 1065-1068, 1986.
- EISENACH, K.D., CRAWFORD, J.T., & BATES, J.H. - Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** 26 (11): 2240-2245, 1988.
- EISENACH, K.D. CAVE, M. D. BATES, J. H. & CRAWFORD, J.T. – Polymerase chain reaction amplification of a repetitive sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.** 16 : 977-981, 1990.

- FISS, E., CHEHAB, F. & BROOKS, G. - DNA amplification and reverse dot blot hybridization for detection and identification of mycobacteria to the species level in the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.** 30 (5): 1220-1224. 1992.
- FOMUKONG, N. G., DALE, J. W., OSBORN, T. W. & GRANGE, J. M. - Use of gene probes based on the insertion sequence IS986 to differentiate between BCG vaccine strains. **J. Appl. Microbiol.** 72: 16-133, 1992.
- FOX, B. C., MOBLEY, H. L. T. & WADE, C.J. - The use of a DNA probe for epidemiological studies of candidiasis in immunocompromised hosts. **J. Infect. Dis.** 159: 488-494, 1989.
- FRIEDMAN, C. R., STOECKLE M. Y., JOHNSON JR, W. D. & RILEY, L. W. - Double-Repetitive-Elements PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.** 33 (5): 1383-1384. 1995.
- FRIES, J. W. U., PATEL, R. J., PIESSENS, W, F. & WIRTH, D. F. - Detection of untreated mycobacteria by using polymerase chain reaction and specific DNA probes. **J. Clin. Microbiol.** 29 (8): 1744-1747. 1991.
- GENEWEIN, A., AMALIO, T., CLAUDIA B., CARLO M., SEVERIN W., MAURER, A.M., RIEDER, H., SCHOPFER, K., BODMER, T. - Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. **Public Health.** 342: 841-4, 1993.

GODFREY-FAUSSET, P., MORTIMER, P. R.; JENKINS, P. A. & STOKER, N.G -Evidence of transmission of tuberculosis by DNA fingerprinting. **Br. Med. J.** **305** : 221-223, 1992.

GREEN, E. P., TIZARD, M. L. V., MOSS, M. T., THOMPSON, J. WINTERBOURNE, D. J., McFADDEN, J. J. & HERMON-TAYLOR, J. – Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Nucleic Acids Res.** **17** (22): 9063-9073, 1989.

GROSSKINSKY, C. M., JACOBS, W. R. Jr., CLARK-CURTISS, J. E. & BLOOM, B.R. - Genetic relationships among *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, and candidate leprosy of an *M. leprae*-specific repetitive sequence. **Infect. Immun.** **57**: 1535-1541, 1989.

HAAS, W. H.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L. & CRAWFORD, J. T. – Mixed-Linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J. Clin. Microbiol.** **31** (5): 1293-1298,1993.

HANCE, A.J., GRANDCHAMP, B., LEVY-FREBAULT, V., LECOSSIÈRE D., RAUZYER, J., BOCART, D. & GICKEL. - Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. **Mol. Microbiol.** **3** (7): 843-849. 1989.

HERMANS, P.W.M.; VAN SOOLINGEN,D.; DALE, J.W.; SCHUITTEMA, A.R.; McADAM, R.A.; CATTY, D. & VAN EMBDEN, J.D.A. - Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** **28** (9): 2051-2058, 1990a.

HERMANS, P. W. M., SCHUITTEMA, A. R. J., Van SOOLINGEN, D., VERSTYNEN, C. P. H., BIK, E. M., THOLE, J. E. R., KOLK, A. H. J. & Van EMBDEN, J. D. A. - Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** **28** (6): 1204-1213. 1990b.

HERMANS, P. W. M., VAN SOOLINGEN, D., BIK, E. M., HAAS, P. E. W. DE., DALE, J. W., & VAN EMBDEN, J. D. A.A. - The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in hot-spot integration region for insertion Elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strain. **Infect. Immun.** **59**: 2695-2705. 1991.

HOPEWELL, P. C. - Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features, management and control of tuberculosis. **Clin. Infect. Dis.** Vol. 15: 540-547. 1992.

IMAEDA,T.-Deoxyribonucleic acid relatedness among selcted strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **35**: 147-150, 1985.

- KOLK, A. H.J., SCHUITEMA, A. R. J., KULPER, S., VAN LEEUWEN, J., HERMANS, P. W. M. VAN EMBDEN, J. D. A. & HARTSKEERL. - Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using polymerase chain reaction and nonradioactive detection system. **J. Clin. Microbiol.** 30 (10): 2567-2575, 1992.
- KOX, L.F.F., RHIENTHONG, D., MEDO MIRANDA, A., UDOMSANTISUK, N., ELLIS, K., VAN LEEUWEN, J., VAN HEUSDEN, S., KULPER, S. & KOLK, A.H.J. - A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.** 32 (3): 672 - 78, 1994.
- LAGUNA, F., ADRADOS, M., DÍAZ, F., MARTÍNEZ, R., AGUADO, G.C., PUENTES, S. & LAHOZ, J.M.G. - AIDS and tuberculosis in Spain. A report of 140 cases. **J. Infect.** 23 (2): 139-44, 1991.
- LINTON, C. J., JALAL, H., LEE, J. P. & MILLAR, M. R. - Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA Analysis. **J. Clin. Microbiol.** 32 (9): 2169-2174, 1994.
- LOUDON, R. G. & ROBERTS, R. M. - Droplet expulsion from the respiratory tract. **Am. Rev. Respir. Dis.** 95: 435, 1967.
- LOUDON, R.G. & ROBERTS, R. M. - Spreading and dissemination of tuberculosis. **Am. Rev. Respir. Dis.** 98: 297-300, 1968.

