

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**INVESTIGAÇÃO DE TUBERCULOSE PULMONAR POR  
INFECÇÃO POLICLONAL DE *Mycobacterium tuberculosis* E  
POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA AOS  
FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS**

**MAURICIO MORISHI OGUSKU**

**Manaus – AM  
Junho/2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MAURICIO MORISHI OGUSKU**

**INVESTIGAÇÃO DE TUBERCULOSE PULMONAR POR  
INFEÇÃO POLICLONAL DE *Mycobacterium tuberculosis* E  
POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA AOS  
FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração “Saúde”.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Júlia Ignez Salem**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca**

**Manaus – AM  
Junho/2012**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Ogusku, Mauricio Morishi

O35i      Investigação de tuberculose pulmonar por infecção policlonal de *Mycobacterium tuberculosis* e possível associação com a resistência aos fármacos antimicobacterianos / Mauricio Morishi Ogusku. - Manaus: UFAM, 2012.

109 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Julia Ignez Salem

Co-Orientador: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca

1. Tuberculose pulmonar 2. Infecção policlonal 3. Farmacologia I. Salem, Julia Ignez (Orient.) II. Naveca, Felipe Gomes (Co-Orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 616-002.5(043.2)

MAURICIO MORISHI OGUSKU

**INVESTIGAÇÃO DE TUBERCULOSE PULMONAR POR INFECÇÃO  
POLICLONAL DE *Mycobacterium tuberculosis* E POSSÍVEL  
ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS  
ANTIMICOBACTERIANOS**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração “Saúde”.

Aprovada em 28 de junho de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Julia Ignez Salem  
Presidente, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – AM

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clarice Queico Fujimura Leite  
Membro Externo, Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara – SP

Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto  
Membro Externo, Universidade Federal do Amazonas – AM

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Orlandi Puccinelli Nogueira  
Membro Interno, Fiocruz, Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane – AM

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza  
Membro Externo, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – AM

*Aos meus pais, Eiriu e Yoshiko,  
pelo amor, compreensão e apoio incondicionais.*

*À minha esposa Aya,  
por ser a razão para eu amar, viver,  
sorrir, emocionar e compartilhar a cada amanhecer.*

*À orientadora, amiga e mãe científica  
Julia Ignez Salem,  
por querer o melhor de mim,  
por desejar o melhor para mim.*

## **Agradecimentos**

*A Deus, pela minha saúde e perseverança para concluir este projeto.*

*Aos meus pais Eiriu e Yoshiko, aos meus irmãos Marly, Marineusa, Márcia, Hatsue, Edson e seus familiares, por compreenderem minha ausência em momentos felizes ou difíceis de suas vidas.*

*À família Sadahiro, pelo apoio e carinho durante todos esses anos de convívio.*

*À Aya, querida esposa, que durante seu doutorado foi a maior incentivadora para que eu retornasse à Manaus e fizesse parte da equipe do Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. E o resultado desse incentivo, hoje, é a conclusão desta tese. Agradeço por ter sido forte, paciente, perseverante, carinhosa, e principalmente, por cultivar nosso amor durante todos esses anos! Te amo!!*

*À Dr<sup>a</sup>. Julia Inez Salem, que me acolheu como estagiário no Laboratório de Micobacteriologia do INPA em 1993, e que desde então me ensina a trilhar os caminhos da Pesquisa em Tuberculose. Atualmente mesmo estando “desobrigada” para com o Inpa, agradeço por sua paciência, orientação e sabedoria, imprescindíveis na conclusão desta tese. Agradeço também pela oportunidade de trabalharmos juntos e por ser a Pesquisadora a quem posso me espelhar.*

*Ao Dr. Felipe Gomes Naveca, pesquisador da Fiocruz Amazônia (Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane – AM), que se uniu à equipe original do projeto e contribuiu de forma inestimável como co-orientador desta tese. Agradeço pelos ensinamentos nos ensaios e análise de sequenciamento de DNA, pela paciência, amizade e oportunidade de continuarmos essa parceria.*

*À Dra. Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto, pela amizade, incentivo e disposição de ajudar a qualquer momento. Pelo seu conhecimento, seriedade e dedicação ao trabalho que a torna exemplo de pesquisadora para todos.*

*Ao Dr. João Vicente Braga de Souza, valoroso pesquisador que veio para somar esforços e trazer qualidade em pesquisas em Micologia Médica, Biotecnologia e para nosso Grupo de Pesquisa “Micobactérias e Fungos da Amazônia”. Agradeço por conduzir o Laboratório de Micobacteriologia durante meu afastamento.*

*Ao Prof. Dr. Maulori Cabral, pesquisador do Instituto de Microbiologia da UFRJ, pela brilhante sugestão de seleção de clones de Mycobacterium tuberculosis em meio de cultivo com fármacos incorporados.*

*À biomédica Ana Paula Miranda Barros, por sua paciência e dedicação no isolamento dos clones de Mycobacterium tuberculosis e realização dos testes de sensibilidade aos fármacos, atividades fundamentais para esta tese.*

*Aos amigos Victor Souza e George Villarouco, pelos ensinamentos na preparação das reações de sequenciamento de DNA e manipulação do sequenciador. Ambos foram prestativos ao máximo e imprescindíveis para a obtenção desses resultados.*

*Ao amigo Andrei Salem Gonçalves, jovem talento em Matemática, Estatística e Ciências Atuariais, por gerar os números aleatórios em software R.*

*Aos amigos recém-doutores, recém-mestres e pós-graduandos Clarice Maia Carvalho, Antonio Luiz Boechat, Eveleise Samira de Jesus Martins, Amélia Sicsu, Narjara Boechat, Alita Moura de Lima, José Jorge Pinheiro Guimarães, Raphaela B. Naveca e Ana Claudia Alves Cortez pelas dificuldades e sucesso compartilhados de muitos experimentos realizados.*

*Aos técnicos e amigos do Laboratório de Micobacteriologia e Micologia, Francisco Farias de Carvalho, Mari Otsuka de Lima, Raimundo Bezerra do Nascimento, Eliana Silva dos Santos, Raimunda Nascimento dos Anjos e Rosalvo Balbino da Silva pela ótima convivência e por serem sempre prestativos.*

*À Dra. Eliana Feldberg, pesquisadora do Inpa, por seu pequeno gesto, mas que auxiliou enormemente nos ensaios de sequenciamento de DNA.*

*À pesquisadora Maria Alice Telles, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP, por ceder os isolados de Mycobacterium tuberculosis resistentes.*

*À Policlínica de Referência em Pneumologia Cardoso Fontes, especialmente à Dra. Irineide Assumpção Antunes, Dra. Joyce Matsuda (pesquisadora da Fiocruz Amazônia), às Enfermeiras Sherly e Cimara, às equipes do laboratório de Análises Clínicas e Aprazamento, que apesar das adversidades se esforçam e se dedicam aos pacientes com Tuberculose.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Secretaria de Estado da Saúde do Amazonas (SUSAM), Ministério da Saúde (MS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq,) pelo auxílio financeiro a este projeto (Edital PPSUS).*

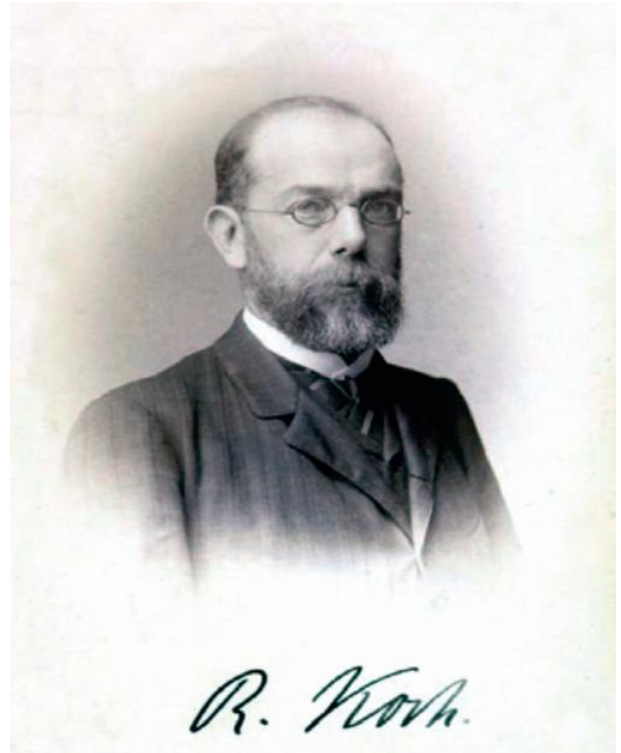
*Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela liberação integral de minhas atividades como servidor público federal.*

*À Fundação Alfredo da Mata, por intermédio do Laboratório de Biologia Molecular, pelo auxílio nos ensaios de sequenciamento de DNA.*

*À Coordenação e Secretaria do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo apoio e compreensão para com todos os pós-graduandos.*

*Aos professores, técnicos e monitores do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, por compartilharem seus conhecimentos e experiências.*

*Aos pacientes com Tuberculose, que apesar da fragilidade física, foram extremamente participativos e atenciosos para com a equipe deste projeto.*



*“... se olharmos para trás para o que aconteceu nos últimos anos na luta contra a Tuberculose... Nós não pudemos ajudar, mas temos a impressão de que um importante início foi feito.”*

*Robert Koch  
(Ao receber o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina – 1905)*



## RESUMO

Na prática clínica é amplamente admitido que um episódio de tuberculose (TB) ativa seja causado por um único clone de *Mycobacterium tuberculosis*. Contudo, vários estudos têm revelado que há uma heterogeneidade de clones e isso pode ser bem maior que o esperado. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar a TB pulmonar por infecção policlonal de *M. tuberculosis* em pacientes recém-diagnosticados, a partir de uma amostra de escarro e antes do início do tratamento. Foram selecionadas 62 amostras de escarros, sendo 31 paucibacilares e 31 multibacilares. A triagem de clones em meio de 7H10 proporcionou o isolamento de clones sensíveis e resistentes à Isoniazida (INH) e/ou Rifampicina (RIF) coexistentes em 19 (30,6%) isolados de *M. tuberculosis*. A genotipagem por DRE-PCR e o sequenciamento parcial de DNA para os genes *katG*, *inhA* e *rpoB* foram realizados em 74 clones sensíveis à INH e RIF, 65 clones resistentes à INH, 1 clone resistente à RIF e 3 clones resistentes à INH e RIF. A presença de clones sensíveis e resistentes a INH e/ou RIF, assim como a ocorrência de diferentes genótipos indicam a heterogeneidade de clones em um mesmo isolado de *M. tuberculosis*. A frequência de infecção policlonal observada foi superior aos estudos descritos na literatura, visto que os mesmos apresentaram percentuais de 0,4% a 19,0%. Estes resultados permitem afirmar que a presença de infecção policlonal não é um fenômeno raro em pacientes com TB pulmonar na população estudada. O sequenciamento parcial dos genes *katG* revelou que apenas 4,4% dos clones resistentes à INH apresentaram as mutações comumente descritas neste gene. Para o gene *inhA* não foram detectadas mutações para os clones resistentes à INH. Os clones resistentes para RIF apresentaram mutações no gene *rpoB*. Dos clones resistentes à INH, 83,8% não apresentaram mutações nos genes *katG* e *inhA*, enquanto 11,7% apresentaram mutações ainda não descritas no gene *katG*. A ausência das mutações comumente associadas à resistência medicamentosa nos genes *katG* e *inhA* e a detecção de novas mutações em clones de *M. tuberculosis* resistentes à INH, explicitam a necessidade de sequenciar fragmentos maiores desses genes ou ampliar a busca de mutações em outros genes, a fim de que sejam propostas estratégias mais rápidas para a detecção de resistência em *M. tuberculosis*. Os resultados da presente pesquisa evidenciam que a infecção policlonal está presente em aproximadamente 1/3 dos pacientes de TB recém-diagnosticados, seja pelas características fenotípica ou genotípica dos clones de *M. tuberculosis*, embora estas não estejam estritamente relacionadas.

Palavras-chaves: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, Resistência aos fármacos, Infecção policlonal.

## ABSTRACT

In clinical practice is widely accepted that an episode of active tuberculosis (TB) is caused by a single clone of *Mycobacterium tuberculosis*. However, several studies have shown that there is heterogeneity of clones and this can be much larger than expected. In this context, the aim of this study was to investigate pulmonary TB by *M. tuberculosis* polyclonal infection in newly diagnosed patients, from a sputum sample and before starting treatment. A total of 62 of sputum samples were select. By screening in 7H10 medium, simultaneous presence of *M. tuberculosis* clones phenotypically sensitive and resistant to INH and/or RIF in the same isolate was observed in 30.6% (n=19). Genotyping by DRE-PCR and DNA sequencing of *katG*, *inhA* and *rpoB* genes were carried out in 74 clones INH and RIF sensitive, 65 clones INH-resistant, a clone RIF-resistant and 3 clones INH/RIF-resistant. The presence of resistant and sensitive clones to INH and/or RIF as well as the occurrence of different genotypes indicating heterogeneity in the same isolated from *M. tuberculosis*. The frequency of polyclonal infection was superior to published studies that show percentages ranging from 0.4% to 19.0%. These results indicate that the presence of polyclonal infection is not a rare phenomenon in patients with pulmonary TB in this population. The partial sequencing of the *katG* gene revealed that only 4.4% of INH-resistant clones were present described mutations in this gene. For *inhA* gene mutations were not detected for INH-resistant clones. Clones resistant to RIF present mutations in the *rpoB* gene. In clones INH-resistant, 83.8% not show mutations in *katG* and *inhA* genes, while 11.7% had mutations in *katG* gene not yet described. The absence of mutations commonly associated with drug resistance in *katG* and *inhA* genes, besides detection of new mutations in *M. tuberculosis* INH-resistant clones, suggests the need to sequencing larger fragments of these genes to propose strategies for fast detection of *M. tuberculosis* resistance. The results of this survey show that polyclonal infection is present in approximately one third of patients newly TB diagnosed, either by genotypic or phenotypic characteristics of *M. tuberculosis* clones, although both are not strictly related.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Drug resistance, Polyclonal infection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Série Histórica de Incidência da TB no Brasil e por Regiões .....	19
<b>Figura 2</b>	Série Histórica de Incidência da TB no Brasil e em estados da Região Norte .....	19
<b>Figura 3</b>	Série Histórica de recidivas, mortes e multidroga resistência da Tuberculose no Estado do Amazonas .....	20
<b>Figura 4</b>	Robert Koch .....	20
<b>Figura 5</b>	Bacilos álcool-ácido resistentes em amostra de escarro corados pela técnica de Kinyoun .....	21
<b>Figura 6</b>	Fluxo de atividades para a investigação da TB policlonal .....	44
<b>Figura 7</b>	Padronização da suspensão de <i>M. tuberculosis</i> .....	45
<b>Figura 8</b>	Gabarito para definição dos quadrantes de seleção de colônias de <i>M. tuberculosis</i> .....	47
<b>Figura 9</b>	1º Grupo de números aleatórios identificados no gabarito para seleção de colônias de <i>M. tuberculosis</i> .....	49
<b>Figura 10</b>	Resultados gerais da seleção de clones de <i>M. tuberculosis</i> , genotipagem e sequenciamento de DNA .....	57
<b>Figura 11</b>	Identificação de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por PCR .....	59
<b>Figura 12</b>	Dendrogramas com os genótipos de clones de <i>M. tuberculosis</i> por DRE-PCR .....	64
<b>Figura 13</b>	Mutações detectadas em clones de <i>M. tuberculosis</i> .....	68
<b>Figura 14</b>	Mutações ainda não descritas no gene <i>katG</i> em clones de <i>M. tuberculosis</i> ...	70

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Números aleatórios gerados no software R, conforme parâmetro de 1 a 644 números .....	48
<b>Tabela 1</b>	Quantitativo de clones de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a INH e/ou RIF em pacientes com TB pulmonar .....	58
<b>Tabela 2</b>	Distribuição de casos de infecção policlonal em relação à carga bacilar dos pacientes de TB pulmonar .....	62
<b>Tabela 3</b>	Mutações detectadas em clones de <i>M. tuberculosis</i> .....	69
<b>Tabela 4</b>	Novas mutações detectadas em clones de <i>M. tuberculosis</i> resistentes .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
a.C.	Antes de Cristo
APC	Célula apresentadora de antígeno
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
d.C.	Depois de Cristo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Coleção Alemã de Microrganismos e Cultura de Células
DRE-PCR	Double-Repetitive-Element PCR PCR de Duplos Elementos Repetitivos
BEM	Etambutol
ETH	Etionamida
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FDA	Food and Drug Administration
GC	Guanina-Citosina
hab.	Habitantes
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
<i>hsp65</i>	Gene codificante da proteína de choque térmico de 65 kDa
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
INH	Isoniazida
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<i>inhA</i>	Gene codificante da enzima enoil-ACP redutase
IS6110	Sequência de inserção 6110
<i>katG</i>	Gene codificante da enzima catalase-peroxidase
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar

MNT	Micobactérias não causadoras de Tuberculose
MDR	Multidroga resistente
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de sódio
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGRS	Polymorphic GC-rich Repetitive Sequence Sequência Polimórfica Repetitiva rica em GC
PPD	Derivado protéico purificado
PZA	Pirazinamida
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo de Fragmentos de Tamanho de Restrição
RIF	Rifampicina
<i>rpoB</i>	Gene codificante da subunidade β da RNA polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SM	Estreptomicina
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multidroga resistente
TE	Tris-EDTA
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1	História e Epidemiologia da Tuberculose .....	16
2.2	Etiologia e Transmissão da Tuberculose .....	20
2.3	Patogenia .....	22
2.4	Diagnóstico Laboratorial .....	23
2.5	A Infecção Policlonal na Tuberculose .....	27
2.6	Genotipagem por DRE-PCR .....	31
2.7	Resistência Medicamentosa na Tuberculose .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
3.1	Objetivo Geral .....	41
3.2	Objetivos Específicos .....	41
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>42</b>
4.1	Modelo de Estudo .....	42
4.2	Universo de Estudo .....	42
4.3	Informações Éticas e de Financiamento .....	44
4.4	Organização do Experimento .....	44
4.5	Detalhes dos Procedimentos .....	45
4.5.1	Procedimentos Micobacteriológicos .....	45
4.5.2	Seleção de colônias micobacterianas .....	45
4.5.3	Teste de Sensibilidade aos Fármacos (Antibiograma) .....	49
4.5.4	Extração de DNA micobacteriano .....	50
4.5.5	Identificação de <i>M. tuberculosis</i> por PCR .....	50
4.5.6	Genotipagem .....	51
4.5.7	Sequenciamento de DNA .....	52
4.6	Análise dos Resultados .....	53
4.7	Análise Estatística .....	55
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>56</b>
5.1	Identificação do Cultivo Primário de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	56
5.2	Seleção e Identificação de Clones de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	56
5.3	Caracterização da TB Policlonal pelo Fenótipo de Resistência à INH e/ou RIF .....	59
5.4	Caracterização da TB Policlonal pela Técnica Molecular de DRE-PCR .....	63
5.5	Mutações Genéticas em Clones de <i>M. tuberculosis</i> Isolados em Infecção Policlonal .....	67
<b>6</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>74</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Estado do Amazonas tem se destacado, nos últimos anos, como detentor da 1ª ou 2ª maior taxa de incidência de Tuberculose (TB) do Brasil (BRASIL, 2010a). Vários fatores contribuem para a manutenção dessa incidência: clima tropical, desnutrição, condições precárias de moradia e saneamento básico, além das dificuldades operacionais de diagnóstico e tratamento da TB.

Adicionado às características regionais e pessoais, em alguns países há relatos de ocorrência de infecções tuberculosas policlonais, ou seja, o mesmo indivíduo sendo portador de diferentes clones de *Mycobacterium tuberculosis*. Porém, na prática clínica, é amplamente admitido que um episódio de TB ativa seja causado por um único clone de *M. tuberculosis*. O mesmo foi inferido para os casos de TB extrapulmonar, cujos clones de *M. tuberculosis* seriam os mesmos que infectavam o trato respiratório (RICHARDSON et al., 2002; VIEDMA et al., 2003). Contudo, alguns estudos com fagotipagem, da década de 70, já indicavam a presença de mais de um fagotipo em um único paciente. Mas, a complexidade técnica desse tipo de ensaio fez com que as infecções com múltiplos clones de *M. tuberculosis* fossem erroneamente caracterizadas como reativação endógena, reinfeção ou contaminação ocorrida nos procedimentos laboratoriais (VIEDMA et al., 2003; DAS et al., 2004; WARREN et al., 2004).

Com o progresso da Biologia Molecular, a tipagem por técnicas moleculares como o Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) resultou em um grande avanço no estudo da epidemiologia da TB (CHAVES et al., 1999). Essa se tornou a principal ferramenta para a caracterização da infecção tuberculosa policlonal devido ao seu maior poder discriminatório (BRADEN et al., 2001). Entretanto, é importante destacar que o padrão de “fingerprint” de *M. tuberculosis* pode ser resultado de um clone predominante na amostra clínica ou mesmo de um padrão composto por múltiplos clones (BRADEN



et al., 2001). Assim, o ideal seria que a distinção de múltiplos clones de *M. tuberculosis* fosse realizada a partir de colônias isoladas individualmente (BRADEN et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2005). Vale ressaltar que a caracterização de infecção policlonal se faz importante no momento em que os clones apresentam padrões de resistência diferenciados aos fármacos, o que pode comprometer o sucesso do tratamento se o clone resistente não for detectado (NIEMANN et al., 2000).

As técnicas moleculares também têm contribuído para a detecção rápida de resistência a fármacos como isoniazida (INH) e rifampicina (RIF). A descrição de mutações associadas a genes como *katG* e *inhA*, encontradas em 75 a 85% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH (SOMOSKOVI et al., 2001; LAURENZO et al., 2011), e *rpoB* associada em 96% dos *M. tuberculosis* com resistência para RIF (RUIZ et al., 2004; SILVA; PALOMINO, 2011), auxiliam na compreensão do mecanismo de ação desses fármacos e fornecem subsídios para o desenvolvimento de novas técnicas moleculares para a determinação rápida da TB resistente.

Em regiões onde a prevalência de TB e a de isolados resistentes é baixa, a transmissão de clones resistentes pode não representar sérias consequências. Entretanto, no Brasil, estudos refletem que é alta a frequência de transmissão de *M. tuberculosis* resistentes. Em regiões de grande endemicidade como é o caso do Estado do Amazonas, essa situação pode conduzir à falência do tratamento e comprometer seriamente as metas do programa de controle da doença (SILVA et al., 2001).

O desconhecimento de isolamento de *M. tuberculosis* resistentes não isenta o Estado do Amazonas, necessariamente, da problemática de casos de TB resistentes como se tem observado em outras regiões ou países. A presença em média de 4,7% por ano de casos de recidiva e de 4,2% por ano de mortes podem ser evidências da presença de *M. tuberculosis* resistentes, assim como pode ser também indicativo da presença da infecção policlonal. Gerar conhecimento sobre essas questões é de fundamental importância para o entendimento da problemática dos altos e constantes coeficientes de incidência de TB no Estado do Amazonas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 História e Epidemiologia da Tuberculose

A Tuberculose (TB) parece ser tão antiga quanto a própria humanidade. A evidência desse fato data de 8.000 a.C., na região da atual Alemanha, onde ossos encontrados de um homem pré-histórico indicavam os sinais da doença. No Egito Antigo, entre 2.500 a 1.000 a.C., esqueletos revelaram a evidência da doença de Pott e, manuscritos antigos hindus e chineses também documentaram a TB. Entretanto, dessas descrições é impossível diferenciar a TB de outras doenças de patologia similar. Talvez, a melhor prova da TB tenha sido encontrada em uma múmia Inca, um menino de oito anos de idade, que viveu aproximadamente em 700 d.C.. A radiografia da coluna lombar indicava a doença de Pott, e os esfregaços da lesão revelaram a presença de bacilos álcool-ácido resistentes - BAAR (DUTT, 2006).

Os isolamentos geográficos e as diferentes formas clínicas fizeram com que a TB permanecesse como doença endêmica e esporádica por muitos séculos na Europa (CAMPOS, 1999). No entanto, uma epidemia de TB que se iniciou na Inglaterra no século XVI, alcançou seu pico por volta de 1780, como resultado da Revolução Industrial e do grande crescimento demográfico das cidades, o que permitiu a disseminação interpessoal (DUTT, 2006). A epidemia cresceu e espalhou-se pela Europa ocidental, sendo responsável por cerca de 25% de todas as mortes nas cidades européias. Lentamente, a TB propagou-se pela Europa oriental, que se mantinha isolada pelo atraso na industrialização, por obstáculos geográficos ou pelas fronteiras políticas. Na América do Norte colonial, a epidemia foi levada pelos pecuaristas europeus e cresceu na medida em que os nativos americanos eram forçados a viver aglomeradamente em reservas. Na América do Sul, os jesuítas foram responsáveis pela

introdução da TB e, a colonização de outras regiões pelos europeus fez com que portadores crônicos de TB a disseminassem para a África (CAMPOS, 1999).

Atualmente o panorama está delineado, predominantemente, pelos casos de TB incidentes nos países em desenvolvimento, onde esta sempre se manteve em níveis endêmicos. Nos países desenvolvidos o cenário foi diferente, a partir da década de 60, com o estabelecimento da antibioticoterapia específica, emergindo um clima de apatia e desinteresse pelas atividades de controle. O contínuo declínio da incidência da TB resultou em um estado de complacência que provocou a redução de verbas e, conseqüentemente, a desativação de programas de controle da doença em muitos países. Em nível global, a negligência foi tão significativa que em 1989 a OMS tinha somente dois profissionais monitorando a TB, os quais eram subordinados ao Programa de Infecções Respiratórias (ESPINAL, 2003).

A década de 80 marcou a re-emergência da TB nos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, em 1984, verificou-se que as notificações de casos de TB não reduziram na mesma taxa de anos anteriores e, posteriormente, começaram a aumentar o que chamou a atenção dos especialistas em saúde pública e TB (CDC, 1985).

As razões para o aumento dos casos de TB foram atribuídas, inicialmente, ao advento do HIV/Aids e do crescimento da pobreza, em especial, nas grandes áreas metropolitanas. Entretanto, logo ficou claro que o aumento dos casos nos Estados Unidos ocorria entre os recentes imigrantes oriundos de países em desenvolvimento. A mesma situação foi observada em países da Europa, como Holanda, Suíça, Suécia, Noruega e Dinamarca. Essa constatação deixou evidente que nenhum programa interno de controle da mesma alcançaria sucesso sem que houvesse um controle global da epidemia. Diante dessa premissa, em 1991, foram estabelecidas as metas globais para o controle da TB: curar 85% dos pacientes com baciloscopias positivas e detectar 70% dos casos. Em 1993 a TB foi declarada emergência global pela Organização Mundial de Saúde (OMS) por ressurgir em nível mundial e pela sua

característica de multirresistência aos fármacos (RAVIGLIONE, 2003).

Mesmo com as metas globais estabelecidas há mais de duas décadas, é notória a dificuldade de planejamento de ações e execução por parte dos programas de controle da TB, já que em muitos países tais índices ainda não foram alcançados. Tal fato a caracterizou como a doença infecciosa que mais provoca mortes no mundo (RAVIGLIONE, 2003), sendo 1,1 a 1,7 milhões de mortes entre as pessoas HIV-negativas, mais um adicional de 0,45 a 0,62 milhões de mortes dentre as pessoas HIV-positivas, conforme estimativas da OMS para o ano de 2008 (WHO, 2010).

Além do exposto, ocorreram cerca de 8,9 a 9,9 milhões de casos novos de TB no mundo, com prevalência de 9,6 a 13,3 milhões. Os cinco países com maior incidência de TB são: Índia (1,6 a 2,4 milhões), China (1,0 a 1,6 milhões), África do Sul (0,38 a 0,57 milhões), Nigéria (0,37 a 0,55 milhões) e Indonésia (0,34 a 0,52 milhões). Estima-se que a Índia e China sejam responsáveis por 35% de todos os casos de TB em nível mundial (WHO, 2010). Atualmente, 22 países são responsáveis por 80% dos casos mundiais de TB, e desses, o Brasil é o único país sul-americano (BRASIL, 2010a).

No Brasil, a média anual de casos novos nos últimos cinco anos é de aproximadamente 72 mil notificações, com cerca de 4,7 mil mortes anuais. O país apresenta 70% de índice de cura dos casos diagnosticados, 12% de abandono do tratamento e 7% de óbitos. Os coeficientes ideais seriam de pelo menos 85% para o índice de cura e de no máximo 5% para as taxas de abandono de tratamento e óbito (BRASIL, 2009a).

