

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

**DIFERENCIAÇÃO DA TUBERCULOSE ATIVA DE OUTRAS
DOENÇAS PULMONARES ATRAVÉS DA EXPRESSÃO
GÊNICA**

LUCAS LAUX DA COSTA

Porto Alegre, Março de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

CELULAR E MOLECULAR

**DIFERENCIAÇÃO DA TUBERCULOSE ATIVA DE OUTRAS
DOENÇAS PULMONARES ATRAVÉS DA EXPRESSÃO
GÊNICA**

LUCAS LAUX DA COSTA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em ciências.

Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Porto Alegre, Março de 2014

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado em seis instituições distintas: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), no Hospital Sanatório Partenon (HSP), na Unidade de Saúde Básica – Restinga (USB Restinga) da Prefeitura Municipal de Porto Alegre, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade da Califórnia – Berkeley (UC Berkeley), Estados Unidos.

Este trabalho teve o financiamento do *International Clinical, Operational, and Health Services Research and Training Award (ICOHRTA Program)*, pelo auxílio com a bolsa *Fogarty International Center/US National Institutes of Health* que financiou custos com passagens, estadias, alimentação e técnicas de biologia molecular durante os nove meses em que desenvolvi essa pesquisa no laboratório do Professor Lee W. Riley na UC Berkeley, Califórnia, Estados Unidos. Este trabalho também teve o auxílio financeiro do HCPA referente ao material de coleta e todos os exames imunológicos por eles processados, teve auxílio financeiro do HSP também por todas as coletas e exames imunológicos por eles processados. E por final, mas não menos importante, esse trabalho teve o auxílio financeiro da FEPPS referente as análises moleculares, compra de kits e confecção de material de altíssima importância para o estudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo. Sem Ele nada seria possível e nem mágico de jeito que sempre é.

À minha orientadora Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti, por todas as oportunidades e por toda a confiança no meu trabalho, e também por me mostrar que desistir muitas vezes é o caminho mais difícil.

À Dra. Elis Regina Dalla Costa, não pelos ensinamentos, que foram muitos, não por toda a ajuda, não por todo tempo que gastamos com esse trabalho, e sim pela amizade, que jamais será esquecida, e sempre será retribuída. Muito obrigado do fundo do meu coração.

À todos os meus colegas do CDCT, por estarem sempre ali para qualquer dúvida, brincadeira, ou até mesmo um simples café. Sim, obrigado à Deus novamente pelo café.

Ao Vico, pela presença ilustre e constante no meu dia a dia, sempre me ajudando e ensinando como encarar os obstáculos que a vida impõe.

À todos os professores e funcionários do PPGBCM da UFRGS, por toda a ajuda e ensinamento. Espero um dia conseguir passar adiante tudo que aprendi durante o tempo que estive aqui.

À Dra. Gisela Unis, Dra. Denise Rossatto e a todos os funcionários do HSP e HCPA, por serem fortes, pela dedicação, e por serem abençoados com o que fazem, sem vocês nada disso teria sido possível. Obrigado pelas vidas salvas diariamente.

À minha família, principalmente aos meus pais, por serem sempre minha inspiração e o meu porto seguro. Eu amo vocês.

À minha namorada e a toda sua família que me acolheu e me aguentou durante esse tempo de trabalho e estresse. Gordinha, FÉRIAS!!! Te amo!

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir)

ÍNDICE

Lista de abreviaturas_____	06
Resumo_____	08
Abstract_____	09
Capítulo 1 – INTRODUÇÃO _____	10
Tuberculose: história e epidemiologia_____	11
Características do bacilo_____	16
Transmissão, sintomas e estágios da doença_____	18
Imunologia_____	21
Diagnóstico e biomarcadores_____	29
Capítulo 2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS _____	37
Capítulo 4 – ARTIGO _____	40
Capítulo 5 – DISCUSSÃO GERAL _____	63
Capítulo 6 – PERSPECTIVAS _____	71
Capítulo 7 – REFERÊNCIAS _____	73
Capítulo 8 – ANEXOS _____	83
Artigo publicado 1	
Artigo publicado 2	
CV Lattes resumido	

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Álcool-ácido
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BRICS	Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul
CD	Células Dendríticas
CÉLULA NK	Células <i>Natural Killers</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>ELISPOT</i>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Spot</i>
EMB	Etambutol
ETH	Etionamida
HIV/SIDA	Vírus da imunodeficiência humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<i>IFN-γ</i>	Interferon-gama
<i>IGRA</i>	<i>Interferon gamma release assay</i>
<i>IL-1</i>	Interleucina 1
<i>IL-10</i>	Interleucina 10
<i>IL-12</i>	Interleucina 12
<i>IL-18</i>	Interleucina 18
<i>IL-23</i>	Interleucina 23
<i>IL-27</i>	Interleucina 27
INH	Isoniazida
T CD4 ⁺	Linfócito T Auxiliar CD4 ⁺
T CD8 ⁺	Linfócito T Citotóxico CD8 ⁺
MGIT	<i>Mycobacterial growth indicator tube</i>

MHCI	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I
MHCII	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido para-amino salicílico
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
PZA	Pirazinamida
RNI	Espécies reativas do Nitrogênio
ROI	Espécies reativas do Oxigênio
STR	Estreptomicina
<i>TGF-β</i>	Fator de transformação do crescimento-beta
TLR	Receptores do Tipo Toll (<i>Toll Like Receptors</i>)
TMC	Células T de Memória Central
TME	Células T de Memória Efetora
<i>TNF-α</i>	Fator de Necrose Tumoral-alfa
ZN	Ziehl–Neelsen

RESUMO

Em uma tentativa de definir uma bioassinatura específica para diagnóstico da tuberculose (TB) pulmonar, esse estudo avaliou os níveis de expressão gênica em pacientes com TB, pneumonia e asma (OPD), e também em pacientes infectados latentemente com *M. tuberculosis*, e em pacientes não infectados com o bacilo. Foram analisados genes alvos específicos previamente testados por Maertzdorf *et al.* (2011) como uma bioassinatura que sugere a diferenciação de casos de TB pulmonar a casos de TB latente: *CD64*, *FCGR1B*, *GZMA*, *GBP5* and *LTF*. Nesse estudo foram realizadas análises estatísticas *randomForest* para calcular a especificidade e a sensibilidade de cada combinação feita entre os genes *CD64*, *GZMA* e *GBP5*, visando discriminar a diferença de expressão gênica entre indivíduos com TB e OPD. Essa bioassinatura nos proporcionou uma especificidade de 92,6% e uma sensibilidade de 95,5% para TB (o reverso para OPD). Os genes *GZMA* e *GBP5* mostraram um poder de discriminação entre os grupos com fator de importância de 18,5 e 26,3, respectivamente para TB, e de 19,2 e 17,4, respectivamente para OPD. O gene *CD64* teve seu fator de importância para TB de 8,5 e para OPD de 3,3. Nosso estudo sugere que a criação de uma ferramenta diagnóstica utilizando a bioassinatura estudada pode ser uma forma de ajudar a área clínica a diferenciar TB de OPD, apoiando a possibilidade de começar a trabalhar em níveis protéicos, com a intenção de criar ferramentas de diagnóstico mais rápidas, acessíveis e precisas, seguindo as recomendações da OMS de reduzir a incidência da TB no mundo.

ABSTRACT

In this study, in an attempt to define a TB-specific biosignature for diagnostics, we evaluated gene expression in TB, pneumonia and asthma patients, as well as healthy donors with latent *M. tuberculosis* infection (LTBI) and healthy non-infected donors (NIDs). We decided to pursue a targeted approach utilizing a specific set of genes previously validated by Maertzdorf *et al.* 2011 as a biosignature to discriminate TB patients and LTBI subjects: *CD64*, *FCGR1B*, *GZMA*, *GBP5* and *LTF*. Random forest analysis was applied to calculate the specificity and sensitivity of each gene combination of *CD64*, *GZMA* and *GBP5* to discriminate between TB and OPD. The combination of the 3 genes gave the highest accuracy in identifying TB and OPD patients. This biosignature gave a specificity of 92.6% and a sensitivity of 95.5% for TB (reverse for OPD). *GZMA* and *GBP5* showed the highest discriminating power with an importance factor of 18.5 and 26.3, respectively for TB, of 19.2 and 17.4, respectively for OPD, versus *CD64* importance of 8.5 for TB and 3.3 for OPD. Our study suggest that the creation of a diagnostic tool using the studied biosignature may be a way to help physician's to differentiate TB from OPD and support the possibility to start to work at protein levels, using this to create faster, cheaper and accurate tools to diagnosis TB and to follow WHO recommendations to reduce global burden of TB incidence worldwide.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Tuberculose: história e epidemiologia

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* descoberto por Robert Koch em 1882 (WHO, 2013). O bacilo de Koch, como assim é chamado, lhe rendeu o premio Nobel em 1905, época em que a doença era um dos maiores problemas de saúde na Europa (Kaufmann *et al.*, 2005). Sugere-se que os membros do Complexo *M. tuberculosis* descendem de um mesmo ancestral de 15 a 20 mil anos atrás (Daniel *et al.*, 2006). Análises de DNA realizadas em múmias egípcias mostraram que a TB é uma doença que vem afetando populações mundiais desde os tempos mais primórdios, matando milhares de pessoas anualmente ao longo dos séculos, onde, devido aos aglomerados populacionais, revoluções, migrações e ao aumento da pobreza, as condições favoráveis à tornaram uma doença epidêmica em meados do século XVI (Donoghue *et al.*, 2004).

Para combater essa epidemia mundial, medidas profiláticas e quimioterápicas foram tomadas, entre elas o desenvolvimento de uma vacina a partir de uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* chamada de BCG, criada por Albert Calmette e Camille Guérin em 1921. Essa vacina foi testada pela primeira vez em uma criança nascida de mãe que estava morrendo por causa da TB e cuidada pela avó que também estava doente. Essa criança sobreviveu sem desenvolver a doença, ficando imune ao bacilo na infância. Tal teste ajudou a imunizar muitas crianças nos séculos seguintes à esta primeira aplicação (Daniel *et al.*, 2006).

Porém, a drástica redução dos números de casos e mortes relacionados a TB foi acontecer somente em 1944 com a introdução da

quimioterapia por STR, desenvolvida por Albert Schatz e Selman Waksman. Dois anos depois Jorgen Lehmann desenvolveu o PAS e logo após a INH, uma das principais drogas referente ao combate da TB, que foi descoberta por três diferentes companhias farmacêuticas, simultaneamente: Hoffman LaRoche, E.R. Squibb & Sons e Beyer. PZA, ETH e EMB foram descobertos em 1952, 1956 e 1961, respectivamente, tornando as décadas de 50 e 60 essenciais para o tratamento da TB, pois tais drogas são utilizadas até hoje para tais fins (Zhang *et al.*, 2005).

A ação quimioterápica dos novos fármacos introduzidos para o controle da TB, a ação profilática da vacina BCG e a invenção do exame de raios-X, em 1895, juntamente com a evolução do quadro de saneamento básico global, reduziram os índices de TB até o final do século XX (Perkins *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007). Em 1993, a OMS considerou a TB uma emergência global devido ao aumento no número de casos em todo mundo (Taylor *et al.*, 2003; WHO, 2013). O fato da reemergência da TB no final do século XX trouxe a tona as principais causas do aumento do número de casos, entre eles: aumento da resistência aos agentes quimioterápicos utilizados para o tratamento da TB, epidemia do vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/SIDA), aumento da migração global, aglomerações populacionais (como hospitais, prisões, favelas e abrigos), aumento no número de pessoas que utilizam drogas injetáveis e deterioração dos sistemas de saúde (Ducati *et al.*, 2006).

No ano de 2012 estima-se que 8,6 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1.3 milhões de pessoas morreram por causa dela, sendo que, das pessoas que morreram, 320 mil eram portadoras do vírus HIV/AIDS (**Figura**

1) (WHO, 2013). Dentre todos os casos de TB no mundo, o Brasil encontra-se entre os 22 países responsáveis por 80% destes casos, sendo que, ele também está englobado no seleto grupo dos 5 países responsáveis por 50% de todos os casos no mundo. Tal grupo se chama BRICS, e ele é uma das maiores preocupações da OMS para atingir as metas de 2015, que baseiam-se em reduzir pela metade as taxas de incidência, mortalidade e prevalência da doença. Essa meta também visa aumentar as taxas de detecção de novos casos e tratamentos completados com sucesso (WHO, 2013).

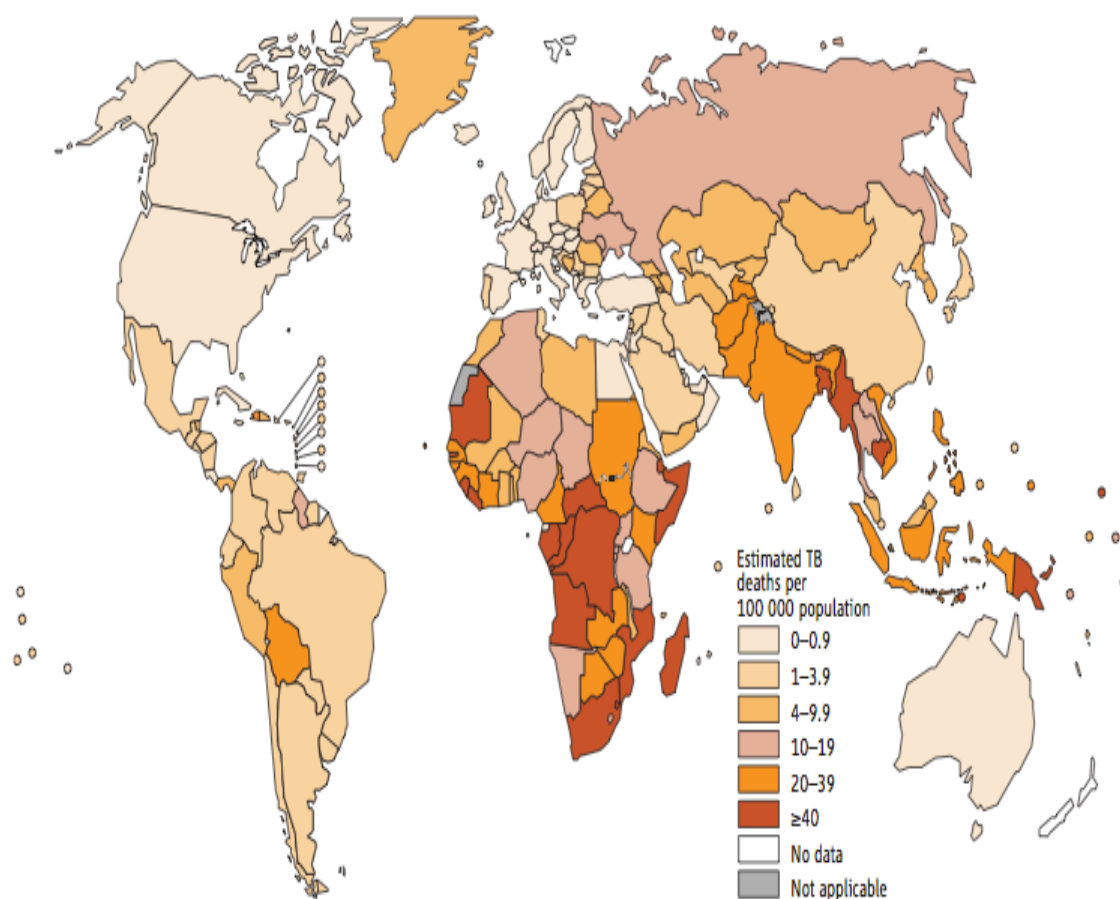


Figura 1. Estimativa de mortes no mundo causadas pela TB a cada 100 mil habitantes em 2012.