LOUDON R. G. & SPOHN, S. K. – Cough frequency and infectivity in patients with pulmonary tuberculosis. **Am. Rev. Respir. Dis.** **99**: 109, 1969.

MANJUNATH, N., SHANKAR, P., RAJAN, L., BHARGAVA, A., SALUJA, S. & SHRINIWAS, R - Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. **Tubercle.** **72**: 21-27. 1991.

MARMUR, J. & DOTY, P. – Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. **J. Mol. Biol.** **5**: 109-118, 1962.

MASLOW, J.N., MULLIGAN, M.E., ARBEIT, R.D. - Molecular Epidemiology: 17 Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms. **Clin. Infect. Dis.**: **17**: 153-64, 1993.

MAZUREK, G.H., CAVE, M.D., EISENACH, K.D., WALLACE, R.J., BATES, Jr., J.B. & CRAWFORD, J.T. - Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** **29** (9): 2030-2033, 1991.

McADAM, R. A., HERMANS, P. W. M., van SOOLINGEN, D., ZAINUDDIN, Z. F., CATTY, D., van EMBDEN, J. D. A. & DALE, J. W. - Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. **Mol. Microbiol.** **4**: 1607-1613. 1990.

- MENDIOLA, M. V., MARTIN, C., OTAL, I. & GICQUEL, B. – Analysis of regions Responsible for *IS6110* RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. **Res. Microbiol.** **143**: 767-772, 1992.
- MONTORO, E., VALDIVIA, J. & LEÃO, S. C. – Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Havana, Cuba, by *IS6110* Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and by the Double- Repetitive-Element PCR ethod. **J. Clin. Microbiol.** **36** (10): 3099-3102, 1998.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. - Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase- catalysed chain reacton. **Meth. Enzymol.** **155**: 335-351. 1987.
- MURRAY, P.R.; KOBAYASHI, G.S.; PEALLER, M.A. & ROSENTHAL, K.S. - **Medical Microbiology** Ed. Morby Year Book Inc. 2^a. Ed. St. Louis, Missouri. 1994. 755p.
- NARAIN, J. P.; RAVIGLIONE, M. C. & KOCHI, A. - HIV-associated tyberculosis in developing countries: epidemiology and strategis for prevention. **Tuberc. Lung Dis.** **73**:311-21, 1992.
- NOLAN, C. M. & ELARTH, A. M. & BARR H., & SAEED, A . M.; & RISSER, D.R. - An outbreak of tuberculosis in shelter for homeless men. A description of its evolution and control. **Am. Rev. Respir. Dis.** Vol. 143: 257-61, 1991.

OLIVEIRA, H. B. – Estudo da tuberculose notificada entre presidiários. In: CONGRESSO BRASILEIRO, 3; IBERO-AMERICANO, 2; LATINO-AMERICANO DE EPIDEMIOLOGIA, 1, Salvador, 1995 – **Temas Livres**, Salvador, 1995 (Resumo, 665).

OLIVEIRA, H. B. - Characteristics of new tuberculosis cases detected at a prison in Campinas-SP-Brazil, 1993-1996. **Intern. J. Tuberc. Lung Dis.**, (5):S102, oct., 1997 (suppl).

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. UNION INTERNACIONAL CONTRA LA TUBERCULOSIS Y ENFERMIAS RESPIRATORIAS. TUBERCULOSIS Y SIDA. Declaración sobre el SIDA Y la tuberculosis. **Bol. Un. Int. Tuberc.** 64: 7-11, 1989.

OTAL, I., MARTIN, C., VINCENT-LÉVY-FRÉBAULT, V., THIERRY, D., & GICQUEL, B. - Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** 29 (6): 1252-1254, 1991.

OSTE, C. - Polymerase chain reaction. **Biotech.** 6 : 162-167. 1988.

PAO, C. C., LIN, S. S., WU, S. Y., JUANG, W. M., CHANG, C. H. & LIN, J. Y. - The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA as probes. **Tubercle.** 69: 27-36, 1988.

PAO, C. C., BENEDICT YEN, T. S., YOU, J. B., MAA, A. S., FIS, E. H. & CHANG C. H. - Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. **J. Clin. Microbiol.** 28 (9): 1877-1880. 1990.

- PATEL, R. J., FRIES, J. W. U., PIESENS, W. F. & WIRTH, D. F. – Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** **28** (3): 513-518, 1990.
- PIERE, C., LECOSSIER, D., BOUSSOUGANT, Y., BOUCART, D., JOLY, V., YENI, P. & HANCE, A. J. - Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. **J. Clin. Microbiol.** **28** (4): 712-717. 1991.
- PINEDA-GARCIA, L., FERREIRA, A. & HOFFNER, S. E. – DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. **J. Clin. Microbiol.** **35** (9): 2393-2397, 1997.
- RAPPUOLI, R., PERUGINI, M. & RATTI, G. – DNA element of *Corynebacterium diphtheriae* with properties of an insertion sequence and usefulness for epidemiological studies. **J. Bacteriol.** **169**: 308-312, 1987.
- RASTOGI, N., ROSS, B. C., DWYER, B., GOH, K. S., CLAVEL-SÉRÈS, S., JEANTILS, V., & CRUAUD, P. – Emergence during unsuccessful chemotherapy of multiple drug resistance in a strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** **11**: 901-907. 1991.
- REDDI, P.P., TALWAR, G. P. & KHANDEKAR, P. S. – Repetitive DNA sequence of *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of differential hybridization pattern with other *Mycobacteria*. **Int. J. Lepr.** **56**: 592-598, 1988.

REVES, R., BLAKEY, D., SNIDER, D.E. Jr., & FARER, L. S. – Transmission of multiple drug-resistant tuberculosis: report of a school and community outbreak. **Am. J. Epidemiol.** **113** (4): 423-35, 1981.