Em relação à região Norte, em 2009, foram notificados 7.250 casos novos de TB refletindo uma incidência de 47,2/100.000 hab., enquanto a média brasileira foi de 37,41/100.000 hab. (Figura 1).

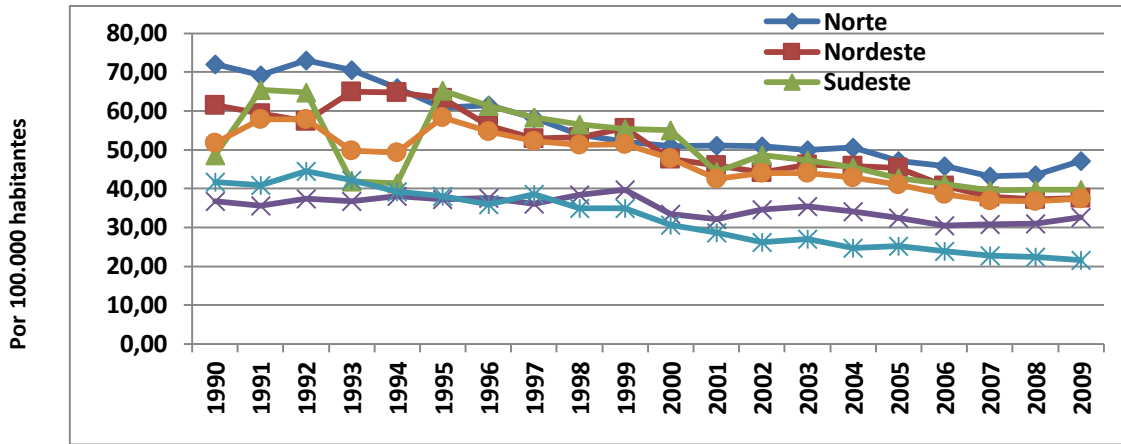


Figura 1. Série Histórica de Incidência da Tuberculose no Brasil e Regiões.  
 Fonte: SINAN (2010b).

Dos 7.250 casos da região Norte em 2009, o Estado do Amazonas notificou 2.273, ou seja, um coeficiente de incidência de 66,98/100.000 hab. (Figura 2). Isto representa o maior coeficiente da região norte e o segundo do país – o Rio de Janeiro é o primeiro com índice de cerca de 70,78/100.000 hab. (BRASIL, 2010b).

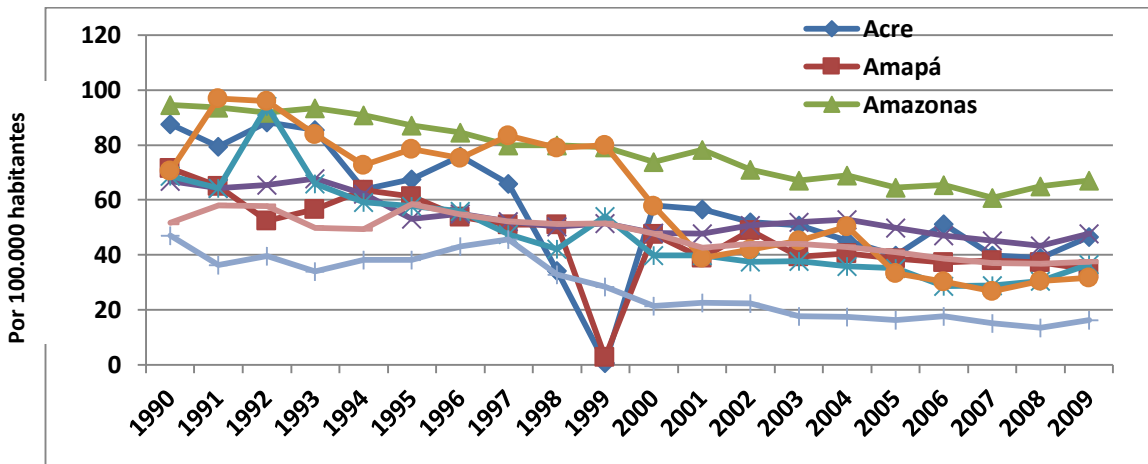


Figura 2. Série Histórica de Incidência da Tuberculose no Brasil e estados da Região Norte.  
 Fonte: SINAN (2010b).

No Estado do Amazonas, além dos altos coeficientes de incidência tem-se observado, nos últimos cinco anos, um percentual crescente de morte por TB, que no ano de 2009 foi inversamente proporcional a taxa de recidiva da doença (BRASIL, 2010c), conforme

apresentado na Figura 3.

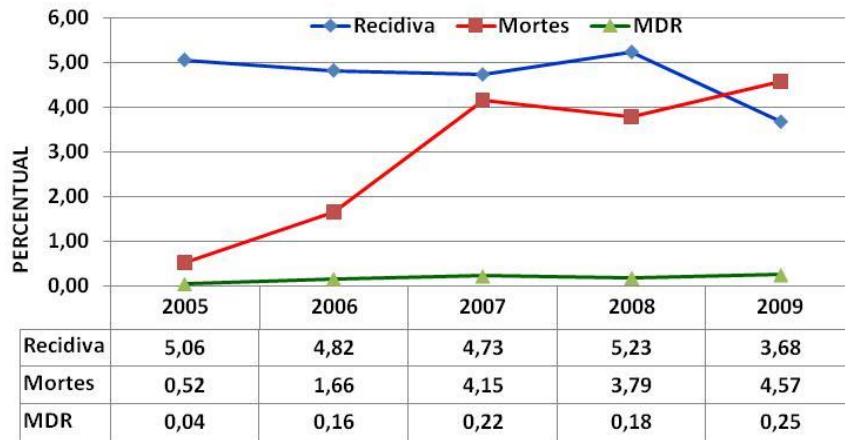


Figura 3. Série Histórica de recidivas, mortes e multidroga resistência da Tuberculose no Estado do Amazonas.  
Fonte: SINAN (2010c).

Constata-se na Figura 3 que além da problemática da recidiva e mortes tem-se também um crescimento do percentual de casos com multirresistência aos fármacos de tratamento da TB.

## 2.2 Etiologia e Transmissão da Tuberculose

O agente etiológico da TB foi anunciado por Robert Koch (Figura 4) em 24 de março de 1882. Em uma apresentação para a *Berlin Physiological Society*, Koch divulgou que teve sucesso em identificar e cultivar o agente causador da TB: uma bactéria em forma de bastonete que ele chamou de bacilo da TB. Com paciência, precisão e clareza, ele descreveu e demonstrou para todos que o assistiam como encontrou o microrganismo no tecido lesionado, corou, isolou do

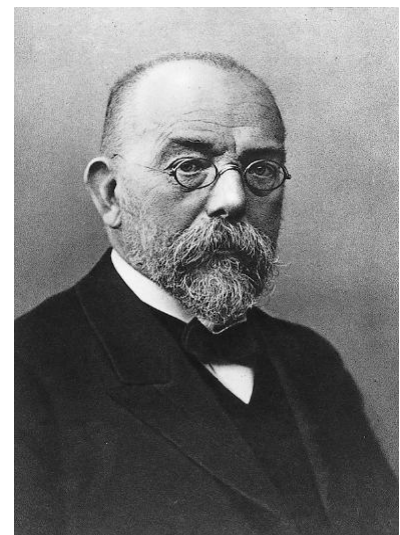


Figura 4. Robert Koch.

Fonte: Barnes, 2000.

tecido, cultivou e, inoculou em animais de laboratório reproduzindo a doença. Aquela apresentação revolucionou a Ciência Médica, cujos efeitos são ainda sentidos até os dias de hoje (BARNES, 2000). Tal abordagem ficou conhecida como os postulados de Koch.

Lehmann e Neumann, em 1896, comprovaram que os agentes etiológicos da TB e da Hanseníase tinham as mesmas características morfológicas e tintoriais de bacilos álcool-ácido resistentes (Figura 5). Agruparam esses

microrganismos como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, definindo as espécies *M. tuberculosis* e *M. leprae*, respectivamente. A denominação do gênero originou-se do latim “*fungus bacterium*”, devido ao *M. tuberculosis* apresentar algumas características semelhantes aos fungos quando cultivado em meio líquido.

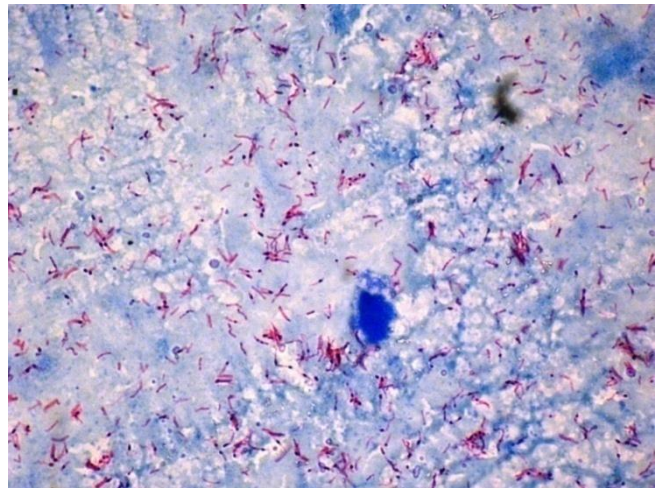


Figura 5. Bacilos álcool-ácido resistentes em amostra de escarro corados pela técnica de Kinyoun.

Foto: Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto

Posteriormente, vários bacilos com as mesmas características do *M. tuberculosis*, mas com variações no tempo de crescimento *in vitro*, produção de pigmentos e patogenicidade foram isolados tanto do homem, como do meio ambiente (BRASIL, 2008; RESTREPO et al., 2009).

Atualmente o gênero *Mycobacterium* está constituído por 158 espécies e subespécies (DSMZ, 2010) e, com exceção do *M. leprae* que não é isolado *in vitro*, são divididas em dois grupos, as pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* e as Micobactérias Não causadoras de TB, comumente designadas de MNT. As espécies do Complexo *M. tuberculosis* causam TB no homem e nos animais, as quais são: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*-BCG, *M. caprae*, *M. pinnipedii*. A espécie “*M. canetti*”, variante de *M. tuberculosis*

encontrada na Somália ainda não está oficialmente reconhecida como espécie do complexo (BRASIL, 2008).

A TB é uma doença contagiosa e a transmissão ocorre quando há um convívio muito próximo e prolongado entre uma pessoa susceptível e uma pessoa com TB ativa. Somente 3 a 5% das pessoas infectadas desenvolvem uma TB ativa (SALYERS; WHITT, 1994).

Embora a TB possa afetar qualquer órgão do corpo humano, os pulmões sempre são, virtualmente, a porta de entrada. Os pacientes com TB pulmonar ativa expõem os bacilos para o ambiente, pela aerosolização de secreções pulmonares, ao tossir, espirrar, falar ou cantar. As gotículas maiores se depositam mais rapidamente no chão, mas as de tamanho entre 1 a 10  $\mu\text{m}$ , contendo de um a dois bacilos, permanecem em suspensão no ar por mais tempo podendo ser aspiradas e conduzidas aos pulmões de um indivíduo. Outras gotículas contendo grumos bacilares podem ser levadas à faringe pelo mecanismo mucociliar, as quais são deglutidas e acabam por ser digeridas no estômago (DUTT, 2006). Em algumas ocasiões, a doença também pode ser adquirida por ingestão ou trauma cutâneo. Ainda que a TB possa ser estabelecida em primatas e animais de laboratório como cobaias, o homem constitui o único reservatório natural (MURRAY et al., 1992).

### **2.3 Patogenia**

Na infecção primária, quando os indivíduos entram em contato com *M. tuberculosis* pela primeira vez, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos, e seus antígenos são expressos na superfície dessas células. Os linfócitos T interagem com os antígenos micobacterianos dispostos na superfície desses macrófagos ou células apresentadoras de antígenos (APC) e liberam citocinas, como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). O IFN- $\gamma$  ativa os macrófagos, aumentando



a capacidade de destruição das micobactérias por essas células. Essa reação do organismo visa à contenção desses agentes em tubérculos, pequenos granulomas constituído de macrófagos. Estes, ao tentarem destruir os bacilos, sem sucesso, causam danos consideráveis ao tecido pulmonar, pela liberação de enzimas lisossomais e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Por outro lado, os bacilos podem sobreviver e multiplicar no interior de macrófagos, e quando isso ocorre, novos fagócitos migram para a área, liquefazendo o tubérculo. Dessa forma, os bacilos em uma lesão liquefeita podem escapar mais facilmente desses sítios, sendo expelidos pela tosse ou disseminar-se para outras partes do organismo, causando a forma disseminada da doença (SALYERS; WHITT, 1994; MIMS et al., 1995). A TB secundária pode ocorrer por reativação de micobactérias latentes ou reinfecção, usualmente, em consequência da depressão do sistema imune por causas como desnutrição, Aids, quimioterapia ou uso de corticosteróides (MIMS et al., 1995).

Os laboratórios de microbiologia desempenham papel imprescindível no controle da TB, pois quanto mais rápido um indivíduo sintomático respiratório é detectado na população, mais rápida será a prescrição de fármacos específicos e, conseqüentemente, menor será o período de disseminação do *M. tuberculosis* a partir daquele indivíduo.

## **2.4 Diagnóstico Laboratorial**

Os laboratórios de microbiologia usualmente devem ter disponíveis métodos que propiciem um diagnóstico laboratorial da TB mais rápido e acurado. A complexidade dos métodos depende da competência do laboratório e de sua posição na escala de hierarquização da rede de laboratórios (ROBERTS; PROCOP, 2006). Os mais comumente utilizados estão a seguir descritos.

A **microscopia direta ou baciloscopia** é a pesquisa de BAAR em um esfregaço de amostra clínica, preparado e corado pela técnica de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun, a qual segue um método padronizado de observação ao microscópio de campo claro. É uma técnica simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo, por isso continua sendo importante no controle da TB, já que pode detectar casos bacilíferos, ou seja, os casos infecciosos da forma pulmonar responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão (BRASIL, 2008). Embora seja uma técnica rápida, possui um limite mínimo de detecção entre 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro e sensibilidade que varia de 22 a 78% nos casos em que o cultivo está positivo (PFLALLER, 1994; BRASIL, 2008). A especificidade da baciloscopia é alta, entre 84 e 100%, porém esta porcentagem pode estar reduzida em zonas endêmicas de infecções pelas bactérias do Complexo *M. avium-intracellulare* (DANIEL, 1990) ou por outras MNT.

A técnica de **baciloscopia após-concentração** (SALEM et al., 1990) se mostrou quatro vezes mais sensível que a baciloscopia direta em amostras de escarro (confirmado após isolamento de *M. tuberculosis*) e pode ser extremamente útil no diagnóstico da TB pulmonar paucibacilar e em casos extrapulmonares.

O **cultivo** é o método laboratorial que permite o isolamento e a posterior identificação de BAAR a partir da semeadura da amostra clínica, em meios de cultivo específicos para micobactérias. É reconhecido como o “Padrão Ouro” para o diagnóstico das infecções causadas por *M. tuberculosis* em casos de TB pulmonar e extrapulmonar ou para avaliar um novo método diagnóstico (BUTCHER et al., 1996; BRASIL, 2008). É o método bacteriológico mais sensível e pode detectar 100 bacilos por mL de escarro, quando é realizada com alta qualidade técnica, pode ser possível detectar de 10 a 100 bacilos por mL de escarro (RIEDER et al., 2007; WHO, 2004). Entretanto, pode requerer até oito semanas para o isolamento e identificação da micobactéria. Devido à presença de microrganismos não micobacterianos em amostras clínicas,

de crescimento mais rápido que *M. tuberculosis* e que suplantam o desenvolvimento deste na superfície do meio de cultivo sólido, se faz necessário o uso de agentes descontaminantes e/ou mucolíticos. Estes acabam por eliminar a microbiota indesejável e desmucolizar o escarro, já que as micobactérias são refratárias a alguns agentes químicos como, por exemplo, a solução de hidróxido de sódio a 4% (ATS, 2000). Outros agentes descontaminantes e mucolíticos podem ser utilizados para o isolamento de micobactérias. Da mesma forma, vários meios de cultivo sólido a base de ovos (Löwenstein-Jensen e Ogawa), a base de ágar (Middlebrook 7H10 e 7H11) e líquidos (7H9 e 7H12) podem ser utilizados para o cultivo de micobactérias (ROBERTS; PROCOP, 2006).

A combinação dos agentes descontaminantes, mucolíticos e meios de cultivo pode ser útil para abreviar o tempo de diagnóstico da TB pulmonar. Nesse sentido Salem et al. (2007) desenvolveram a técnica de **PKO** (iniciais em homenagem a Petroff, Kudoh e Ogawa) para o isolamento de micobactérias a partir de secreções pulmonares. Esta técnica fundamenta-se no uso da solução de hidróxido de sódio a 4% como agente descontaminante e mucolítico, no breve tempo de descontaminação (5 minutos) e no uso do meio de Ogawa modificado (pH 6,4). Pela técnica de PKO, o escarro é descontaminado, centrifugado e semeado diretamente no meio de Ogawa modificado sem a necessidade da neutralização de pH do inóculo. Além disso, a técnica de PKO proporciona o desenvolvimento de colônias de micobactérias em período de tempo menor, equivalente aos sistemas comerciais semi ou totalmente automatizados de cultivo.

Dentre os sistemas comerciais, merecem destaque o **BacT/Alert MB** (bioMérieux) e o **Bactec MGIT 960** (BectonDickinson), que têm como princípios a detecção de produção de CO<sub>2</sub> e o consumo de O<sub>2</sub>, respectivamente. Vários estudos relataram a alta taxa de recuperação para *M. tuberculosis*, porém, ambos os sistemas requerem subcultivos em meio sólido para a confirmação, isolamento e posterior identificação da micobactéria (ATS, 2000; ROBERTS;

PROCOP, 2006).

O desenvolvimento dos **testes moleculares** baseados na amplificação e detecção de sequências de ácido nucléicos específicas do complexo *M. tuberculosis* pode proporcionar resultados para o diagnóstico da TB em 24 a 48 horas. Alguns kits padronizados já estão disponíveis comercialmente e apresentam elevadas sensibilidade (96%) e especificidade (85%) em amostras com pesquisa de BAAR positiva, mas limitada sensibilidade (66%), apesar de alta especificidade (98%), em amostras BAAR negativas. Os sistemas comerciais de amplificação de ácidos nucléicos foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos, apenas para a investigação de TB pulmonar e não devem ser utilizados para monitorar o tratamento e não substituem o exame de cultivo para micobactérias.

No Brasil, estudos de acurácia de novos métodos comerciais como, por exemplo, o método com fita GenoType® MTBDR (HainLifescience) e GeneXpert® System (Cepheid) estão sendo testados para a validação para diagnóstico (SBPT, 2009). Em relação aos sistemas desenvolvidos nos laboratórios de pesquisa, denominados *in house*, estes apresentam acurácia heterogênea, devido a não padronização da técnica de extração de DNA, bem como pela existência de várias sequências-alvo que podem ser utilizadas na detecção do *M. tuberculosis* (OGUSKU; SALEM, 2004).

O **teste de sensibilidade** ou **antibiograma** é realizado para detectar a resistência/sensibilidade dos isolados de *M. tuberculosis* aos fármacos utilizados no tratamento da TB, principalmente nos casos de retratamento e nos suspeitos de resistência medicamentosa. Os métodos padronizados utilizados no Brasil são: método das proporções, razão de resistência e concentração absoluta. Alguns laboratórios de referência utilizam sistemas automatizados a partir de culturas líquidas (Bactec MGIT 960) para reduzir o tempo do resultado para 10 dias (ATS, 2000; BRASIL, 2008). Os casos de resistência aos fármacos têm aumentado em todo

mundo agravando ainda mais a problemática da TB. Além disso, em muitos países, fatores como a falta de esquema terapêutico padronizado, a deficiência na sua implementação e manutenção, escassez no fornecimento de fármacos, uso de fármacos antimicobacterianos de baixa qualidade e a não adesão do paciente ao tratamento prescrito, afetam negativamente os Programas de Controle da TB (BRASIL, 2008).

Entretanto, a resistência aos fármacos pode ser um problema de maior complexidade, principalmente nos casos em que há falência de tratamento à TB, mesmo quando o isolado de *M. tuberculosis* apresenta um antibiograma com perfil de sensibilidade aos fármacos testados. Assim, a repetição do cultivo e do antibiograma com resultados divergentes àqueles iniciais, pode ser evidência de uma infecção policlonal, ou seja, infecção simultânea com clones diferentes de *M. tuberculosis* (THEISEN et al., 1995; BRADEN et al., 2001).

## **2.5 A Infecção Policlonal na Tuberculose**

A infecção policlonal é a presença simultânea de múltiplos patógenos da mesma espécie em um processo patogênico. Esta condição já foi observada em pacientes com HIV, Hepatite C, Mononucleose Infecciosa, Dengue, TB e Malária (COLBORN et al., 2006).

A infecção tuberculosa policlonal pode ser explicada: 1) pelo aparecimento de um novo clone que divergiu ou evoluiu de um clone pré-existente de *M. tuberculosis*; 2) pela coinfeção simultânea de clones adquiridos recentemente; ou 3) pela reinfeção em um indivíduo que tem uma infecção tuberculosa não curada (VIEDMA et al., 2003; FORD et al., 2012).

Apesar dos referidos conhecimentos, na prática clínica é amplamente admitido que um episódio de TB ativa seja causado por um único clone de *M. tuberculosis*. O mesmo foi inferido para os casos de TB extrapulmonar cujos clones de *M. tuberculosis* seriam os mesmos que

infectavam o trato respiratório (RICHARDSON et al., 2002; VIEDMA et al., 2003). Contudo, alguns estudos com fagotipagem realizados na década de 70 já indicavam a presença de mais de um clone (fagotipos) em um único paciente. Porém, a complexidade técnica desse tipo de ensaio fez com que os resultados não fossem considerados fidedignos (DAS et al., 2004).

As infecções com múltiplos clones de *M. tuberculosis* já foram erroneamente caracterizados como reativação (VIEDMA et al., 2003; WARREN et al., 2004), reinfecção ou contaminação ocorrida nos procedimentos laboratoriais (DAS et al., 2004). Segundo Theisen et al. (1995), provavelmente a prevalência de infecções tuberculosas policlonais esteja sendo subestimada devido à dificuldade de se identificar, bacteriologicamente, diferentes clones de *M. tuberculosis* provenientes de uma mesma amostra clínica.

Com o advento de novos métodos de genotipagem, no início dos anos 90, como o DNA “fingerprinting” a partir da sequência de inserção IS6110, foi possível identificar precisamente os clones de *M. tuberculosis* isolados de amostras clínicas (DAS et al., 2004). A tipagem por técnicas moleculares como Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) resultou em um grande avanço no estudo da epidemiologia da TB (CHAVES et al., 1999). Segundo Braden et al. (2001) o RFLP se tornou a principal ferramenta para a caracterização da infecção tuberculosa policlonal devido ao seu maior poder discriminatório. Porém, os autores ressaltam que o padrão de “fingerprint” do *M. tuberculosis* pode ser resultado de um clone predominante na amostra clínica ou mesmo de um padrão composto por múltiplos clones.

Segundo Behr (2005), a maioria dos bancos de dados de RFLP sugere que a infecção policlonal seja uma evidência ocasional, e que este tipo de infecção é extremamente raro. Entretanto, o autor considera que a técnica do RFLP tem por princípio que a TB é causada por uma infecção micobacteriana monoclonal, já que o escarro de um paciente é cultivado em meio sólido como o Löwenstein-Jensen por algumas semanas. Posteriormente, uma grande massa de

colônias de micobactérias tem o DNA extraído, digerido, submetido à eletroforese e hibridizado com sonda para um elemento genético de transposição que varia em número e posição no genoma de diversos clones. Conclui o autor que esse padrão genético é usado para representar a população de micobactérias daquele paciente e comparado com o de outros indivíduos.

Ainda segundo Behr (2005), se o DNA de uma minoria da população é insuficiente para gerar bandas na autorradiografia, a técnica de RFLP pode ser insensível para detectar as infecções policlonais. Assim, os ensaios fundamentados na PCR podem ser utilizados para a detecção de clones ou subpopulações específicas (BEHR, 2005; van RIE et al., 2005) ou se for utilizado o RFLP, a distinção de múltiplos clones de *M. tuberculosis* deve ser realizada a partir de colônias isoladas individualmente (MATSUMOTO et al., 2005).

Algumas publicações que abordam a infecção policlonal destacam a importância de sua caracterização. Theisen et al. (1995) relataram um caso de infecção policlonal por *M. tuberculosis*, sendo o primeiro clone isolado sensível a todos os fármacos anti-TB testados. Já o segundo clone de *M. tuberculosis*, isolado após 100 dias do diagnóstico inicial, apresentou resistência para INH e RIF e possuía um perfil genotípico diferente do primeiro clone isolado. Mendez et al. (2009) também relataram um caso semelhante, cujo *M. tuberculosis* multidroga resistente (MDR) se tornou evidente enquanto o paciente estava sendo tratado para *M. tuberculosis* sensível a todos os fármacos de primeira linha. Os autores chamam a atenção dos clínicos para que considerem a infecção policlonal como a causa possível de recidiva da TB.

O estudo de Chaves et al. (1999) trouxe evidências de reinfecção exógena e infecção policlonal em uma população carcerária de soropositivos para o HIV. No grupo A (n=9) de pacientes que permaneceram com cultivo positivo quatro meses após o início de tratamento específico, dois tiveram isolamento de um segundo clone de *M. tuberculosis* com genótipos diferentes para IS6110. Em um paciente o segundo clone era MDR e no outro paciente, ambos

os clones eram fármaco sensíveis. As evidências clínicas e microbiológicas destes dois casos eram consistentes com reinfecção. No grupo B (n=28) de pacientes com isolamento de *M. tuberculosis* de diferentes sítios anatômicos, um paciente teve clones provenientes do escarro e da urina com diferentes genótipos, ambos sensíveis aos fármacos específicos. De acordo com os autores, esse caso representa um exemplo de infecção policlonal.

Os estudos de Pavlic et al. (1999) e Braden et al. (2001) relatam casos de infecção tuberculosa policlonal, cujos pacientes imunocompetentes foram cronicamente expostos a fontes infecciosas em seus locais de trabalhos. Pavlic et al. (1999) apresentaram o caso de um atendente de bar com dois clones de *M. tuberculosis* fármacos sensíveis, enquanto que Braden et al. (2001), ao estudarem dois pacientes que trabalhavam no descarte/processamento de resíduos hospitalares, isolaram de um dos paciente clones sensíveis e resistentes à INH e do outro um clone sensível e um clone MDR.

Um caso de um paciente imunocompetente infectado inicialmente com um clone resistente a INH e SM, e que após três meses de tratamento teve um segundo clone de *M. tuberculosis* MDR isolado, foi relatado por Niemann et al. (2000). Ao todo, os cultivos desse paciente apresentavam resistência para nove fármacos anti-TB.

Richardson et al. (2002) encontraram três pacientes imunocompetentes (2,3%) que tinham uma mistura de clones de *M. tuberculosis* em até dois de seus cultivos. Estes pacientes residiam em uma comunidade com alta incidência de TB (área metropolitana da Cidade do Cabo, África do Sul, coeficiente 251/100.000 hab.) e os diferentes clones isolados eram sensíveis aos fármacos anti-TB.

Estudo realizado em um distrito da Índia com alta incidência de TB, a evidência de infecção policlonal só foi observada em dois de 543 pacientes (< 0,4%), cujos clones eram sensíveis aos fármacos anti-TB (DAS et al., 2004).



No estudo de Viedma et al. (2003), 6% (3 em 50) dos pacientes tinham mais de um clone de *M. tuberculosis* e, devido à observação de que os clones co-infectantes não eram igualmente distribuídos entre os sítios pulmonares e extrapulmonares foi apresentado o termo “compartimentalização”. Em um dos pacientes, embora tenham sido isolados dois genótipos no trato respiratório, somente um desses genótipos estava envolvido na infecção extrapulmonar. Isto sugere que uma seleção clonal possa ter ocorrido na disseminação da infecção.

Mediante o exposto, a caracterização de uma infecção policlonal se faz de extrema importância no momento em que os clones apresentam perfis de resistência diferenciados aos fármacos, o que pode comprometer o sucesso do tratamento da TB se o clone resistente não for identificado (NIEMANN et al., 2000).