(Adaptado de WHO, 2013)

O fato da TB ser uma doença reemergente, em países como os Estados Unidos e países da Europa, não condiz com a sua situação no Brasil, que nunca deixou de ter a TB como um problema presente desde muito tempo (Ruffino-Netto, 2002).

O Brasil, em 2012, apresentou 70 mil novos casos de TB, com uma incidência de, aproximadamente, 36 casos a cada 100 mil habitantes. Conforme podemos enxergar na **Figura 2**, a taxa de incidência no Brasil vem caindo com o passar dos anos, porém não o suficiente para tirar-lhe a 17^a posição entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos de TB no mundo (BRASIL, 2012). A TB se enquadra no Brasil como uma de suas principais doenças infectocontagiosas, ocupando o 4^o lugar no número de mortes entre pessoas não infectadas pelo vírus HIV/SIDA, e o 1^o lugar no número de mortes entre pessoas infectadas pelo vírus HIV/SIDA (SVS, 2010).

Por 100.000 hab.

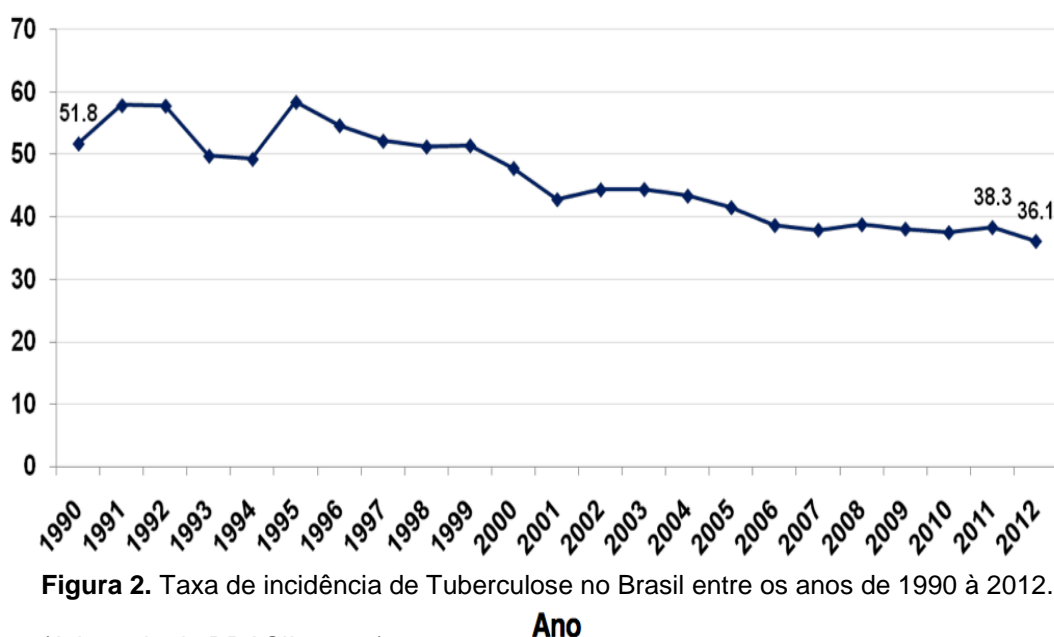


Figura 2. Taxa de incidência de Tuberculose no Brasil entre os anos de 1990 à 2012.

(Adaptado de BRASIL, 2012)

No ano de 2012, o estado do Rio Grande do Sul (RS) teve mais de 6,5 mil casos de TB (**Figura 3**), sendo que destes, aproximadamente 6 mil eram novos casos, obtendo uma taxa de incidência de 46 casos a cada 100 mil habitantes. A taxa de coinfeção entre pacientes TB/HIV no estado do RS é o dobro da taxa nos demais estados brasileiros, atingindo um índice em que 23% dos casos de TB são relacionados a coinfeção. O RS também tem a capital brasileira com a maior taxa de incidência de TB (BRASIL, 2012).

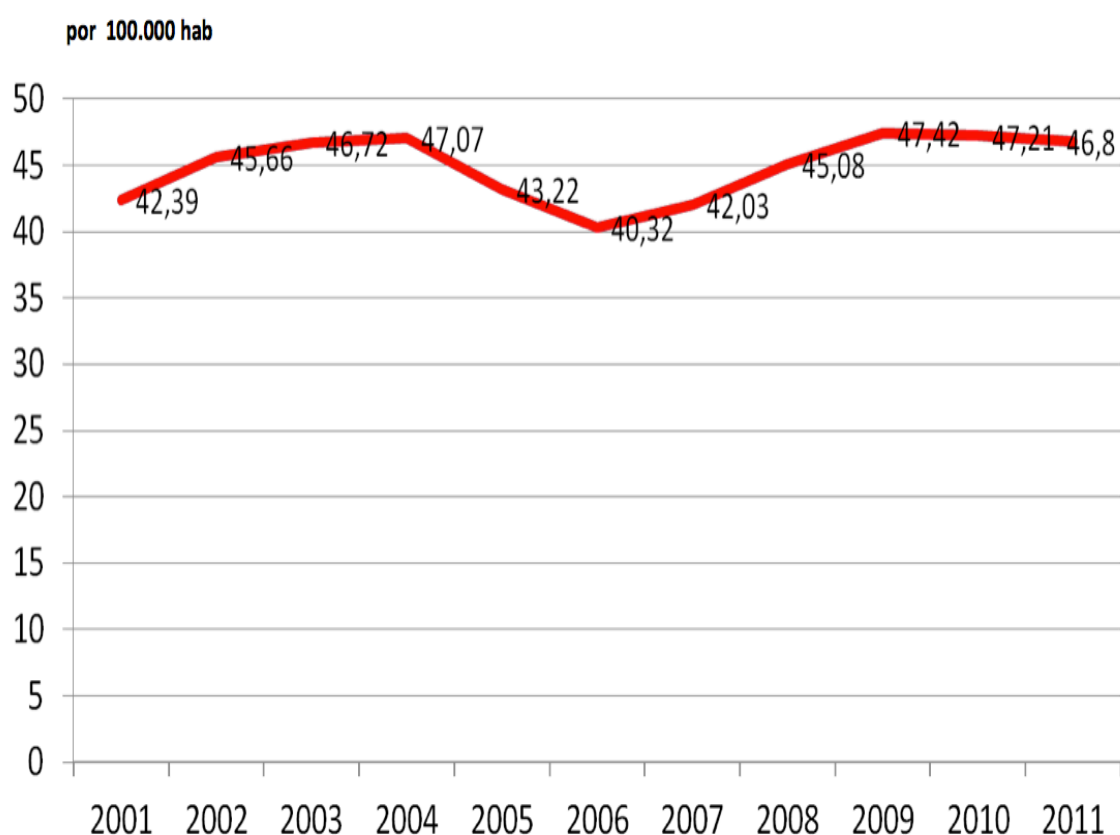


Figura 3. Taxa de incidência de Tuberculose no Rio Grande do Sul entre os anos de 2001 à 2011.

(Adaptado de BRASIL, 2012)

Porto Alegre é a capital brasileira com maior taxa de incidência da doença, registrando aproximadamente 111 casos por 100 mil habitantes (**Figura 4**), é também a cidade de maior coinfeção tuberculose e HIV no país, onde um em cada três pacientes com tuberculose é também soropositivo para HIV (Brasil, 2012).

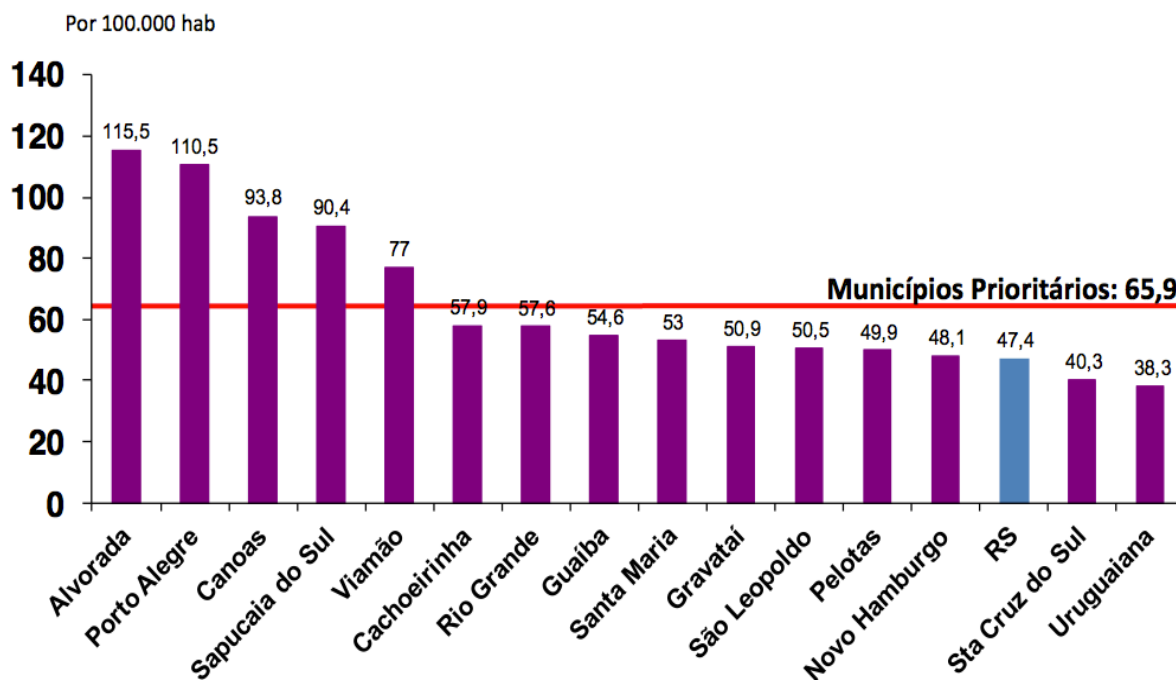


Figura 4. Taxa de incidência de TB por municípios prioritários do estado do RS no ano de 2011.

(BRASIL, 2012)

Características do Bacilo

As micobactérias pertencem à ordem Actinomycetales e a família Mycobacteriaceae, que possui um único gênero, denominado *Mycobacterium*. O gênero *Mycobacterium* inclui um conjunto de espécies patogênicas que causam doenças altamente infecciosas, dentre elas a TB e a hanseníase (Gagneux, 2013).

O complexo *M. tuberculosis* é composto por: *M. tuberculosis*, o agente etiológico responsável pela maioria dos casos de TB em humanos; *M. africanum* e *M. canettii*, causadores de TB em humano em algumas regiões da África; *M. microti*, patógeno de roedores, geralmente isolados de ratos silvestres; *M. bovis*, apresenta o mais amplo espectro de infecção do hospedeiro, afetando desde os seres humanos a bovinos e caprinos domésticos ou selvagens, e o BCG, uma variante atenuada de *M. bovis*; *M.*

caprae, isolado em ovinos e caprinos; e *M. pinnipedii*, infecta focas e leões marinhos (Gagneux, 2013).

Os bacilos apresentam-se em formato bacilar reto ou levemente curvado, e, algumas vezes na forma cocobacilar ou filamentoso de acordo com a espécie. São bacilos imóveis, não esporulados, aeróbios ou microaerófilos, tendo como sua principal característica a capacidade de resistir à descoloração quando tratados com álcool-ácido (Kato-Maeda *et al.*, 2011). As bactérias que compõem este gênero, apesar de serem diferentes em relação à morfologia das colônias e às propriedades bioquímicas, possuem características taxonômicas comuns, como presença de ácidos micólicos de alto peso molecular (60 a 90 carbonos) em sua parede celular (Dos Vultos *et al.*, 2008).

Estas micobactérias apresentam altos percentuais de Guanina e Citosina (de 61% a 71%) o que indica provável ausência de transferência horizontal de genes envolvidos com a patogenicidade, além de 99,9% de homologia em seu DNA e semelhança na sequência de RNA ribossomal (rRNA), com exceção do *Mycobacterium canettii*, diferenciando-se somente em termos de tropismos por hospedeiros, fenótipos e patogenicidade. (Barrera *et al.*, 2007; Brosch *et al.*, 2002). A micobactéria também sintetiza uma parede celular de baixa permeabilidade que contribui para a sua resistência contra alguns agentes terapêuticos (Brennan *et al.*, 1995). O complexo *M. tuberculosis* pode ser diferenciado de outras micobactérias através de suas sequências genéticas específicas como a *IS6110*, *IS1081* e *mpb70*. Fenotipicamente podem ser diferenciados por características como a ausência de pigmentação de suas colônias, catalase termoestável e

arilsulfatas, ausência de crescimento a 45°C, ausência de crescimento na presença de 0,5g/mL de p-nitrobenzoato e 5% de cloreto de sódio (Morita *et al.*, 2004).