RIEDER, H.L., CAUTHEN, G.M., COMSTOCK, G.W. & SNIDER, D. E. Jr. - Epidemiology of tuberculosis in the United States. **Epidemiol. Rev.** **11**: 79-98, 1989a

RIEDER, H.L., CAUTHEN, G.M., KELLY, G. D., BLOCH, A.B. & SNIDER, D. E. Jr. – Tuberculosis in the United States. **JAMA** **262**: 385-389, 1989b.

RILEY, R. L., MILLS, C. C., O'GRADY, F., SULTAN, L. U., WITTSTADT, F. & SHIVPURI, D. N.- Infectiousness of air from a tuberculosis ward. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **85**: 511, 1962.

RILEY, R. L. – The hazard is relative. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **96**: 623, 1967.

ROBERTS, M. C., McMILLAN, C. & COYLE, M. B. – Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. **J. Clin Microbiol.** **25** (7): 1239-1243, 1987.

ROOK, G..A.W. & STANFORD, I.L. - Tuberculosis. The Koch Phenomenon and the Immunopathology of Tuberculosis. **CTMI** (215): 240-258, 1996.

ROOS, B. C., RAIOS, K., JACKSON, K. SIEVERS, A. & DWYER, B. – Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains using a nonradioactive Southern blot hybridization method. **J. Infect. Dis.** 163: 904-907, 1991.

ROOS, B. C., RAIOS, K., JACKSON, K. & DWYER. - Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. **J. Clin. Microbiol.** 30 (4) : 942-946, 1992.

ROUILLON, A., PERDRIZET, S. y WAALER, H. – La transmisión del bacilo tuberculoso: el efecto de la quimioterapia. In: Metodos de Control de la Tuberculosis. **Organizacion Panamericana de La Salud.** 346: 1 – 30, 1977.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular Cloning : A laboratorial Manual - 2ª Ed. 1989 - Cold Spring Harbor Laboratory Pres, - EUA.

SEKINE, Y. & OHTSUBO, E. - Frameshifting is requerid for production of the transposase encoded by insertion sequente 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA:** 4609- 4613, 1989.

SELWYN, P.A, HARTEL, D. & LEWIS IA - A prospective study of the risk of tuberculosis among intreavenous drug abusers with human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.** 320 (9): 545-50, 1989.

- SHANKAR, P., MANJUNATH, U., LAKSHMI, R., ADITI, B.; SETH, P. & SHERINIWAS – Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. **Lancet**. **335**: 423, 1990.
- SHAWAR, R. M., EL-ZAATARI, F. A. K., NATARAJ, A. & CLARRIDGE, J. E. - Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using two-step PCR and nonisotopic hybridization methods. **J. Clin. Microbiol.** **31** (1): 61-65. 1993.
- SHOEMAKER, S.A., FISHER, J. H. & SCOGGIN, C. H. – Techniques of DNA hybridization detect small numbers of mycobacteria with no cross-hybridization with nonmycobacterial respiratory organisms. **Am. Rev. Respir. Dis.** **131**: 760-763, 1985.
- SHOEMAKER, S. A., JONES, W. D. JR. & SCOGGIN, C. H. – Restriction fragment analysis of chromosomal DNA defines different strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Am. Rev Respir. Dis.** **134**: 210-213, 1986.
- SNIDER, D. E. Jr., HUTTON, M. D. - Tuberculosis in correctional institutions [Editorial]. **JAMA**. **261** (3): 436-7, 1989.
- SOLA, C., HORGAN, L., GOH, K. S. & RASTOGI, N. – Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* on a Caribbean island with IS6110 and DR probes **J. Clin. Microbiol.** **35** (4): 843-846, 1997.

- SOLA, C., HORGAN, L., MAISETTI, J., DEVALLOIS, A., GOH, K. S. & RASTOGI, N. - Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as a rapid alternative to *IS6110* fingerprinting for epidemiological studies in tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** **36** (4): 1122-1124, 1998.
- SKOLNICK, A. - Government Issues Guidelines to Stem Rising Tuberculosis Rates in Prisons. **JAMA.** **262** (23): 3249-53, 1989.
- SMALL, P. M., HOPEWELL, P. C; SINGH, S. P., MURPHY, M. J., DESMOND, E., SIERRA, M. F., & SCHOLNIK, G. K. - Exogenous reinfection with Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. **N. Engl. J. Med.** **328**: 1137 - 1144, 1993.
- SMALL, P. M., HOPEWELL, P. C., SINGH, S. P., PAZ, A., PARSONNET, J., RUSTON, D. C., SCHECTER, G. F., DALEY, C. L., & SCHOLNIK, G. K. - The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. **N. Engl. J. Med.** **330**: 1703 - 1709, 1994.
- STEAD, W.W. - Undetected tuberculosis in prison: source infection for community at large. **JAMA.** **240** (23): 2544-7, 1978.
- TABET, S.R., GOLDBAUM, G. M., HOOTON, T. M., EISENACH, K. D., CAVE, M. D. & NOLAN, C. M. - Restriction fragment length polymorphism analysis Detecting a community-based tuberculosis outbreak among HIV infected persons. **J. Infect. Dis.** **169**: 189-192, 1994.

TALA, E. & KOCHI. - Elimination of tuberculosis from Europe and the world. **Eur. Respir. J.** 4: 1159-1160.

THYERRY, D., BRISSON-NOËL, A., VICENT-LÉVY-FRÉBAULT, V., NGUYEN, S., GUESDON, J. & GICQUEL, B. - Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **J. Clin. Microbiol.** 28 (12): 2668-2673, 1990a.