## **2.6 Genotipagem por DRE-PCR**

A técnica de genotipagem de Double-Repetitive-Element PCR (DRE-PCR) foi desenvolvida por FRIEDMAN et al. (1995) e está fundamentada na PCR de segmentos de DNA localizados entre dois elementos repetitivos. Estes elementos repetitivos são a sequência de inserção IS6110 e a sequência polimórfica repetitiva rica em GC (polymorphic GC-rich repetitive sequence ou PGRS).

No presente estudo, esta técnica foi aplicada pela primeira vez para a caracterização da infecção policlonal a partir de uma amostra de escarro, coletada de pacientes recém-diagnosticados, antes do início do tratamento anti-TB e com procedimentos padronizados para a seleção de clones de *M. tuberculosis* fenotipicamente sensíveis e resistentes coexistentes no cultivo primário.

Embora a DRE-PCR não seja recomendada para estudos epidemiológicos de base

populacional com grande número de isolados, pode ser útil para comparar múltiplos isolados do mesmo paciente (LOURENÇO et al., 2000). Além disso, possui poder discriminatório equivalente ao RFLP (DELA et al., 2006) e maior que o Spoligotyping (SILVA et al., 2009), sendo uma técnica mais simples e rápida que o RFLP, cujos resultados podem ser interpretados após 8 horas de trabalho (VARELA et al., 2005). Pode ser executada em laboratórios com equipamentos básicos para estudos moleculares (MONTORO et al., 1998; LOURENÇO et al., 2000), não necessita de subcultivos de *M. tuberculosis*, podendo ser aplicada em bacilos não viáveis (VRIONI et al., 2004).

## **2.7 Resistência Medicamentosa na Tuberculose**

As bactérias desenvolvem diferentes mecanismos de resistências aos antibióticos, os quais podem ser: 1) redução da permeabilidade e bombas de efluxo; 2) inativação ou degradação de enzimas (por exemplo,  $\beta$ -lactamases); 3) modificação do “alvo” do fármaco (mutação de um gene associado). A aquisição das informações genéticas para tais propriedades pode ser via plasmídeos ou residir no cromossomo da bactéria. O mecanismo mais frequente de resistência é a presença de plasmídeos que controlam a síntese de enzimas modificadoras dos fármacos, tornando-os inativos em sua ação antibacteriana (CAMPOS, 1999).

Segundo David et al. (1994), no caso do *M. tuberculosis* a resistência aos fármacos anti-TB deve-se exclusivamente às mutações no cromossomo, visto que ainda não foram descritos plasmídeos de resistência na espécie. As mutações ocorrem espontaneamente durante a divisão celular, na replicação do DNA. Quando a mutação ocorre em um gene que controla a sensibilidade a um fármaco, o bacilo adquire resistência ao mesmo. Estas mutações ocorrem na frequência de um mutante em  $10^6$  a  $10^8$  bacilos, isto é, se for adicionado Isoniazida (INH) a um

cultivo com  $10^6$  bacilos, apenas um sobreviverá e continuará a multiplicar-se para formar uma população de bacilos resistentes. Em condições idênticas, a adição de Rifampicina (RIF) leva à seleção de mutantes resistentes. Contudo, se forem adicionados INH e RIF simultaneamente em um cultivo com  $10^6$  bacilos, o mutante resistente a INH será morto pela RIF, enquanto o resistente a RIF será morto pela INH. Entretanto, se uma população bacteriana for composta de  $10^{12}$  bacilos, dos quais pelo menos um bacilo é resistente simultâneo à INH e RIF, a adição de INH e RIF seleciona uma população resistente a ambos os fármacos. Por isso, o princípio de tratamento múltiplo em TB associa pelo menos três fármacos. Esses permitem a esterilização das lesões (caverna pulmonar), as quais podem conter um número médio de  $10^8$  bacilos.

Os primeiros estudos sobre resistência aos fármacos na TB ocorreram na década de 60, alguns anos após a introdução da INH no tratamento específico da TB em 1952. Nesses estudos, a resistência em casos novos<sup>i</sup> a pelo menos um fármaco variou de 3 a 13% e foram relatados na Finlândia, Itália, Grã Bretanha, Canadá, Austrália, Japão, França e Estados Unidos. Em Hong Kong, Quênia e Índia as prevalências de resistência em casos novos a pelo menos um fármaco foram de 20%, 14,7% e 22%, respectivamente (ESPINAL, 2003).

Após décadas de declínio contínuo da TB, pouca informação sobre a magnitude da resistência aos fármacos e TB-MDR, definida como resistência a pelo menos INH e RIF, estava disponível em nível mundial (RAVIGLIONE, 2003).

O primeiro estudo global em resistência foi divulgado em 1997 pela OMS e incluía dados de 35 países e regiões geográficas. A prevalência média de resistência em casos novos a pelo menos um fármaco foi de 9,9% (variação: 2 a 41%) e a TB-MDR, 1,4% (variação: 0 a

---

<sup>i</sup> “Resistência em casos novos” é observada em pacientes com TB que nunca receberam fármacos específicos anterior ao tratamento atual ou que receberam fármacos por menos de 1 mês. “Resistência em casos previamente tratados” observada em pacientes com TB que receberam tratamento específico por pelo menos 1 mês, cujos bacilos desenvolveram resistência a uma ou mais fármacos. O uso desses termos é recomendado em substituição aos termos “resistência primária” e “resistência adquirida”, respectivamente, devido à dificuldade de se confirmar a história de tratamento prévio dos pacientes acometidos de TB.

14%). Como era esperada, a prevalência de resistência em casos previamente tratados foi elevada, onde a média a pelo menos um fármaco alcançou 36% (variação: 5 a 100%) e de TB-MDR, 13% (variação: 0 a 54%) (WHO, 1997). No Brasil a prevalência de resistência em casos novos a pelo menos um fármaco foi de 8,6% e a de TB-MDR, 0,9%. Nos casos de TB previamente tratados, a resistência a pelo menos um fármaco e de TB-MDR alcançaram 14,4% e 5,4%, respectivamente (PABLOS-MÉNDEZ et al., 1998).

Um estudo global foi divulgado em 2000 (WHO, 2000), o qual incluía dados de 58 países/regiões geográficas e tendência de 28 locais. Entre os casos novos, a incidência de resistência a pelo menos um fármaco foi de 10,7% (variação: 2 a 36%) e a de TB-MDR, 1% (variação: 0 a 14%). Em relação aos casos previamente tratados, a incidência de resistência a pelo menos um fármaco foi de 23% (variação: 0 a 94%) e de TB-MDR, 9% (variação: 0 a 48%).

A partir desses dois grandes estudos, a TB-MDR não pode ser considerada um problema em nível mundial, pois a prevalência média encontrada foi de 1%. Entretanto, a TB-MDR é um grave problema de saúde pública em países como a Argentina, Estônia, Latvia, República Dominicana, Costa do Marfim e em regiões da Rússia e da China (ESPINAL, 2003).

Em geral, é razoável admitir que a prevalência de *M. tuberculosis* resistentes a determinado fármaco deva ser inferior a 5%, para que seja possível aceitar que o esquema contendo esse fármaco seja eficaz em termos de saúde pública. Quando a resistência em casos novos de TB ultrapassa esse valor, é necessário realizar o antibiograma para todos os casos (DAVID et al., 1994).

No Brasil, alguns estudos isolados foram realizados para verificar a prevalência de resistência aos fármacos, os quais indicam a problemática da TB-MDR, que de acordo com o Ministério da Saúde é a resistência conjunta a INH, RIF e mais um terceiro fármaco do tratamento padrão (DALCOLMO et al., 2007).

A preocupação com a TB resistente data desde o final da década de 50, no estado da Guanabara (atual cidade do Rio de Janeiro), onde 66,6% dos pacientes em tratamento se tornaram resistentes a dois ou três fármacos do tratamento padrão da época. O mesmo foi observado em outras capitais brasileiras, evidenciando o problema no país. No Rio Grande do Sul, em 1960, a taxa de cura era somente de 12,9%, refletindo-se em um coeficiente de mortalidade de 92,0/100.000. Um estudo realizado entre 1962 e 1966 documentou a resistência de 20,5% para os fármacos (no mínimo dois) que eram padrões naquela época (Estreptomicina-SM, INH e Pirazinamida-PZA). Após algumas mudanças introduzidas no Serviço Nacional de Tuberculose em 1960, dentre elas, o tratamento padronizado com SM, ácido para-aminosalicílico e INH para os casos novos, os resultados foram modestos no Rio Grande do Sul, mas apesar da taxa de cura manter-se baixa (36,9%), os percentuais de cura triplicaram. No Instituto Clemente Ferreira, em São Paulo, os índices de resistência para as décadas de 60 a 70 foram menores que das décadas de 70 a 80 (9,6% para 7,4%). Esta redução ocorreu devido a melhor organização do programa de controle da TB na década de 70 e pela introdução de fármacos mais potentes no tratamento, a administração combinada de INH e RIF, na década de 80 (DALCOLMO et al., 2007).

Os estudos prosseguiram e Fandinho et al. (1999) analisaram a resistência aos fármacos em *M. tuberculosis* isolados de 265 pacientes de dois centros de referência do Rio de Janeiro-RJ: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Centro de Referência para Aids) e Instituto Estadual de Doenças do Tórax Ari Parreiras (Centro de Referência para TB). Nos casos novos, a resistência a pelo menos um fármaco foi de 10,7% e a de TB-MDR, 4,4%. Nos casos previamente tratados, a resistência a pelo menos um fármaco e a de TB-MDR alcançaram 32,1% e 23,8%, respectivamente. Vale ressaltar que nesse estudo, os fármacos testados foram somente INH e RIF.

Em outro estudo também realizado no Rio de Janeiro-RJ, Lourenço et al. (2000) constataram a prevalência de TB-MDR no Sanatório Penal do Sistema Penitenciário Estadual do Rio de Janeiro. Os testes de sensibilidade a INH, RIF, PZA, Etambutol (EMB), SM e Etionamida (ETH) foram realizados em *M. tuberculosis* de 58 pacientes. A resistência a pelo menos um fármaco foi de 17,2% e a de TB-MDR, 3,4%. Os autores não puderam fazer a distinção entre resistência em casos novos e os previamente tratados por ausência de informações, o que faz com que esses dados sejam interpretados com cautela.

No Rio Grande do Sul, o estudo conduzido por Silva et al. (2001) verificou a resistência de 170 *M. tuberculosis* isolados de pacientes da região metropolitana de Porto Alegre e da cidade de Rio Grande. Os fármacos testados foram INH, RIF, PZA, EMB, SM e ETH. Nos casos novos de TB a resistência a pelo menos um fármaco alcançou 14%, enquanto que a TB-MDR foi de 10%. Entre os casos de TB previamente tratados a resistência a pelo menos um fármaco e a TB-MDR foram respectivamente, 73% e 44%.

Baptista et al. (2002) realizaram o estudo de resistência na região de Bauru-SP, no qual 54 isolados de *M. tuberculosis* foram testados frente aos antibióticos INH, RIF, PZA, EMB e SM. A resistência a pelo menos um fármaco foi encontrada em 24% e 14,8% dos casos novos de TB e dos previamente tratados, respectivamente. Pelos dados apresentados, pôde-se concluir que a TB-MDR estava presente em 5,5% dos casos. Entretanto, os autores não distinguiram a TB-MDR entre os casos novos de TB daqueles previamente tratados, nem apresentaram os resultados de forma que tal conclusão pudesse ser visualizada.

No Amazonas, o estudo de Salem et al. (1990) foi o pioneiro na investigação de resistência em *M. tuberculosis*, o qual já alertava sobre os altos níveis detectados. Os fármacos testados foram INH, RIF, PZA, SM, EMB e ETH e a resistência em casos novos de TB a pelo menos um fármaco foi de 25,3%, enquanto a TB-MDR alcançou 2,3%. Nos casos de TB

previamente tratados, a resistência a pelo menos um fármaco foi de 71% e a de TB-MDR, 25,8%.

Em um estudo recente realizado em Manaus – AM, Martins (2010) testou os seguintes fármacos INH, RIF, EMB e SM e, encontrou 12,5% de resistência em casos novos de TB a pelo menos uma fármaco (SM) e 4,1% de TB polirresistente, ou seja, resistente a INH e SM.

Os estudos de resistência aos fármacos no Brasil refletem a alta incidência de *M. tuberculosis* resistentes. Em regiões onde a prevalência de TB e a de isolados resistentes é baixa, podem não representar sérias consequências. Entretanto, a alta frequência de isolados resistentes em regiões de grande endemicidade de TB pode conduzir à falência do tratamento e comprometer seriamente as metas do programa de controle da TB (SILVA et al., 2001).

Assim, a adoção de medidas como o tratamento individualizado com base no padrão de sensibilidade do *M. tuberculosis* isolado requer a implantação de laboratórios para realização de cultivos e antibiograma, e o contínuo monitoramento da resistência aos fármacos são necessários para minimizar a transmissão de bacilos resistentes (SALEM et al., 1990).

Paralelamente à importância do cultivo e do antibiograma na rede básica de saúde para o controle da TB, muitos conhecimentos foram gerados para a compreensão dos mecanismos de ação dos fármacos, destacando-se os relacionados com as bases da resistência aos mesmos.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos ou associados no desenvolvimento da resistência pode auxiliar na proposição de novas metodologias para a detecção rápida de *M. tuberculosis* resistentes e, conseqüentemente, na redução de linhagens resistentes circulantes, trazendo grandes benefícios para a saúde pública (ROSSETTI et., 2002). A resistência aos fármacos do *M. tuberculosis* surge em consequência de mutações espontâneas que ocorrem em genes que codificam o alvo do fármaco ou enzimas que estão envolvidas na ativação de determinados fármacos. Embora mutações pontuais, deleções ou inserções

associadas à resistência tenham sido descritas para quase todos os fármacos de 1ª linha, alguns de 2ª linha e para fármacos mais novos (SOMOSKOVI et al., 2001; SILVA; PALOMINO, 2011; LAURENZO et al., 2011), vale descrever em detalhes as mutações associadas a resistência para INH e RIF por serem esses os mais eficientes contra o bacilo da TB (SHAMPUTA et al., 2004; YANG et al., 2005).

### ➤ **Resistência à Isoniazida**

A isoniazida (INH) é bactericida, metabolizada pelo fígado e possui meia vida de uma a três horas, dependendo do perfil de acetilação do indivíduo. Pode ser de administração oral, intramuscular ou intravenosa em regimes de duas ou três vezes por semana. A concentração inibitória mínima é muito baixa, o que contribui para sua eficácia (0,02 a 0,05 µg/mL). Difunde-se rapidamente pelos tecidos do corpo, bem como pelo sistema nervoso central (ROSSETTI et al., 2002; KHAN; KIMERLING, 2006).

A INH é um pró-fármaco que requer ativação da enzima catalase-peroxidase, produzida pela espécie micobacteriana sensível e codificada pelo gene *katG* (SOMOSKOVI et al., 2001; SILVA; PALOMINO, 2011). Evidências sugerem que o mecanismo de ação da INH é o bloqueio da biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a parede celular, o que faz com que a bactéria se torne suscetível aos radicais de oxigênio e a outros fatores do meio (ROSSETTI et al., 2002).

A resistência para esse fármaco está associada a mutações no gene *katG*, principalmente na região referente ao códon 315 (S315T), o que resulta em uma enzima sem a capacidade de ativar a INH endogenamente. Outro gene também está associado à resistência para INH, o *inhA*, que codifica a enoil-ACP redutase e catalisa uma etapa primária na síntese de ácido graxo (RUIZ et al., 2004). Em consequência da mutação no gene, a enzima modifica sua afinidade



pelo cofator, resultando em um fenótipo resistente a INH. As mutações nos genes *katG* e *inhA* são encontradas em 75-85% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes.

A presença de isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH que não apresentam mutações nos genes *katG* e *inhA* indicam que outros genes estão envolvidos com a resistência a INH. Assim, a identificação de novos genes pode auxiliar a compreensão do mecanismo de ação da INH, bem como facilitar o desenvolvimento de novas técnicas moleculares para a detecção rápida da resistência (SLAYDEN; BARRY, 2000; SOMOSKOVI et al., 2001; ROSSETTI et al., 2002).

#### ➤ **Resistência à Rifampicina**

A rifampicina (RIF) é bactericida e metabolizada pelo fígado. É um potente fármaco anti-TB, eliminando bactérias persistentes (ação esterilizante), com concentração inibitória mínima de 0,1 a 0,2 µg/mL. Possui meia vida de 1,5 a 5 horas e pode ser de administração oral ou intravenosa (KHAN; KIMERLING, 2006; ROSSETTI et al., 2002).

A atividade da RIF é muito alta sobre *M. tuberculosis*, pois o fármaco se difunde rapidamente através do envelope celular hidrofóbico (CAMPOS, 1999) e se liga à subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, inibindo a etapa de transcrição (SOMOSKOVI et al., 2001; HERRERA-LEÓN et al., 2005).

As mutações no gene *rpoB* conferem trocas conformacionais da RNA polimerase, o que impede uma ligação eficiente com a RIF e, em consequência, surge a resistência (ROSSETTI et al., 2002). Mais de 96% das amostras resistentes à RIF apresentam mutações em uma região *core* ou *hot spot* de 81 pares de base desse gene (RUIZ et al., 2004). Mutações em sequências referentes a alguns códons dessa região estão mais frequentemente associados com a resistência, especialmente os 531, 526 e 516, sendo que alguns destes foram associados a altos níveis de resistência a RIF ou outras rifamicinas (SOMOSKOVI et al., 2001; VIEDMA, 2003;

YANG et al., 2005). A resistência à RIF, na rara frequência de um em  $10^8$  bacilos, quando ocorre resulta na rápida seleção de mutantes resistentes a outros fármacos do esquema de curta duração. Assim, a resistência a RIF pode ser considerada como um marcador de MDR (CAMPOS, 1999).

Diante da endemicidade da TB no Estado do Amazonas e da elevação da transmissão de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos no mundo, a caracterização da infecção tuberculosa policlonal e sua associação com a resistência pode evidenciar a presença desse fenômeno nos pacientes de TB do estado, indicando a necessidade de adoção de novas estratégias que favoreçam o controle da TB.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a infecção policlonal de *Mycobacterium tuberculosis* e averiguar possível associação com a resistência aos fármacos antimicobacterianos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Verificar se há relação entre genótipos de *M. tuberculosis*, infecção policlonal e resistência aos fármacos isoniazida e rifampicina;
- 3.2.2 Analisar a associação entre infecção policlonal por *M. tuberculosis* em pacientes com TB paucibacilar e multibacilar;
- 3.2.3 Identificar as mutações genéticas associadas à resistência aos fármacos isoniazida e rifampicina em clones de *M. tuberculosis* isolados em Manaus – AM.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Modelo de estudo**

Estudo prospectivo, experimental, para investigação de Tuberculose (TB) pulmonar por múltiplos clones de *Mycobacterium tuberculosis* e possível associação com a resistência aos fármacos antimicobacterianos.

### **4.2 Universo de Estudo**

#### **4.2.1 População de Referência**

O estudo teve como população de referência os pacientes com TB pulmonar, seja caso novo ou com antecedente de TB, residentes em Manaus – AM e atendidos na Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes. A policlínica é referência estadual em TB, o que faz com que seja procurada pelos sintomáticos respiratórios com suspeita da doença residentes nos quatro distritos sanitários (norte, sul, leste e oeste) de Manaus. Por esse motivo é responsável por aproximadamente 52% dos diagnósticos de TB da cidade de Manaus (SEMSA, 2009).

#### **4.2.2 Participantes e Critérios de Elegibilidade**

Na população de referência foram selecionados os participantes do estudo, com base no número de pacientes diagnosticados como TB pulmonar no ano de 2008. Para tanto, foram obtidos, junto a Diretoria da Policlínica, os quantitativos que foram diagnosticados como portadores de TB multibacilar (baciloscopias positivas) e TB paucibacilar (baciloscopias negativas com indicação clínica e/ou radiológica de TB). Para o cálculo dos participantes utilizou-se o módulo EpiTable (tamanho de amostra, proporção simples) do software Epi Info<sup>TM</sup> 6, versão 6.04d (DEAN et al., 1998).

No cálculo dos pacientes multibacilares, considerou-se: a) os 321 de casos de TB

pulmonar multibacilar diagnosticados em 2008; b) precisão de 4%; c) prevalência esperada de TB resistente de 1,4% (BRASIL, 2009b); d) intervalo de confiança de 95%. Assim, a casuística prevista foi de 31 pacientes. Para o cálculo dos pacientes paucibacilares, considerou-se: a) os 339 de casos de TB pulmonar paucibacilar diagnosticados em 2008; b) precisão: 4%; c) prevalência esperada de TB resistente: 1,4% (BRASIL, 2009b); d) intervalo de confiança: 95%. O número de participantes também ficou estipulado em 31 pacientes.

Em visita prévia a Policlínica Cardoso Fontes, constatou-se que os casos novos e os com antecedentes de TB, são atendidos nos setores de “Aprazamento I” e “Aprazamento II”, respectivamente, pela equipe da referida Policlínica. Nesses setores recebem as orientações sobre a doença, tratamento, importância da adesão ao tratamento e demais informações e, são agendados para acompanhamento do tratamento e recebimento dos fármacos específicos anti-TB. Assim, aleatoriamente foi selecionado o período matutino das quintas-feiras para que, logo após o recebimento dos fármacos e das orientações, todos os pacientes do período fossem convidados a participar do estudo.

A seleção ocorreu de acordo com os seguintes critérios de inclusão: aceitação de participação no estudo mediante concordância com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1), idade entre 18 e 60 anos, de ambos os gêneros, imunocompetentes ou não, com ou sem antecedente e tratamento para TB e não pertencentes a etnia indígena. Os pacientes que contemplavam esses critérios de inclusão foram instruídos para uma nova coleta de escarro, para a qual foram fornecidos os potes e instruções verbais e escritas (Apêndice 1) de coleta.

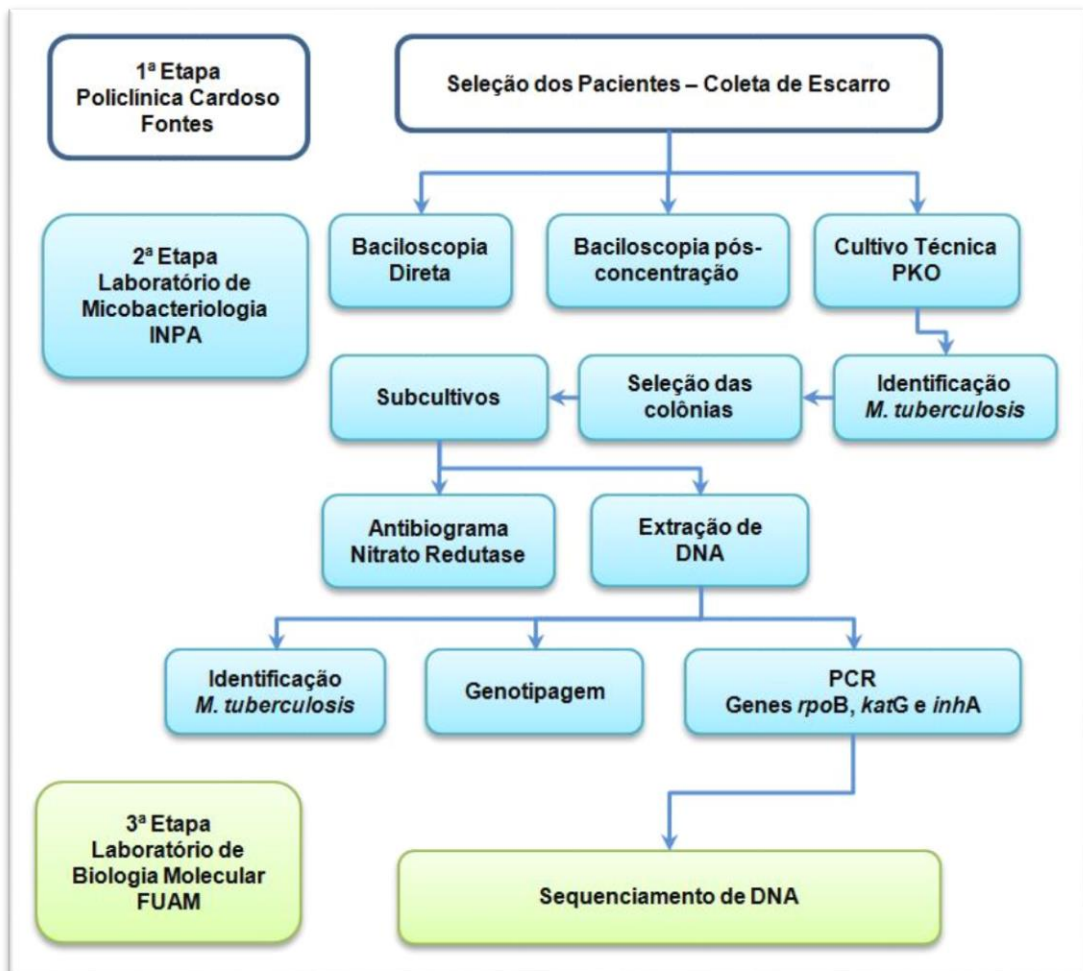
Foram excluídos do estudo os participantes cujos cultivos dos escarros foram negativos para *M. tuberculosis* ou positivos para Micobactérias não causadoras de Tuberculose (MNT), assim como os que tiveram seus cultivos contaminados por microrganismos que não os micobacterianos. Vale ressaltar que a reposição do número de participantes excluídos, foi efetuada por novas seleções até a obtenção dos quantitativos estipulados nas casuísticas – 31 pacientes multibacilares e 31 paucibacilares.

### 4.3 Informações Éticas e de Financiamento

O estudo foi avaliado pelo CEP – INPA e aprovado em 30/11/2009 sob o protocolo de número 221-09. Recebeu Auxílio Financeiro do Programa Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde (Edital 007/2009) da FAPEAM, no valor de R\$ 121.000,00, de acordo com a decisão 005/2010 de 03/02/2010 do Conselho Diretor. Entretanto, a liberação do Auxílio Financeiro somente ocorreu em 24/08/2010.

### 4.4 Organização do Experimento

O fluxo dos procedimentos que foram realizados está representado na Figura 6.



INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; FUAM = Fundação “Alfredo da Mata”.

Figura 6. Fluxo de atividades para a investigação da Tuberculose pulmonar policlonal.

## 4.5 Detalhes dos Procedimentos

### 4.5.1 Procedimentos Micobacteriológicos

Conforme apresentado na Figura 6, foram executados os exames de baciloscopia direta, baciloscopia após-concentração e o cultivo, visando à classificação dos casos em multibacilar ou paucibacilar e a obtenção dos isolados de *M. tuberculosis*. As técnicas realizadas estão em de acordo com Salem et al. (1990) e Salem et al. (2007), cujos detalhes estão apresentados no Apêndice 2.

### 4.5.2 Seleção de clones micobacterianos

Inicialmente foi realizada uma padronização da suspensão micobacteriana que permitiu o desenvolvimento e seleção de colônias isoladas, na superfície do meio de cultivo 7H10 em placa de Petri com 8,7 cm de diâmetro. Para tanto, a cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv foi subcultivada em meio de Löwenstein-Jensen por 21 dias para sua reativação. Após o desenvolvimento das colônias na superfície do meio, uma suspensão com aproximadamente 6000/mL bacilos foi preparada e semeada em meio 7H10, conforme apresentado na Figura 7.

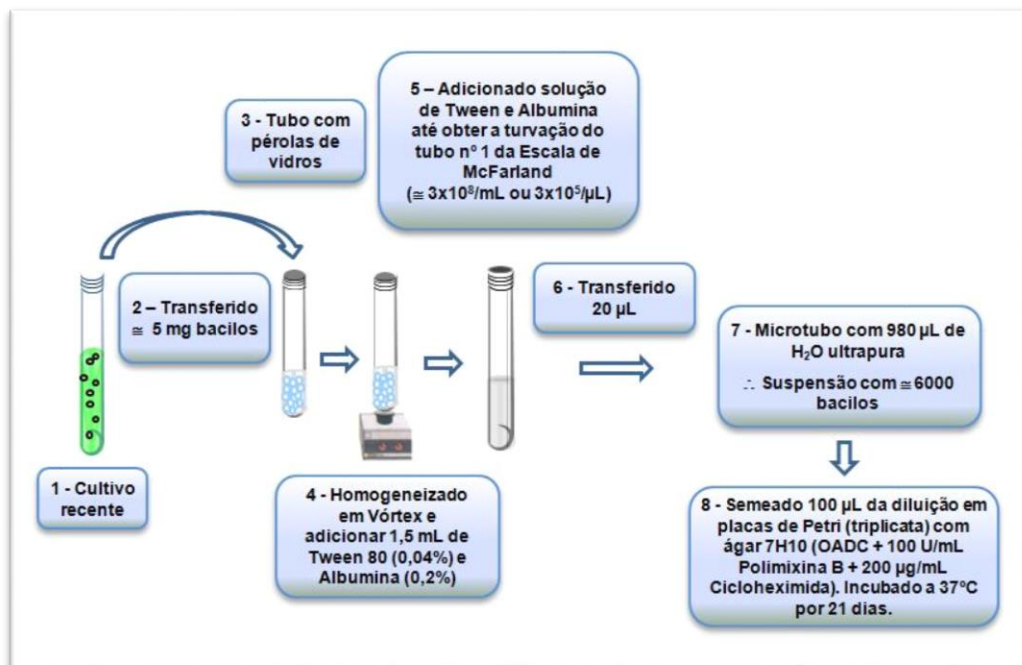


Figura 7. Padronização da suspensão de *M. tuberculosis* para obtenção de colônias isoladas.