Transmissão, sintomas e estágios da doença

A tuberculose, doença infectocontagiosa, causada pelo bacilo *M. tuberculosis*, em 85% dos seus casos se desenvolve na forma pulmonar e em 15% na forma extra pulmonar, acometendo ossos, pleura, órgãos e demais tecidos. A transmissão da TB se dá, principalmente, de pessoa a pessoa, onde um paciente com a doença ativa, através da tosse, libera partículas, vindas do pulmão cronicamente infectado, no ar. Essas partículas, que no seu interior abrigam núcleos, chamados núcleos de Wells, com diâmetros de até 5µm contendo de 1 a 2 bacilos no seu interior, são capazes de permanecer em suspensão no ar por várias horas, o que caracteriza a TB como uma doença altamente contagiosa, podendo atingir os alvéolos e bronquíolos pulmonares e iniciarem a multiplicação com facilidade (Ducati *et al.*, 2006). O aumento da transmissão muitas vezes se dá pelo aparecimento da doença cavitária, onde uma lesão necrótica granulomatosa que causa erosão dos brônquios, expelindo milhões de bactérias nas vias aéreas (Flynn *et al.*, 2005).

A infecção causada pelo bacilo *M. tuberculosis* produz processos patológicos e inflamatórios típicos, como febre, perda de peso, dores no peito, suores noturnos, fraqueza, tosse e insuficiência respiratória (Bloom *et al.*, 1992).

A TB tem uma relação direta com a miséria e com a exclusão social, sendo uma doença que ocorre em sua grande maioria em classes socioeconomicamente desfavorecidas, sendo que a possibilidade de uma pessoa ser infectada pelo bacilo é inerente a diversos fatores como: características das fontes de infecção e seus contactantes próximos (pessoas que coabitam com o doente); a concentração de bacilos no ar, determinada pela ventilação e volume do ambiente; a condição e o quão imunocomprometida a pessoa vai estar no momento da exposição e ao tempo de exposição ao bacilo (BRASIL, 2012).

O bacilo, após penetrar nas vias aéreas inferiores e percorrer o seu caminho até o pulmão, tem quatro diferentes destinos (van Crevel *et al.*, 2003):

- A morte e eliminação do bacilo pela resposta imunológica inata do hospedeiro, onde o hospedeiro não irá desenvolver a infecção por causa desse evento e não apresentará nenhuma evidência clínica ou imunológica dessa interação;
- Imediatamente após a infecção, o bacilo consegue crescer e se multiplicar, gerando assim a doença ativa, com todos os sinais e sintomas clínicos característicos da infecção;
- Desenvolvimento da infecção latente, onde o bacilo permanece na forma quiescente, sem nenhuma manifestação clínica. A bactéria pode permanecer em um estado dormente ou, pode persistir em um pequeno número, impedida de se replicar pelo sistema imune, sem chance nenhuma de causar a doença ativa. Essa forma só é confirmada por resultados positivos em testes

específicos como o Teste de Mantoux ou pelo Teste de Detecção do Interferon Gama [IGRA];

- A reativação do bacilo que estava adormecido ou a sua fuga da resposta imune do hospedeiro, onde ele abandona a fase quiescente e desenvolve a doença ativa, ou seja, a reativação da TB;

Os estágios da infecção por *M. tuberculosis* são bem distintos um do outro. O estágio de latência do bacilo, a chamada, TB latente, ocorre quando a pessoa está infectada com a micobactéria causadora da TB, porém, não desenvolve nenhum sintoma da doença, ou seja, os bacilos se encontram em um estado de dormência metabólica, abrigando-se no interior do macrófago, aonde podem sobreviver durante anos, sem se manifestar (Smith, 2003). A capacidade que o bacilo *M. tuberculosis* tem de entrar em períodos de latência, com atividade metabólica limitada, dificulta a ação dos antimicrobianos e contribui para a natureza crônica da doença, o que impõe um longo regime de tratamento aos pacientes infectados (Coll, 2003). O segundo estágio da infecção é conhecido como doença ativa, onde o bacilo consegue escapar e resistir à resposta imune do hospedeiro, multiplicando-se dentro do seu organismo e gerando toda a sintomatologia previamente descrita, acometendo pulmões e outros órgãos dependendo do tipo de infecção que está se estabelecendo (Walzl *et al.*, 2011).

A maioria dos indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* desenvolve a infecção latente, gerando um enorme reservatório que representa a principal fonte de casos novos de TB. Uma pessoa infectada latentemente tem de 5-10% de chance de desenvolver a doença ativa durante toda a sua vida,

porém, se ela estiver ou for infectada pelo vírus HIV essa proporção passa para 5-10% ao ano. A coinfeção pelo HIV é um fator que aumenta a taxa de manifestação da TB, assim como a virulência da cepa de *M. tuberculosis*, o status do hospedeiro em relação a sua genética, nutrição, vacinação e estado de saúde, e fatores ambientais como outros tipos de coinfeção, também aumentam a taxa de manifestação da doença (Ottenhoff *et al.*, 2009).

Imunologia

Após serem inalados, os bacilos passam pelo trato respiratório inferior e se depositam nos espaços alveolares sendo fagocitados por células polimorfonucleares, presentes no parênquima pulmonar (Mihret, 2012). A maioria dos indivíduos tem a capacidade de gerar uma resposta imune eficiente contra o *M. tuberculosis*, tornando-os resistentes a infecção. O curso da doença é determinado pelo tipo de resposta imune que o hospedeiro vai ter contra a micobactéria, onde indivíduos imunocompetentes tem até 5% de chance de desenvolver a infecção em até dois anos, e, em outros 5% a ativação pode acontecer mais tardiamente, ou nunca acontecer (Small *et al.*, 2010). A eficácia desses acontecimentos depende de vários fatores, como a capacidade bactericida intrínseca dos macrófagos, as características patogênicas do bacilo inalado e o ambiente inflamatório instalado no sítio da infecção, ou seja, o quão bem, imunologicamente, o hospedeiro vai estar no momento da infecção (Kaufmann, 2001).

No organismo humano, o controle da TB se dá por diversos eventos, que incluem a produção de citocinas bactericidas como o *IFN-γ* e o *TNF-α*, a liberação de ROI e RNI, e a lise das micobactérias no fagolisossomo

(Almeida *et al.*, 2005; Kaufmann, 2001). Todos esses eventos são mediados, principalmente, por macrófagos, CD, linfócitos B e linfócitos T. Os macrófagos e as CD após fagocitarem os bacilos do *M. tuberculosis* migram em direção ao linfonodo regional, através do sistema linfático, formando o complexo de Ghon (Almeida *et al.*, 2005; Kaufmann *et al.*, 2005). Junto com essa migração, os macrófagos e CD penetram no parênquima pulmonar, sinalizando a infecção para outros macrófagos e CD, que migram até o pulmão para ajudar no combate aos bacilos, caracterizando um processo inflamatório. A fagocitose do *M. tuberculosis* por estas células representa a ativação dos primeiros mecanismos de defesa da resposta inata, e também o início da ativação da resposta imune adaptativa (Kaufmann *et al.*, 2005; Tailleux *et al.*, 2003).

Após serem fagocitados, os bacilos que foram inalados ficam presos nos vacúolos citoplasmáticos das células fagocíticas e são apresentados, via MHCII, que está presente nos macrófagos, CD e linfócitos B, para os linfócitos T CD4⁺. As células responsáveis pela apresentação dos bacilos aos linfócitos T CD4⁺ são chamadas de APCs que tem como principal função o recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o foco da infecção, através da produção de citocinas inflamatórias como o *TNF- α* e a *IL-1*. A apresentação dos antígenos aos linfócitos T CD4⁺ é de principal importância para o controle da infecção, o que pode ser provado pela pandemia do vírus HIV. A diminuição no número e a perda da função dos linfócitos T CD4⁺ resultam na progressão da infecção primária, reativação do *M. tuberculosis* latente e aumento da suscetibilidade à reinfecção. Além disso, animais que não expressam o gene para o co-receptor CD4 ou não expressam moléculas do

MHCII foram todos altamente susceptíveis à infecção pelo bacilo (Caruso *et al.*, 1999; Repique *et al.*, 2003).

Contudo, os linfócitos T CD8⁺ também participam na resposta imune ao *M. tuberculosis*. Essas células, reconhecem antígenos provenientes do citoplasma, sendo capazes de reconhecer fragmentos peptídicos ligados ao MHCI, molécula expressa em praticamente todas as células diferenciadas e, ou, maduras do organismo (Winau *et al.*, 2006). As células T CD8⁺ podem ser estimuladas por vesículas apoptóticas, que contem o antígeno do bacilo associado ao MHCI, decorrentes de células infectadas, ou, podem ser estimuladas devido a apresentação cruzada, onde a interação do fagossomo com o retículo endoplasmático faz com que os antígenos dos patógenos tenham uma ligação direta com o MHCI (North *et al.*, 2004).

Entre outros tipos específicos de células T, estão as células T de memória, que conferem proteção imediata aos casos de reencontros com o antígeno, gerando uma resposta mais rápida e efetiva quando comparada com a resposta das células T *naive*, ou seja, células que ainda não encontraram um antígeno. Essas células T se dividem em células TME, que circulam na corrente sanguínea quando não há mais a presença da infecção bacteriana, e células TMC, que podem sobreviver por toda a vida do indivíduo sendo que, para alguns, sem a função de proteção (Walzl *et al.*, 2011).

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias da resposta imune inata a chegar ao sítio da infecção, seguidas das células NK, que são responsáveis pela destruição dos macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis*, ativação de mais células fagocíticas no foco da infecção, e destruição direta dos bacilos, e dos macrófagos, provenientes dos monócitos

da corrente sanguínea (North *et al.*, 2004). Essas células conseguem reconhecer os bacilos que invadiram o organismo via receptores de reconhecimento específicos, como receptores para a porção Fc de anticorpos, receptores de manose, receptores para produtos de ativação do sistema complemento, como C3b e C4b, entre outros (North *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 1995). Além dos receptores expressos por estas células, os macrófagos e as CD também expressam receptores responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à microbactéria, os receptores de reconhecimento de padrões. Uma das principais famílias desses receptores, a família dos TLR (Akira *et al.*, 2001).

Uma das principais funções dos TLR é a indução da secreção de moléculas pró-inflamatórias como *IL-12*, *TNF- α* e quimiocinas. Essa indução ocorre, pois alguns componentes estruturais do *M. tuberculosis* interagem com os TLR, o que vai desencadear a ativação da resposta imune, gerando uma sinalização intracelular que transloca o fator de transcrição NF- κ B para o núcleo (Quesniaux *et al.*, 2004). Dentre os vários TLR existentes, alguns são os que mais se destacam na interação com o *M. tuberculosis*, como o TLR2 e o TLR4 que interagem com a lipoarabinomana presente no envelope da micobactéria, estimulando as CD a secretarem *IL-12*. O TLR9 também tem um papel muito importante na interação com o bacilo, pois tal interação ajuda a ativar CD derivadas de precursores da medula óssea, o que gera a produção de altas concentrações de *IL-12*, que mantêm a ativação e a proliferação de linfócitos, o que induz a resposta celular predominantemente pró-inflamatória. Além disso, *IL-12* também está relacionado ao aumento da produção de *IFN- γ* em células NK, e ajuda na expansão de células Th1

antígeno específicas. Outras citocinas como *IL-18*, *IL-23* e *IL-27* também são importantes indutoras da produção de *IFN-γ*. A ação em conjunto dos TLR2 e TLR9 pode ajudar a aumentar a resistência do hospedeira perante a infecção por *M. tuberculosis* (Stenger *et al.*, 2002; Pompei *et al.*, 2007)

O *IFN-γ* é a principal e mais potente citocina para ativar os macrófagos frente ao bacilo do *M. tuberculosis* (Salgame, 2005). As diversas funções desencadeadas pelo aumento da produção do *IFN-γ* são cruciais para o combate ao patógeno, pois, elas ajudam a induzir o aumento da expressão de MHC, ou seja, aumento na apresentação de antígenos, elas são capazes de incrementar a expressão de diversos genes no macrófago, recrutar linfócitos T que participam da destruição bacteriana, e participam na produção de ROI e RNI (North *et al.*, 2004; Ottenhoff *et al.*, 2005). A ação isolada do *IFN-γ* não é suficiente para controlar a infecção por *M. tuberculosis*. Entretanto, o *IFN-γ* representa um elemento decisivo no controle da tuberculose, além de também estimular os macrófagos a liberarem *TNF-α* que, por sua vez, é importante para a formação do granuloma e para o controle da extensão da infecção (Chan *et al.*, 2004). A importância do *TNF-α* foi demonstrada pelo risco substancialmente aumentado da progressão para a doença ativa, incluindo a doença extrapulmonar e disseminada, apresentada por pacientes latentes tratados com Infliximabe, um agente anti-*TNF* para doenças reumatológicas e imunológicas (Keane *et al.*, 2001).

A latência tende a ser um dos maiores obstáculos para a erradicação da tuberculose, devido ao fato da micobactéria ter diversos mecanismos de escape quando dentro do organismo do hospedeiro. A produção de ESAT-6, molécula produzida pelo *M. tuberculosis*, é capaz de inibir a secreção de *IL-*

12 e *IFN-γ*, que tende a impedir a apoptose de macrófagos infectados e, impedir a fusão do fagócito com o lisossomo, o que vai favorecer a sobrevivência e a multiplicação dos bacilos dentro da célula fagocítica (Almeida *et al.*, 2005). A interação da lipoproteína 19KDa e outros derivados lipídicos da micobactéria, com a TLR2, que é um receptor de superfície celular nos fagócitos e outras células que é capaz de reconhecer estruturas microbianas, aumenta a produção de *IL-10* e *TGF-β*, citocinas supressoras da imunidade celular, que fazem com que o organismo tenda a diminuir a resposta inflamatória, o que contribui para a formação do granuloma (Walzl *et al.*, 2011).