THYERRY, D., CAVE, M.D., EISENACH, K.D., CRAWFORD, J. T., BATES, J.H., GICQUEL, B. & GUESDON, J.L. - IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Nucleic Acids Research.** 18 (1): 188, 1990b.

TISDALL, P. A., DEYOUNG, D. R., ROBERTS, G. D. & ANHALT, J. P.- Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography: a 10-month follow-up study. **J. Clin. Microbiol.** 16 (2): 400-402, 1982.

Van EMBDEN J. D. A ., & CAVE, M. D. & CRAWFORD, J. T. DALE, J. W., EISENACH, K. D., GICQUEL, B., HERMANS, P., MARTIN, C., McADAM, R., SHINNICK, T. M. & SMALL, P. - Strain identification of *Micobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J. Clin. Microbiol.** 31 (2): 406-09, 1993.

- Van SOOLINGEN, D., HASS, P. E. W., HERMANS, P. W. M., GROENEN, P. M.A., & VAN EMBDEN J. D. A. - Comparison of Various Repetitive DNA elements as Genetic Markers for Strain Differentiation and Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** 31 (8): 1987-1995. 1993.
- Van SOOLINGEN, D., HERMANS, P.W. M., HASS, P.E.W., SOOL, D.R.; & Van EMBDEN, J.D.A. - 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.** 29 (11): 2578-2586, 1991.
- Van SOOLINGEN.D., HERMANS, P.W.M., de HAAS, P. E. W. & van EMBDEN, J. D. A. - Insertion element *IS1081*-associated restriction fragment length polymorphism In *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. **J. Clin. Microbiol.** 30 (7): 1772-1777, 1992.
- VICTOR, T., DU TOIT, R. & Van HELDEN, P. D. - Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 30 (6): 1514-1517. 1992.
- YANG, Z.H., HAAS, P. E. W., VAN SOOLINGEN, D., VAN EMBDEN, J. D. A. & ANDERSEN, A. - Restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992: evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. **J. Clin. Microbiol.** 32 (12): 3018-3025, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **World Health**, 4, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION TUBERCULOSIS PROGRAMME – Tuberculosis notification update. WHO/TB/ 94: 175, December 1993.

ZAINUDDIN, Z.F. & DALE, J.W. – Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium tuberculosis* detected with a gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. **J. Clin. Microbiol.**, 135 (9): 2347-2355, 1989.

ANEXO I

Ficha de Notificação Tuberculose



**FICHA DE NOTIFICAÇÃO
TUBERCULOSE**

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA
 PROF. ALEXANDRE VIANIAC

Nº da Ficha: _____ Nº do Prontuário: _____ Data da Notificação: ____/____/____

Semana Epidem.: [][] [][] [][] [][] [][] [][] [][] [][] [][]

Era: _____ Unidade: _____ Código Unidade: [][] [][] [][] [][] [][] [][] [][] [][] [][]

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: ____ (anos, meses, dias) Sexo: 1 - Masc 2 - Fem

Nome da mãe: _____

Endereço: _____ Nº _____

Bairro: _____ Substr/Dist. paz: _____

Município: _____ Era: ____ Estado: ____ Cod. Res.: ____

2. IDENTIFICAÇÃO COMPLEMENTAR

Ocupação: _____ Escolaridade: _____

3 - TRATAMENTO ANTERIOR (o último antes de atual).

Não 1 - Não traiu/não sabe informar

☐

Sim 2 - Alta cura há: _____ anos _____ meses

3 - Abandono há: _____ anos _____ meses

Drogas utilizadas: _____

Código drogas
R - Rifampicina
I - Isoniazida
Z - Pirazinamida
S - Streptomicina
E - Etionamida
M - Etambutol
O - Outras
N - Não sabe inf.

4-FORMA CLÍNICA

☐	01 - Pulmonar	05 - Ganglionar
☐	03 - Meningite	06 - Óstea
☐	04 - Pleural	07 - Vias urinárias

Outras:

5. DESCOBERTA (caso pulmonar).

1 - Apresentação espontânea com sintomas respiratórios

2 - Apresentação por outros motivos

3 - Encaminhamento com suspeita ou diagnóstico de tuberculose
serviço de saúde que o encaminhou

4 - Controle do comunicante

6 - TEMPO DECORRIDO (caso pulmonar).

a) Do início dos sintomas respiratórios ao tratamento: meses
 semanas

b) Da 1ª consulta ao tratamento: meses
 semanas

7 - BACILOSCOPIA E CULTURA

☐ Baciloscopia de escarro: se positivo, quando: ____/____/____	Código das Culturas e bacterioscopia 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Em andamento 8 - Não realizado
☐ Cultura de escarro	
☐ Cultura de urina	
☐ Cultura de outro material: _____ .	

8 - RADIO

☐ RX-Torax	Código do RX
☐ RX outro local: _____	1 - Normal
	2 - Suspeita de TB
	3 - Suspeita de TB c/caverna
	4 - Outras afecções
	8 - Não realizado

9-OUTROS EXAMES COMPLEMENTARES

Teste Tuberculíneo: milímetros (Código para não realizado = 85)

Histopatologia do material: _____

Descrição: _____

10 - DOENÇAS ASSOCIADAS

Código	
1 - Aids	
2 - Diabetes	
3 - Alcoolismo	
4 - Doença mental	
5 - Outras:	
6 - Nenhuma	

II - ANTI-HIV

1 - Positivo
2 - Negativo
3 - Em andamento
4 - Não realizado

12 - HOSP. IMEDIATA

1 - Sim - Indicação médica
2 - Indicação social
3 - Não

13 - TRATAMENTO ATUAL

Inicio: / /

Drogas:

COMENTÁRIOS ADICIONAIS: _____

PARA CASOS HOSPITALIZADOS
PREENCHA O VERSO

Aspiração do meco

carimbos ERM ERM:

14 - INTERNAÇÃO

Data da internação: ____/____/____	0 - Não adesão ao tratamento	7 - Diabetes
Motivo principal: ☐	1 - Insuficiência respiratória aguda	8 - Intolerância medicamentosa
	2 - Hemoptise	9 - Caquexia
	3 - Meningite	10 - Elucidação diagnóstica
	4 - Miliar	11 - Causas sociais
Outro(s) motivo(s): ☐	5 - Abscesso	12 - Outros: _____
	6 - Aids	13 - Sem informação

15 - SAÍDA DO HOSPITAL

Data da saída: ____/____/____	1 - Cura
	2 - A pedido
	3 - Disciplinar
	4 - Mudança de diagnóstico
	5 - Alta para tratamento ambulatorial. Qual? _____
Tipo da saída: ☐	6 - Transferido p/ outro hospital. Qual? _____
	7 - Óbito por tuberculose
	8 - Óbito por outra causa. Qual? _____
	10 - Evadiu-se

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DA FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE TUBERCULOSE

Preencher esta ficha para todo e qualquer doente para o qual a unidade inicie ou continue o tratamento de tuberculose, seja ele caso novo, reinício de tratamento após abandono ou recebido por transferência, independentemente de já ter sido notificado anteriormente (a duplicidade de notificação será detectada por computador).

Os campos assinalados com asterisco serão preenchidos pelo C.V.E.

1 - IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

NOME: Preencher de forma legível o nome completo, sem abreviações.

ENDEREÇO: Anotar o endereço completo e o ERSa de residência. No caso de detentos, anotar "SISTEMA PENITENCIÁRIO".

2 - IDENTIFICAÇÃO COMPLEMENTAR

OCUPAÇÃO: Evitar termos gerais, como ajudante (de quê?), aposentado (em quê?).

3 - TRATAMENTO ANTERIOR

NÃO: significa que o paciente nunca tratou anteriormente ou não sabe informar se foi ou não tratado. Utilize o código 1 (um), mesmo que já esteja em tratamento há algum tempo, independentemente de já ter sido notificado por outro serviço.

SIM: neste caso, assinalar o tipo de alta do último tratamento: cura (código 2) ou abandono (código 3), e especifique as drogas utilizadas, bem como a data da ocorrência.

4 - FORMA CLÍNICA

Registrar a(s) forma(s) clínica(s) diagnosticada(s), com o(s) código(s) relacionado(s). No caso de outra forma não-codificada, especifique. O código 2 é reservado para o C.V.E.

5 - DESCOBERTA (caso pulmonar)

Este campo somente deve ser preenchido para o caso de Forma Clínica Pulmonar. Deixar em branco para os casos de extrapulmonar.

CÓDIGO 1 - Apresentação espontânea com sintomas respiratórios: situação em que o paciente se apresenta na Unidade de Saúde (Ambulatório ou Hospital) por iniciativa própria com sintomas respiratórios, sem encaminhamento por outra Unidade.

CÓDIGO 2 - Apresentação por outros motivos: o paciente procurou a Unidade de Saúde por outros motivos, que não os sintomas respiratórios (por exemplo: diabetes, doença mental, etc.), sendo então diagnosticada tuberculose.

CÓDIGO 3 - Neste caso registre o nome do Serviço de Saúde que encaminhou o paciente.

CÓDIGO 4 - Controle de comunicante: quando o caso é descoberto pelo médico, através da rotina de controle de comunicantes dos doentes de tuberculose.

6 - TEMPO DECORRIDO (caso pulmonar)

A) registrar o tempo decorrido desde o início dos sintomas respiratórios até o início do tratamento;

B) registrar o tempo decorrido desde a 1ª consulta, devida aos sintomas (em qualquer serviço médico), até o início do tratamento.

7 - BACILOSCOPIA E CULTURA

Anotar os resultados destes exames por ocasião do diagnóstico. No caso de utilização do código 3 (exame em andamento), preencher a lápis e informar posteriormente o resultado ao ERSa para correção. O resultado da baciloscopia deve ser informado no prazo máximo de 30 dias.

Quando for feita bacterioscopia de outro material, que não escarro, anotar no campo "COMENTÁRIOS ADICIONAIS".

8 - RAIOS X

CÓDIGO 2 - refere-se a imagem radiológica compatível com qualquer forma de tuberculose (condensação pulmonar típica ou não, aumento de glânglios mediastinais, derrame pleural, R-X de outro órgão com alterações compatíveis, etc).

CÓDIGO 3 - refere-se a R-X suspeito de TB, com presença de cavidade.

CÓDIGO 4 - é reservado para afecções não-tuberculosas (ex: cardiopatias).

10 - Não havendo doença associada, registrar o código 6.

13 - TRATAMENTO ATUAL

Anotar as drogas conforme códigos específicos no item 3 (tratamento anterior).