Esta suspensão micobacteriana proporcionou a obtenção de colônias isoladas da cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv, em um espaço de até 9 mm<sup>2</sup> da placa de Petri contendo meio de 7H10, com densidade populacional distribuída homogênea, ou seja, sem o desenvolvimento excessivo de colônias confluentes.

Vale ressaltar que o desenvolvimento de uma colônia é realizado a partir de uma unidade formadora de colônia (UFC), o que propiciou a obtenção de diferentes clones a partir do cultivo primário de *M. tuberculosis*.

Para isolamento de clones de *M. tuberculosis* de pacientes com TB pulmonar foi adotada a estratégia de selecionar clones resistentes aos fármacos INH e RIF (sugestão do Prof. Dr. Maulori Cabral - UFRJ). Para isso foram preparadas alíquotas de meio de cultivo 7H10 com os citados fármacos nas concentrações descritas a seguir, além do meio 7H10 com Polimixina e Cicloheximida mencionado na Figura 7:

- a) Meio 7H10 adicionado de suplemento OADC, INH (0,2 µg/mL) e Cicloheximida (200 µg/mL);
- b) Meio 7H10 adicionado de suplemento OADC, RIF (40,0 µg/mL) e Cicloheximida (200 µg/mL);
- c) Meio 7H10 adicionado de suplemento OADC, INH (0,2 µg/mL), RIF (40,0 µg/mL) e Cicloheximida (200 µg/mL);

As suspensões de *M. tuberculosis*, a partir do cultivo primário de cada paciente com TB, foram preparadas da mesma forma que a da cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv. Após a semeadura das placas de 7H10 com e sem fármacos, as mesmas foram incubadas a 37°C por 30 dias.

Para a seleção aleatória das colônias, foi elaborado um gabarito circular (Figura 8) com 8,7 cm de diâmetro, tamanho compatível ao da placa de Petri, no qual as subdivisões de 9 mm<sup>2</sup> (0,09 cm<sup>2</sup>) resultaram em 644 quadrantes.



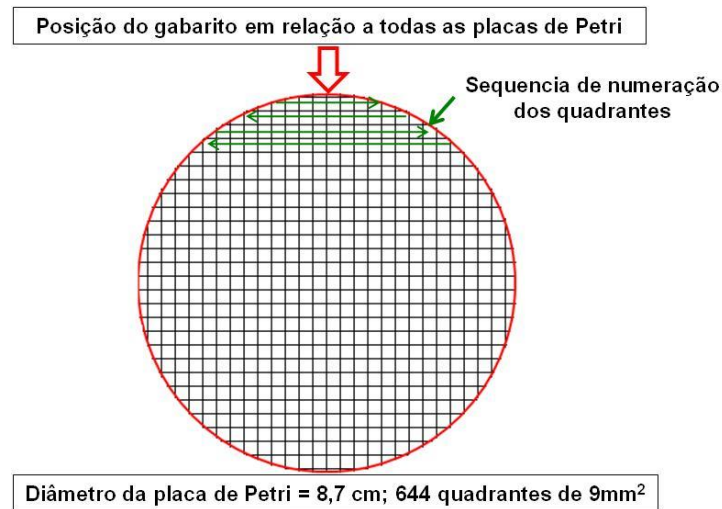


Figura 8. Gabarito para definição dos quadrantes de seleção de colônias de *M. tuberculosis*

Para que ocorresse a justaposição da placa de Petri com o gabarito, essa também recebeu uma marcação aleatória em sua parede lateral e foi posicionada sobre o ponto de indicação do gabarito (seta na Figura 8), garantindo-se assim o mesmo posicionamento da placa durante a seleção das colônias. Além disso, os números dos quadrantes foram demarcados conforme a sequência ilustrada na Figura 8.

Foram eleitas e analisadas as colônias micobacterianas existentes nos quadrantes selecionados por amostragem aleatória simples (CALLEGARI-JACQUES, 2003), nos quais todas as colônias micobacterianas, do isolado de *M. tuberculosis* da diluição padrão, tiveram igual probabilidade de serem selecionadas. Nesse intuito utilizou-se o software estatístico R (versão 2.9.1) para a geração de 50 números aleatórios que corresponderam à posição de cada quadrante no gabarito circular. Os números aleatórios foram utilizados na seleção de 10 colônias de cada isolado de *M. tuberculosis*, que se desenvolveram em meio 7H10 sem a adição de INH e/ou RIF. O mesmo critério foi utilizado para as colônias resistentes que se desenvolveram em número superior a 10 em meio 7H10 com a adição de INH e/ou RIF. Quando o número era inferior a dez, todas as colônias resistentes a INH e/ou RIF foram selecionadas.

Os números aleatórios gerados estão apresentados no Quadro 1 e suas escolhas

obedeceram a ordem sequencial da colunas, sempre de cima para baixo.

### Quadro 1

Números aleatórios gerados no software R, conforme parâmetro de 1 a 644 números

Colunas				
1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
214	65	491	467	625
253	552	107	71	154
227	363	161	620	248
36	29	128	595	178
244	317	538	274	601
348	446	579	638	27
544	6	307	133	200
302	46	447	543	442
68	603	190	102	586
372	209	512	332	61

A opção da geração de 50 números visou à reposição de quadrantes excluídos devido à possibilidade de existência de colônias confluentes ou mais de uma colônia existente no mesmo quadrante. Assim, convencionou-se que:

- a) Se no quadrante definido havia duas ou mais colônias de crescimento confluentes, esse foi ignorado e a colônia selecionada foi a que estava no próximo quadrante nomeado;
- b) Se no quadrante selecionado havia colônias isoladas, porém nos limites do mesmo, a colônia escolhida foi aquela cujo diâmetro estava ocupando maior espaço do quadrante.

Após a semeadura e desenvolvimento das colônias micobacterianas, conforme ilustrado na Figura 7, o gabarito foi posicionado sob a placa de Petri e as colônias que coincidiram com as posições dos quadrantes do gabarito circular foram selecionadas. A figura 9 exemplifica os quadrantes (em vermelho) referentes ao 1º grupo de números aleatórios gerados.

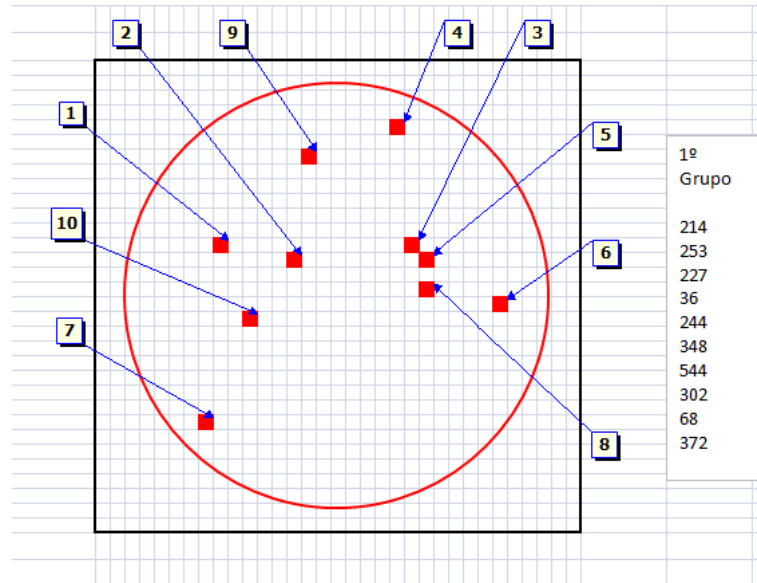


Figura 9 – 1º Grupo de números aleatórios identificados no gabarito para seleção de colônias de *M. tuberculosis*.

As colônias selecionadas foram subcultivadas, individualmente, em meio sólido de Löwenstein-Jensen ou Ogawa modificado por pelo menos 21 dias para a posterior realização do antibiograma. Paralelamente, também foram subcultivadas em cinco mL de meio 7H9 contendo 0,2% de Tween 80 até a obtenção de uma suspensão bacilar com turbidez equivalente à escala 1 de McFarland para a extração de DNA, identificação de *M. tuberculosis* por PCR, genotipagem e sequenciamento de DNA dos genes associados à resistência aos fármacos INH e RIF.

#### 4.5.3 Teste de Susceptibilidade aos Fármacos

As colônias subcultivadas tiveram a sensibilidade à INH e RIF determinada pela técnica da Nitrato Redutase, realizada de acordo com Martins (2010), bem como foram confirmadas a resistência à INH e/ou RIF das colônias pré-selecionadas a partir do meio 7H10 com os citados fármacos.

Pela técnica da Nitrato Redutase foram detectados bacilos resistentes a INH e/ou RIF nas concentrações de 0,2 µg/mL e 40,0 µg/mL, respectivamente. Resumidamente, uma

suspensão bacilar (escala 1 de McFarland diluída 1:10 em PBS) de *M. tuberculosis* foi semeada em tubos contendo o meio de Löwenstein-Jensen acrescido de um dos fármacos e NaNO<sub>3</sub> e os tubos incubados a 37°C por 10 dias. Para controle foram utilizados a cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv e isolados de *M. tuberculosis*, reconhecidamente resistentes à INH e RIF (gentilmente cedida pela pesquisadora Maria Alice Telles do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP). Ao final desse período 0,5 mL da solução reagente reveladora de Griess (*n*-1-naftiletilediamino dihidroclorato) foi adicionado ao tubo controle. Quando não houve a redução do nitrato a nitrito, todos os tubos semeados foram reincubados até o 14º dia, conforme necessário. Quando houve a redução do nitrato a nitrito em um tubo controle, o reagente de Griess foi adicionado aos tubos com fármacos. A mudança de coloração do meio de cultivo de verde para róseo (mais intenso que no tubo controle) indicou que houve redução de nitrato a nitrito, devido ao desenvolvimento do *M. tuberculosis* nos tubos com fármaco, evidenciando sua resistência.

#### **4.5.4 Extração de DNA micobacteriano**

A extração de DNA foi executada após modificações no protocolo utilizado por Friedman et al. (1995). Um volume de 500 µL da suspensão micobacteriana em meio 7H9, referida anteriormente, foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos e o concentrado de micobactérias foi ressuspendido em 200 µL de água ultrapura. A etapa de centrifugação foi repetida e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 200 µL de água ultrapura e a suspensão de micobactérias foi incubada a 90°C por 60 minutos para inativação dos bacilos e, posteriormente, a 100°C por 10 minutos. A amostra foi mantida a -20°C até o momento de uso.

#### **4.5.5 Identificação de *M. tuberculosis* por PCR**

A identificação de *M. tuberculosis* foi realizada por PCR com iniciadores específicos para o Complexo *M. tuberculosis*. Neste ensaio, um fragmento de 245 pares de bases (pb) da

sequência de inserção IS6110 foi amplificado por PCR com oligonucleotídeos INS-1 (5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3') e INS-2 (5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3'), de acordo com Hermans et al. (1990) e van Embden et al. (1993).

Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Os produtos de PCR foram observados após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR Green, em transiluminador de luz azul.

#### 4.5.6 Genotipagem

A genotipagem das colônias de *M. tuberculosis*, individualmente subcultivadas, foi realizada com a técnica de DRE-PCR (FRIEDMAN et al., 1995). Para a referida técnica foi necessária sua otimização para as condições do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, bem como para os reagentes adquiridos no mercado nacional.

Por esta técnica, 10 µL de DNA de cada colônia de *M. tuberculosis*, extraído como descrito no item 4.5.4, foram adicionados a uma mistura de reagentes contendo tampão de PCR, 200 µM de cada dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada iniciador Ris 1 (5'-GGC TGA GGT CTC AGA TCA G-3'), Ris 2 (5'-ACC CCA TCC TTT CCA AGA AC-3'), Pntb 1 (5'-CCG TTG CCG TAC AGC TG-3') e Pntb 2 (5'-CCT AGC CGA ACC CTT TG-3') e 2 U de *Taq* DNA Polimerase, em um volume final de 25 µL.

Os parâmetros de amplificação foram: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 56°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos, de acordo com modificações introduzidas por Montoro et al. (1998).

O genótipo dos clones foi observado após eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com SYBR Green em transiluminador de luz azul.

A visualização de *M. tuberculosis* com genótipos diferenciados provenientes da mesma

amostra clínica foi considerada evidência de infecção policlonal. Os ensaios foram repetidos para confirmação dos resultados.

#### 4.5.7 Sequenciamento de DNA

A detecção das mutações associadas à resistência aos fármacos das colônias de *M. tuberculosis* foi efetuada por sequenciamento automático de DNA, de acordo com Campbell et al. (2011). Para INH foram pesquisadas mutações nos genes *katG* e *inhA*. Os fragmentos de genes *katG* (455 pb) e *inhA* (455 pb), foram amplificados usando os oligonucleotídeos *katG*-5 (5'-AAC GAC GTC GAA ACA GCG GC-3') e *katG*-6 (5'-GCG AAC TCG TCG GCC AAT TC-3') e *inhA*-1f (5'-TGC CCA GAA AGG GAT CCG TCA TG-3') e *inhA*-2r (5'-ATG AGG AAT GCG TCC GCG GA-3'), respectivamente.

Para RIF, as mutações foram pesquisadas no gene *rpoB*. Para amplificação de um fragmento de 543 pb do gene *rpoB* foram utilizados os oligonucleotídeos *rpoB*-1f (5'-CTT GCA CGA GGG TCA GAC CA-3') e *rpoB*-2r (5' ATC TCG TCG CTA ACC ACG CC-3'). A reação de amplificação (25 µL) para cada gene foi constituída por tampão de PCR, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq* DNA Polimerase e 5 µL de DNA extraído. Os parâmetros de amplificação em termociclador foram: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Green e visualizado em transiluminador de luz azul.

Após confirmação da amplificação dos fragmentos de DNA, os produtos de PCR foram purificados com Polietilenoglicol fundamentado no protocolo descrito por Lis; Schleif (1975), com contribuições de Lis (1980) e Paithankar; Prasad (1991).

O produto de PCR foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e o mesmo volume da

solução de polietilenoglicol (PEG 8000 a 20% w/v, 2,5 M NaCl) foi adicionado. A amostra foi agitada em vórtex suavemente por 10 segundos e incubada a 37°C por 15 minutos. Após este período, a amostra foi centrifugada a 2500  $x$  g por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 125 $\mu$ L de etanol 80% gelado foram adicionados. Em seguida foi centrifugada a 1450  $x$  g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o microtubo foi incubado a 37°C por 15 minutos para remoção de resíduos de etanol. Um volume de 20  $\mu$ L de água ultrapura foi adicionado e o microtubo agitado em vórtex por 10 segundos e armazenado a -20°C.

Os produtos de PCR purificados foram quantificados em espectrofotômetro de luz ultravioleta (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, GE Healthcare Life Sciences) e um quantitativo de 10 a 20 ng do produto de PCR foi usado para a reação de sequenciamento de DNA. Nesta, foi utilizado o Kit BigDye Terminator (versão 3.1), de acordo com o protocolo do fabricante, exceto para o volume de BigDye que foi reduzido para 0,3  $\mu$ L em cada reação, para cada um dos oligonucleotídeos e seus respectivos genes.

Os terminadores não incorporados foram removidos após tratamento com Etanol/EDTA/Acetato de sódio, de acordo com o protocolo do fabricante, e o sequenciamento foi conduzido em um analisador automático de DNA, 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) com a colaboração com a Fundação Alfredo da Mata.

## **4.6 Análise dos Resultados**

### **4.6.1 Baciloscopia**

A leitura foi realizada em microscópio óptico, em objetiva de imersão, com aumento de 1.000 X. Na interpretação dos resultados de amostras de escarro foi utilizada uma escala semi-quantitativa (BRASIL, 2008), que tem por base o número de bacilos visualizados em cada campo microscópico examinado. Para a baciloscopia direta e após-concentração de amostras

de escarro a escala tem os seguintes padrões:

- Nenhum BAAR em 100 campos → negativo
- 1 a 9 BAAR em 100 campos → especificar quantitativo
- 10 a 99 BAAR em 100 campos → positivo +
- Média de 1 a 10 BAAR em 50 campos → positivo ++
- Média superior a 10 BAAR em 20 campos → positivo +++

#### **4.6.2 Cultivo de *M. tuberculosis***

A confirmação de crescimento micobacteriano foi dada pela análise de álcool-ácido resistência, realizada por meio de esfregaços de pequenos fragmentos da colônia isolada corados pela técnica de Kinyoun. Quando BAAR positivo, as colônias foram avaliadas quanto à produção de pigmentos (acromógena), aspecto das colônias (rugosa) e velocidade de crescimento (lenta). Por PCR, as espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* apresentaram um fragmento de DNA de 245 pb.

#### **4.6.3 Antibiograma**

Uma cepa foi considerada resistente quando houve aparecimento de cor rósea ou violácea de maior intensidade que a do tubo controle, revelando a presença de nitrito originada da redução do nitrato pela enzima nitrato redutase, produzida pelo *M. tuberculosis* em crescimento na presença de INH ou RIF.

#### **4.6.4 Genotipagem**

As imagens da eletroforese das reações de DRE-PCR de cada grupo clones de *M. tuberculosis* foram capturadas via sistema de fotodocumentação digital (formato “tiff”) e as mesmas comparadas entre si usando software GelCompar II (Applied Maths). Foram considerados os fragmentos de DNA entre 100 e 1000 pb, anotados automaticamente pelo



software e, posteriormente, confirmados de forma visual/manual. Os diferentes perfis de migração dos fragmentos de DNA foram utilizados para definição dos diferentes genótipos.

#### **4.6.5 Sequenciamento de DNA**

As sequências de DNA obtidas para os genes *katG*, *inhA* e *rpoB* de cada amostra, utilizando as reações nos dois sentidos da fita de DNA, foram editadas usando o software Geneious Pro, versão 5.4 (Drumond et al., 2011) e comparadas às dos genes da cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv (acesso GenBank NC\_000962) via BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – NCBI, National Center for Biotechnology Information) para identificar as mutações associadas às resistências da INH e RIF. Os clones de *M. tuberculosis* sensíveis à INH e RIF também foram pesquisados quanto à presença de mutações nos citados genes.

#### **4.7 Análise Estatística**

Para determinar se houve associação entre presença de infecção policlonal e dados microbiológicos foi utilizado o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com correção de Yates (ZAR, 1984). O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 5\%$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No período de maio de 2010 a junho de 2011 foram incluídas no estudo 62 amostras de escarros de 62 pacientes com TB pulmonar, atendidos na Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes. A média de idade foi de 34 ( $\pm 9$ ) anos, sendo 29 (46,8%) pacientes do sexo feminino e 33 (53,2%) masculino. De acordo com o cálculo amostral estabelecido na metodologia, 31 (50%) eram amostras multibacilares e 31 paucibacilares, cumprindo-se assim o estipulado na casuística do estudo.

### 5.1 Identificação do Cultivo Primário de *Mycobacterium tuberculosis*

Pela técnica de PKO, todos os cultivos de escarro proporcionaram o isolamento de colônias de micobactérias, ou seja, com características de álcool-ácido resistência, rugosas, acromógenas e de crescimento lento. Estas micobactérias foram identificadas preliminarmente como pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* por PCR com iniciadores específicos para a sequência de inserção IS6110.

### 5.2 Seleção e Identificação de Clones de *Mycobacterium tuberculosis*

Dos 62 isolados de *M. tuberculosis*, foram obtidos 190 clones a partir do meio 7H10 e 74 clones resistentes a partir do ensaio de triagem em 7H10 acrescidos de fármacos. Vale ressaltar que a utilização de meio 7H10 sem fármaco visou à comparação genotípica frente aos clones resistentes provenientes do mesmo isolado.

É importante relatar que houve perdas de clones por não se desenvolverem nos subcultivos, ou por contaminação dos mesmos ou por não apresentarem crescimento como controle positivo do teste de sensibilidade aos fármacos pela técnica da Nitrato Redutase.

Os dados resultantes da seleção de clones estão Figura 10 e os clones obtidos na triagem estão apresentados na Tabela 1.

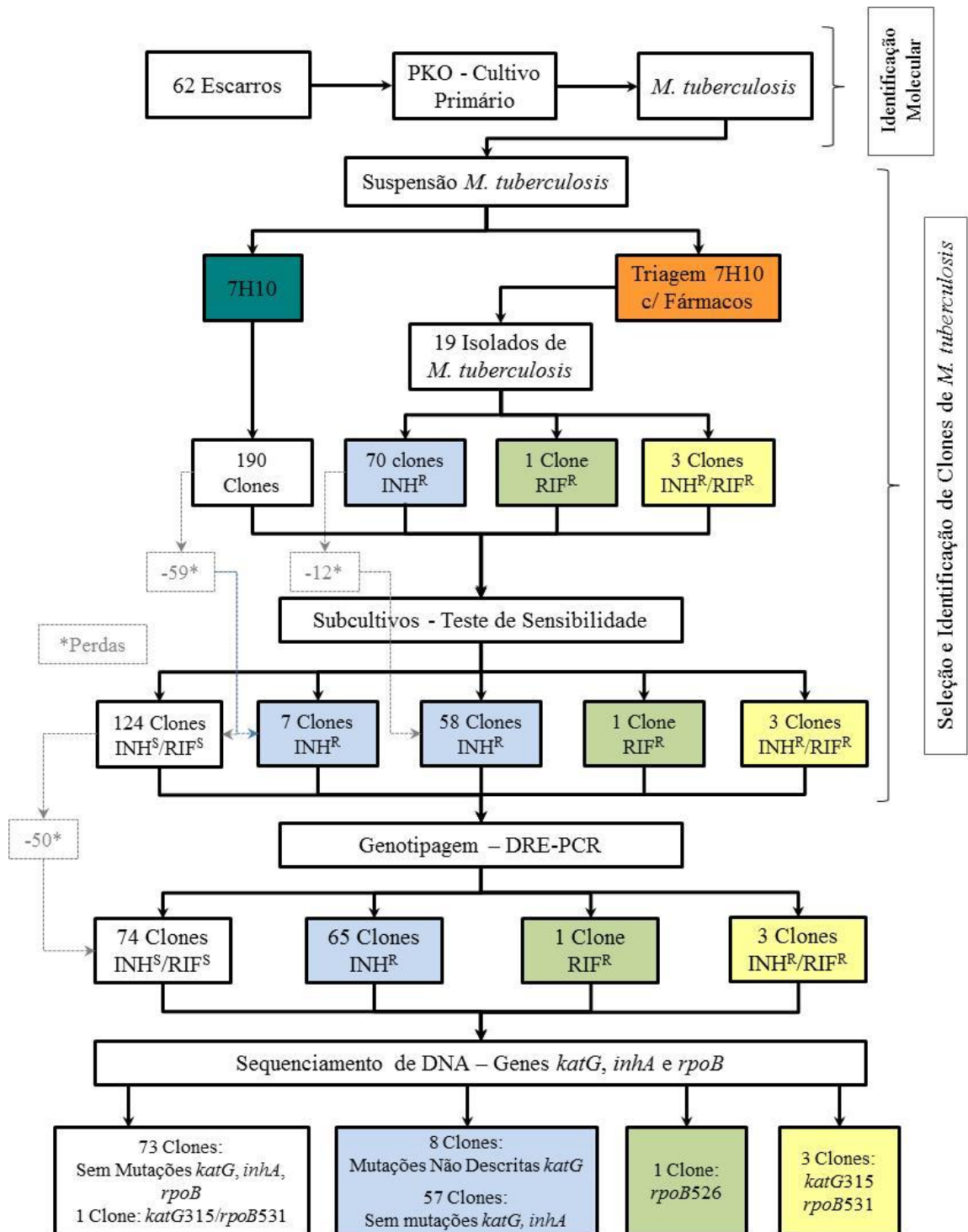


Figura 10. Fluxograma dos resultados gerais da seleção de clones de *M. tuberculosis*, genotipagem e sequenciamento de DNA.

Tabela 1 – Quantitativo de clones de *M. tuberculosis* resistentes a INH e/ou RIF em isolados de pacientes com TB pulmonar.

Nº Ordem	Nº Registro	Nº de Clones de <i>M. tuberculosis</i> Resistentes a			Proporção de Clones Resistentes/Sensíveis
		INH	RIF	INH + RIF	
1	083/10	1	0	0	< 1%
2	084/10	0	1	0	< 1%
3	085/10	3	0	0	< 1%
4	099/10	0	0	3	< 1%
5	101/10	3	0	0	< 1%
6	103/10	5	0	0	< 1%
7	105/10	2	0	0	< 1%
8	110/10	2	0	0	< 1%
9	119/10	2	0	0	< 1%
10	168/10	3	0	0	< 1%
11	189/10	2	0	0	< 1%
12	190/10	1	0	0	< 1%
13	046/11	6	0	0	< 1%
14	069/11	8	0	0	< 1%
15	088/11	10	0	0	> 1%
16	099/11	3	0	0	< 1%
17	100/11	10	0	0	> 1%
18	103/11	7	0	0	< 1%
19	107/11	2	0	0	< 1%

Da mesma forma como os cultivos primários foram identificados, todos os clones isolados e subcultivados individualmente também tiveram a identificação de *M. tuberculosis* confirmada por PCR (Figura 11), com a amplificação de um fragmento de DNA de 245 pares de base (pb).

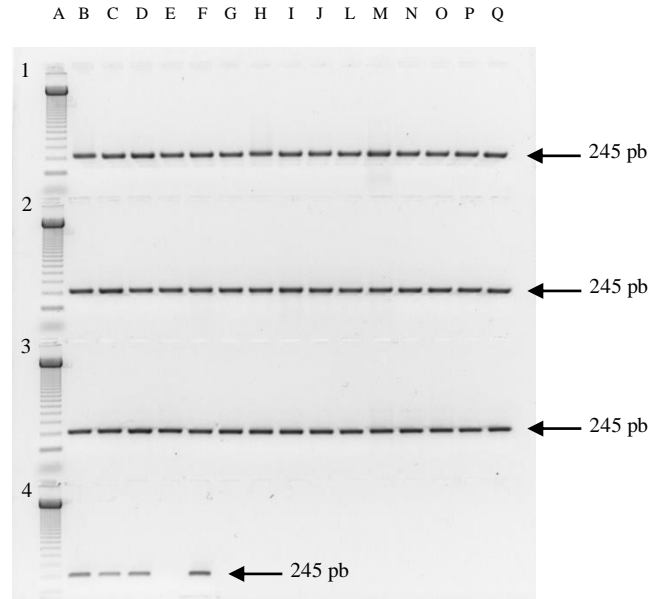


Figura 11. Identificação de *M. tuberculosis* por PCR. Eletroforese em Gel de em agarose a 1,5% corado com SYBR Green®. Linha A = Ladder 123 pb; Pentas 1 a 3, linhas B a Q = clones de *M. tuberculosis*; Pente 4, linhas B a D = clones de *M. tuberculosis*, linha E = controle negativo, linha F = controle positivo *M. tuberculosis* H37Rv.

### 5.3 Caracterização da TB Policlonal pelo Fenótipo de Resistência à INH e/ou RIF

A presença simultânea de clones de *M. tuberculosis*, fenotipicamente sensíveis e resistentes à INH e/ou RIF em um mesmo isolado de paciente, foi detectada em 30,6% dos pacientes. Este resultado evidencia a condição de infecção policlonal neste grupo de indivíduos.

Conforme exposto na Tabela 1, dos 19 isolados que apresentaram clones resistentes, a presença de clone RIF<sup>R</sup> foi observada em um (5,25%) isolado (Reg 084/10). Três clones multirresistente à INH<sup>R</sup> e RIF<sup>R</sup> também foram encontrados em um isolado (Reg 099/10). Foi constatado que pelo menos um clone INH<sup>R</sup> foi detectado em 17 (89,5%) isolados. Neste grupo, a proporção de clones resistentes em relação aos sensíveis (>10/644) foi maior que 1% em dois (10,5%) isolados que seriam considerados resistentes à INH, se comparado ao método padrão das proporções.