O granuloma é uma estrutura característica de infecções crônicas como a TB, e ele é formado a partir da interação dos diferentes tipos de linfócitos com os macrófagos, decorrente da indução da resposta inflamatória. O acúmulo de células polimorfonucleares gera dentro do granuloma uma estrutura organizada, onde os macrófagos infectados localizam-se no centro da estrutura, e os linfócitos na parte periférica dela, formando uma camada. O interior do granuloma também apresenta um aglomerado de células gigantes, que não se sabe sua função específica, além de ocupar os espaços vazios dentro da área do granuloma. Essa organização, produzida, principalmente, pela liberação de citocinas como *IFN-γ* e *TNF-α*, tem como objetivo principal a interação entre os linfócitos com os macrófagos infectados, visando uma defesa antimicrobiana efetiva (Walzl *et al.*, 2011). Além de visar uma defesa antimicrobiana específica, o granuloma também serve para limitar o ambiente tóxico, formado pela liberação de ROI e RNI para o combate ao bacilo, o que vai proteger os

tecidos alveolares nas proximidades, e também serve para conter a disseminação da bactéria dentro do pulmão, ou seja, dentro de granulomas existe um balanço entre sobrevivência e morte dos bacilos (Saunders *et al.*, 2007).

O granuloma, também pode prejudicar os tecidos pulmonares, destruindo tecidos adjacentes e necrosando a região central de onde ele fica situado, o que pode acarretar em perda funcional com formação de cavidades (Saunders *et al.*, 2007). Porém, o granuloma não é apenas uma simples barreira para conter o bacilo, ele pode servir como um órgão linfoide terciário, onde linfócitos T ativados entram e saem constantemente. Em relação também a imunidade humoral, os linfócitos B estão presentes em grande número no granuloma, e a sua presença é de grande importância, pois animais que tem deficiência na produção dessas células recrutam menos linfócitos T para o pulmão, o que não os deixa mais susceptíveis a infecção, porém deixa claro que os linfócitos B são de extrema importância para a formação do granuloma e recrutamento celular (Davis *et al.*, 2008).

Na **Figura 5** estão esquematizados os componentes existentes dentro do granuloma, juntamente com todos os desfechos possíveis, indicando todas as fases da infecção, causados pelo tratamento *M. tuberculosis*.

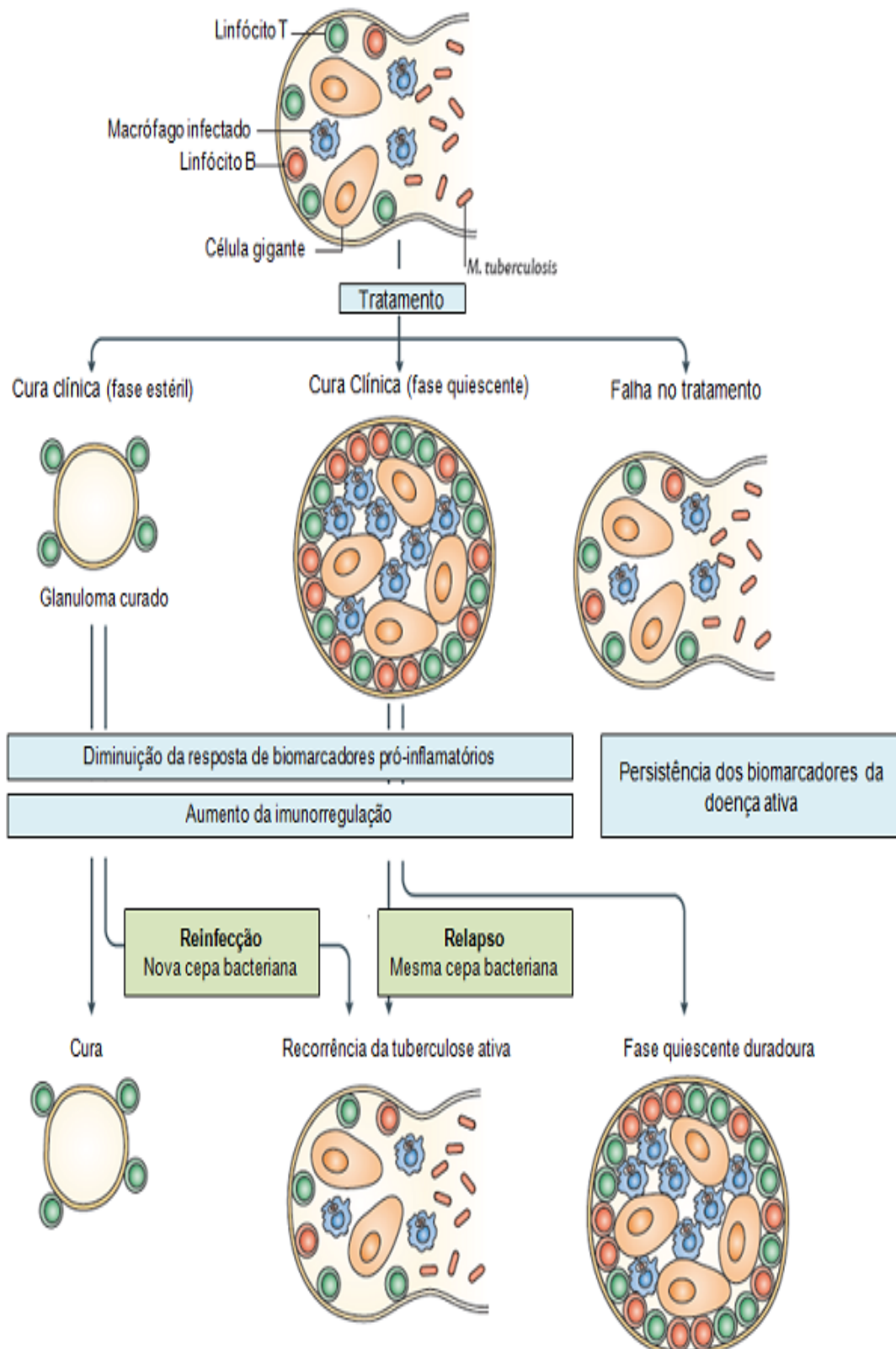


Figura 5. Esquema de todos os desfechos que podem ocorrer com o granuloma durante a resposta imune ao tratamento do patógeno *M. tuberculosis*. (Figura adaptada de Walzl *et al.*, 2011)

Diagnóstico e biomarcadores

Um diagnóstico precoce, tratamento efetivo das diversas formas de TB e o aperfeiçoamento das vacinas contra a doença são essenciais para a erradicação da doença. A baixa eficiência da atual vacina contra TB, a BCG, ainda é um ponto fraco na luta contra a erradicação, pois vários estudos epidemiológicos mundiais demonstraram que a eficiência dessa vacina pode girar de 0 a 80% em casos de TB pulmonar (WHO, 2013). A existência de coinfeções, exposição a micobactérias do meio ambiente, variação genética entre populações e também nas cepas utilizadas, e diferenças nutricionais dos indivíduos vacinados são as principais causas da baixa eficiência da BCG (Kauffman *et al.*, 2005). Sobretudo, é importante enfatizar que mesmo tendo uma baixa eficiência, a vacinação continua sendo recomendada em neonatos, mesmo em áreas com baixa prevalência de TB, onde a vacinação ajuda na prevenção de meningite, com exceção de crianças portadoras do vírus HIV, e que, mesmo que uma nova vacina seja desenvolvida para o controle da TB, ela não vai ser capaz de prevenir que os mais que 2 bilhões de indivíduos previamente infectados pelo bacilo *M. tuberculosis* progridam para a doença ativa, o que traz a tona a ideia de desenvolver novos métodos para diagnóstico e tratamento da doença nas próximas décadas (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2004; WHO, 2013).

A baciloscopia, ou seja, técnica de coloração específica ZN baseada na coloração a quente da fucsina fenicada, seguido da descoloração com AA, onde somente as micobactérias adquirem uma coloração vermelha por serem AA resistentes, é o principal método de pesquisa de bacilos no escarro e é um método prioritário de diagnóstico e controle da doença ativa, pois após o

desenvolvimento da infecção, o escarro começa a ser produzido com o aumento da necrose no tecido pulmonar e com o aumento da inflamação. O ZN também é um teste barato e simples, sendo uma técnica de fácil acesso nos laboratórios ao redor do mundo. Apesar das suas diversas qualidades, a baciloscopia ainda é uma técnica pouco sensível, tendo uma sensibilidade de 30-60%, com muitos resultados negativos, pois essa técnica exige que o paciente tenha pelo menos 5 mil bacilos/mL de escarro para detectar um resultado positivo (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2004).

A técnica de cultura do escarro, que tem como vantagem permitir a detecção e o isolamento da micobactéria, é geralmente utilizada quando a baciloscopia for negativa e o paciente ainda estiver com suspeita de TB pulmonar. Com essa técnica, o escarro é semeado em meios como o Löwenstein-Jensen (meio sólido à base de ovo), e o Middlebrook (sólido ou líquido, à base de ágar), e é capaz de se distinguir espécies, complexos isolado e sensibilidade a fármacos quimioterápicos para TB. Contudo, apesar de ser considerada padrão ouro para diagnóstico de TB pulmonar, a cultura microbiológica continua sendo um processo muito demorado devido ao tempo de crescimento do bacilo, que gira em torno de 15-20h, e também porque tal método requer condições adequadas de biossegurança e técnicos mais especializados para lidar com o procedimento, dificultando o emprego dessa técnica em muitos laboratórios do mundo, sendo que esse método também não apresenta 100% de positividade (Frieden *et al.*, 2003). Além da cultura, outras técnicas automatizadas, tais como o MGIT, BACTEC 460 TB[®] e o BACTEC 9000[®], baseadas no enriquecimento dos meios de cultura para promover um crescimento mais rápido da micobactéria, são bastante

promissoras, porém ainda tem um alto índice de resultados falso-positivos devido a contaminação cruzada por outras bactérias (WHO, 2013).

Dentre as demais técnicas existentes para auxiliar no diagnóstico da TB, a radiografia de tórax é a mais utilizada em pacientes paucibacilares sintomáticos, em pacientes com suspeita de TB extrapulmonar e em familiares de pacientes com TB pulmonar. Essa técnica, baseada no encontro de opacidades radiológicas características da TB, é muito empregada devido a sua agilidade, onde o resultado fica pronto de imediato, não exigindo que o paciente tenha que voltar ao hospital para saber o resultado do exame. Porém, mesmo sendo uma técnica rápida, ela tem diversos limitantes, pois precisa de equipamento e ambiente específicos para sua aplicação, necessitando de técnicos treinados para a realização do exame e também, ela não é um exame altamente específico para a TB. As lesões pulmonares encontradas nele podem ser confundidas com opacidades características de outras doenças pulmonares, como a pneumonia, ou em caso de uma reinfecção, as lesões anteriores, provenientes da primeira infecção pelo *M. tuberculosis*, podem atrapalhar no futuro diagnóstico da TB (Sahin *et al.*, 2013).

Uma das principais armas utilizadas até hoje para o diagnóstico da infecção sem a doença ativa, e também para a triagem e acompanhamento de pacientes latentemente infectados pelo bacilo *M. tuberculosis*, é o teste de Mantoux, que tem como princípio a inoculação da proteína PPD intradérmica, fazendo com que haja um acúmulo de células inflamatórias no sítio da inoculação de 24h até 72h após a aplicação. Desenvolvido originalmente em 1890 por Robert Koch, o teste de Mantoux tem seus valores de referência

estabelecidos pela OMS, onde, nos dias de hoje, pacientes com um endurecimento local maior que 5mm são considerados latentemente infectados pelo bacilo *M. tuberculosis* (WHO, 2013). Apesar de ser um dos testes mais antigos já desenvolvidos para o diagnóstico da TB, o teste de Mantoux tem limitações quando tratamos de sensibilidade e especificidade, onde de 10-25% dos pacientes com a doença ativa não reagem ao PPD, e, tal reação tende a variar muito em diferentes áreas geográficas, podendo também não ser reativa em pacientes imunocomprometidos, ou anérgicos à proteína (Andersen *et al.*, 2000). O teste de Mantoux também, em alguns casos, não é reagente em neonatos, e não consegue distinguir pacientes recém vacinados com a BCG, ou pacientes infectados com outras micobactérias do meio ambiente, tendo resultados falso-positivos por reação cruzada (WHO, 2013).

A carência de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos para a TB, e o fato do PPD continuar sendo utilizado mesmo tendo tantas limitações, evidencia a necessidade do uso de ferramentas imunológicas que supram a carência de um método de diagnóstico rápido, menos oneroso e com alta sensibilidade e especificidade (Walzl *et al.*, 2011). Testes baseados na quantificação dos níveis de *IFN- γ* , como o *ELISPOT* e o QuantiFERON-Gold[®] [*IGRA*], porém tais testes ainda tem limitações quanto ao prognóstico de progressão da TB latente para a TB ativa, e também quanto ao diagnóstico da TB ativa, uma vez que nenhum deles tem valores de referência que acusem essa fase da doença, além de ambos serem caros e necessitarem de no mínimo 12h para o processamento das amostras, e de materiais e ambientes específicos para o seu processamento (Pai *et al.*,

2004; Ulrichs *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

A ideia de trabalhar com um teste que auxilie a prever a progressão da infecção latente para a doença ativa, determine rapidamente o diagnóstico da doença ativa e possa distinguir a TB de outras doenças pulmonares é o que mais tem impulsionado a busca de biomarcadores específicos como ferramenta de diagnóstico para a TB (O'Garra *et al.*, 2013).