ANEXO II

HISTÓRIA DE VIDA CARCERÁRIA DOS DETENTOS

ANEXO II - HISTÓRIA DE VIDA CARCERÁRIA DOS DETENTOS

PACIENTE	1974 A 1990	1991	1992	1993	1994
1				16/11/93 - CDSP	17/5/94 - FR
2					
3					
4		2/8/91 - CDSP		29/6/93 - HMAND	19/7/93 - CDSP
5					
6					
7	17/10/86 - FR	29/03/90 - EXCLCP			
8					07/11/94 - MR
9				18/02/93 - PI	24/06/93 - FUGA 24/9/93 - CD
10					20/9/94 - ATN
11					
12	27/2/87 - ATN	03/10/87 - PR DOM 20/6/89 - FR	11/2/91 - FUGA	28/4/92 - CD	04/02/93 - EX CPE
13					
14	23/03/90 - CDSP				
15				03 A 28/9/93 - S B - EXCLUSÃO	
16	28/12/90 - CDSP		29/4/92 - P DOMIC		01/6/94 - HPOL
17					15/7/94 - CD
18	12/12/74 - CDSP		11/02/92 - BARUERI	04/10/93 - BAURU	08/01/94 - FUGA
19		25/12/91 - S B		12/1/93 - ATN	24/3/93 - FUGA 24/11/93 - S B
20			19/6/92 - S BERN		13/01/94 - CD
21	10/8/88 - TAUBATE	04/10/91 - PESP	8/10/92 - SOROCABA	04/01/93 - FLOCH	27/01/94 - CD
22				28/5/93 - PESP	19/11/94 - PI
23					
24					
25		04/7/91 - CD		10/2/93 - ATN	12/4/93 - FUGA 25/6/93 - S B 2/7/93 - CD
26		20/11/91 - HPOLDR	17/2/92 - COND		
27		07/2/91 - PI		30/7/93 - EXCLCPE	
28		01/01/91 - ATN	13/2/91 - PI		
29		02/8/91 - PESP			11/11/94 - PI
30				08/11/93 - CDSP	29/03/94 - ATN
31		20/9/91 - CD		04/08/93 - EXCLCP	02/12/94 - S BE
32		20/10/91 - PI			
33					
34					19/6/94 - PESP
35				26/11/93 - PI	
36		24/5/91 - CDSP			
37	17/12/90 - PI	14/6/91 - ATN	21/10/91 - P DOMIC	10/3/92 - PI	
38					
39					22/9/94 - CD
40					

PESP = Penitenciária do Estado S Paulo; CDSP = Casa de Detenção Flaminio Favaro S Paulo; CD = Casa de Detenção Campinas; PI = Penitenciária I Campinas; / HCSP = Hospital Central Sistema Prisional S Paulo; PII = Penitenciária II Campinas; Excl C Pe = Exclusão por cumprimento de pena; Hipodr = Cadeia Pública de P. Domic. = Prisão Albergue Domiciliar.

1995			1996			1997		
26/5/94-FUGA						10/3/97-CD	10/4/97-PESP-TR/26/5/97 CD	
	27/03/95 - CD			10/6 A 8/7/96 - PESP	08/7/96-CD	11/08/97- ATN		
			22/8/96 - CD			21/3 A 21/4/97-PESP TRAT	22/4/97-CD	09/6/97-EXCLC P
	15/5/95-PI		03/3/96-PESP	21/06/96-PI		17/3/97 - ATN	16/5/97 - EXCLC P	
			30/7/96-PI			19/3/97- ATN	11/6/97 - INDULTO	
						25/04/97- ATN	02/5/97 - CD	
			03 A 12/96 - PESP TRATO			10/03/97-PI		
	28/6/95-PI	15/11/95-CD				09/6/97- ATN	25/8/97 - FUGA	
						11/7/97 - MQATTI	15/7/97-PESP TRATO	19/7/97-INDULTO
						17/3/97 - CD	24/11/97 - HCSP TI	08/12/97-PESP TRATO
	17/10/95-CD					27/8/97-M GATTI	11/9/97 - CD	
						07/8/97-CD	18/11/97 - PI	
						24/02/97-CD	19/5/97-M GATTI	
						12/5/97-S BERN	04/9/97-ATN	
7/9/94-CD			18/10/96 - ATN				03/12/97-TREMEMBÉ	
							08/10/97 - PESP TRAT	23/10/97- CD
			16/2/96-CDSP	02/10/96 - PI			16/9/97-UNICAMP	24/10/97-UNICAMP
01/12/94- SOLTO			16/02/96-S BERN			15/5/97-CD		
	02/10/95- ATN		02/01/96 - FUGA			06/06/97 ATN	01/07/97- CD	
						06/06/97- ATN	19/8/97- PI	
						03/06/97 - PI		
							22/12/97 - CD	
	02/06/95 - CDSP						21/10/97 P CD	
						20/8/97 - ATN		
							07/11/97 - PI	
						13/1/97 - ATN		
	14/2/95-VÁRIOS							
6/8/94 - FUGA	12/12/94 - S B	07/7/95 - PI						
			13/2/96 - ATN/FUG	25/7/96- CD				
5/11/94 MONG								
	14/3/95 - FUGA							
	13/4/95 - ATN	24/4/95 - PI				20/10/97 - ATN		
	01/12/95 CD					26/8/97-HCSP-TR/6/10/97- CD		
	4/9/95 - S BERN	6/10/95 - CONDIC	1/3/96-S BERN	25/7/96 - PI				
			22/11/96-PI					

N = Presídio Ataliba Nogueira Campinas; S Bern = Cadeia São Bernardo Campinas;
pódromo = Mir = Penitenciária II de Mirandópolis; Condic = Livramento Condicional;