Relatos de casos de infecção policlonal com isolados de *M. tuberculosis* sensíveis e

resistentes provenientes do mesmo paciente, foram descritos por Theisin et al. (1995), Braden et al. (2001) e Mendez et al. (2009). Isolados de *M. tuberculosis* sensíveis aos fármacos foram isolados antes do início do tratamento, enquanto que os resistentes foram isolados durante o tratamento, a partir de várias amostras de escarro.

Em nosso estudo, a triagem de clones em meio 7H10 com fármacos permitiu visualizar a extensão do fenômeno de infecção policlonal em pacientes considerados de menor probabilidade, ou seja, em casos novos de TB, antes do início do tratamento específico e, a partir de apenas uma amostra de escarro.

Se a seleção de clones fosse executada somente em meio 7H10 original, a presença de clones resistentes seria detectada em apenas três (4,8%) isolados, ou seja, seria seis vezes inferior. Esse resultado exemplificaria o relato de Theisen et al. (1995) que devido à dificuldade de se identificar, bacteriologicamente, mais de um clone de *M. tuberculosis* em uma mesma amostra clínica, a prevalência de infecções policlonais seria subestimada.

Até o presente momento a suspeita de infecção policlonal surge em decorrência das divergências do teste de susceptibilidade aos fármacos a partir de várias amostras de escarro coletados durante o tratamento para TB (BRADEN et al., 2001). Os procedimentos utilizados no presente estudo não eliminaram totalmente as etapas laboriosas para a seleção individual de clones de *M. tuberculosis*, mas aumentaram a sensibilidade na detecção de clones resistentes presentes em menor número nos cultivos primários. Esta estratégia foi importante, pois diferenças na taxa de crescimento de distintas populações podem ser responsáveis pela composição clonal de uma amostra clínica (MARTIN et al., 2010). Isto foi observado em *M. tuberculosis* resistentes que, em consequência da aquisição de resistência a um fármaco teriam menor ritmo de crescimento em relação aos sensíveis (SERGEEV et al., 2011). Assim, pacientes podem ser portadores de clones resistentes e sensíveis, dos quais somente um deles pode ser detectado no teste de susceptibilidade aos fármacos (DICKMAN et al., 2010).

A presença de clones de *M. tuberculosis* resistentes em proporção menor que 1% é algo

que pode ser observado nos resultados de testes de susceptibilidade aos fármacos em laboratórios de micobacteriologia. Pelo método padrão das proporções, estes isolados seriam considerados sensíveis aos respectivos fármacos para efeito de tratamento. Entretanto, pode provocar questionamentos. Entre eles - O que explicaria a presença de clones de *M. tuberculosis* resistentes em pacientes sem antecedente de TB, recém-diagnosticados e antes do início do tratamento?

De acordo com Ford et al. (2012) a heterogeneidade de *M. tuberculosis* em pacientes pode surgir em decorrência da: a) infecção simultânea com bacilos originários de várias fontes; b) reinfecção com uma nova estirpe de *M. tuberculosis*, sendo o paciente portador de uma TB ainda não curada; c) evolução de parte da população de *M. tuberculosis* durante o curso da infecção.

A infecção simultânea e a reinfecção podem ocorrer devido a uma transmissão de *M. tuberculosis* fármaco-resistente, o que foi relatado por Theisin et al. (1995) e Chaves et al. (1999), respectivamente. Os casos de evolução poderiam estar de acordo com o que se conhece sobre as mutações espontâneas associadas à replicação do DNA do *M. tuberculosis* (SILVA; PALOMINO, 2011). Outra hipótese está fundamentada na pressão da resposta imunológica do indivíduo sobre o bacilo. De acordo com Ford et al. (2011) e Gupta et al. (2012) as mutações ocorrem pelo dano oxidativo sobre o DNA do *M. tuberculosis*, isto é, no interior do macrófago os bacilos sofrem ação contínua de radicais livres, os quais têm efeito danoso direto sobre o DNA bacteriano. Além disso, Ford et al. (2011) acrescentam que *M. tuberculosis* possui maior capacidade de adquirir resistência aos fármacos durante o período de latência. Estes pesquisadores, utilizando modelos símios (macacos cynomolgus, *Macaca fascicularis*), constataram que a população de *M. tuberculosis* em macacos com infecção clinicamente latente adquiriam mutações no mesmo ritmo de bacilos *in vitro*. A explicação para esse fato é que haveria um equilíbrio entre bacilos ativamente em replicação e outros eliminados pelo sistema

imune, durante todo o período de latência.

No entanto, Comas et al. (2010) investigaram as regiões do genoma de *M. tuberculosis* que codificam para os epítomos antigênicos, reconhecidos pelas células T, e estas regiões permanecem altamente conservadas. Diante desses achados, houve a especulação de que a resposta imune por células T possa favorecer mais o bacilo que o hospedeiro. Em outras palavras, é melhor para o bacilo da TB ser reconhecido pelo sistema imune adaptativo, que contribuirá para o processo de destruição celular, com formação de cavidades no tecido pulmonar, os quais aumentará a transmissão do bacilo. Contudo, este processo não exclui a possibilidade que variações antigênicas aconteçam (BANU et al., 2002), devido as alterações em outras regiões do genoma de *M. tuberculosis*, ocasionadas principalmente a partir da resposta pelas células da imunidade inata, sendo inclusive auxiliadas pela ação das células T da imunidade adaptativa.

Na Tabela 2 está apresentada a distribuição de casos de infecção policlonal em relação aos casos de TB multibacilares ou paucibacilares.

Tabela 2 – Distribuição de casos de infecção policlonal em relação à carga bacilar dos pacientes de TB pulmonar.

Infecção Policlonal	Pacientes		Total (%)
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	
Presente	9 (29,0)	10 (32,2)	19 (30,6)
Ausente	22 (71,0)	21 (67,8)	43 (69,4)
Total	31 (100,0)	31 (100,0)	62 (100,0)

Não foi observada associação entre TB policlonal e a carga bacilar dos pacientes incluídos no estudo ( $\chi^2 = 0,01$ ;  $p = 1,0$ ). Este achado contraria a hipótese de Warren et al. (2004) de que a frequência de infecção policlonal poderia ser muito diferente em pacientes com baciloscopia negativa. Por outro lado os resultados obtidos permitem afirmar que a presença de infecção tuberculosa policlonal não é um fenômeno raro em pacientes com TB pulmonar



residentes em Manaus - AM.

Assim como em outras regiões de alta incidência de TB pulmonar, os relatos de casos de TB policlonal têm sido mais frequentes, principalmente, pela difusão ou aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular. Desta forma, uma técnica de genotipagem também foi utilizada para a caracterização da TB policlonal e ratificação da heterogeneidade de *M. tuberculosis* observada nos diferentes fenótipos de susceptibilidade aos fármacos.

#### 5.4 Caracterização da TB Policlonal pela Técnica Molecular de DRE-PCR

A caracterização molecular da infecção policlonal foi realizada em 65 clones de *M. tuberculosis* resistentes à INH, 1 resistente à RIF, 3 resistentes à INH e RIF e 74 clones sensíveis à INH e RIF. Não foi possível apresentar a genotipagem de 50 clones de *M. tuberculosis* sensíveis devido à inibição do ensaio de DRE-PCR. Entretanto, pelo menos um clone de *M. tuberculosis* sensível aos fármacos foi comparado ao clone resistente proveniente do mesmo paciente.

A genotipagem dos clones de *M. tuberculosis* oriundos dos 19 isolados que apresentaram resistência está ilustrada na Figura 12. A heterogeneidade genética entre os clones de um mesmo isolado foi observada entre os 19 (30,6%), confirmando o resultado obtido com o isolamento de clones fenotipicamente resistentes e sensíveis coexistentes em um mesmo isolado. A menor similaridade (25%) entre os clones de *M. tuberculosis* foi observado para o isolado Reg 088/11 (Figura 12P).

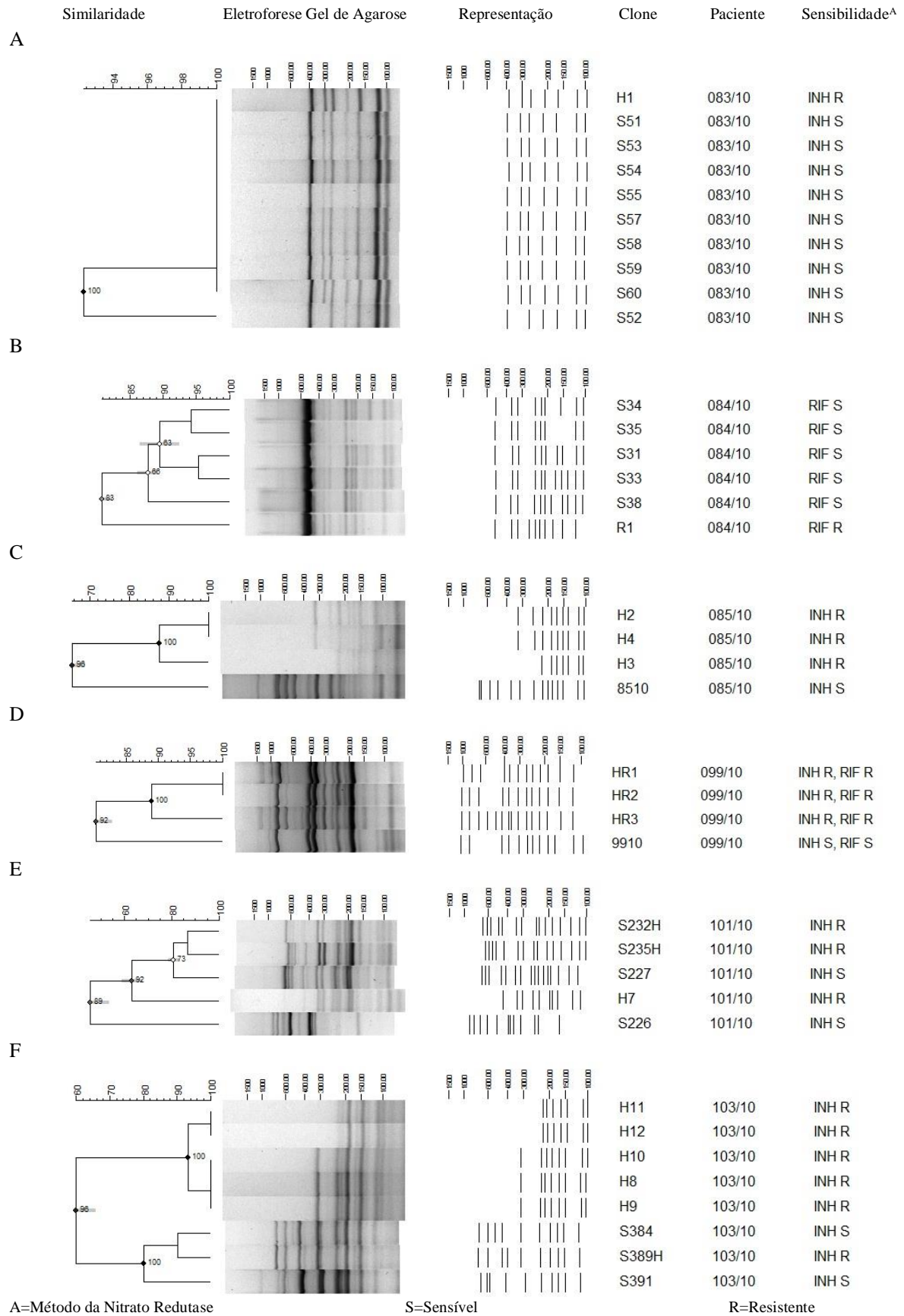
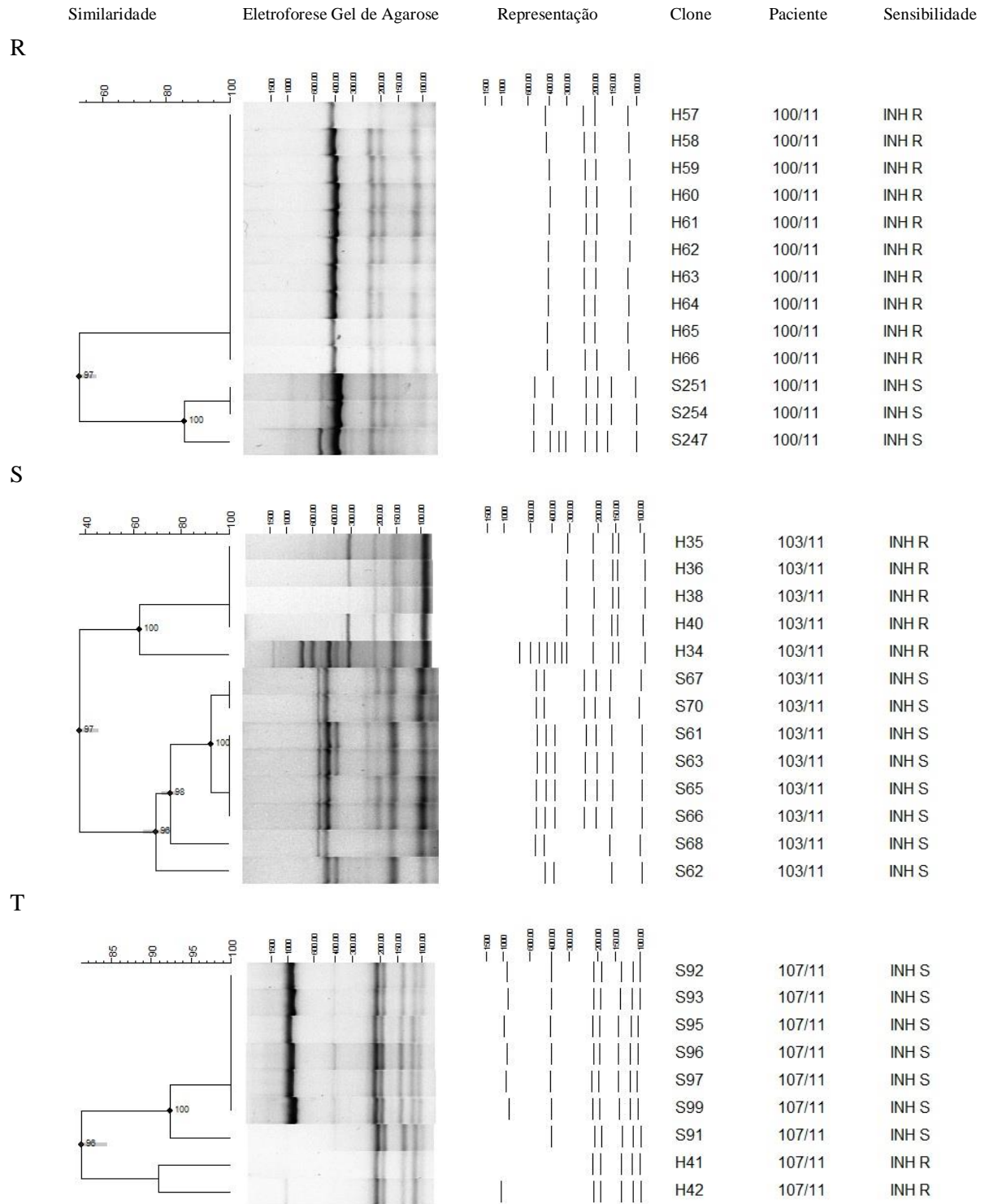


Figura 12. Dendrogramas com os genótipos de clones de *M. tuberculosis* por DRE-PCR. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com SYBR Green<sup>®</sup>. A a T = Grupo de clones dos 19 pacientes com TB pulmonar. Análise em GelCompar II, Versão 6.5, Coeficiente de Similaridade Dice, Tolerância 1%, Análise de Cluster UPGMA.

	Similaridade	Eletroforese Gel de Agarose	Representação	Clone	Paciente	Sensibilidade
G				S365	105/10	INH S
				S367	105/10	INH S
				H13	105/10	INH R
				H14	105/10	INH R
				S364	105/10	INH S
H				H15	110/10	INH R
				H16	110/10	INH R
				S405	110/10	INH S
				S408	110/10	INH S
				S403	110/10	INH S
I				S439	119/10	INH S
				S441H	119/10	INH R
				S442H	119/10	INH R
				S437H	119/10	INH R
				S438H	119/10	INH R
				H18	119/10	INH R
J				S454	168/10	INH S
				S457	168/10	INH S
				S458	168/10	INH S
				H20	168/10	INH R
				H21	168/10	INH R
L				S83	189/10	INH S
				S84	189/10	INH S
				H22	189/10	INH R
				S81	189/10	INH S
				H23	189/10	INH R
				S86	189/10	INH S
				S87	189/10	INH S
M				S166	190/10	INH S
				S167	190/10	INH S
				S169	190/10	INH S
				S170	190/10	INH S
				S174	190/10	INH S
				H24	190/10	INH R

	Similaridade	Eletofórese Gel de Agarose	Representação	Clone	Paciente	Sensibilidade
N				H28	046/11	INH R
				H29	046/11	INH R
				H27	046/11	INH R
				H30	046/11	INH R
				S515	046/11	INH S
				S518	046/11	INH S
				S513	046/11	INH S
				H26	046/11	INH R
O				H45	069/11	INH R
				H46	069/11	INH R
				H49	069/11	INH R
				H43	069/11	INH R
				H47	069/11	INH R
				S494	069/11	INH S
				S495	069/11	INH S
				H48	069/11	INH R
				S499	069/11	INH S
				H44	069/11	INH R
P				H72	088/11	INH R
				H74	088/11	INH R
				H71	088/11	INH R
				H76	088/11	INH R
				H69	088/11	INH R
				S209	088/11	INH S
				S210	088/11	INH S
				S213	088/11	INH S
				H70	088/11	INH R
Q				S1	099/11	INH S
				S3	099/11	INH S
				S4	099/11	INH S
				S5	099/11	INH S
				H33	099/11	INH R
				S2	099/11	INH S
				H32	099/11	INH R
				H31	099/11	INH R
				S10	099/11	INH S
				S9	099/11	INH S



Os resultados demonstrados nas Figuras 12 e 12P foram superiores aos estudos descritos na literatura, visto que os mesmos apresentaram percentuais para a detecção de infecção policlonal de 0,4% (DAS et al., 2004) na Índia, 4,8% no Vietnã do Sul (HUYEN et al., 2012) e 19,0% na África do Sul (WARREN et al., 2004). Segundo Dickman et al. (2010) os diversos percentuais de infecção policlonal relatados podem ser o reflexo do poder discriminatório das técnicas utilizadas para a detecção de múltiplos clones de *M. tuberculosis*. Da mesma forma, a população estudada e o método de amostragem para coleta de escarro podem influenciar na estimativa da infecção policlonal (FANG et al., 2008). Provavelmente, o diferencial no presente estudo tenha sido aliar a seleção fenotípica de clones resistentes de *M. tuberculosis* a uma técnica de genotipagem baseada em PCR. Caso contrário seria detectado 4,8% de infecção policlonal, como comentado anteriormente.

Diante da diversidade genética de *M. tuberculosis* foi possível observar que os clones isolados do escarro de um mesmo paciente apresentavam pelo menos dois genótipos distintos. Entretanto, o genótipo do clone não está exclusivamente associado ao fenótipo apresentado no teste de susceptibilidade, o que também foi observado por Vrioni et al. (2004) e Varela et al. (2005). Um exemplo é o clone H1 (Reg 083/10, Figura 12A), resistente à INH, que apresentou o mesmo genótipo que os clones sensíveis, com exceção ao clone S52. Este clone tinha um genótipo diferenciado com ausência de um fragmento de DNA e era fenotipicamente sensível à INH. Essa situação sugere que a distinção dos genótipos não está relacionada com a diferença da susceptibilidade aos fármacos entre os clones, mas pela transposição da sequência de inserção IS6110 (VRIONI et al. 2004).

É possível que a alta frequência de infecção policlonal detectada neste estudo esteja vinculada a reinfecção ou superinfecção, pois se especula que o curso da infecção tuberculosa possa alterar a resposta imune, aumentando a susceptibilidade à reinfecção. Alternativamente, a ocorrência de reinfecção após algum tempo da infecção primária pode iniciar a progressão ou

reativação da infecção primária (WARREN et al., 2004). Para os autores, uma observação importante é que a infecção inicial é incapaz de proporcionar uma proteção contra infecção subsequente. E isto é particularmente importante para a compreensão da imunidade, no desenvolvimento de novas vacinas e fármacos.

De fato, a resposta imunológica pode estar intimamente relacionada ao surgimento da infecção policlonal, conforme já discutido anteriormente mediante os estudos de Ford et al. (2011) e Gupta et al. (2012).

Por outro lado, não está descartada de que a infecção policlonal detectada entre os pacientes sem antecedente de TB possa ter ocorrido a partir de múltiplas fontes de infecção. Esse fato tem por base que a cidade de Manaus apresenta um alto coeficiente de incidência da doença (90,6/100.000 hab.), taxa de cura de bacilíferos de 73,4% e 9,7% de abandono de tratamento (BRASIL, 2012). Características ainda somadas à superlotação do transporte público urbano e clima tropical que favorece a aglomeração pública em locais de ambientes fechados e climatizados que, conseqüentemente, beneficiam a transmissibilidade de *M. tuberculosis*.

Vale salientar que não se pode ignorar a possibilidade da presença de infecção policlonal entre os 43 isolados (69,4%) de *M. tuberculosis* que não tiveram isolamento de clones resistentes. Essa premissa tem por base os clones de *M. tuberculosis* sensíveis detectados em um mesmo isolado (do grupo de 19 isolados) que apresentaram diferentes genótipos, sugerindo que a presença de infecção policlonal possa ser maior do que o que foi detectado até então.

Embora não seja possível comparar os genótipos obtidos no presente estudo com os já publicados (pelas diferentes técnicas de genotipagem) pode-se teorizar que em Manaus – AM há uma grande diversidade genética de *M. tuberculosis* circulantes. Situação semelhante foi encontrada por Stavrum et al. (2009) que detectou uma grande variedade de padrões de

Spoligotypes na África do Sul. Outro estudo realizado que vem corroborar a diversidade genética dos clones de *M. tuberculosis* detectados em Manaus – AM é o de Gomes et al. (2012). Estes autores realizaram a genotipagem por *Spoligotyping* de 1911 isolados de *M. tuberculosis* originários de 11 Estados do Brasil, sendo 37 (1,86%) do Amazonas, predominantemente de Manaus – AM. Destes, 8 (21,6%) foram considerados órfãos, ou seja, com padrões de *Spoligotypes* registrados uma única vez. Dois desses isolados eram relacionados à família LAM, enquanto que 6 apresentaram padrões desconhecidos, não atribuídos a qualquer linhagem/sublinhagem descritas no banco de dados internacional.

Os resultados da presente pesquisa evidenciam que a infecção policlonal está presente em aproximadamente 1/3 dos pacientes de TB recém-diagnosticados, seja pelas características fenotípica ou genotípica dos clones de *M. tuberculosis*, embora estas não estejam estritamente relacionadas.

Com o intuito de associar o fenótipo de susceptibilidade aos fármacos às mutações genéticas comumente conhecidas para *M. tuberculosis*, foram realizados os ensaios de sequenciamento de DNA para os clones obtidos neste estudo.

### **5.5 Mutações genéticas em clones de *M. tuberculosis* isolados em infecção policlonal.**

O sequenciamento parcial dos genes *katG*, *rpoB* e da região promotora do gene *inhA* foi realizado em 143 clones de *M. tuberculosis*. Estes clones estavam distribuídos entre: 65 clones de *M. tuberculosis* resistentes à INH, 1 resistente à RIF, 3 resistentes à INH e RIF e 74 clones sensíveis à INH e RIF. Também foram incluídos dois isolados de *M. tuberculosis* MDR, gentilmente cedidos pela pesquisadora Maria Alice Telles, do Instituto Adolf Lutz, São Paulo – SP. Estes isolados IAL216 e IAL354 foram identificados anteriormente como mutantes duplos para as sequências dos genes *katG* e *rpoB* por MAS-PCR (OGUSKU et al., 2009) e



serviram como controle positivo de mutação nos ensaios de sequenciamento de DNA. A cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv foi utilizada como controle negativo.

As mutações encontradas nos clones de *M. tuberculosis* resistentes estão na Figura 13 e descritas na Tabela 3.

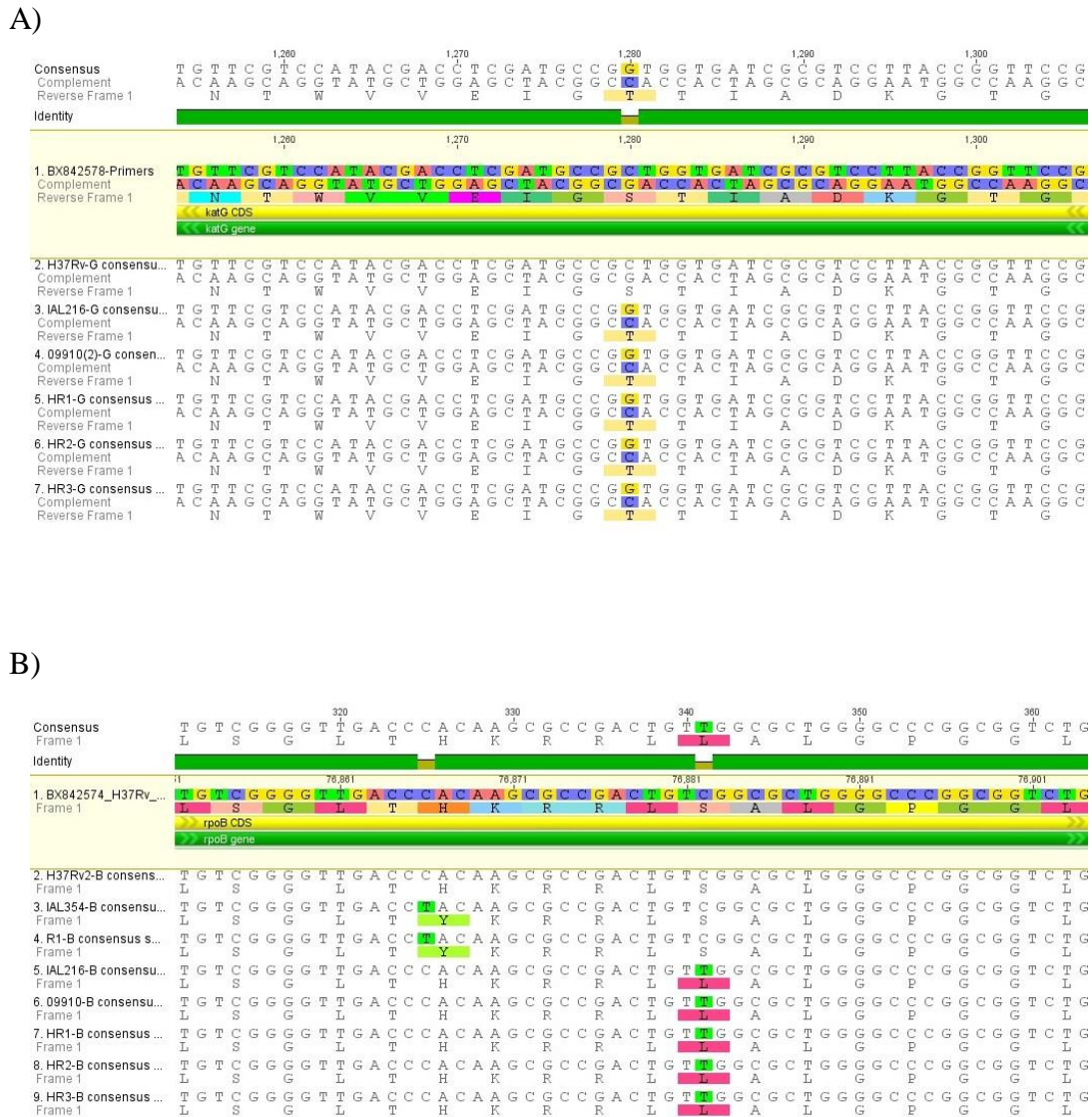


Figura 13. Mutações detectadas em clones de *M. tuberculosis*. A=sequência referente ao códon 315 do gene *katG* (clones 09910, HR1, HR2 e HR3, paciente 099/10). B=sequência referente aos códons 526 (clone R1, paciente 084/10) e 531 (clones 09910, HR1, HR2 e HR3, paciente 099/10) do gene *rpoB*. Software Geneious Pro, versão 5.6.3

Tabela 3 – Mutações detectadas em clones de *M. tuberculosis* resistentes.