Um biomarcador ideal para o diagnóstico da TB deve (Walzl *et al.*, 2011):

- Claramente diferenciar a TB ativa da infecção latente pelo bacilo *M. tuberculosis*;
- Retornar a níveis normais durante o tratamento da doença ativa;
- Reproduzir e prever os desfechos clínicos da doença, como cura, risco de relapso ou erradicação da infecção por *M. tuberculosis* em diferentes populações de pacientes;
- Prever a eficácia da vacinação por BCG, ou por outras vacinas que podem ser futuramente desenvolvidas;
- Disponibilizar informações-chaves para o diagnóstico clínico da doença;
- Diferenciar a TB ativa de outras doenças pulmonares e de pacientes saudáveis;

Recentemente, diversos pesquisadores estão averiguando os melhores biomarcadores para suprir tais necessidades (**Tabela 1.**), correlacionando diferentes estágios da doença, estágios do tratamento,

grupos étnicos, doenças pulmonares, bioassinaturas, técnicas laboratoriais e metodologias de estudo, para, assim, desenvolver novas ferramentas metodológicas que supram as carências do diagnóstico da TB. Ainda não há uma seleção de biomarcadores que possam suprir essas necessidades, porém já há grupos de pesquisa com vários estudos publicados que demonstraram resultados com um excelente potencial para tornarem-se ferramentas de detecção para o diagnóstico da TB (Jacobsen *et al.*, 2007; Thuong *et al.*, 2008; Maertzdorf *et al.*, 2011; Walzl *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011; Maertzdorf *et al.*, 2012; O'Garra *et al.*, 2013).

<u>Símbolo do Gene</u>	<u>Número de acesso no GeneBank</u>	<u>Sumario do Gene</u>	<u>Localização Subcelular</u>	<u>Referência</u>
CD64A	NM_000566	Específico de monócitos/macrófagos é um receptor de elevada afinidade para a região Fc de imunoglobulinas gama. Função em ambas as respostas imune inata e adaptativa.	- Membrana Celular	- Maertzdorf <i>et al.</i> , 2011 - Jacobsen <i>et al.</i> , 2007
CD64B	NM_001004340	Regulado pelo IFN-gama, podem ligar-se com a região Fc de imunoglobulinas gama com uma baixa afinidade em comparação com <i>CD64A</i> e também pode funcionar na resposta imunológica humoral.	- Membrana Celular	- Maertzdorf <i>et al.</i> , 2011
GBP5	NM_052942	Indução por <i>INF-gama</i> durante a ativação dos macrófagos, ajuda a estimulação do conjunto inflamatório <i>NLRP3</i> após desafio bacteriano.	- Citoplasma - Membrana Celular - Âncora Lipídica	- Maertzdorf <i>et al.</i> , 2011
GZMA	NM_006144	Necessário para a lise das células alvo nas respostas imunes mediadas por células, e também está envolvida na apoptose e hidrólise de proteínas, incluindo a fibronectina, o colágeno tipo IV e nucleolina.	- Grânulos Citoplasmáticos - Secretado	- Maertzdorf <i>et al.</i> , 2011
LTF	NM_002343	Ligação ao ferro em leite e secreções corporais com atividade antimicrobiana, tornando-se um componente importante do sistema imunológico não específico.	- Núcleo - Citoplasma - Secretado	- Maertzdorf <i>et al.</i> , 2011
CXCL10	NM_001565	A ligação a proteína <i>CXCR3</i> resulta em efeitos pleiotrópicos, incluindo a estimulação de monócitos, células natural killer e migração de células T.	- Secretado	- Whittaker <i>et al.</i> , 2008 - Lighter <i>et al.</i> , 2009
CXCL9	NM_002416	Induzido por <i>INF-gama</i> e <i>TNF-alfa</i> , afeta o crescimento, movimento, ou estado de ativação das células que participam da resposta imune e inflamatória.	- Secretado	- Alessandri <i>et al.</i> , 2006 - Hasan <i>et al.</i> , 2009
CCL1	NM_002981	Esta citocina é secretada por células T ativadas e exibe atividade quimiotática para monócitos/macrófagos.	- Secretado	- Thuong <i>et al.</i> , 2008
IL-12B	NM_002187	Citocina que pode atuar como um fator de crescimento para as células T e NK ativadas, aumentam a atividade lítica das células NK. Defeitos em <i>IL12B</i> são uma causa de suscetibilidade à infecções por micobactérias atípicas.	- Secretado	- Nau <i>et al.</i> , 2002 - Thuong <i>et al.</i> , 2008

IL-15	NM_172175	Citocina que estimula a proliferação de linfócitos T e células NK.	- Citoplasma - Secretado	- Nau <i>et al.</i> , 2002
IL-23A	NM_016584	Secretado por células dendríticas ativadas, funciona tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa.	- Secretado	- Thuong <i>et al.</i> , 2008
MMP1	NM_2421	Envolvido na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, tais como desenvolvimento embrionário, reprodução, e remodelação de tecidos, bem como em processos de doença.	- Matrix Extracelular	- Thuong <i>et al.</i> , 2008
CCL20	NM_004591	Fator quimiotático que atrai linfócitos e neutrófilos, predominantemente expresso no sangue periférico e no pulmão. Induzido por lipopolissacarídeos bacterianos, <i>TNF-alfa</i> e <i>IFN-gama</i> .	- Secretado	- Thuong <i>et al.</i> , 2008
CXCL11	NM_005409	A induzido por <i>IFN-gama</i> e <i>TNF-alfa</i> em monócitos, pode desempenhar um papel na resposta imunológica dérmica.	- Secretado	- Thuong <i>et al.</i> , 2008
CCR7	NM_001838	Expresso em vários tecidos linfóides e ativa os linfócitos B e T. Controlar a migração de células T de memória para os tecidos inflamados, assim como estimula a maturação de células dendríticas.	- Membrana Celular	- Sutherland <i>et al.</i> , 2011
CCL2	NM_002982	Fator quimiotático que atrai os monócitos e basófilos. Tem sido implicado na patogênese de doenças caracterizadas por infiltrados monocítica.	- Secretado	- Frahm <i>et al.</i> , 2011
HAS1	NM_001523	Desempenha um papel na síntese de ácido hialurônico, e também é capaz de catalisar a síntese de oligossacarídeos.	- Membrana Celular	- Thuong <i>et al.</i> , 2008
AK3	NM_016282	Envolvido na manutenção da homeostase de nucleotídeos celulares.	- Matrix Mitocondrial	- Thuong <i>et al.</i> , 2008
MMP19	NM_002429	Endopeptidase que degrada diversas componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento, hemostase e condições patológicas.	- Secretado - Matrix Extracelular	- Thuong <i>et al.</i> , 2008
IL-18	NM_001562	Aumenta a atividade das células NK em células do baço e estimula a produção de <i>INF-gama</i> nas células Th1.	- Secretado	- Sutherland <i>et al.</i> , 2011

Tabela1. Genes estudados em artigos publicados sobre a diferença da expressão gênica e os biomarcadores que mais se destacaram como sendo promissores para auxiliar no diagnóstico da tuberculose.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Justificativa

A tuberculose, apesar de todos os avanços científicos e tecnológicos, continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública global nos dias de hoje. A Organização Mundial da Saúde, segue se esforçando, financiando pesquisas e estabelecendo metas para diminuir a incidência em 50% até 2015, e erradicar a doença até o ano de 2050, porém a incidência da doença em alguns países subdesenvolvidos continua aumentando, e cada vez mais, casos de resistência a múltiplas drogas vem sendo encontrados em diversos países.

Tendo em vista que os métodos de vacinação, tratamento e diagnóstico rápido da TB precisam ser melhorados, a pesquisa por novos biomarcadores é de extrema importância para o desenvolvimento de novas técnicas que auxiliem a diminuir a incidência dessa doença que continua prevalecendo ao longo dos anos. Esse estudo visa aprofundar o conhecimento sobre a expressão gênica em diferentes bioassinaturas que possam contribuir para o diagnóstico da TB em relação aos diferentes estágios da doença e em relação a outras doenças pulmonares.

Objetivo Geral

O principal objetivo desse trabalho é comparar o nível de expressão dos genes *CD64*, *FCGR1B*, *GBP5*, *LTF* e *GZMA* em diferentes grupos de pacientes, visando estabelecer uma bioassinatura que possa diferenciar a TB ativa de outras doenças pulmonares, como asma e pneumonia.

Objetivo Específicos

- Coleta sanguínea e coleta de dados clínicos e epidemiológicos de pacientes com TB ativa, TB latente, doadores saudáveis, pacientes com asma e pacientes com pneumonia;
- Padronizar a técnica de extração de RNA dos diferentes grupos de pacientes;
- Padronizar a síntese de cDNA e criar um banco de amostras dos diferentes grupos de pacientes;
- Padronizar a técnica de PCR em tempo real para os genes *CD64*, *FCGR1B*, *GBP5*, *LTF*, *GZMA* e *B2M*.
- Analisar o nível de expressão dos genes *CD64*, *FCGR1B*, *GBP5*, *LTF*, *GZMA* em comparação com o gene constitutivo *B2M*;
- Comparar os diferentes níveis de expressão dos genes *CD64*, *FCGR1B*, *GBP5*, *LTF*, *GZMA* entre os diferentes grupos de pacientes;

Capítulo 4

ARTIGO

GZMA/GBP5/CD64: a three-gene signature to discriminate between tuberculosis and other pulmonary diseases

Lucas Laux da Costa^{1,2,3}, Melaine Delcroix³, Elis Regina Dalla Costa¹, Mariana Milano^{1,2}, Steve Francis³, Gisela Unis⁴, Denise Rossato Silva^{5,6}, Lee W. Riley³ and Maria Lucia R. Rossetti^{1,2,7}

¹ Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, Brazil

² Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

³ Division of Infectious Diseases, School of Public Health, University of California, Berkeley

⁴ Hospital Sanatório Partenon (HSP), Porto Alegre, Brazil

⁵ Programa de Pós-graduação em Ciências Pneumológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

⁶ Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

⁷ Universidade Luterana do Brasil (ULBRA/RS), Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: Maria Lucia Rosa Rossetti - Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT); Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Av. Ipiranga, nº 5400 - 3º andar. CEP: 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel.: +55 51 3352 0336; fax: +55 51 3352 0336.

E-mail address: mrossett@terra.com.br

ABSTRACT

Background. In this study, in an attempt to define a TB-specific biosignature for diagnostics, we evaluated gene expression in TB, pneumonia and asthma patients (OPD), as well as healthy donors with latent *M. tuberculosis* infection (LTBI) and healthy non-infected donors (NIDs).

Methods. Gene expression level of *B2M*, *CD64*, *FCGR1B*, *GZMA*, *GBP5* and *LTF* was assessed by real-time PCR in whole blood from 25 NIDs, 27 LTBI, 27 TB and 22 OPD donors.

Results. Random forest analysis was applied to calculate the specificity and sensitivity of each gene combination of *CD64*, *GZMA* and *GBP5* to discriminate between TB and OPD. The combination of the 3 genes gave the highest accuracy in identifying TB and OPD patients. This biosignature gave a specificity of 92.6% and a sensitivity of 95.5% for TB (reverse for OPD).

Conclusions. Our study suggest that the creation of a diagnostic tool using the studied biosignature may be a way to help physician's to differentiate TB from OPD and support the possibility to start to work at protein levels, using this to create faster, cheaper and accurate tools to diagnosis TB and to follow WHO recommendations to reduce global burden of TB incidence worldwide.

Keywords: *M. tuberculosis*, tuberculosis, pneumonia, biosignature, biomarkers, gene expression.

INTRODUCTION

Despite high treatment success rates, tuberculosis (TB) continues to spread worldwide. The World Health Organization (WHO) estimates that 8.6 million people developed TB and 1.3 million died from the disease in 2012 [1]. WHO reported the number of TB deaths as “unacceptably large given that most are preventable”. Accurate and early diagnosis is currently the rate-limiting step in TB control [2]. Delayed diagnosis has serious consequences as it delays patient’s treatment and fails to stop transmission from untreated TB cases. A confirmed diagnosis of TB is challenging. The century-old sputum smear test, the “front-line” diagnostic test for pulmonary TB, has low sensitivity and requires that two sputum samples be tested for acid-fast bacilli by microscopy. Bacterial culture, albeit the most sensitive method, has significant limitations: it takes several weeks and requires advanced technical infrastructure [2]. The lack of specificity of chest X-ray is also a major concern: radiographic appearance of TB is not uniform and image interpretation is subject to the clinician’s error [3].

Better TB diagnostics would therefore greatly impact on TB control by facilitating early treatment. The identification of biomarkers for host’s immunological state is a very promising strategy to diagnose TB. Unbiased gene expression profiling, such as microarrays, has provided candidate biosignatures for discrimination between TB patients and healthy donors using whole blood as surrogate tissue [4-6]. However, these studies mostly reflect/mirror a general pathological state of persistent inflammation, including type I and II interferon signaling pathways [5-6], innate cell pathways [4], the Fc γ receptor 1 network, and markers of apoptosis [7].

A biosignature appropriate for clinical diagnosis of TB needs to be unique/specific for TB [8]. Recently, a few groups have been hunting for TB-specific biomarkers by comparing TB biosignatures with that of other inflammatory pulmonary diseases, showing that blood transcriptional responses of patients with TB and sarcoidosis, another chronic inflammatory lung disease, highly overlap with up-regulation of proinflammatory pathways and *IFN* signaling/general immunopathological mechanisms [9-10]. On the other hand, Maerzdorf *et al.* (2011) unraveled a unique set of up-regulated genes for TB involved in metabolic activity and antimicrobial defense responses in TB patients [7]. Also, gene expression patterns were analyzed between pulmonary TB subjects and pulmonary sarcoidosis, pneumonia and lung cancer subjects, identifying 144 transcripts that were over-abundantly expressed only in the TB patients and distinguished the TB samples from all other pulmonary diseases [11].

Comparisons between TB with other pulmonary diseases aiming to create a useful diagnostic tool still a crucial role when we talk about TB biomarkers expression and biosignatures [11]. In this study, in an attempt to define a TB-specific biosignature for diagnostics, we evaluated gene expression in TB, pneumonia and asthma patients, as well as healthy donors with latent *M. tuberculosis* infection (LTBI) and healthy non-infected donors (NIDs). We decided to pursue a targeted approach utilizing a specific set of genes previously validated by Maerzdorf *et al.* 2011 as a biosignature to discriminate TB patients and LTBI subjects: *CD64*, *FCGR1B*, Granzyme A (*GZMA*), guanylate binding protein 5 (*GBP5*) and *LTF*.