1998		1999	
		15/3/99 - INDULTO	
28/4/98 - CONDIC			
25/11/98 - CDSP		22/1/99 - FR	15/3/99 - PESP TRA 25/3/99 - FR
		03/3/99 - P DOMIC	
12/01/98 - ATN	20/02/98 - CONDIC		
30/6/98 - PI			
08/1/98 - PESP TRA 09/2/98 - CD		24/6/99 - ATN	
		30/3/99 - ATN	
17/4/98 - PE			
05 A 19/3/98 PUC 27/3/98 PESP TRA 07/12/98 - RESID. TRATO			
16/1/98 - P DOMIC			
		19/5/99 - P DOMIC	
12/97 - CD			
28/01/98 - ATN	10/8/98 - FUGA		
24/6/98 - ATN	24/8/98 - FUGA		
09/4/98 - TAUBATE	17/9/98 - SOROCABA	03/10/98 - PI	31/5/99 - FR
17/1/98 - PUCC	30/9/98 - ATN	04/11/98 - FUGA	
	13/8/98 - ATN		04/1/99 - FUGA
09/1/98 - ATN		26/4/99 - CD	
	30/6/98 - DOMIC		
	10/02/98 - HCSP TR 03/6/98 - PI		
06/4/98 - PI			
	11/2/98 - PE	17/3/98 - PI	
14/1/98 - ATN	01/7/98 - M GATTI 01/10/98 ATN	03/11/98 - FALEC	
16/5/98 M GATTI 18/6/98 - FALEC			
23/12 A 17/3/98 - PESP TRATO		17/3/99 - PI	06/05/99 - HCSP TRATO
29/4/98 PNHP/PI	08/6/98 - HCSP FALEC		
11/5/98 - PI			
29/6/98 - HCSP TRA 30/7/98 - DOMIC			
26/01/98 - PI	14/10/98 - ATN	23 A 26/10/98 - M GATTI	14/1/99 - HCSP - FALEC
16/7/98 - HCSP - T 03/08/98 - PIE AT 23/9/98 - HCSP E FALEC			
		10/5/99 - CONDIC	
	28/04/99 - HCSP TRATO ATE 20/5/98.	29/5/99 - ATN	

ANEXO III

**RECOMENDAÇÕES PARA AJUDAR NO
CONTROLE DA TUBERCULOSE NAS PRISÕES**

Recomendações para ajudar no Controle da Tuberculose nas Prisões

A primeira medida seria a implantação de um programa com objetivos de esclarecimento à população carcerária sobre o que é a doença tuberculose, como ela é transmitida, seus sintomas e principalmente esclarecer que é uma doença perfeitamente curável desde que seguido o tratamento corretamente. A Secretaria da Saúde de São Paulo elaborou algumas recomendações (material avulso elaborado pela GT-RC-SS/SAP/SSP-maio/97-CVE-Div TB) entre elas:

- designar pessoas responsáveis pela coordenação das ações de um programa de tuberculose, que deverão conduzir o processo desde o planejamento até a implantação e avaliação do programa;
- devem ser beneficiados pelo programa os detentos e os profissionais que trabalham diretamente com os mesmos, já que ambos estão submetidos a maior risco de **infecção por *M. tuberculosis***.
- sensibilizar toda população envolvida, autoridades, funcionários e detentos por meio de material escrito, audiovisual, palestras e discussões

sobre tuberculose, abrangendo noções sobre a doença desde sua transmissão até a cura. Periodicamente devem ser retomadas essas atividades, de forma a garantir a mobilização.

- identificar o doente de tuberculose. Nesse caso proceder investigação dos sintomáticos respiratórios (que tosem a mais de três semanas) entre todos os detentos e funcionários; solicitar o exame de baciloscopia, ou de cultura de escarro, e nos casos onde houve tratamento anterior, teste de sensibilidade às drogas; oferecer aos detentos a realização do teste anti-HIV; realizar em todos os funcionários e nos detentos o teste tuberculínico, quando indicado (ou seja, para aqueles que apesar de apresentar sintomas respiratórios, obtiveram resultado negativo nos exames acima citados).

Além da baciloscopia e da cultura de escarro outros tipos de exames complementares podem ser utilizados na investigação diagnóstica de tuberculose como por exemplo: radiológicos, histopatológicos e imunológicos e mais atualmente outros como o ELISA e técnicas de Biologia molecular (Brasil, 1994a). O exame bacteriológico de forma direta (baciloscopia) é o mais empregado pelas Unidades de Saúde devido ao baixo

custo, rapidez e simplicidade. Tal exame poderia ser utilizado para busca ativa dos casos de tuberculose hoje existentes nos presídios.

Outra medida, também de essencial importância, está relacionada ao tratamento desses indivíduos. Fazer um acompanhamento e controle sobre a efetiva e correta ingestão dos medicamentos poderia assegurar não apenas a cura destes mas também a prevenção quanto ao aparecimento de casos onde o doente passe a ser portador de *M. tuberculosis* resistente aos medicamentos. No entanto esse não é o único problema ligado à tuberculose resistente pois existe também a possibilidade de pessoas sadias serem infectadas por bacilos já resistentes às múltiplas drogas perpetuando ainda mais o problema desta doença.

Sem dúvida, nos presídios existe a questão da superlotação e ausência de ventilação adequada que são fatores favoráveis à transmissão do bacilo da tuberculose. Medidas que visem melhorar tais condições poderiam ser úteis na prevenção e controle desta doença.

ANEXO IV

SOLUÇÕES UTILIZADAS

Soluções utilizadas

1 - No preparo das Culturas

Hidróxido de sódio 4%*

hidróxido de sódio 4,0 g
água deionizada..... 100,0 ml

Ácido clorídrico 1,0 N contendo 0.004% de vermelho de fenol *

água deionizada q.s.p. 80,0 ml
HCl concentrado a 37% 8,5 ml
solução de vermelho de fenol a 0,4% 1,0 ml
completar o volume com água deionizada para 100,0 ml

Vermelho de fenol 0,4%*

vermelho de fenol 0,4 g
solução de hidróxido de sódio a 1N 100,0ml

* Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

2 - Extração do DNA genômico

Tampão TE 10X (100mM Tris/HCl, pH 8,0/ 10mM EDTA) *

trizma base 0,2423 g

EDTA 0,0744 g
água deionizada 10,0 ml
Completar o volume com água deionizada p/ 20.0 ml

Solução de lisozima:

10 mg de lisozima/ml de água deionizada esterilizada
(estocar em alíquotas a -20°C).