Fármaco	Gene	Mutação	Modificação	Clones	Isolado	Frequência Relativa <sup>A</sup> (%)
INH	<i>katG</i>	AGC315ACC	Serina→Treonina	HR1, HR2, HR3	099/10	4,4
RIF	<i>rpoB</i>	CAC526TAC	Histidina→Tirosina	R1	084/10	25,0
		TCG531TTG	Serina→Leucina	HR1, HR2, HR3	099/10	75,0

A=comparado ao total de clones de *M. tuberculosis* resistentes ao respectivo fármaco

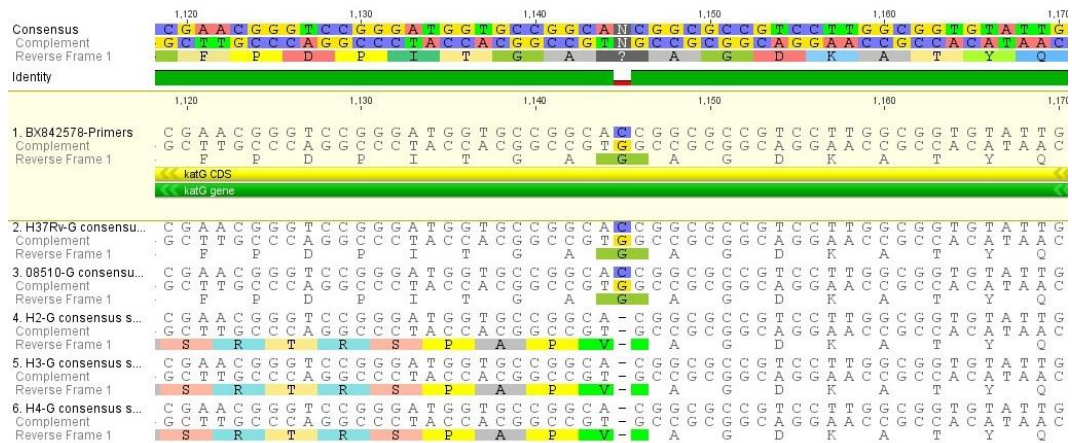
De acordo com a Tabela 3, estes resultados evidenciam que os clones resistentes apresentaram as mutações mais frequentemente descritas na literatura em de acordo com os estudos de Cardoso et al. (2004), Alves et al. (2011), Campbell et al. (2011) e Perizzolo et al. (2012). Em relação ao gene *inhA* não foi detectada nenhuma mutação associada com a resistência para INH.

Pode ser também observado na Figura 13, que mutações nos genes *katG* (*katG315*) e *rpoB* (*rpoB531*) foram detectados para o clone 09910, sensível para INH e RIF. Neste caso especificamente, apesar da dupla mutação, estas podem estar relacionadas com baixo nível de resistência aos fármacos, conforme anteriormente disposto por Campbell et al. (2011). Entretanto, uma maior investigação deverá ser realizada para confirmação deste fato.

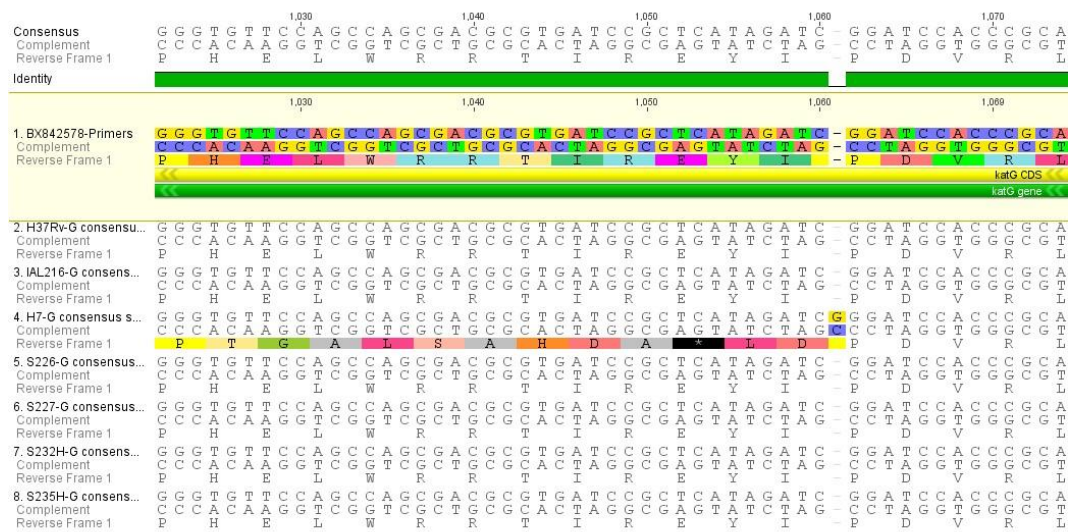
É importante destacar que não foi observada associação de uma determinada mutação com o genótipo do clone por DRE-PCR. Por exemplo, os clones HR1 e HR3 apresentaram a mesma mutação associada à INH e RIF, *katG315* e *rpoB531*, respectivamente. Porém, estes clones não eram 100% similares. A mesma situação foi observada por Vrioni et al. (2004).

Mutações ainda não descritas no gene *katG* (Figura 14) foram detectadas em clones de *M. tuberculosis* e estão apresentadas na Tabela 4.

A



B



C

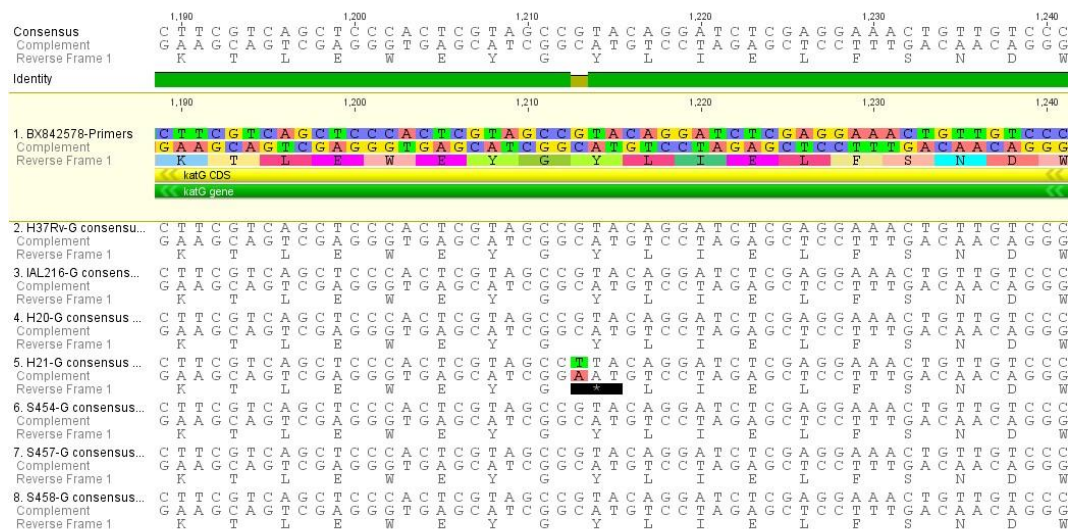
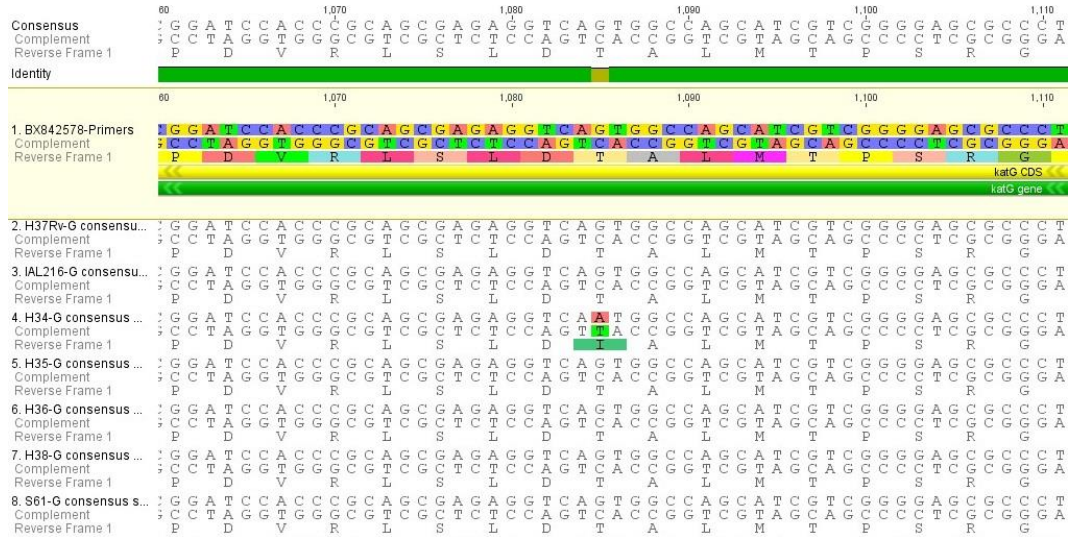


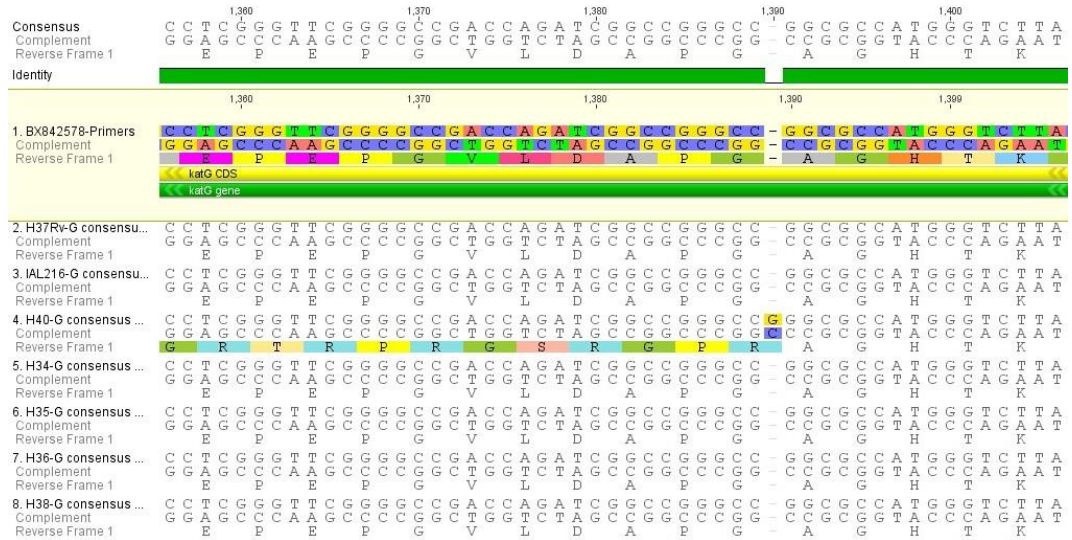
Figura 14. Mutações ainda não descritas no gene *katG* em clones de *M. tuberculosis*. A=Paciente 085/10; B=101/10; C=168/10; D=103/11; E=103/11; F=107/11. Software Geneious Pro, versão 5.6.3



D



E



F

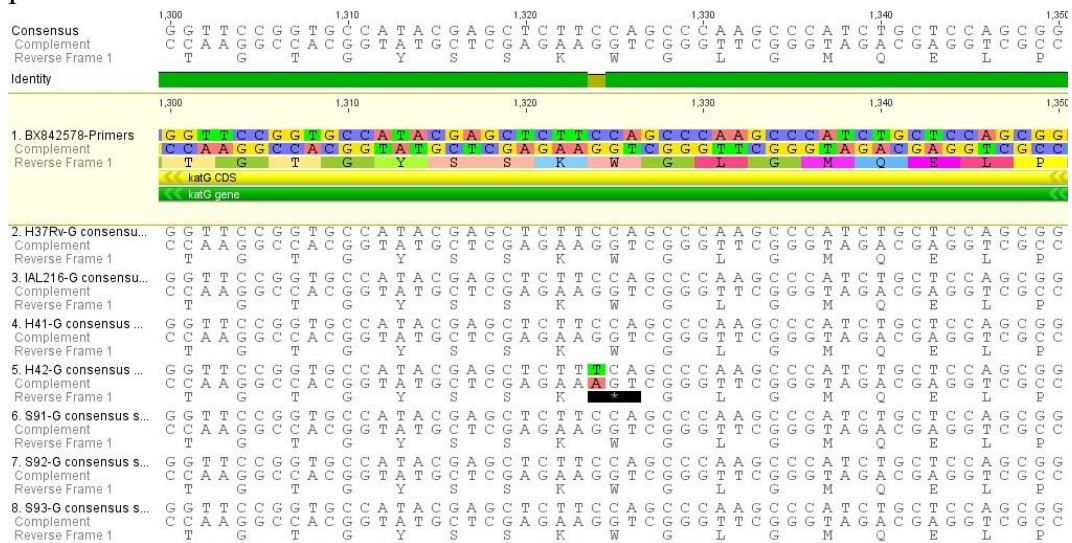


Tabela 4 – Novas mutações detectadas em clones de *M. tuberculosis* resistentes.

Fármaco	Gene	Mutação	Modificação	Clones	Isolado	Frequência Relativa <sup>A</sup> (%)
INH	<i>katG</i>	Deleção G, posição 1145	Sequência de a.a. alterada	H2, H3, H4	085/10	4,4
		Inserção C, posição 1061	Sequência de a.a. alterada	H7	101/10	1,4
		TAC337TAA	Tirosina→parada	H21	168/10	1,4
		ACT380ATT	Treonina→Isoleucina	H34	103/11	1,4
		Inserção C, posição 1390	Sequência de a.a. alterada	H40	103/11	1,4
		TGG300TGA	Triptofano→parada	H42	107/11	1,4

<sup>A</sup>=comparado ao total de clones de *M. tuberculosis* resistentes ao respectivo fármaco; a.a.=aminoácidos

É importante salientar que dos clones de *M. tuberculosis* resistentes à INH: 1) 83,8% (57/68) não apresentavam mutações nas sequências pesquisadas dos genes *katG* e *inhA*; 2) 11,7% (8/68) apresentaram mutações ainda não descritas.

Estes resultados explicitam a necessidade de sequenciar fragmentos maiores desses genes ou ampliar a busca de mutações em outros genes como *kasA* (MDLULI et al., 1998), *ndh* (LEE et al., 1999), *ahpC* (KIPIELA et al., 2000). Assim como sugerem que estes clones são passíveis de uma investigação mais detalhada em novos mecanismos de resistência à INH (CARDOSO et al., 2004). Além disso, indica que técnicas que visam detectar por PCR mutações específicas comumente relatadas, como MAS-PCR (MOUKROUSOV et al., 2003; YANG et al., 2005; OGUSKU et al., 2009), poderiam apresentar resultados de falsa-susceptibilidade se fossem aplicadas em isolados de *M. tuberculosis* isolados em Manaus – AM.

Dessa forma, é necessário que o máximo de isolados seja sequenciado para que, posteriormente, sejam propostas técnicas mais acessíveis que o sequenciamento de DNA para determinação rápida da sensibilidade aos fármacos em *M. tuberculosis* em nossa região.

## 6. CONCLUSÕES

- 6.1 A estratégia de triagem de clones pela resistência aos fármacos proporcionou o isolamento de clones resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* em número seis vezes superior ao isolamento aleatório. Este procedimento poderá servir de modelo para futuros estudos de caracterização de casos de reativação ou reinfeção a partir de uma série de escarros coletados de pacientes com TB pulmonar durante o tratamento.
- 6.2 A presença de clones fenotipicamente sensíveis e resistentes em 30,6% dos pacientes com TB pulmonar ativa, antes do início de tratamento e a partir de uma amostra de escarro, caracteriza a infecção policlonal como um fenômeno não raro em uma cidade de alta endemicidade como Manaus – AM. Isto chama a atenção para a necessidade de realização de testes de susceptibilidade aos fármacos periodicamente para o máximo possível de pacientes com TB, seja caso novo ou retratamento.
- 6.3 A técnica de DRE-PCR possui poder discriminatório suficiente para genotipar os clones de *M. tuberculosis* de um mesmo paciente. Entretanto, os genótipos de clones de um mesmo paciente não estão relacionados exclusivamente ao fenótipo de sensibilidade aos fármacos INH e RIF.
- 6.4 A frequência de infecção policlonal em pacientes de Manaus – AM sugere que há uma alta taxa de transmissão e/ou reinfeção, ressaltando que a atenção deva ser redobrada para os exames mensais de controle (baciloscopia ou cultivo/teste de susceptibilidade) de tratamento da TB.
- 6.5 A infecção policlonal pode ser um dos fatores para que o nível de cura da TB em Manaus – AM não seja alcançado a contento.

6.6 A ausência das mutações comumente associadas à resistência medicamentosa nos genes *katG* e *inhA* e a detecção de novas mutações em clones de *M. tuberculosis* resistentes, explicitam a necessidade de sequenciar fragmentos maiores desses genes ou ampliar a busca de mutações em outros genes ou investigar novos mecanismos de resistência à INH, a fim de que sejam propostas estratégias mais rápidas para a detecção de resistência em *M. tuberculosis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.L.A.; METZKER, F.S.; ARAÚJO-FILHO, J.A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; KIPNIS, A. Clinical data and molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from drug-resistant tuberculosis patients in Goiás, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, p. 655-61, 2011.
- ATS, AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic standards and classification of Tuberculosis in adults and children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 161, p. 1376-95, 2000.
- BANU, S.; HONORÉ, N.; SAINT-JOANIS, B.; PHILPOTT, D.; PRÉVOST, M.C.; COLE S.T.; COMAS, I.; GAGNEUX, S. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Molecular Microbiology*, v. 44, p. 9-19, 2002.
- BAPTISTA, I.M.F.; OELEMANN, M.C.; OPROMOLLA, D.V.A.; SUFFYS, P.N. Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 1147-52, 2002.
- BARNES, D.S. Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. *Microbes and Infection*, v. 2, 431-40, 2000.
- BEHR, M.A. Polyclonal Tuberculosis and the emergence of drug resistance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 172, p. 521-2, 2005.
- BRADEN, C.R.; MORLOCH, G.P.; WOODLEY, C.L.; JOHNSON, K.R.; COLOMBEI, A.C.; CAVE, M.D.; YANG, Z.; VALWAY, S.; ONORATO, I.M.; CRAWFORD, J.T. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, p. 42-7, 2001.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008, 434p.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe eletrônico da Tuberculose. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, v. 2, p.1-3, 2009a.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Resistência da bactéria causadora da Tuberculose no país é de apenas 1,4%**. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=30985](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=30985). Acesso em 9 mar. 2009b.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Os casos de retratamento de Tuberculose no Brasil. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, v. 11, p. 1-8, 2010a.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Agravos



de Notificação. **Série Histórica da Taxa de Incidência de Tuberculose**. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1527](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527), atualizado em 03 set. 2010b.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Agravos de Notificação. **Série Histórica de recidivas, mortes e multidroga resistência da Tuberculose no Estado do Amazonas**. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1527](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527), atualizado em 03 set. 2010c.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional De Controle da Tuberculose. **Relatório de Visista de Monitoramento ao Município de Manaus**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012, 8p.

BUTCHER, P.D.; HUTCHINSON, N.A.; DORAN, T.J.; DALE, J.W. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. in: Mycobacterial disease - old problems, new solutions. (Suplement) *Journal of Applied Bacteriology*, V. 81, p. 53S-71S, 1996.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. *Bioestatística, Princípios e Aplicações*. São Paulo: Artmed Editora, 2003, 256p.

CAMPBELL, P.J.; MORLOCK, G.P.; SIKES, R.D.; DALTON, T.L.; METCHOCK, B.; STARKS, A.M.; HOOKS, D.P.; COWAN, L.S.; PLIKAYTIS, B.B.; POSEY, J.E. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 2032-41, 2011.

CAMPOS, H.S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência? *Boletim de Pneumologia Sanitária*, v. 7, p. 51-64, 1999.

CARDOSO, R.F.; COOKSEY, R.C.; MORLOCK, G.P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C.Q.F.; SATO, D.N.; SHIKAMA, M.L.; ELSA M. MAMIZUKA, E.M.; HIRATA, R.D.; HIRATA, M.H. Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 3373-81, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Tuberculosis – United States, first 39 weeks. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 34, p. 625-7, 1985.

CHAVES, F; DRONDA, F.; ALONSO-SANZ, M.; NORIEGA, A.R. Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. *AIDS*, v. 13, 615-20, 1999.

COLBORN, J.M.; KOITA, O.A.; CISSÉ, O.; BAGAYOKO, M.W.; GUTHRIE, E.J.; KROGSTAD, D.J. Identifying and quantifying genotypes in polyclonal infections due to single species. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, p. 475-82, 2006.

COMAS, I.; GAGNEUX, S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathogens*, 5(10): e1000600. 2009. (doi:10.1371/journal.ppat.1000600).

DALCOLMO, M.P.; ANDRADE, M.K.N.; PICON, P.D. Multiresistant Tuberculosis in Brazil: history and control. *Revista de Saúde Pública*, v. 41, p. 1-8, 2007.

DANIEL, T.M. The rapid diagnosis of Tuberculosis: a seletive review. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 116:277-282, 1990.

DAS, S.; NARAYANAN, S.; HARI, L.; MOHAN, N.S.; SOMASUNDARAN, S.; SELVAKUMAR, N.; NARAYANAN, P.R. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction fragment length polymorphism analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 8, p. 267-70, 2004.

DAVID, H.; BRUM, L.; PRIETO, E. **Manual de Micobacteriologia em Saúde Pública: Princípios e Métodos**. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, 1994, 89p.

DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D. **Epi Info™, Version 6.04d, a word processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers**. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1998.

DELA, A.; SAJDUDA, A.; PAWŁOWSKAB, I.; DZIADEK, J. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Lodz, Poland: Analysis by IS6110 restriction fragment length polymorphism and double-repetitive-element PCR. *Journal of Infection*, v. 52, p. 346-53, 2006.

DICKMAN, K.D.; NABYONGA, L., KATEETE, D.P.; KATABAZI, F.A.; ASIIMWE, B.B.; HARRIET K MAYANJA, H.K.; OKWERA, A.; WHALEN, C.; JOLOBA, M.L. Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. *BMC Infectious Diseases*, v. 10, p. 349-55, 2010.

DSMZ, Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellouturen. **Bacterial Nomenclature up-to-date (Aproved Lists, Validation Lists). September 2010**. Braunschweig, Germany, 2010. Disponível em: [http://www.dsmz.de/microorgaisms/main.php?contentleft\\_id=14](http://www.dsmz.de/microorgaisms/main.php?contentleft_id=14)>. Acesso em: 02 out. 2010.

DUTT, A. Epidemiology and host factors. In: SCHLOSSBERG, D. **Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections**. New York: McGraw-Hill, 2006, p. 1-17, cap. 1.

ESPINAL, M.A. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis*, v. 83, p. 44-51, 2003.

FANDINHO, F.C.O.; KRITSKI, A.L.; HOFER, C.; CONDE JR, H.; FERREIRA, R.M.C.; SILVA, M.G.; FONSECA, L.S. Drug resistance patterns among hospitalized tuberculous patients in Rio de Janeiro, Brazil, 1993-1994. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 543-7, 1999.

FANG, R.; LI, X.; LI, J.; WU, J. Mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients in Shanghai, China. *Tuberculosis*, v. 88, p. 469-73, 2008.

FORD, C.B.; LIN, P.L.; CHASE, M.R.; SHAH, R.R.; IARTCHOUK, O.; GALAGAN, J.;

MOHAIDEEN, N.; IOERGER, T.R.; SACCHETTINI, J.C.; LIPSITCH, M.; FLYNN, J.L.; FORTUNE, S.M. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nature Genetics*, v. 43, p. 482-86, 2011.

FORD, C.; YUSIM, K.; IOERGER, T.; FENG, S.; CHASE, M.; GREENE, M.; KORBER, B.; FORTUNE, S. *Mycobacterium tuberculosis* - Heterogeneity revealed through whole genome sequencing. *Tuberculosis*, v. 92, p. 194-201, 2012.

FRIEDMAN, C.R.; STOECKLE, M.Y.; WARREN, D.J.; RILEY, L.W. Double-Repetitive-Element PCR Method for Subtyping *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1383-1384, 1995.

GOMES, H.M.; ELIAS, A.R.; OELEMANN, M.A.C.; PEREIRA, M.A.S.; FANDINHO-MONTES, F.C.O.; MARSICO, A.G.; KRITSKI, A.L.; FILHO, L.A.; CALDAS, P.C.; POSSUELO, L.G.; CAFRUNE, P.; ROSSETTI, M.L.; LUCENA, N.; SAAD, M.H.F.; CAVALCANTI, H.R.; LEITE, C.Q.F.; BRITO, R.C.; LOPES, M.L.; LIMA, K.; SOUZA, M.; TRINDADE, R.C.; ZOZIO, T.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; SUFFYS, P.N. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, p. 649-56, 2012.

GUPTAA, A.; KAULA, A.; TSOLAKIB, A.G.; KISHOREB, U.; BHAKTAA, S. *Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*, v. 217, p. 363-74, 2012.

HERMANS, P.W.M.; VAN SOOLINGEN, D.; DALE, J.W.; SCHUITEMA, A.R.J.; 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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, 2051-8, 1990.

HUYEN, M.N.; KREMER, K.; LAN, N.T.; COBELENS, F.G.; BUU, T.N.; DUNG, N.H.; CAWS, M.; TIEMERSMA, E.W.; VAN SOOLINGEN, D. Mixed tuberculosis infections in rural South Vietnam. *Journal Clinical of Microbiology*, v. 50, p. 1586-92, 2012.

KHAN, A.E.; KIMERLING, M.E. Chemotherapy of Tuberculosis. In: SCHLOSSBERG, D. **Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections**. New York: McGraw-Hill, 2006, p. 77-90, cap. 6.

KENT, P.T.; KUBICA, G. P. **Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III Laboratory**. U.S. Department of Health Education and Welfare, C.D.C., Atlanta: Centers for Disease Control, 1985.

KIEPIELA, P.; BISHOP, K.S.; SMITH, A.N.; ROUX, L.; YORK, D.F. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *aphC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. *Tuberculosis Lung Disease*, v. 80, p. 47-56, 2000.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA M, G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. Brussels: European Commission International Co-operation (INCO) for Developing countries (DEV) concerted Action (CA), 2004, 165p.

LEE, A.S.; LIM, I.H.; TANG, L.L.; TELENTI, A.; WONG, S.Y. Contribution of *kasA* analysis to

detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 2087–89, 1999.

LIS, J.T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Research*, v. 2, p. 383-9, 1975.

LIS, J.T. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods in Enzymology*, v. 65, p. 347-53, 1980.

LAURENZO, D.; MOUSA, S.A. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Tropica*, v. 119, p. 5-10, 2011.

LOURENÇO, M.C.S.; SILVA, M.G.; FONSECA, L.S. Multidrug-resistant Tuberculosis among male inmates in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 17-19, 2000.

MALAGHINI, M.; BROCKELT, S.R.; BURGER, M.; KRITSKI, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the State of Parana in southern Brazil. *Tuberculosis*, v. 89, p. 101-5, 2009.

MARTÍN, A.; HERRANZ, M.; SERRANO, M.J.R.; BOUZA, E.; VIEDMA, D.G. The clonal composition of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens could be modified by culture. *Tuberculosis*, v. 90, p. 201-7, 2010.

MARTINS, E.S.J. **Avaliação de modificações no método de redução de nitrato visando a detecção de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes.** Manaus: UFAM, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Amazonas, 2010.

MATSUMOTO, T.; ANO, H.; NAGAI, T.; DANNO, K.; TAKASHIMA, T.; TSUYUGUCHI, I. IS6110 DNA fingerprinting analysis of individually separated colonies of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, v. 85, p. 207-12, 2005.

MDLULI, K.; SLAYDEN, R.A.; ZHU, Y.; RAMASWAMY, S.; PAN, X.; MEAD, D.; CRANE, D.D.; MUSSER, J.M.; BARRY, C.E. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science*, v. 280, p. 1607–10, 1998.

MENDEZ, M.P.; LANDON, M.E.; MCCLLOUD, M.K.; DAVIDSON, P.; CHRISTENSEN, P.J. Co-infection with pansensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, p. 578-580, 2009.

MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L.; ROITT, I.M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica.** Trad. Maria Terezinha Carneiro Leão Leme, Flávio Queiróz Telles, Nei Ferreira de Camargo Neto, Ida Cristina Gubert. São Paulo: Editora Manole Ltda., 1995, p. 14-17, cap. 22.

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 Method. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:3099–3102, 1998.

MOKROUSOV, I.; OTTEN, T.; VYAZOVAYA, A.; LIMESCHENKO, E.; FILIPENKO, M.L.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; STEKLOVA, L.; VYSHNEVSKIY, B.; NARVSKAYA, O. PCR-

Based Methodology for Detecting Multidrug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family Circulating in Russia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 22, p. 342-48, 2003.

MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G.S.; THOMPSON, JR., J.H. **Microbiologia Médica**. Trad. Cláudia Lúcia Caetano de Araújo. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1992, p. 513p.

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S.; SCHLAAK, M.; GREINERT, U. Double infection with a resistant and a multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 6, p. 548-51, 2000.

OGUSKU, M.M.; SALEM, J.I. Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando ao diagnóstico da Tuberculose no Estado do Amazonas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 30, p. 433-9, 2004.

OGUSKU, M.M.; OKAMURA, L.H.; MARTINS, E.S.J.; SADAHIRO, A.; SALEM, J.I. PCR-Multiplex Alelo Específico (PCR-MAS) para a determinação rápida da sensibilidade aos antibióticos isoniazida e rifampicina em *Mycobacterium tuberculosis* isolados no Amazonas. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE. *Microbiologia in Foco*. v. único, p. 93-93, 2009.

PABLOS-MÉNDEZ, A.; RAVIGLIONE, M.C.; LASZLO, A.; BINKIN, N.; RIEDER, H.L.; BUSTREO, F.; COHN, D.L.; LAMBREGTS-van WEEZENBEEK, C.S.B.; KIM, S.J.; CHAULET, P.; NUNN, P. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994–1997. *The New England Journal of Medicine*, v. 338, p. 1641-1649, 1998.

PAITHANKAR, K.R.; PRASAD, K.S. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research*, v. 25, p. 1346, 1991.

PAVLIC, M.; ALLERBERGER, F.; DIERICH, M.P.; PRODINGER, W.M. Simultaneous Infection with two drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains in an immunocompetent host. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 4156-7, 1999.

PERIZZOLO, P.F.; COSTA, E.R.D.; RIBEIRO, A.W.; SPIES, F.S.; MARTA O. RIBEIRO, M.O.; DIAS, C.F.; UNIS, G.; SILVA, P.A.; GOMES, H.M.; SUFFYS, F.N.; ROSSETTI, M.L. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. *Tuberculosis*, v. 92, p. 56-9, 2012.

PFLALLER, M.A. Application of new technology to the detection, identification and antimicrobial susceptibility testing by mycobacteria. *Clinical Microbiological Infectious Diseases*, v. 101, p. 329-37, 1994.

RAVIGLIONE, M.C. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis*, v. 83, p. 4-14, 2003.

RESTREPO, A.V.; SALEM, J.I.; OGUSKU, M.M.; GOMES, L.F.; FRAIJI, N.A. Pesquisa de Micobactérias Ambientais em água de torneira, luvas e soluções utilizadas em procedimentos cirúrgicos no Hospital Universitário Getúlio Vargas - Manaus/AM. *Acta Amazonica*, v. 39, p. 889-900, 2009.

RICHARDSON, M.; CARROL, N.M.; ENGELKE, E.; van der SPUIY, G.G.; SALKER, F.; MUNCH, Z.; GIE, R.P.; WARREN, R.M.; BEYERS, N.; van HELDEN, P.D. Multiple *Mycobacterium tuberculosis* strain in early cultures from patients in a high-incidence community setting. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 2750-4, 2002.

RIEDER, H.L.; van DEUN, A.; KAM, K.M.; KIM, S.J.; CHOND, T.M.; TRÉBUCQ, A.; URBANCZIK, R. **Priorities for Tuberculosis bacteriology services in low-income countries**. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2007, 150p.

ROBERTS; G.D.; PROCOP, G.W. Laboratory diagnosis and susceptibility testing. In: SCHLOSSBERG, D. **Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections**. New York: McGraw-Hill, 2006, p. 52-60, cap. 3.

ROSSETTI, M.L.R.; VALIM, A.R.M.; SILVA, M.S.N.; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, p. 525-32, 2002.

RUIZ, M.; TORRES, M.J.; LLANOS, A.C.; ARROYO, A.; PALOMARES, J.C.; AZNAR, J. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 1585-9, 2004.

SALEM, J.I.; MARÓJA, M.F.; CARVALHO, F.F.; LIMA, M.O.; LITTAIF, L.R.L.; CARDOSO, M.S.; BRIGLIA, M.F.S.; DAVID, H.L. Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da Tuberculose pulmonar no Amazonas. *Jornal de Pneumologia*, v. 16, p. 133-6, 1990.

SALEM, J.I.; CARVALHO, C.M.; OGUSKU, M.M.; MAIA, R.; RUFFINO-NETTO, A. PKO – Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. *Acta Amazonica*, v. 37, p. 419-24, 2007.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1994, p. 307-321, cap. 26.

SBPT, SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 35, p. 1018-48, 2009.

SEMSA, SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. Departamento de Atenção Básica. Programa de Controle da Tuberculose. **Plano de Ação e Programação Anual 2009**. Manaus – Amazonas, 2009, 17p.

SERGEEV, R.; COLIJN, C.; COHEN, T. Models to understand the population-level impact of mixed strain *M. tuberculosis* infections. *Journal of Theoretical Biology*, v. 280, p. 88-100. 2011.

SHAMPUTA, I.C.; RIGOUTS, L.; EYONGETA, L.A.; EL AILA, N.A.; van DEUN, A.; SALIM, A.H.; WILLERY, E.; LOCHT, C.; SUPPLY, P.; PORTAELS. Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 5528-36, 2004.

SILVA, P.E.A.; OSÓRIO, M.; REINHARDT, M.C.; FONSECA, L.S.; DELLAGOSTIN, O.A. Drug resistance of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Brazil. *Microbes and Infection*, v. 3, p. 1111-3, 2001.

SILVA, M.S.N; SENNA, S.G.; RIBEIRO, M.O.; VALIM, A.R.M.; TELLES, M.A.; KRITSKI, A. MORLOCK, G.P.; COOKSEY, R.C.; ZAHA, A.; ROSSETTI, M.L.R. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* Genes of brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 4471-4, 2003.

SILVA, P.E.A.; PALOMINO, J.C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, V. 66, p. 1417-30, 2011.

SLAYDEN, R.A.; BARRY, C.E. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 659-69, 2000.

SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L.M.; SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research*, v. 2, p. 164-8, 2001.

STAVRUM, R.; MPHAHLELE, M.; OVREAS, K.; MUTHIVHI, T.; FOURIE, P.B.; WEYER, K.; GREWAL, H.M.S. High Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes in South Africa and Preponderance of Mixed Infections among ST53 Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, p. 1848-56, 2009.

THEISEN, H.; REICHEL, C.; RÜSCH-GERDES, S.; HASS, W.H.; ROCKSTROH, J.K.; SPENGLER, U.; SAUERBRUCH, T. Mixed-strain infection with a drug-sensitive and multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet*, v. 345, P. 1512-13, 1995.

VAN RIE, A.; VICTOR, T.C.; RICHARDSON, M.; JOHNSON, R.; VAN DER SPUY, G.D.; MURRAY, E.J.; BEYERS, N.; VAN PITTIUS, N.C.G.; VAN HELDEN, P.D.; WARREN, R.M. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 172, p. 636-42, 2005.

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.; M. SMALL, P.M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 406-9, 1993.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P.W.M.; HAAS, P.E.W.; SOLL, D.R.; VAN EMBDEN, J.D.A. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA Polymorphism as a tool in the epidemiology of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 2578-86, 1991.

VARELA, G.; CARVAJALES, S.; GADEA, P.; SIROK, A.; GROTIUZ, G.; MOTA, M.I.; RITACCO, V.; RENIERO, A.; RIVAS, C.; SCHELOTTO, F. Comparative molecular study of *Mycobacterium tuberculosis* strains, in times of antimicrobial drug resistance. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 37, p. 11-5, 2005.

VIEDMA, D.G.; MARIN, M.; SERRANO, M.J.R.; ALCALÁ, L.; BOUZA, E. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 187, p. 695-9, 2003.

VRIONI, G.; LEVIDIOTOU, S.; MATSIOTA-BERNARD, P.; MARINIS E. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates presenting various drug susceptibility profiles from Greece using three DNA typing methods. *Journal of Infection*, v. 48, p. 253-62, 2004.

ZAR J.H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Ed Prentice Hall, Inc, Englewood Cliff, 1984, 401p.

WARREN, R.M.; VICTOR, T.C.; STREICHER, E.M.; RICHARDSON, M.; BEYERS, N.; van PITTIUS, N.C.G.; van HELDEN, P.D. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 169, p. 610-4, 2004.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Anti-tuberculosis drug resistance in the world: prevalence and trends**. Report N° 2. WHO/CDS/TB/2000.278. Geneva: WHO, 2000.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Toman's Tuberculosis. Case detection, treatment, and monitoring. Questions and answers**. Geneva: WHO, 2004.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report**, Geneva: WHO, 2010.

YAM, W.C.; TAM, C.M.; LEUNG, C.C.; TONG, H.L.; CHAN, K.H.; LEUNG, E.T.Y.; WONG, K.C.; YEW, W.W.; SETO, W.H.; YUEN, K.Y.; HO, P.L. Direct detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by PCR-DNA sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42, p. 4438-43, 2004.

YANG, Z.; DURMAZ, R.; YANG, D.; GUNAL, S.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; SANIC, A.; MARRS, C.F. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 53, p. 201-8, 2005.

### **Obras Consultadas**

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 2.0. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2000, 259p.

BEIGUELMAN, B. **Curso prático de bioestatística**. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2002, 272p.



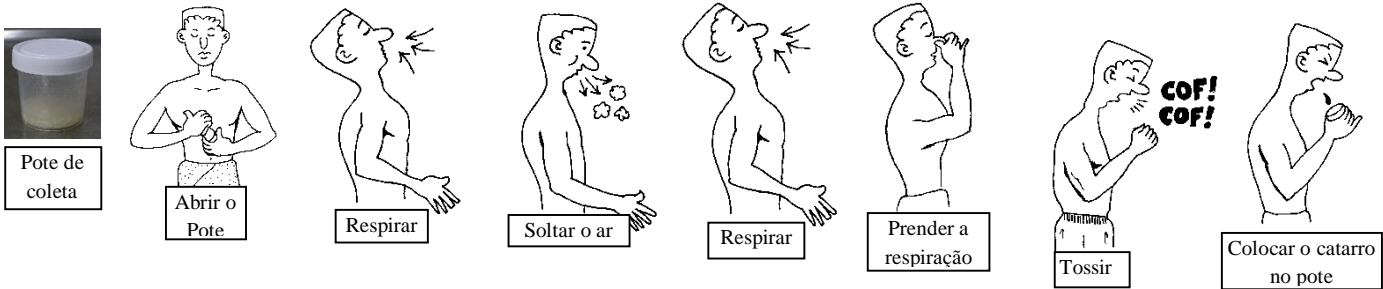
APÊNDICE 1 - TCLE

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

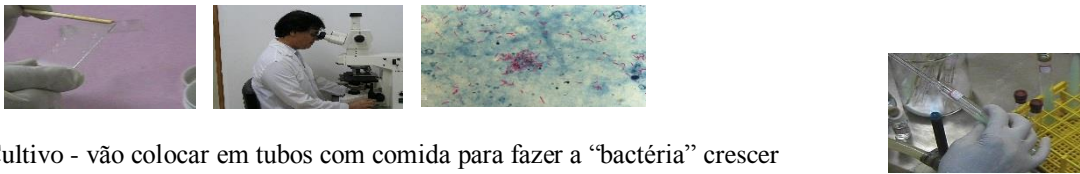
Nº de Registro na Pesquisa: .....

Os pesquisadores **Mauricio Morishi Ogusku e Julia Ignez Salem** pedem sua autorização para realizar as atividades do Projeto de Pesquisa “Investigação de Tuberculose pulmonar por múltiplas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Infecção Policlonal) e sua possível associação com a resistência às drogas antimicobacterianas”. O projeto será realizado com pacientes que sejam atendidos no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia que fica na Av. André Araújo 2936, Bairro do Aleixo em Manaus e na Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes. Serão realizados exames de laboratório no escarro (catarro) dos pacientes com tosse para descobrir se tem a doença tuberculose. O escarro é coletado em um frasco, não dói e nem prejudica a saúde. Veja como é:



Os pesquisadores vão fazer 2 tipos de exames no escarro:

- 1. Baciloscopia - vão colocar um pouco numa lâmina e olhar no microscópio para procurar a “bactéria” da tuberculose



- 2. Cultivo - vão colocar em tubos com comida para fazer a “bactéria” crescer

Se os pesquisadores encontrarem a bactéria da tuberculose vão utilizá-la para realizar um teste chamado Antibiograma. Isso é, vão tentar descobrir por dois diferentes exames se a bactéria que está causando a tuberculose é resistente ou não aos remédios que serão dados pelos médicos para seu tratamento. Depois os pesquisadores vão analisar qual dos exames é o melhor para descobrir se a bactéria é resistente ou não aos remédios. O paciente não receberá nenhum benefício em dinheiro ou bem material em troca e a bactéria e as amostras de escarro serão guardadas na coleção de Microbiologia do INPA, que poderá utilizá-los em outros estudos. Se tiver um paciente que não queira participar da pesquisa, os exames também serão realizados apenas para saber se está doente de tuberculose e se tem que ser tratado. Os resultados da pesquisa serão informados diretamente ao paciente, que mesmo após aceitar participar, terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento fornecido pelos pesquisadores. Os resultados serão divulgados nos meios científicos, sem os nomes ou características que possam identificar os participantes. Se o paciente quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa basta se dirigir ao INPA ou telefonar para (92) 3643-3216 que os pesquisadores darão todas as informações.

Eu, \_\_\_\_\_, entendi e dou meu consentimento para realizarem os exames do projeto para descobrir se a “bactéria” que está causando a Tuberculose no meu corpo é resistente ou não ao tratamento que vou receber dos médicos. Atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

.....  
Assinatura do paciente Data: ...../...../.....

Impressão do polegar, caso o paciente não saiba escrever seu nome.

.....  
Nome do profissional que conversou com o paciente Data: ...../...../.....

**APÊNDICE 2** – Detalhes dos procedimentos micobacteriológicos conforme estabelecido por Salem et al. (1990) e Salem et al. (2007).

### **Baciloscopia Direta**

- a) A porção mais densa da amostra e com aspecto purulento será depositada sobre a lâmina de microscopia, previamente identificada com o número de registro do paciente;
- b) A porção será distendida em movimentos de vai-e-vem, com o auxílio de um aplicador de madeira, até a obtenção de uma película homogênea que na prática é denominado de esfregaço;
- c) O esfregaço permanecerá em temperatura ambiente até a completa secagem e, posteriormente, será submetido à coloração específica de Kinyoun e leitura microscópica.

### **Baciloscopia Após-concentração**

- a) A amostra de escarro será transferida para um tubo de centrífuga de fundo cônico com capacidade para 15 mL, ao qual será adicionado um volume de solução de NaOH 4% estéril, na mesma proporção do escarro (volume/volume);
- b) Após homogeneização em agitador de tubos, a amostra ficará em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente;
- c) Seu volume será completado para 15 mL com água destilada estéril e centrifugado a 3.500 x g durante 15 minutos;
- d) O sobrenadante será desprezado e o sedimento ressuspenso em 1,5 mL de água destilada estéril;
- e) Duas gotas da suspensão serão depositadas, individualmente, sobre uma lâmina de microscopia previamente identificada com o número de registro do paciente;

- f) A lâmina permanecerá em temperatura ambiente, no interior da cabine de segurança biológica, até a completa secagem e, posteriormente, será corada pela técnica de Kinyoun e realizada a leitura microscópica.

### **Cultivo - Técnica de PKO**

- a) Alíquotas de 0,2 mL, do restante da suspensão obtida no tópico “d” da técnica de baciloscopia após-concentração, serão semeadas em três tubos contendo o meio de Ogawa modificado (pH 6,4). Após a semeadura os tubos serão incubados a 37°C em estufa bacteriológica. O restante da suspensão será acondicionado em um criotubo de 2 mL e armazenado em freezer a -20°C;
- b) Os tubos de cultivo e as placas de Petri semeadas serão observados, semanalmente, quanto ao crescimento microbiano, pelo período de dois meses.

### **Coloração de Kinyoun (KENT; KUBICA, 1985)**

- a) As lâminas dos esfregaços direto e após-concentração serão colocadas em suporte adequado. Em suas superfícies serão adicionadas a fucsina fenicada de Kinyoun (4 g de fucsina básica dissolvida em 20 mL de etanol a 95°GL ao qual são adicionados 100 mL de solução de fenol aquosa a 8%), previamente filtrada, e deixada em repouso por 5 minutos sem uso de aquecimento;
- b) Após esse período, o excesso de fucsina será eliminado e as lâminas cuidadosamente lavadas com jato d'água de baixa pressão;
- c) As lâminas serão recolocadas no suporte e em suas superfícies será adicionada solução álcool-ácido (3 mL de ácido clorídrico em 97 mL de etanol) com tempo de permanência de 3 minutos. A solução álcool-ácida será vertida sob um jato d'água de baixa pressão e

lavagens rápidas com nova solução álcool-ácida serão realizadas caso ainda permaneçam resíduos de fucsina sobre o esfregaço;

- d) Na superfície das lâminas será adicionada solução de azul de metileno (0,3 g de azul de metileno dissolvido em 100 mL de água destilada) por 4 minutos;
- e) Após esse período, o excesso de azul de metileno será eliminado e as lâminas lavadas, cuidadosamente, com jato d'água de baixa pressão;
- f) As lâminas serão deixadas à temperatura ambiente até a secagem completa e, posteriormente, submetidas à leitura microscópica.

**APÊNDICE 3 – Equipe Científica**

<b>NOME</b>	<b>FORMAÇÃO</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>ÓRGÃO</b>	<b>ATIVIDADE</b>
Mauricio Morishi Ogusku	Farmacêutico-Bioquímico	Mestre	INPA	Pesquisador
Julia Ignez Salem	Médica	Doutor	INPA	Orientadora Micobacteriologia
Felipe Gomes Naveca	Microbiologista	Doutor	Fiocruz	Co-orientador Biologia Molecular
Aya Sadahiro	Farmacêutico-Bioquímico	Doutor	UFAM	Colaboradora Biologia Molecular
João Vicente Braga de Souza	Farmacêutico	Doutor	INPA	Colaborador Biologia Molecular
Ana Paula Miranda Barros	Biomédica	Especialista	INPA	Bolsista FAPEAM DCTA-C
Irineide Assumpção Antunes	Médica	Mestre	Policlínica Cardoso Fontes	Colaboradora Infectologia

**APÊNDICE 4 – Cronograma de Execução Física**

ATIVIDADES	2012					
	MESES					
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
Seleção das colônias	x					
Identificação do <i>M. tuberculosis</i>	x					
Realização do antibiograma	x	x				
Extração de DNA do <i>M. tuberculosis</i>		x				
Realização da DRE-PCR		x	x			
Realização do seqüenciamento de DNA			x	x		
Análise dos resultados			x	x		
Elaboração da tese e artigos científicos para publicação				x	x	
Defesa da tese						x

## APÊNDICE 5 – Orçamento Detalhado

Itens	Despesas de Custeio	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
	Material de Consumo			
1	Tubos de centrífuga 15 mL, descartável, esterilizado, pacote com 50 unidades	20	63,00	1.260,00
2	Tubos de centrífuga 50 mL, descartável, esterilizado, pacote com 25 unidades	10	45,00	450,00
3	Isoniazida, frasco 50 g	1	56,00	56,00
4	Rifampicina, frasco 5 g	2	1.267,00	2.534,00
5	Oligonucleotídeos liofilizados	10	133,00	1.330,00
6	Agarose grau biologia molecular, 500g	1	1.450,00	1.450,00
7	DNA ladder 100pb	2	447,00	894,00
8	Taq DNA Polimerase 500U	6	296,00	1.776,00
9	dNTP Mix 100mM	2	886,00	1.772,00
10	Kit de Extração de DNA p/ micobactérias	2	3.400,00	6.800,00
11	BigDye Terminator Kit	6	2.500,00	15.000,00
12	Polímero POP	2	6.600,00	13.200,00
13	Microtubos 1,5 mL, pacote com 500 und	5	29,00	145,00
14	Microtubo 0,2mL, pacote c/ 1000 und	2	110,00	220,00
15	Ponteiras com filtro 1000 uL, pacote c/ 1000	5	167,00	835,00
16	Ponteiras com filtro 200uL, pacote c/ 1000	5	167,00	835,00
17	Enzima de Restrição <i>PvuII</i> , frasco c/ 1500U	4	333,00	1.332,00
18	Marcador de peso molecular Lambda DNA/ <i>Hind III</i>	2	295,00	590,00
19	Marcador de peso molecular <i>Phi X 174 RF</i> DNA/ <i>HaeIII</i>	2	302,00	604,00
20	Kit para marcação de sonda genética e detecção da hibridização: ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System – para marcação de 10µg de DNA	2	2.354,00	4.708,00
21	Membrana para hibridização – Hybond – N+ (30cm x 3m), rolo	2	1.225,90	2.451,80
22	Filme de Raio X – Hyperfilm™ ECL™ – High performance chemiluminescence film, tamanho do filme 18 X 24, 100 unds	2	1.346,00	2.692,00
23	Papel de Filtro (Filter Paper), modelo 583 Gel Dryer, 25, tamanho 34 X 45 cm	2	375,00	750,00
24	Software BioNumerics	1	19.238,50	19.238,50
<b>Sub-Total 1:</b>			<b>43.085,40</b>	<b>80.923,30</b>

Itens	Despesas de Capital	Quantidade	Valor Individual (R\$)	Valor Total (R\$)
	Equipamentos e Material Permanente			
1	Cuba horizontal nivelável média 15 x 12,8 cm c/ 2 bandeja UV e 2 pentes de 1,0 mm c/16 poços	1	2.412,00	2.412,00
2	Cassete p/ autoradiografia – Hypercassette Neutral (18 X 24 cm)	1	748,00	748,00
3	Microscópio óptico, binocular c/ objetivas planacromáticas, campo claro	1	4.500,00	4.500,00
4	Freezer vertical 360L	1	1.350,70	1.350,70
5	Refrigerador duplex 360L	1	1.450,00	1.450,00
<b>Sub-Total 2:</b>			<b>10.460,70</b>	<b>10.460,70</b>

Item	Bolsa	Quantidade	Valor Individual (R\$)	Valor Total (R\$)
1	DCTA-C	24	1,234,00	29.616,00
<b>Sub-Total 3:</b>			<b>1.234,00</b>	<b>29.616,00</b>

<b>Total Geral (R\$):</b>			<b>121.000,00</b>
---------------------------	--	--	-------------------



**APÊNDICE 3:** Artigo submetido a Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

**Tuberculosis Polyclonal Infection: phenotypic and genotypic profile of  
*Mycobacterium tuberculosis*, Manaus - Amazonas, Brazil.**

**Título resumido: Polyclonal infections of *M. tuberculosis***

Mauricio Morishi Ogusku<sup>1,2/+</sup>, Aya Sadahiro<sup>3</sup>, Ana Paula Miranda Barros<sup>4</sup>, Eduardo Bentes Santana Filho<sup>3</sup>, Maulori Curié Cabral<sup>5</sup>, Irineide Assumpção Antunes<sup>6</sup>, Joycenéa da Silva Matsuda<sup>7</sup>, João Vicente Braga de Souza<sup>1</sup>, Felipe Gomes Naveca<sup>7</sup>,  
Julia Ignez do Nascimento Salem José<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Manaus, AM, Brasil.

<sup>2</sup>Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Manaus, AM, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Manaus, AM, Brasil.

<sup>4</sup>Bolsista DCTA-C, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, FAPEAM, Manaus, AM, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Departamento de Virologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>6</sup>Policlínica de Referência em Pneumologia Cardoso Fontes, Secretaria de Estado da Saúde do Amazonas, SUSAM, Manaus, AM, Brasil.

<sup>7</sup>FIOCRUZ Amazônia, Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, Manaus, AM, Brasil.

**Correspondence to:** Mauricio Morishi Ogusku, Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Av. André Araújo, 2936, Bairro do Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, AM, Brazil, Tel (+055) 92 3643 3057. (+055) 92 8168 2434. E-mail: mmogusku@inpa.gov.br

## **SUMMARY**

**In clinical practice it is widely accepted that an episode of active tuberculosis (TB) is caused by a single clone of *Mycobacterium tuberculosis*. However, several studies have shown that there is a mix of clones and this can be more than expected. In this context, the aim of this study was to verify the frequency of polyclonal infection in sputum samples from newly diagnosed pulmonary TB patients. We included 62 clinical samples, 31 paucibacillary and 31 multibacillary, which were phenotypically characterized for sensitivity to isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) and genotypically by PCR-DER. In nineteen clinical samples (30.6%) were determined the presence of clones resistant and sensitive to INH and/or RIF as well as the appearance of different genotypes, indicating heterogeneity of clones of *Mycobacterium tuberculosis* in a single sample. The occurrence of polyclonal tuberculosis infection was considered high when compared to results from other studies that had a maximum 19.0% of polyclonal infection. These results indicate that the presence of polyclonal infection is not a rare phenomenon in pulmonary TB patients, at least in this studied population.**

**Keywords: Polyclonal infection, Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Drug resistance**

## Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, and is a serious public health problem. In 2010, according to World Health Organization, there were 6.2 million cases worldwide and from these 5.4 million were new cases. India and China contribute with 40% of TB cases and Brazil are among the 22 countries which account for 82% of TB worldwide cases (WHO, 2011). The Manaus city has an incidence rate of 90.6/100,000 while the Amazonas State has 67.6/100,000.

For many years, it was believed that TB patient would be infected with only one clone of *M. tuberculosis*. However, several studies have shown that there is a heterogeneity of clones and this may be more complicated than expected (MARTIN et al., 2010). The presence of multiple clones in a pathogenic process may be called polyclonal infection or mixed infection. This condition in TB should occur by: a) simultaneous infection with multiple clones, b) super-infection or reinfection by new clone and c) genetic diversity generated spontaneously in the bacterial population during the course of infection (FORD et al. 2012).

In TB, polyclonal infections can be observed by phenotypic tests, by identification of *M. tuberculosis* clones with different susceptibility to antimycobacterial, and genetic testing, using molecular tools that can reveal different genetic profiles of bacilli from the same clinical sample.

Among molecular techniques, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) has been widely used to investigate polyclonal infections. According to Braden et al. (2001), this technique became the main tool for the characterization of TB polyclonal infection, due to its higher discriminatory power. However, the pattern of *M. tuberculosis* "fingerprint" can be produced by a clone in predominant clinical sample or a pattern compound by multiple clones.

In this case, if the DNA of a minority of bacterial population is insufficient to produce

autoradiograph bands, RFLP technique may be insensitive to detect polyclonal infections. Therefore, according to Behr (2005), most databases RFLP suggests that polyclonal infection is occasionally evident, and this type of infection is extremely rare.

Thus, PCR-based assays can be used to detect clones or subpopulations (BEHR, 2005, van RIE et al., 2005) or if RFLP were used to distinguish multiple clones of *M. tuberculosis* should be made from individually isolated colonies (MATSUMOTO et al., 2005).

The polyclonal infection has been linked to cases of TB retreatment with collection of several sputum samples from patient under medication. In this context, the aim of this study was detect polyclonal infection in pulmonary TB patients newly diagnosed, from a single sputum sample collected before TB treatment. For this, a phenotypic assay was standardized for selection of *M. tuberculosis* clones by drug sensitivity for INH and/or RIF, and subsequently submitted to genotyping by DRE-PCR. The phenotypic and genotypic characterization of TB infection is relevant to evidence if there is a profile of polyclonal infection in TB patients in endemic region such as Manaus – Amazonas, Brazil.

## **Study population and Methods**

### **Patients**

A total of 62 pulmonary TB patients (31 paucibacillary and 31 multibacillary), of both genders, 18-65 years old, HIV negative and residents in Manaus, capital of Amazonas State - Brazil, were selected from a Reference Center for TB treatment: Policlínica de Referência em Pneumologia Cardoso Fontes. The study excluded patients with sputum culture positive for nontuberculous mycobacteria (NTM).

This study was approved (protocol 221-09) by the Ethical Committee of Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus - Amazonas, Brazil.