METHODS

Study Participants and Definitions

The present study was accepted by the ethical committees of the Prefeitura de Porto Alegre (IRB approval 630), the Clinical Hospital in Porto Alegre (IRB approval 110201) and the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (IRB approval 03/2011). Subjects involved in this study were recruited between March 1, 2011 and March 30, 2013. Written informed consent was obtained from all study participants. Our case control study population included 27 patients with active tuberculosis (TB), 27 healthy donors with latent *M. tuberculosis* infection (LTBI), 25 healthy non-infected donors (NIDs), 22 patients suffering from other pulmonary diseases: 14 patients with asthma and 8 patients with bacterial pneumonia. All enrolled subjects were older than 18 years old and answered a questionnaire on their epidemiological data (Table 1).

TB patients were recruited at the Sanatorio Partenon Hospital, Porto Alegre, Brazil. All samples were collected prior to TB treatment from patients that never had tuberculosis before. TB patients presented clinical symptoms of pulmonary TB, both their sputum smear and culture were positive for *M. tuberculosis*, and their chest X-ray showed specific lesions for TB. Healthy LTBI donors were recruited at the Unidade Basica de Saude Restinga in Porto Alegre, Brazil. LTBI subjects were household contacts of TB patients and characterized by a positive PPD Test (> 5 mm), a normal chest X-ray, and no clinical symptoms of TB or other pulmonary diseases. NIDs and patients with other pulmonary diseases were recruited at the Clinical Hospital in Porto Alegre, Brazil. NIDs had a negative PPD Test (< 5 mm), no clinical

symptoms of TB or other pulmonary diseases, and a normal chest X-ray. Patients with other pulmonary diseases had a negative PPD Test (< 5 mm), no clinical symptoms of TB, a suggestive chest X-ray for asthma or pneumonia, and technical reports confirming other pulmonary diseases (asthma or pneumonia). Immunological tests for HIV/HCV/HBV were negative for all participants included in this study. All our subjects were BCG vaccinated and all of them answered a questionnaire declaring no other immunological disease or diabetes.

RNA extraction and cDNA synthesis

We collected 2.5mL peripheral whole blood with PAXgene blood RNA tube (PreAnalytiX) for every donor. Total RNA was extracted from PAXgene tube using the PAXgene Blood RNA kit (Qiagen) protocol. RNA was quantified with the Qubit RNA Assay Kit on the Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies). RNA extraction yielded 2.5 – 4.0µg per donor. cDNA was generated conform protocol from 200ng of RNA by reverse transcription using Oligo-dT primers and Superscript III (Life Technologies).

Real Time PCR Validation and Analysis

cDNA was quantified by real-time PCR using SsoAdvanced SYBR Green Supermix (BioRad) on the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad). Primers to amplify targets and the reference gene *B2M* were published by Maertzdorf *et al.* (2011) and are listed in Table 2. For each target, primer concentrations were optimized using a primer matrix and 100% primer efficiency was confirmed by running a real-time assay on a 5-fold series dilution of pooled donors' cDNA.

Data analysis

Scatter plots for gene expression levels were generated using the ggplot2 package [12] on R [13]. Random forest analysis was performed using the randomForest package [14] on R with the study groups encoded as factors to produce classification trees. Regression analysis (R^2 function) for age and gender correlation, and *t*-tests (TTEST2,2 function) were run on Microsoft Excel.

RESULTS

Gene expression level of *B2M*, *CD64*, *FCGR1B*, *GZMA*, *GBP5* and *LTF* was assessed by real-time PCR in whole blood from 25 NIDs, 27 LTBI, 27 TB and 22 OPD donors (Table 1). *B2M* was chosen as reference gene based on Maertzdorf *et al.* (2011) study. There are differences in age between the study groups but we found no evidence to suggest gene expression level is correlated with donor's age (data not shown). When plotting gene Ct for male and female subjects separately, we found that gender does seem to play a role in *FCGR1B* and *LTF* expression (data not shown). We then decided to continue our analysis with *CD64*, *GZMA* and *GBP5* and did not include *FCGR1B* and *LTF* in our predictive model.

As our goal is to identify a unique set of genes to discriminate TB versus OPD, we focused on comparisons of TB with OPD. *CD64*, *GZMA* and *GBP5* showed significant difference in gene expression between TB and OPD patients with a *p* value less than 0.01 for *CD64* and less than 0.001 for *GZMA* and *GBP5* (Figure 1).

Random forest analysis was applied to calculate the specificity and sensitivity of each gene combination of *CD64*, *GZMA* and *GBP5* to

discriminate between TB and OPD. The combination of the 3 genes gave the highest accuracy in identifying TB and OPD patients. This biosignature gave a specificity of 92.6% and a sensitivity of 95.5% for TB (reverse for OPD). *GZMA* and *GBP5* showed the highest discriminating power with an importance factor of 18.5 and 26.3, respectively for TB, of 19.2 and 17.4, respectively for OPD, versus *CD64* importance of 8.5 for TB and 3.3 for OPD. *GZMA* was a strong predictor to identify TB cases within TB patients (96.3% specificity) but did not perform as well as the 3-gene combination to discriminate TB versus OPD in OPD patients (77.3% specificity).

Comparing gene expression levels between subjects with ACTB and LTBI, we found, with a strict cutoff ($p < 0.001$), that *CD64*, *GBP5* and *GZMA* were biomarkers able to segregate subjects with ACTB and LTBI (Figure 1). When compared gene expression profile between ACTB and NIDs we observed that results were the same as comparisons between ACTB and LTBI, with a strict cutoff ($p < 0.001$) for *CD64*, *GBP5* and *GZMA*, showing that they are good biomarkers to perform this kind of comparison (Figure 1).

After comparing ACTB group between all the others study groups, we started to compare all the other groups to see if we can still distinguish each other. When compared LTBI *versus* OPD we can only found two genes that were able to distinguish infection statuses but not with a very strict cutoff ($p < 0.05$). *CD64* and *GBP5* were able to differentiate both groups with these criteria (Figure 1). LTBI *versus* NIDs showed a good gene expression profile once *CD64*, *GBP5* and *GZMA* had a very strict significance cutoff ($p < 0.001$) helping to differentiate each group (Figure 1). The last comparison was performed between NIDs and OPD, showing a very strict significance cutoff

($p < 0.001$) only to *CD64* (Figure 1). For this group comparison, *GBP5* and *GZMA* were not able to distinguish each infection statuses (Figure 1).

DISCUSSION

Development of fast, cheap and accurate methods for TB diagnosis is one of the major problems on TB control. Physicians also have problems regarding differential diagnosis between TB and other pulmonary diseases when sputum smear is negative and chest X-ray show inconclusive results. Therefore, a number of studies have been conducted in order to define a biosignature who can predict TB infection statuses [9-11]. Lu *et al.* (2011), show that *CXCL10*, *ATP10A*, and *TLR6* are a trusty set of biomarkers that may be predictive to differentiate ACTB from LTBI [6]. Also, in an attempt to define differentiation between TB infection statuses and other lung diseases, Bloom *et al.* (2013), showed that granulomatous diseases, like TB and sarcoidosis, have an INF-inducible transcriptional signature distinct from other pulmonary diseases, like pneumonia and lung cancer, who are dominated by an inflammatory signature [11].

In 2007, a study combining microarray analyses with qPCR tried to find candidate biomarkers for differentiation of ACTB patients and healthy donors, infected and noninfected subjects. Their approach revealed an optimal group of genes able to discriminate both stages of disease including *CD64*, *LTF*, and *Rab33A* [4]. From the same group, Maertzdorf *et al.* (2011) also defined a unique biosignature who may help to predict susceptibility for, or resistance against ACTB. Performing a large microarray study, they identified more than 2048 differentially expressed transcripts. *FCGR1B*, *CD64*, *LTF*, *GBP5* and

GZMA were the combination of the five most prominently differentiated genes that turned out to give the highest accuracy in discriminating between ACTB and LTBI [7].

Our study suggests that several biomarker responses may be useful for detection of ACTB infection against OPD, as well as for differentiating ACTB from LTBI and NIDs subjects. Although our study suffers from a number of limitations, including relatively small sample size on subjects with pneumonia and asthma ($n = 8$ and $n = 14$, respectively), and a heterogeneous subject population inside the OPD group, we were able to perform valid expression levels of the studied target genes. Our results on the OPD group were statistically significant when compared with other groups because we had a very homogeneous gene expression levels between pneumonia and asthma samples, allowing us to group them inside OPD subjects. In fact, similar gene expression levels between pneumonia and asthma samples may allow us the idea that studied target genes were specific for ACTB diagnosis [11].

CD64, or *FCGR1A* (Fc fragment of IgG, high affinity IA, receptor), was identified as the target gene with one of the highest degrees of differentiation between and within our four groups. We observed *CD64* with a very strict cutoff ($p < 0,001$) in comparisons between ACTB *versus* LTBI and NIDs subjects, between LTBI *versus* OPD and NIDs subjects, and also between NIDs *versus* OPD subjects. With a not so strict cutoff ($p < 0.01$) *CD64* was also able to differentiate ACTB from OPD subjects. A bunch of studies support the idea that *CD64* play a role on the regulation of gene expression in dendritic cells and macrophages, regulating cytokines like and interleukin-10

(*IL-10*) and *IFN-γ* [4, 15-16]. Although, *M. tuberculosis* has the survival strategy to block various transcriptional responses including induction of *CD64*, which does not allow regulation of *IFN-γ*, one of the main mediators in anti-mycobacterial host defense. Also, this gene has the characteristic of induct phagocytosis, respiratory burst, and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in granulocytes, macrophages and monocytes [17-20].

Following Maertzdorf *et al.* (2011) steps, we design *CD64* qPCR primers to specifically target gene encoding mRNA due to *CD64* and *FCGR1B* similar sequences and cross-reactivity. These specific primer designs allowed us to analyze both genes with accuracy [7]. *CD64* and *FCGR1B* family used to be not so important in TB researches and diagnosis until recent studies suggested that those antibodies may play a role in control against *M. tuberculosis* infection and, their binding capacity with antibodies can active or inhibit some signaling pathways for cell activation, generating a well-balance on immune responses [21-23]. Maertzdorf *et al.* (2011) suggest in his study that *FCGR1* family upregulation in TB could indicate an immune modulatory function, or, just “shot” from immune system to establish a protective immune response [7].

Maertzdorf *et al.* (2011) also analyzed *GBP5* and *GZMA*, showing that they are good genes to be inside a biosignature to discriminate TB from LTBI subjects [7]. We showed that in our study both genes had a very expressive discriminating power in TB and OPD subjects, and both were able to distinguish the same infection statuses analyzed by Maertzdorf *et al.* (2011) [7]. In our study both allowed us to differentiate TB from OPD and NIDs. Differentiation between LTBI and NIDs can also be performed with both

genes, and *GBP5* is able to differentiate LTBI from OPD subjects together with *CD64*. *GBP5* is a gene responsible to promote selective *NLRP3* (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) inflammasome response against pathogenic bacteria. *NLRP3* gene make part of the *NLR* (*nucleotide binding and oligomerization, leucine-rich repeat*) family, who is an inflammasome complex, with the function of alert the immune system to the presence of infection or tissue damage [24]. *GZMA* gene is also a good predictive gene for TB studies, with the characteristic of encode Granzyme A protein responsible for lysis of target cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells [25].

A biosignature that helps to differentiate TB from other infection statuses has been studied for a while, showing that research in TB improved with the passed years. Jacobsen *et al.* (2007) achieved with his research a biosignature with three genes (*CD64*, *LTF* and *RAB33A*) and a sensitivity and specificity of 88 and 91%, respectively to distinguish between TB donors and LTBI [4]. In 2011, from the same group, Maertzdorf *et al.* (2011) achieved in their research sensitivity and specificity of 94 and 97%, respectively comparing TB with LTBI subjects between five studied genes (*CD64*, *FCGR1B*, *GBP5*, *LTF* and *GZMA*) [7]. In our study we analyzed the same set of genes that Maertzdorf *et al.* (2011) performed. Different from them we excluded *LTF* and *FCGR1B* because on our study population both genes do not have a trustful gender analysis, showing that gender does seems to play a role for them. With our three genes biosignature we achieved a specificity of 92.6% and a sensitivity of 95.5% comparing TB with OPD, showing that, even with three genes, Maertzdorf *et al.* (2011) biosignature may allow us to

distinguish TB from OPD subjects [7].

In conclusion, TB fast, cheap and accurate diagnosis still even more necessary for the eradication of the disease in 2050, and development of a biosignature that helps to differentiate TB from others infection statuses is a way to achieved it [1]. Our study suggest that the creation of a diagnostic tool using the studied biosignature may be a way to help physician's to differentiate TB from OPD and support the possibility to start to work at protein levels, using this to create faster, cheaper and accurate tools to diagnosis TB and to follow WHO recommendations to reduce global burden of TB incidence worldwide. Also, this biosignature should be tested in all kind of diseases related to pulmonary and infections disorders, to figure if this biosignature is unique for active TB.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the staff of HSP and Lee Riley's lab.

FINANCIAL SUPPORT

We would like to thank FEPPS, HCPA and Lee W. Riley laboratory for financial support. We also thank the International Clinical, Operational, and Health Services Research and Training Award (ICOHRTA Program), the Fogarty International Center/US National Institutes of Health for grant support.

POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the

ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO) Annual Report 2013. Global Tuberculosis Control - Epidemiology, Strategy, Financing. WHO: Geneva, Switzerland, 2013.
2. McNerney R, Daley P. Towards a point-of-care test for active tuberculosis: obstacles and opportunities. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(3):204-13.
3. Keller E, Perkins MD, Small P, et al. Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature* 2006; 444(1):49-57.
4. Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, et al. Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85(6):613-21.
5. Berry MP, Graham CM, McNab FW, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 2010; 19;466(7309):973-7.
6. Lu C, Wu J, Wang H, et al. Novel biomarkers distinguishing active tuberculosis from latent infection identified by gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* 2011; 6(8):e24290.
7. Maertzdorf J, Repsilber D, Parida SK, et al. Human gene expression profiles of susceptibility and resistance in tuberculosis. *Genes Immun*

- 2011; 12(1):15-22.
8. Weiner J, Maertzdorf J, Kaufmann SH. The dual role of biomarkers for understanding basic principles and devising novel intervention strategies in tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1283:22-9.
 9. Maertzdorf J, Weiner J 3rd, Mollenkopf HJ. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 15:7853-8.
 10. Koth LL, Solberg OD, Peng JC, et al. Sarcoidosis blood transcriptome reflects lung inflammation and overlaps with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(10):1153-63.
 11. Bloom CI, Graham CM, Berry MP, et al. Transcriptional blood signatures distinguish pulmonary tuberculosis, pulmonary sarcoidosis, pneumonias and lung cancers. *PLoS One*. 2013; 8(8):e70630.
 12. Wickham H. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer New York 2009.
 13. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
 14. Liaw A, Wiener M. Classification and Regression by randomForest. *R News* 2002; 2(3):18-22.
 15. Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med* 1983; 158:1092–1113.
 16. te Velde AA, de Waal Malefijt R, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and

- cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J Immunol* 1992; 149:4048–4052.
17. Flynn FL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:93–129.
 18. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001; 1:20–30.
 19. Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol* 1999; 163:3898–3906.
 20. Vanham G, Edmonds K, Qing L, et al. Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1996; 103:30–34.
 21. Glatman-Freedman A, Casadevall A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:514-532.
 22. Abebe F, Bjune G. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol* 2009; 157:235–243.
 23. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:34–47.
 24. Shenoy AR, Wellington DA, Kumar P, et al. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science* 2012; 336(6080):481-5.

25. Bell JK, Goetz DH, Mahrus S, et al. The oligomeric structure of human granzyme A is a determinant of its extended substrate specificity. *Nat Struct Biol* 2003; 10(7):527-34.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Demographic characteristics of study groups. NID, healthy non-infected donors; LTBI, healthy donors latently infected with *M. tuberculosis*; TB, tuberculosis patients; OPD, patients with other pulmonary disease than TB (asthma and pneumonia).

		NIDs	LTBI	TB	OPD
Number of subjects		25	27	27	22
Age	Mean (SD)	32.6 (12.5)	42.1 (15.8)	34.4 (13.6)	55.0 (10.2)
	Range	20-62	18-65	19-65	26-65
Gender	Male	13	12	18	7
	Female	12	15	9	15

Table 2. Function and primer sequences of target genes and reference gene.

Gene name (Symbol)	Accession number	Primer sequence	Size (Bp)*	Role
<i>Fc gamma receptor IA</i> (<i>CD64</i>)	NM_000566	Fwd - 5' AGGCCTGGTTTGCAGCTTT 3' Rev - 5' CTGCCTCGCAGGGTCTTG 3'	59	Induces phagocytosis, respiratory burst, and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in monocytes, macrophages, and granulocytes.
<i>Fc gamma receptor IB</i> (<i>FCGR1B</i>)	NM_001017986	Fwd - 5' GGAAGGGGTGCACCGGAAGG 3' Rev - 5' CACGGGGAGCAAGTGGGCAG 3'	98	Induces phagocytosis, respiratory burst, and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in monocytes, macrophages, and granulocytes.
<i>Guanylate binding protein 5</i> (<i>GBP5</i>)	NM_052942	Fwd - 5' TGGCAAATCCTACCTGATGA 3' Rev - 5' CCATATCCAAATTCCCTTGG 3'	97	Helps <i>NLRP3</i> inflammasome assembly upon bacterial challenge.
<i>Lactoferrin</i> (<i>LTF</i>)	NM_002343	Fwd - 5' AGAGAGACTCCCCATCCAGT 3' Rev - 5' CCATCAAGGGTCACAGCATC 3'	70	Iron transporter molecule, which likely competes with microbes for binding iron.
<i>Granzyme A</i> (<i>GZMA</i>)	NM_006144	Fwd - 5' GAAGAGACTCGTGCAATGGA 3' Rev - 5' AAGGCCAAAGGAAGTGACC 3'	80	Serine protease involved in targeted cell apoptosis.

<i>Beta-2-</i> <i>microglobulin</i> (<i>B2M</i>)	NM_004048	Fwd - 5' GCTCGCGCTACTCTCTCTTT 3' Rev - 5' CTCTGCTGGATGACGTGAGT 3'	82	Component of MHC class I molecules involved in the presentation of peptide antigens to the immune system.
--	-----------	--	----	---

*Bp = Amplicon size in base pare.

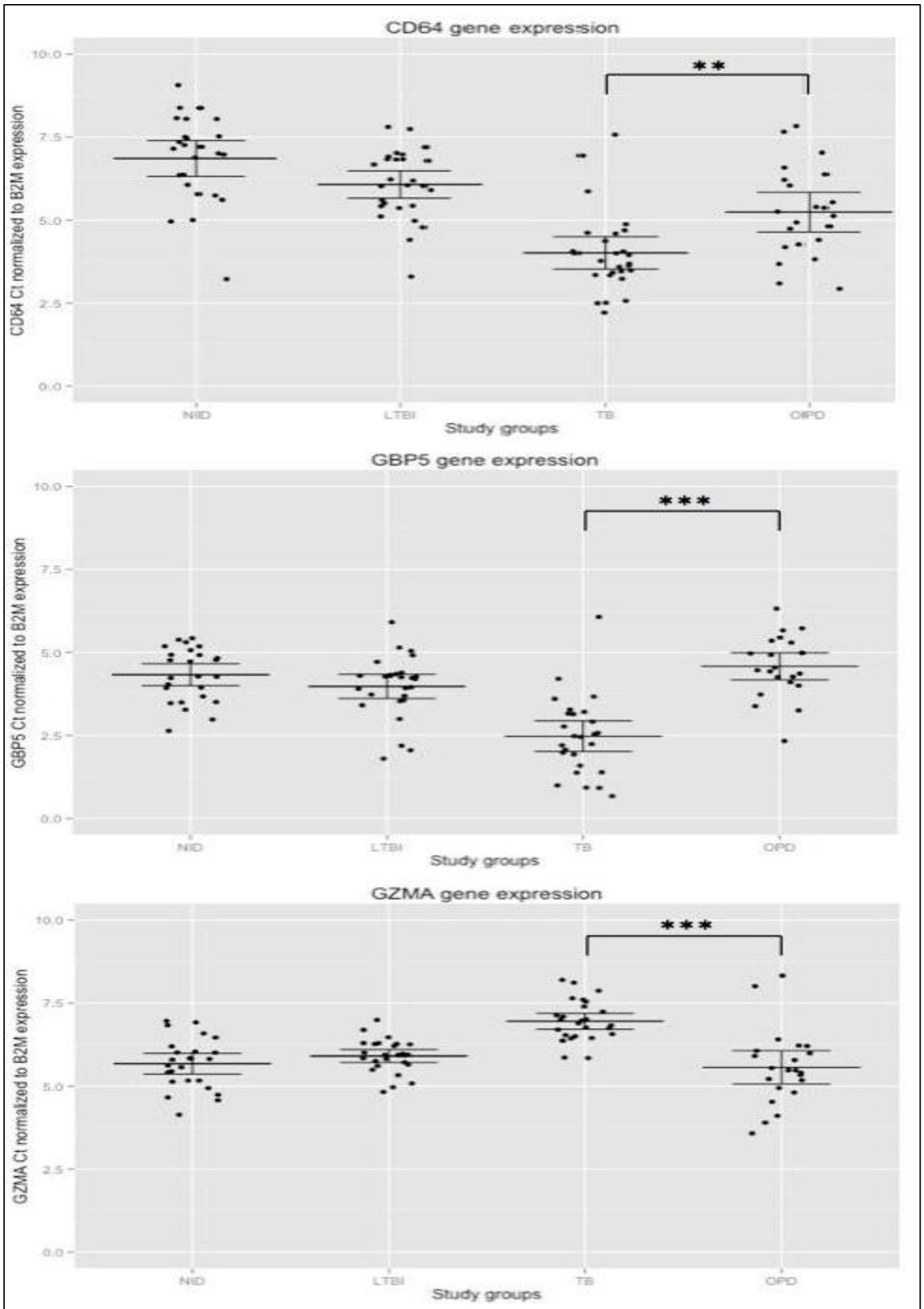


Figure 1. Demographic characteristics of study groups. NID, healthy non-infected donors; LTBI, healthy donors latently infected with *M. tuberculosis*; TB, tuberculosis patients; OPD, patients with other pulmonary disease than TB (asthma and pneumonia).

DISCUSSÃO GERAL

Embora a ciência tenha feito muitos avanços na área de pesquisa clínica e do rápido diagnóstico da TB, novas ferramentas ainda são necessárias para o controle e erradicação da doença (WHO, 2013). O progresso na pesquisa ainda é limitado, uma vez que várias lacunas referentes à pesquisa básica de *M. tuberculosis* ainda não foram preenchidas (Gagneux, 2013). Atualmente, a TB é responsável por cerca de 2 milhões de mortes ao ano, estando em segundo lugar entre as doenças infecciosas com maior mortalidade entre adultos, e, deixando claro que o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que sejam rápidos, menos onerosos e específicos são essenciais para o controle da doença (Bloom *et al.*, 2013). Nas últimas décadas, estudos buscando biomarcadores tanto em *M. tuberculosis* quanto em humanos, têm sido conduzidos, e estes têm sido focados em três grandes áreas; a cura da TB ativa, a reativação da TB latente e a indução protetiva da resposta imune através de vacinas (Wallis *et al.*, 2013).

O diagnóstico clínico da TB, mesmo sendo rápido, é dependente de métodos laboratoriais como a microscopia, a cultura do escarro e o raio-X. Tal diagnóstico também se torna inespecífico quando o resultado do raio-X é inconclusivo, deixando a possibilidade do paciente ter outro tipo de doença pulmonar que não TB. Pacientes com pneumonia podem ter lesões pulmonares de lobo superior que podem ser confundidas com casos de TB, com alguns sintomas clínicos similares entre as doenças (Sahin *et al.*, 2012). Quando falamos de expressão gênica e biomarcadores, vários estudos têm sido conduzidos para tentar definir uma bioassinatura que seja capaz de diferenciar TB de outras doenças pulmonares. Uma bioassinatura apropriada para o diagnóstico clínico da TB precisa ser única e específica para a

doença. Recentemente, alguns grupos têm procurado essa bioassinatura, comparando a expressão gênica em indivíduos com TB em relação à expressão gênica de indivíduos com outras doenças pulmonares, demonstrando que doenças crônicas com características granulomatosas, como a TB e a sarcoidose, têm uma bioassinatura transcripcional induzida por *INF*, o que diferencia essas doenças de outras doenças pulmonares não granulomatosas, como a pneumonia e o câncer de pulmão, que tem em seu domínio uma assinatura inflamatória (Maertzdorf *et al.*, 2012; Bloom *et al.*, 2013).

Em 2007, um estudo combinou técnicas de microarranjo, com a averiguação dos resultados com PCR em Tempo Real, visando encontrar possíveis biomarcadores que pudessem auxiliar a diferenciar a TB ativa de pacientes TB latentes e pacientes não infectados pelo bacilo da TB. Tal pesquisa revelou uma promissora bioassinatura, trazendo a possível capacidade de corretamente discriminar indivíduos com TB ativa, TB latente e indivíduos não infectados pelo bacilo da TB. Os genes que fazem parte dessa bioassinatura são: *CD64*, *LTF* e *Rab33A* (Jacobsen *et al.*, 2007). Do mesmo grupo de pesquisadores, outro estudo foi realizado, onde foi possível definir uma única bioassinatura contendo cinco diferentes genes (*FCGR1B*, *CD64*, *LTF*, *GBP5* e *GZMA*), capazes de ajudar na diferenciação entre pacientes com TB ativa de pacientes com TB latente e de pacientes não infectados pelo bacilo da TB. Nesse estudo, eles conseguiram identificar mais de 2048 diferentes transcritos expressos, definindo uma bioassinatura distinta com a possibilidade de ajudar a prever a susceptibilidade ou a resistência dos indivíduos contra a infecção (Maertzdorf *et al.*, 2011). Foi demonstrado

também que uma bioassinatura com os genes *CXCL10*, *ATP10A* e *TLR6* pode auxiliar na diferenciação entre a TB ativa e a TB latente (Lu *et al.*, 2011).

Nosso estudo sugere que a resposta de alguns biomarcadores pode ajudar na detecção da TB ativa quando comparada com outras doenças pulmonares, e também ajudar na diferenciação de outros estágios da infecção, como a diferenciação da TB ativa frente a TB latente, ou até mesmo, frente a pacientes não infectados pelo bacilo da TB. Porém, esse estudo sofre de algumas limitações relacionadas ao tamanho amostral dentro do grupo das outras doenças pulmonares, e também, tem limitações devido a heterogeneidade de gênero dentro do grupo das outras doenças pulmonares. Em relação ao tamanho amostral do grupo, temos um total de 22 indivíduos com outras doenças pulmonares, sendo que desses, 14 foram diagnosticados com asma e 8 foram diagnosticados com pneumonia. Quanto à heterogeneidade do grupo, nossas análises estatísticas mostraram que o gênero influenciou nos resultados de dois genes analisados, *FCGR1B* e *LTF*. Tais genes já foram analisados previamente por outros grupos, e mostraram bons resultados para a diferenciação da TB ativa frente a TB latente (Jacobsen *et al.*, 2007; Maertzdorf *et al.*, 2011). Mesmo apresentando limitações, essas análises mostraram que o nosso grupo de pacientes com outras doenças pulmonares é estatisticamente significativo pois ele tem níveis de expressão gênica bastante homogêneas entre cada amostra, nos permitindo agrupar asma e pneumonia dentro do mesmo grupo, o que nos sugeriu que os genes *CD64*, *GBP5* e *GZMA* podem ser específicos e únicos para a TB ativa.