SDS (Sodium Duodecyl Sulfato) 10%

SDS10,0 g
água deionizada100,0 ml

Obs.: A solução deverá ser dissolvida com
aquecimento a (65°C) por 20 minutos e ficar estocada
em temperatura ambiente.

Solução de Proteinase K: 10 mg de proteinase K/ml de
água deionizada esterilizada (estocar em alíquotas a -
20°C.).

Solução de SDS/Proteinase K:

Solução de Proteinase K 5µl
SDS 10% 70µl

NaCl 5M*

NaCl 29,1 g

água deionizada 100,0 ml

Manter à temperatura ambiente

Solução CTAB/NaCl:

NaCl 4,1 g

Brometo de Cetil Trimetil Amônio “Sigma-H5882”

CTAB 8,0 g

água deionizada aquecida a 65°C 80,0ml

Após dissolvido, ajustar o volume e estocar à temperatura ambiente.

Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1):

misturar 24 volumes de clorofórmio com 1 volume de álcool isoamílico.

* Soluções autoclavadas a 121°C por 20 minutos

3 - Corrida Eletroforética**Tampão TEB (5X)**

trisma-base 54,0 g

ácido bórico(H₃BO₃) 27,5 g

0,5M EDTA (pH 8,0) 20,0ml

Dissolver em 700 ml água deionizada e completar o volume com água deionizada para 1 litro.

Tampão de Ressuspensão do DNA

Solução de sacarose a 50% na qual adicionou-se azul de bromofenol e xilenocianol, na concentração final de 0,25%.

4 - PCR

dNTP: Colocar 10µl de cada desoxinucleotídeo (10mM) (Adenina, Guanina, Citosina e Timina) e completar com água deionizada para 100 µl.

OBS.: Utilizada a enzima *Taq* DNA Polymerase, Tampão (10X) e o $MgCl_2$ (50 mM), todos da GIBCO BRL.

Iniciadores: Os iniciadores (*IS1*, *IS2*, *IS3*) utilizados para a amplificação de fragmentos específicos dentro do elemento de inserção *IS6110* têm a seguinte sequência de bases (Thierry *et al.*, 1990b).

IS1: 5'-TGG -GTC- CGC- CAG- GCG- CAG- GTC- 3'

IS2: 5'-CAG-GAC- CAC- GAT- CGC- TGA- TCC-3'

IS3: 5'-GTA- GGC- GTC- GGT- GAC- AAA- GGC-3'

5 - DRE-PCR

dNTP e enzima *Taq* DNA Polymerase: idem ao já descrito para a PCR (item 4.2)

Iniciadores: Os iniciadores correspondentes às sequências terminais dos elementos de inserção *IS6110* e *PGRS* estão citados abaixo (Friedman *et al.*, 1995). Estas sequências foram desenhadas de maneira tal que as terminações 3' dos iniciadores *Ris1*, *Ris2*, *Pmtb1* e *Pmtb2*, estivessem localizados diretamente à jusante dos elementos para amplificar segmentos entre as sequências de inserções repetidas.

Ris 1: 5'-GGC-TGA-GGT-CTC-AGA-TCA-G-3'

Ris 2: 5'-ACC-CCA-TCC-TTT-CCA-AGA-AC-3'

Pmtb 1: 5'-CCG-TTG-CCG-TAC-AGC-TG-3'

Pmtb 2: 5'-CCT-AGC-CGA-ACC-CTT-TG-3'

Obs.: No DRE-PCR adicionou-se a solução Dimetyl Sulfoxide (C₂H₆OS)–DMSO (Berse) na concentração final de 6%.

6 - Digestão do DNA genômico

Foi utilizada a enzima *Pst*I

7 - Southern blotting

Solução de Denaturação (NaOH 0,5N/NaCl 0,5M)*

NaOH 20,0 g

NaCl 29,0 g

Após dissolvida a solução, o volume de água deionizada foi completado para 1 litro.

Solução de Neutralização (0,5M Tris HCl pH 7,5/ 2M NaCl)*

Trizma base 15,14g

NaCl 29,25g

O pH da solução foi ajustado com HCl para 7,5.

SSC (20X)*

NaCl 352,0g

Citrato de Sódio 176,0g

Após diluição, o volume de água deionizada foi ajustado para 2 litros.

* Soluções autoclavadas a 121°C por 20 minutos

8 - Marcação Radioativa da Sonda

A sonda *IS6110* obtida através de amplificação por PCR (amostra 24) foi radioativamente marcada com [α - 32 P]dCTP, utilizando-se o “Oligolabelling Kit” da Pharmacia e seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

9 - Hibridização

SSPE (20X):

NaCl 175,3g
 (Fosfato de Sódio Monobásico) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27,6g
 (EDTA Dissódico) $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7,4g
 O pH da solução foi ajustado para 7,4 com NaOH e
 o volume completado com água deionizada para 1 litro.

SDS 10% (solução já descrita no item extração do DNA genômico).

Solução de Denhardt's 50x concentrada:

Ficoll (tipo 400 da Pharmacia) 5g

BSA(Soroalbumina bovina) fração V... 5g

Polivinilpirrolidona (PVP) 5g

Após diluição, o volume foi completado para 500 ml com água deionizada e separado em alíquotas de 50ml e estocados a -20°C

Solução de Pré-Hibridização (concentrações finais):

- 6xSSPE

- 5x de solução de Denhardt's

- 0,5% de SDS;

- 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão denaturado;

- 50% de formamida (aquecida a 42 °C)

completada a solução com 2,0 ml de água deionizada