### **Procedures Mycobacteriological**

The sputum samples were examined by acid-fast microscopy (direct and pos-concentrated smear) and PKO method culture. The techniques were performed according to Salem et al. (1990) and Salem et al. (2007).

### **Selection of Clones Mycobacterial**

For isolation of clones of *M. tuberculosis* was used a strategy of screening clones resistant to isoniazid (INH) and rifampin (RIF) in 7H10(in Petri dishes) medium supplemented with: a) INH, 0.2 ug/mL; b) RIF, 40.0 ug/mL; c) combination of INH 0.2 ug/mL and RIF 40.0 ug/mL. For sensitive clones, was used 7H10 without INH or RIF, but supplemented with Polimixin B 100 U/mL and Ciclohexymide 200 ug/mL. The 7H10 plates were incubated at 37°C for 30 days. From positive culture of each patient, a mycobacterial suspension equivalent to McFarland scale No. 1 was diluted 1:50 and 100 uL were inoculated in each 7H10 medium for selection of colony forming units (CFU). The standard strain *M. tuberculosis* H37Rv and *M. tuberculosis* isolates, notoriously drug-resistant (provided by researcher Mary Alice Telles from Adolfo Lutz Institute in São Paulo - SP) were used as control sensitive and resistant to drugs, respectively. For random selection of clones, was created a circular template (Figure 1) with equal measures of Petri dish, with subdivisions of 9 mm<sup>2</sup> (0.09 cm<sup>2</sup>) which resulted in 644 quadrants. A mark were made in lateral of petri dish, to ensuring the same plate positioning during the selection of the colonies (Figure 1). The mycobacterial colonies existing in the quadrants were chosen by simple random sampling (CALLEGARI-JACQUES, 2003), in which all the colonies had equal probability of being selected. The R statistical software (version 2.9.1) was used to generate 50 random numbers (from 1 to 644) that corresponded to the position of each quadrant on the template (Table 1). These random numbers were used for selection of 10 clones of each isolate

of *M. tuberculosis* on 7H10 medium without INH and/or RIF. The same criterion was used for resistant clones on 7H10 medium with INH and/or RIF. When the number of colonies was less than ten, all colonies resistant to INH and/or RIF were selected.

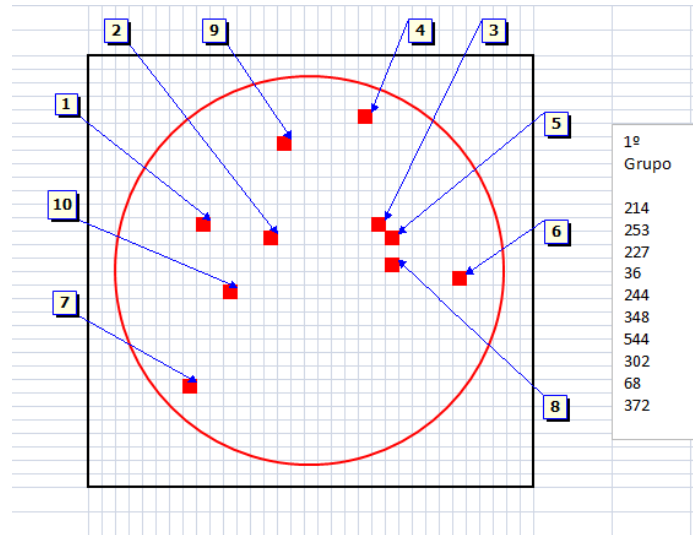


Figure 1 - 1<sup>st</sup> group of random numbers identified in the template for selection of *M. tuberculosis* clones.

Table 1 – Random numbers from 1 to 644 generated in R software.

1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	Rows			5 <sup>th</sup>
		3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>		
214	65	491	467	625	
253	552	107	71	154	
227	363	161	620	248	
36	29	128	595	178	
244	317	538	274	601	
348	446	579	638	27	
544	6	307	133	200	
302	46	447	543	442	
68	603	190	102	586	
372	209	512	332	61	

The selected colonies were subcultured individually on solid Löwenstein-Jensen or Ogawa modified by at least 21 days to carry out drug susceptibility test. In addition, were subcultured

in 5 mL of 7H9 medium with Tween 80 (0.2%) to obtain a bacterial suspension with a turbidity equivalent to McFarland scale to extract DNA, Identification of *M. tuberculosis* by PCR, genotyping, and DNA sequencing of genes associated with INH and RIF drug resistance.

### **Drug Susceptibility Test**

The subcultured clones were tested for sensitivity to INH and RIF by technique of Nitrate Reductase Method, performed according to Martins (2010). The selected clones from 7H10 with drugs were also confirmed as resistance to INH and/or RIF.

### **DNA Extraction**

DNA extraction was performed after minor protocol modifications of Friedman et al. (1991), as the initial volume (500 uL) and the inclusion of step inactivation of mycobacteria at 90°C for 60 minutes. The samples were stored at -20°C until use.

### **Identification of *M. tuberculosis* by PCR**

Identification of the isolates was performed by PCR with specific primers for *M. tuberculosis*. In this assay, a fragment of 245 base pairs (bp) of the IS6110 insertion sequence was amplified with primers INS-1 (5'-GGC CGT GAG ATC GTG GAG GC-3 ') and INS-2 (5'-TAG GCG GTG GCG GCT ACA AA-3 ') according to Hermans et al. (1990) and van Embden et al. (1993). The amplification parameters were: 94°C for 4 minutes, 35 cycles at 94°C for 1 minute, 66°C for 1 minute and 72°C for 1 minute. The PCR products were observed after gel electrophoresis in a 1.5% agarose, stained with SYBR Green, in Blue light transilluminator.

## Genotyping

Genotyping of *M. tuberculosis* clones individually subcultured, was carried out by DRE-PCR (Repetitive Double-Element-PCR) described by Friedman et al. (1995). 10 uL DNA (100-200 ng) of each *M. tuberculosis* clone was added to a mixture containing PCR buffer, 200 mM dNTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 uM of each primer Ris 1 (5'-GGC TGA GGT TCA AGA CTC G-3'), Ris 2 (5'-CCA ACC TTC TCC AGA CCA AC-3'), Pntb 1 (5'-CCG CCG TTG TAC AGC TG-3') and Pntb 2 (5'-CTT TCC AGC AGC CCA TG-3') and 2 U Taq DNA Polymerase in a final volume of 25 uL. The amplification parameters were: 95°C for 5 minutes, 35 cycles at 94°C for 1 minute, 56°C for 2 minutes and 72°C for 3 minutes in accordance with changes made by Montoro et al. (1998).

The polymorphism of clones was seen after gel electrophoresis 2.5% stained with SYBR Green displayed in blue light transilluminator. The polymorphism images by DRE-PCR from each group of *M. tuberculosis* clones were captured via digital photo documentation system and compared using Gel Compar II software (Applied Maths). The presence of different genotypes for *M. tuberculosis* from the same clinical sample was considered polyclonal infection.

## Results

During the study period 62 sputum samples from 62 pulmonary TB patients were included. The patients were assisted at Policlínica de Referência em Pneumologia Cardoso Fontes. According to methodology, 31 (50%) samples were multibacillary and 31 paucibacillary.

The mean age of the patients was 34 ( $\pm$  9) years old and 29 of them were female and 33 were male.



The strategy used to select resistant clones of *M. tuberculosis* in 7H10 with INH and/or RIF resulted in the identification of 19 (30.6%) primary cultures containing at least one *M. tuberculosis* clone resistant. From these cultures were isolated 74 clones (Table 2). However, 12 INH-resistant clones were excluded, by not growth in subculture or fungal contamination. Of the 19 primary cultures, 190 *M. tuberculosis* clones were isolated from 7H10 medium without addition of INH and/or RIF. Of these, 59 were excluded by not growth in subcultures or fungal contamination, resulting in 131 *M. tuberculosis* clones.

Table 2 - Selection of *M. tuberculosis* clones resistant to INH and/or RIF in pulmonary TB patients.

Sequence	Patient No.	<i>M. tuberculosis</i> Clones Numbers			Clones Proportion Sensitive/Resistant
		INH	RIF	INH + RIF	
1	083/10	1	0	0	< 1%
2	084/10	0	1	0	< 1%
3	085/10	3	0	0	< 1%
4	099/10	0	0	3	< 1%
5	101/10	3	0	0	< 1%
6	103/10	5	0	0	< 1%
7	105/10	2	0	0	< 1%
8	110/10	2	0	0	< 1%
9	119/10	2	0	0	< 1%
10	168/10	3	0	0	< 1%
11	189/10	2	0	0	< 1%
12	190/10	1	0	0	< 1%
13	046/11	6	0	0	< 1%
14	069/11	8	0	0	< 1%
15	088/11	10	0	0	> 1%
16	099/11	3	0	0	< 1%
17	100/11	10	0	0	> 1%
18	103/11	7	0	0	< 1%
19	107/11	2	0	0	< 1%

Confirmation of resistance or sensitivity of the selected clones was performed by the Nitrate Reductase technique. Among the 131 clones seven were INH-resistant.

Table 3 shows the distribution of polyclonal infection cases in relation to multibacillary or paucibacillary TB. There was no association between polyclonal TB and bacterial load of patients in the study ( $\chi^2 = 0.01$ ,  $p = 1.0$ ).

Table 3 - Polyclonal infection cases distribution in relation to bacterial load of pulmonary TB patients.

Polyclonal Infection	Patients		Total (%)
	Multibacillary (%)	Paucibacillary (%)	
Present	9 (29,0)	10 (32,2)	19 (30,6)
Absent	22 (71,0)	21 (67,8)	43 (69,4)
Total	31 (100,0)	31 (100,0)	62 (100,0)

In this study, from the primary cultures (n = 19) with resistant clones, the presence of RIF-resistant clone was observed in one (5.25%) patient (084/10). Multidrug resistance to INH and RIF was also found in a culture (099/10). On the other hand, at least one INH-resistant clone was detected in 17 (89.5%) cultures. It was observed that the proportion of resistant clones compared to susceptible (> 10/644), ie, greater than 1% was seen in two (10.5%) and would be considered resistant to isoniazid, compared to the standard method proportion.

Molecular characterization of polyclonal TB was performed in 65 clones of *M. tuberculosis* resistant to isoniazid, RIF-resistant, 3 INH-resistant clones and RIF and 74 sensitive to INH and RIF. It was not possible genotyping 50 clones of *M. tuberculosis* susceptible because DRE-PCR assay inhibition. However, at least one *M. tuberculosis* clone drug sensitive was compared to clone drug resistant from the same patient.

Genotyping of *M. tuberculosis* clones resistant and its respective sensitive clones from two patients of TB is shown in Figure 2. The genetic heterogeneity among the clones from the same

patient was observed in that 19 patients. This confirm the presence of infection by the isolation of polyclonal phenotypically resistant and sensitive clones coexistent in the same patient.

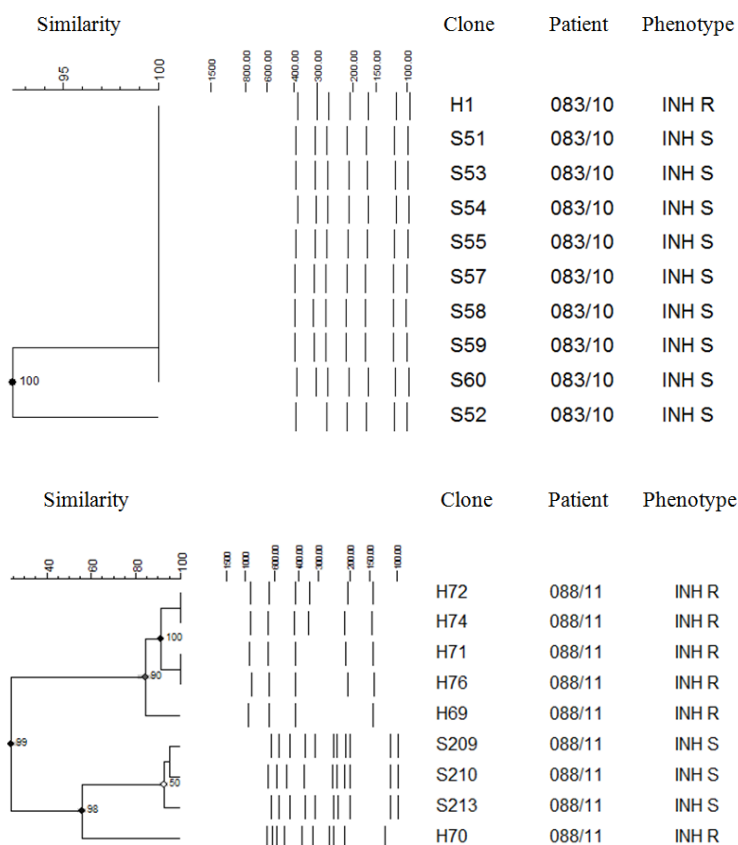


Figure 2 – Dendrograms of genotyping by DRE-PCR for *M. tuberculosis* clones from two patients. A – 083/10 patient. B – 088/11 patient. Analysis in GelCompar II, version 6.5, Dice Similarity Coefficient, 1% Tolerance, UPGMA.

## Discussion

Simultaneous presence of *M. tuberculosis* clones phenotypically resistant and sensitive to INH and/or RIF in the same sample of sputum was observed in 30.6% of the patients (n=19) by selection in media plates 7H10 with the incorporation of drugs. This result shows the condition of polyclonal infection in this population, higher than that observed in other studies, which reached 2.3 to 19% (RICHARDSON et al., 2002; VIEDMA et al., 2005; VIEDMA et al., 2004, WARREN et al., 2004; FANG et al., 2008, WANG et al., 2010).

These results indicate that the presence of polyclonal tuberculous infection is not a rare phenomenon in pulmonary TB patients living in Manaus - AM.

Furthermore, the selection strategy enables to visualize the extent of phenomenon of polyclonal infection in patients considered less likely, ie new cases of tuberculosis, before starting treatment and from only one sample of sputum.

If clones selection were carried out using only original 7H10 medium, the presence of resistant clones would be detected just in three (4.8%) patients, ie, it would be six times lower. This result exemplify what was described by Theisen et al. (1995) that due to the difficulty of identifying, bacteriologically more than one *M. tuberculosis* clone in a single clinical sample, the prevalence of polyclonal infections would be underestimated.

In TB diagnosis laboratory, the evaluation of clones by sensitivity to INH and RIF is the most accessible method for bacteriological characterization of polyclonal tuberculosis infection during the treatment (BRADEN et al., 2001). The procedures used in this study do not totally eliminate laborious steps for the selection of individual *M. tuberculosis* clones, but increase the sensitivity in the detection of clones present in smaller numbers in primary cultures. This strategy was important because differences in growth rate in different populations may be responsible for the clonal composition of a clinical sample (Martin et al., 2010). This was observed in *M. tuberculosis* resistant as a consequence of acquired drug resistance it would have a lower fitness in relation to sensitive clones (Sergeev et al, 2011). Thus, patients can carry sensitive and resistant clones, but only one can be detected in the drug susceptibility testing (Dickman et al. 2010).

How to explain the presence of sensitive and resistant *M. tuberculosis* clones in the patients without a history of TB, newly diagnosed and before beginning treatment?

According to Ford et al. (2012) *M. tuberculosis* heterogeneity in patients can occur due to: a) simultaneous bacilli infection from various sources, b) new strain *M. tuberculosis* reinfection, while the patient has not yet cured for TB, c) evolution of population part of *M. tuberculosis* during the infection course.

Simultaneous infection (THEISIN et al., 1995) and reinfection can occur with *M. tuberculosis* already drug-resistant (CHAVES et al., 1999).

Evolution cases could be, in accordance to spontaneous mutations, associated to *M. tuberculosis* DNA replication (PALOMINO & SILVA, 2011). Another hypothesis is based on the pressure of bacillus immune response. According to Ford et al. (2011) and Gupta et al. (2012) mutations occur by oxidative damage on *M. tuberculosis* DNA, ie inside the macrophage, bacilli undergo continuous action of free radicals, which are directly detrimental effect on bacterial DNA. Furthermore, Ford et al. (2011) add that *M. tuberculosis* has a greater capacity to acquire drug resistance during the latency period. These researchers, using monkey models, found that population of *M. tuberculosis* in monkeys with clinically latent infection acquired mutations at the same rate of bacilli in vitro. The explanations that there would be a balance between actively replicating bacilli and others eliminated by immune system throughout the period of latency.

Besides that, the experiments show that the tuberculous lesions can be genetically distinct and independent, so that bacilli of a lesion can not represent the actual diversity in the same individual. Therefore, only the mycobacteria from cavity open lesion will be present in sputum sample (FORD et al., 2012).

These results were higher than other studies, because previous studies had percentages for detection of polyclonal infection ranging from 0.4% (Das et al., 2004) in India, 4.8% in South Vietnam (Huyen et al., 2012) to 19.0% in South Africa (Warren et al., 2004). The various

percentages of polyclonal infection reported can reflect discriminatory power of the techniques used to detect multiple clones of *M. tuberculosis* (Dickman et al., 2010). Likewise, the studied population and the sampling method for sputum collection may influence the estimate of polyclonal infection (Fang et al., 2008). Probably the difference in the present study was to combine phenotypic selection of *M. tuberculosis* resistant clones to a genotyping technique based on PCR. Otherwise it would be detected 4.8% of polyclonal infection, as previously mentioned.

It was observed that *M. tuberculosis* clones isolated from the sputum of one patient had at least two distinct genotypes. However, genotype of the clone is not entirely associated to the test sensitivity phenotypes (Vrioni et al. 2004; Varela et al. 2005). Clone H1 is an example (Patient 083/10, Figure 2A), INH-resistant, which showed the same genotype that sensitive clones, except to clone S52. This clone had a different genotype with the absence of a DNA fragment and it was INH-sensitive phenotype. This strongly suggests that the distinction of genotypes is not related to the difference in drugs sensitivity among the clones, but by transposition of insertion sequence, IS (Vrioni et al. 2004). The lower similarity among *M. tuberculosis* clones was found for 088/11 patient (Figure 2B).

It is possible that the high frequency of polyclonal infections detected in this study is related to reinfection or superinfection. It is speculated that the course of tuberculous infection may alter the immune response, increasing susceptibility to reinfection. Alternatively, the occurrence of reinfection after a primary infection, can initiate progression or reactivation of the primary infection (Warren et al. 2004). According to these authors, an important observation is that the initial infection is unable to provide protection against subsequent infection. And this is

particularly important for the understanding of immunity and the development of new vaccines and drugs.

On the other hand, is not ruled out that polyclonal infection detected in patients without a history of tuberculosis may have occurred from multiple sources of infection. Considering that Manaus city has a high incidence rate of tuberculosis (90.6/100.000), cure rate of 73.4% and 9.7% of neglected treatment (Brazil, 2012). These features added to overcrowding of urban public transport and tropical climate that favors people agglomeration in public places indoor air-conditioned, thus benefiting the transmissibility of *M. tuberculosis*.

It is worth noting that there is a possible presence of polyclonal infection among the 43 patients (69.4%) which had no isolation of *M. tuberculosis* resistant clones. Because, if we observe that *M. tuberculosis* clones sensitive from the same patient (group of 19 patients) showed different genotypes, these results suggest that the presence of polyclonal infection may be greater than detected in this study.

Although it is not possible to compare the genotypes obtained in this study with those already published (by different genotyping techniques) we can theorize that in Manaus - AM is circulating a large genetic diversity of *M. tuberculosis*. A similar situation was found by Stavrum et al. (2009) that detected a wide variety of Spoligotypes patterns in South Africa. The study by Gomes et al. (2012) corroborates the genetic diversity of *M. tuberculosis* clones detected in Manaus - AM. These authors carried out genotyping by Spoligotyping in 1911 *M. tuberculosis* isolates from 11 states of Brazil, 37 (1.86%) were isolates from Amazon state, predominantly from Manaus - AM. Of these, eight (21.6%) were orphans, ie with patterns Spoligotypes recorded only once. Two of these isolates were related to LAM family, whereas 6 had unknown patterns, not assigned to any lineage/sublineage described in the international database.

In conclusion, the selection of clones by drug resistance profile was usefeul procedure because it was provided isolation of *Mycobacterium tuberculosis* clones resistant in a six-fold higher than the random isolation. This procedure may be adopted in future studies to characterize cases of reactivation or reinfection from a series of sputum collected from pulmonary TB patients. The presence of phenotypically sensitive and resistant clones in 30.6% of pulmonary TB patients before starting treatment and from a sputum sample characterized polyclonal infection as a phenomenon not uncommon in Manaus, Amazonas, Brazil.

The technique of DRE-PCR has sufficient discriminatory power to genotype clones of *M. tuberculosis* from the same patient. However, the genotypes of clones from the same patient are not related exclusively to the drug sensitivity phenotype to INH or RIF.

### **Acknowledgment**

To FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas),Secretaria de Estado da Saúde do Amazonas (SUSAM), Ministério da Saúde (MS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq,) by financial support (PPSUS).

To Maria Alice Telles, from Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP for *M. tuberculosis* resistant strains.

To Andrei Salem Gonçalves, for his assistance in R Software.

To Megumi Sadahiro, Secretaria Municipal de Saúde de Manaus, for her assistance.

### **References**

- Behr MA 2005. Polyclonal Tuberculosis and the emergence of drug resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 521-522.
- Braden CR, Morloch GP, Woodley CL, Johnson KR, Colombel AC, Cave MD, Yang Z, Valway SE, Onorato IM, Crawford JT 2001. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis* 33: 42-47.
- Brasil 2012. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional De



- Controle da Tuberculose. **Relatório de Visista de Monitoramento ao Município de Manaus**. Brasília: Ministério da Saúde, 8p.
- Callegari-Jacques SM 2003. *Bioestatística, Princípios e Aplicações*, 1ª. Ed., Artmed Editora, São Paulo, 256pp.
- Chaves F, Dronda F, Alonso-Sanz M, Noriega AR 1999. Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. *Aids* 13: 615-620.
- Das S, Narayanan S, Hari L, Mohan NS, Somasundaram S, Selvakumar N, Narayanan PR 2004. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 267–270.
- Dela A, Sajduda A, Pawłowskab I, Dziadek J 2006. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Lodz, Poland: Analysis by IS6110 restriction fragment length polymorphism and double-repetitive-element PCR. *J Infection* 52: 346-353.
- Dickman KR, Nabyonga L, Kateete DP, Katabazi FA, Asiiimwe BB, Mayanja HK, Okwera A, Whalen C, Joloba ML 2010. Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis* 10: 349-355.
- Fang R, Li X, Li J, Wu J, Shen X, Gui X, DeRiemer K, Liu L, Mei J, Gao Q 2008. Mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients in Shanghai, China. *Tuberculosis* 88: 469-473.
- Ford C, Yusim K, Iorger T, Feng S, Chase M, Greene M, Korber B, Fortune S 2012. *Mycobacterium tuberculosis* - Heterogeneity revealed through whole genome sequencing. *Tuberculosis* (in press).
- Ford CB, Lin PL, Chase MR, Shah RR, Iartchouk O, Galagan J, Mohaideen N, Ioerger TR, Sacchettini JC, Lipsitch M, Flynn JL, Fortune SM 2011. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat Genet* 43: 482-486.
- Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson JR WD, Riley LW 1995. Double-Repetitive-Element PCR Method for Subtyping *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *J Clin Microbiology* 33: 1383-1384.
- Gomes HM, Elias AR, Oelemann MAC, Pereira MAS, Fandinho-Montes FCO, Marsico AG, Kritski AL, Filho LA, Paulo C. Caldas, Possuelo LG, Cafrune P, Rossetti ML, Lucena N, Saad MHF, Cavalcanti HR, Leite CQF, Brito RC, Lopes ML, Lima K, Souza M, Trindade RC, Zozio T, Sola C, Rastogi N, Suffys PN 2012. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol* 12: 649-56.
- Guptaa A, Kaula A, Tsolakib AG, Kishoreb U, Bhaktaa S 2012. *Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* 217: 363-374.
- Hermans PWM, Van Soolingen D, Dale JW, Schuitema AR, McAdam RA, Catty D, van Embdem JD 1990. Insertion Element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiology* 28: 2051-2058.
- Huyen MN, Kremer K, Lan NT, Cobelens FG, Buu TN, Dung NH, Caws M, Tiemersma EW, van Soolingen D 2012. Mixed tuberculosis infections in rural South Vietnam. *J Clin Microbiology* 50: 1586-92.
- Lourenço MCS, Grinsztejn B, Fandinho-Montes FCO, Silva MG, Saad MHF, Fonseca LS 2000. Genotypic patterns of multiple isolates of *M. tuberculosis* from tuberculous HIV patients. *Trop Med Int Health* 5: 488-494.

- Martín A, Herrán M, Serrano M, Bouza E, Viedma D 2007. Rapid clonal analysis of recurrent tuberculosis by direct MIRU-VNTR typing on stored isolates. *BMC Microbiol.* 7: 73-80.
- Martins ESJ 2010. Avaliação de modificações no método de redução de nitrato visando a detecção de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes, Dissertação, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 66 pp.
- Matsumoto T, Ano H, Nagai T, Danno K, Takashima T, Tsuyuguchi I 2005. IS6110 DNA fingerprinting analysis of individually separated colonies of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 85: 207-212.
- Montoro E, Valdivia J, Leão SC. Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Havana, Cuba, by IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and by the Double-Repetitive-Element PCR Method 1998. *J Clin Microbiology* 36: 3099–3102.
- R Development Core Team 2012. R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.15.0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Richardson M, Carrol NM, Engelke E, van der Spuy GD, Salker F, Munch Z, Gie RP, Warren RM, Beyers N, van Helden PD 2002. Multiple *Mycobacterium tuberculosis* strain in early cultures from patients in a high-incidence community setting. *J Clin Microbiology* 40: 2750-2754.
- Salem JI, Carvalho CM, Ogusku MM, Maia R, Ruffino-Netto A 2007. PKO – Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. *Acta Amazonica* 37: 419-424.
- Salem JI, Marója MF, Carvalho FF, Lima MO, Litaiff LRL, Cardoso MSL, Briglia MFS, David HL 1990. Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da Tuberculose pulmonar no Amazonas. *J Pneumol* 16: 133-136.
- Sergeev R, Colijn C, Cohen T 2011. Models to understand the population-level impact of mixed strain *M. tuberculosis* infections. *J Theor Biol* 280: 88-100.
- Silva PEA, Palomino JC 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* 66: 1417-1430.
- Stavrum R, Mphahlele M, Ovreas K, Muthivhi T, Fourie PB, Weyer K, Grewal HMS 2009. High Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes in South Africa and Preponderance of Mixed Infections among ST53 Isolates. *J Clin Microbiology* 47: 1848-1856.
- Theisen H, Reichel C, Rüscher-Gerdes S, Hass WH, Rockstroh JK, Spengler U, Sauerbruch T 1995. Mixed-strain infection with a drug-sensitive and multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet* 345: 1512-1513.
- van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiology* 31: 406-409.
- van Rie A, Victor TC, Richardson M, Johnson R, van der Spuy GD, Murray EJ, Beyers N, van Pittius NCG, van Helden PD, Warren RM 2005. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 636-642.
- Varela G, Carvajales S, Gadea P, Sirok A, Grotiuz G, Mota MI, Ritacco V, Reniero A, Rivas C, Schelotto F 2005. Comparative molecular study of *Mycobacterium tuberculosis* strains, in times of antimicrobial drug resistance. *Rev Argent Microbiol* 37: 11-15.

- Viedma DG, Marín M, Ruiz MJ, Bouza E 2004. Analysis of Clonal Composition of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Primary Infections in Children. *J Clin Microbiology* 43: 3415-3418.
- Viedma DG, Rodriguez NA, Andrés S, Serrano MJR, Bouza E 2005. Characterization of Clonal Complexity in Tuberculosis by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing. *J Clin Microbiology* 43: 5660-5664.
- Vrioni G, Levidiotou S, Matsiota-Bernard P, Marinis E 2004. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates presenting various drug susceptibility profiles from Greece using three DNA typing methods. *J Infect* 48: 253-262.
- Wang JY, Hsu HL, Yu MC, Chiang CY, Yu FL, Yu CJ, Lee LN, Yang PC, TAMI Group 2011. Mixed infection with Beijing and non-Beijing strains in pulmonary tuberculosis in Taiwan: prevalence, risk factors, and dominant strain. *Clin Microbiol Infect* 17: 1239-1245.
- Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, van Pittius NCG, van Helden PD 2004. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 610-614.
- Who 2011. World Health Organization Report. *Global Tuberculosis Control*, WHO Press, Geneva, Switzerland, 258 pp.