CD64, ou *FCGR1A* (Fc fragment of IgG, high affinity IA, receptor), foi identificado no nosso estudo com um dos genes com maior grau de diferenciação entre os grupos de indivíduos por nós estudados. Observamos que esse gene é capaz de diferenciar indivíduos com TB ativa de indivíduos com TB latente e de indivíduos não infectados pelo bacilo da TB com um valor de *p* menor que 0,001, diferenciando também indivíduos com TB latente de indivíduos não infectados e indivíduos com outras doenças pulmonares, com o mesmo valor de *p*. Com esse *cutoff* o gene *CD64* também é capaz de diferenciar indivíduos com outras doenças pulmonares de indivíduos saudáveis, e com um *cutoff* um pouco menos restrito ($p < 0,01$), tal gene é capaz de diferenciar pacientes com TB ativa de pacientes com outras doenças pulmonares. Vários estudos embasam a ideia de que o gene *CD64* participa de importantes funções na regulação da expressão gênica em macrófagos e nas células dendríticas, regulando citocinas como a *IL-10* e o *INF-γ* (Perussia *et al.*, 1983; te Velde *et al.*, 1992; Jacobsen *et al.*, 2007). Porém, estudos têm embasado a ideia de que o bacilo *M. tuberculosis* consegue, estrategicamente, bloquear várias respostas transcricionais, incluindo a indução de *CD64*, o que interfere na regulação do *INF-γ*, um dos principais mediadores da defesa contra micobactérias no hospedeiro (Flynn *et al.*, 2001; Kaufmann, 2001; Ting *et al.*, 1999; Vanham *et al.*, 1996).

Para o nosso estudo, seguindo os passos das análises de Maertzdorf *et al.* (2011), nós desenhamos *primers* alvos para o mRNA que codificam o gene *CD64*, o que nos permitem diferenciar esse gene do gene *FCGR1B*, onde ambos os genes tem sequências bastante similares. Esses *primers* foram desenhados especificamente para nos permitir analisar ambos os

genes com acurácia. Estudos recentes, sugerem que tanto o gene *CD64* quanto o *FCGR1B*, anteriormente considerados não tão importantes em pesquisas relacionadas com TB, podem apresentar um papel importante no controle da infecção pelo *M. tuberculosis*, e também, na sua capacidade de ligação com outros anticorpos podem ativar ou inibir diferentes vias de ativação celular, gerando equilíbrio nas respostas do sistema imune do hospedeiro (Glatman-Freedman *et al.*, 1998; Abebe *et al.*, 2009; Nimmerjahn *et al.*, 2008). Uma alta expressão de genes da família *FCGR1* durante a infecção pelo bacilo *M. tuberculosis*, pode indicar que o sistema imune do hospedeiro está desempenhando uma função moduladora para controlar a TB, ou, até mesmo, estabelecendo uma resposta protetora contra o hospedeiro (Maertzdorf *et al.*, 2011).

Maertzdorf *et al.* (2011), também analisou os genes *GBP5* e *GZMA*, demonstrando que ambos são genes com um bom perfil de expressão para fazerem parte de uma bioassinatura que ajudaria a diferenciar indivíduos com TB ativa de indivíduos com TB latente. Em nosso estudo, nossas análises estatísticas demonstraram que ambos os genes tiveram um poder de discriminar indivíduos com TB ativa de indivíduos com outras doenças pulmonares. Assim como no estudo publicado por Maertzdorf *et al.* (2011), ambos os genes foram capazes de distinguir pacientes com TB ativa de pacientes com TB latente, bem como, ambos os genes foram capazes de nos ajudar a diferenciar indivíduos com TB ativa de indivíduos com outras doenças pulmonares e de indivíduos não infectados pelo bacilo da TB. Analisando ambos os genes, também fomos capazes também de diferenciar indivíduos com TB latente de indivíduos não infectados pelo bacilo da TB, e,

os genes *GBP5* e *CD64* juntos, foram capazes de nos ajudar a diferenciar pacientes com TB latente de pacientes com outras doenças pulmonares.

GBP5 é o gene responsável por promover uma resposta inflamatória mediada pelo receptor *NLRP3* (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) contra bactérias patogênicas. O gene *NLRP3* faz parte da família *NLR* (*nucleotide binding and oligomerization, leucine-rich repeat*), que compõe o complexo inflamossoma, com a função de alertar o sistema imune para a presença de alguma infecção ou dano tecidual (Shenoy *et al.*, 2012). O gene *GZMA* é também um bom gene a ser estudado na área da TB, com a característica de codificar a proteína Granzyme A, que é responsável pela lise das células marcadas pelos linfócitos T CD8⁺ e células NK (Bell *et al.*, 2003).

Uma bioassinatura que ajude a diferenciar a TB de outras doenças pulmonares, ou, de outros estágios da infecção por TB, já tem sido buscada à algum tempo, mostrando que pesquisas e tecnologias relacionadas a essa área tem evoluído com o passar dos anos. Jacobsen *et al.* (2007) conseguiram definir uma bioassinatura com três genes (*CD64*, *LTF* e *Rab33A*) capazes de diferenciar os diferentes estágios da TB, com uma sensibilidade e uma especificidade de 88 e 91%, respectivamente. Em 2011, o mesmo grupo conseguiu definir em sua pesquisa uma bioassinatura composta por cinco genes (*CD64*, *FCGR1B*, *GBP5*, *LTF* e *GZMA*) capaz de obter uma sensibilidade e uma especificidade de 94 e 97% (Maertzdorf *et al.*, 2011). Em nosso estudo, nós analisamos os mesmo cinco genes estudados por esse estudo de 2011, visando diferenciar pacientes com TB ativa, de pacientes com outras doenças pulmonares. Diferentemente do estudo

publicado em 2011, nós excluimos os genes *LTF* e *FCGR1B* pois eles não apresentaram resultados de gênero estatisticamente confiáveis. Se estivermos buscando marcadores capazes de diferenciar tuberculose ativa de tuberculose latente, e tuberculose ativa de outras doenças pulmonares, esses marcadores não podem ser diferentemente expressos entre os gêneros, pois um teste baseado na sua bioassinatura não teria utilidade na rotina clínica. A bioassinatura contendo três genes (*CD64*, *GBP5* e *GZMA*), mostrou que é possível alcançar sensibilidade e especificidade de 95,5% e 92,6% comparando indivíduos portadores de TB ativa com indivíduos portadores de outras doenças pulmonares. Esses resultados podem confirmar a ideia proposta por Maertzdorf *et al.* (2011), que essa bioassinatura, mesmo que com somente três genes analisados, nos permite diferenciar pacientes com TB ativa de pacientes com outras doenças pulmonares.

Em conclusão, nosso estudo sugere que o desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico, utilizando a bioassinatura por nós analisada, pode ajudar a diferenciar indivíduos com TB ativa de indivíduos com outras doenças pulmonares, permitindo assim avaliações clínicas mais precisas, e apoiando a ideia de se trabalhar com detecção de níveis proteicos para desenvolver ferramentas de diagnóstico específicas, que ajudem a reduzir a incidência global da TB, conforme recomendações da OMS. Também sugerimos que essa bioassinatura seja testada em todos os tipos de doenças relacionadas ao pulmão, e também em doenças infecciosas, seguindo a ideia de encontrar uma bioassinatura única e específica para a TB ativa.

PERSPECTIVAS

As bioassinaturas são ferramentas importantes e indispensáveis na busca por mecanismos moleculares menos invasivos e mais efetivos para erradicação da tuberculose no mundo. Diferentes biomarcadores foram estudados nas últimas décadas a fim de determinar alvos que possam determinar à cura da TB, a ativação de uma resposta imune protetora, a reativação de uma infecção latente e biomarcadores imunopatológicos da TB que a diferenciem de outras doenças pulmonares. Muitos marcadores não específicos, de resposta inflamatória, foram descritos e tem sua relevância quando considerados isoladamente, porém não demonstram valores preditivos para o uso clínico na caracterização da TB quando poderia haver a suspeita clínica de outra doença pulmonar. Embora nenhum novo e preciso biomarcador especificamente para a TB tenha sido descrito ainda, um progresso substancial foi feito nessa área. No entanto, a qualificação de biomarcadores como um substituto para um determinação clínico-laboratorial da tuberculose é muito desafiadora e merece ser estudada com bastante ênfase, visando à obtenção de testes diagnósticos mais rápidos e precisos, que ajudem a diminuir a incidência global da TB.

O presente estudo tem como perspectivas aumentar o número de grupos estudados, adicionando mais pacientes com outras doenças pulmonares, como câncer de pulmão e sarcoidose, buscando mostrar que a bioassinatura estudada é única e específica de TB. Temos também a perspectiva de começar a trabalhar em níveis proteicos, buscando desenvolver um kit de diagnóstico rápido, de fácil aplicação e com custos baixos, que facilite a determinação clínico-laboratorial da TB frente a outras doenças pulmonares.

REFERÊNCIAS

Abebe F, Bjune G (2009). The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol* 157: 235–243.

Akira M, Sakatani M (2001). Clinical and high-resolution computed tomographic findings in five patients with pulmonary tuberculosis who developed respiratory failure following chemotherapy. *Clin Radiol* 56: 550-555.

Alessandri AI, Souza AL, Oliveira SC, *et al.* 2006. Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. *Inflamm Res* 55: 528-533.

Almeida CS, Abramo C, Ferreira AP, *et al.* (2005). Avaliação de novos antígenos de Mtb para vacinação e imunodiagnóstico precoce da TB. *Camin Inic Cient* 10: 97-106.

Andersen P, Munk ME, Pollock JM, *et al.* (2000). Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356: 1099-1104.

Barrera L, Montoro E (2007). New diagnosis tools for tuberculosis laboratory network in Latin America. *Rev Cubana Med Trop* 59: 82-89.

Bell JK, Goetz DH, Mahrus S, *et al.* (2003) The oligomeric structure of human granzyme A is a determinant of its extended substrate specificity. *Nat Struct Biol* 10: 527-534.

Berry MP, Graham CM, McNab FW, *et al.* (2010). An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 466: 973-977.

Bloom BR, Murray CJ (1992). Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257: 1055-1064.

Bloom CI, Graham CM, Berry MP, *et al.* (2013). Transcriptional blood

signatures distinguish pulmonary tuberculosis, pulmonary sarcoidosis, pneumonias and lung cancers. PLoS One 8: e70630.

BRASIL (2012). Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Ministério da saúde, Secretaria de vigilância em saúde, Programa nacional de controle da Tuberculose.

Brennan P (1995). The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem 64: 29-65.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, *et al.* (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA 99: 3684-3689.

Caruso AM, Serbina N, Klein E, *et al.* (1999). Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. J Immunol 162: 5407-5416.

Chan J, Flynn J (2004). The immunological aspects of latency in tuberculosis. Clin Immunol 110: 2-12.

Coll P (2003). Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm Infec Microbiol Clin 21: 299-308.

Daniel TM (2006). The history of tuberculosis. Respir Med 100: 1862-1870.

Davis JM, Ramakrishnan L (2008). "The very pulse of the machine": the tuberculous granuloma in motion. Immunity 28: 146-148.

Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, *et al.* (2004). Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. Lancet Infect Dis 4: 584-592.

Dos Vultos T, Mestre O, Rauzier J, *et al.* (2008). Evolution and

diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One 3: e1538.

Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, *et al.* (2006). The resumption of consumption – a review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 697-714.

Flynn FL, Chan J (2001). Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 19: 93–129.

Flynn JL, Chan J (2005). What's good for the host is good for the bug. Trends Microbiol 13: 98-102.

Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, *et al.* (2003). Tuberculosis. Lancet 362: 887-899.

Gagneux S (2013). Genetic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Curr Top Microbiol Immunol 374: 01-25.

Glatman-Freedman A, Casadevall A (1998). Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev 11: 514-532.

Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, *et al.* (2007). Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. J Mol Med (Berl) 85: 613-621.

Kato-Maeda M, Gagneux S, Flores LL, *et al.* (2011). Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis*: congruence between large sequence polymorphisms and spoligotypes. Int J Tuberc Lung Dis 15: 131-133.

Kaufmann SH (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nat Rev Immunol 1: 20-30.

Kaufmann SH, Schaible UE (2005). 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol* 13: 469-475.

Kaufmann SH, Schaible UE (2005). Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Curr Opin Immunol* 17: 79-87.

Keane J, Gershon S, Wise RP, *et al.* (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345: 1098-1104.

Keller E, Perkins MD, Small P, *et al.* (2006). Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature* 444: 49-57.

Koth LL, Solberg OD, Peng JC, *et al.* (2011). Sarcoidosis blood transcriptome reflects lung inflammation and overlaps with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 1153-1163.

Lighter J, Rigaud M, Huie M, *et al.* (2009). Chemokine IP-10: an adjunct marker for latent tuberculosis infection in children. *Int J Tuberc Lung Dis* 13: 731-736.

Lu C, Wu J, Wang H, *et al.* (2011). Novel biomarkers distinguishing active tuberculosis from latent infection identified by gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* 6: e24290.

Maertzdorf J, Repsilber D, Parida SK, *et al.* (2011). Human gene expression profiles of susceptibility and resistance in tuberculosis. *Genes Immun* 12: 15-22.

Maertzdorf J, Weiner J 3rd, Mollenkopf HJ (2012). Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. *Proc Natl*

Acad Sci USA 15: 7853-7858.

Makhopadhyay A, Guan M, Chen HY, *et al.* (2006). Prospective study of a new serological test (ASSURE TB Rapid Test) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 620-624.

McNerney R, Daley P (2011). Towards a point-of-care test for active tuberculosis: obstacles and opportunities. *Nat Rev Microbiol* 9: 204-213.

Mihret A (2012). The role of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Virulence* 3: 654-659.

Morita YS, Patterson JH, Billman-Jacobe H, *et al.* (2004). Biosynthesis of mycobacterial phosphatidylinositol mannosides. *Biochem J* 597: 589-597.

Nimmerjahn F, Ravetch JV (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8: 34–47.

North RJ, Jung YJ (2004). Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 22: 599-623.

O'Garra A, Redford PS, McNab FW, *et al.* (2013). The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 31: 475-527.

Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, *et al.* (2005). Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 53-64.

Ottenhoff THM (2009). Overcoming the global crisis: “Yes, we can”, but also for TB? *Eur J Immunol* 39: 1991-2058.

Pai M, Riley LW, Colford JM Jr (2004). Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 4: 761-776.

Pereira SM (2007). BCG vaccine against tuberculosis: it is protective. *Rev Saúde Pub* 41: 1-7.

Perkins MD, Cunningham J (2007). Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. *J Infect Dis* 196: 15-27.

Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, *et al.* (1983). Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J Exp Med* 158: 1092–1113.

Pompei L, Jang S, Zamlynny B, *et al.* (2007). Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J Immunol* 178: 5192-5199.

Quesniaux V, Fremont C, Jacobs M (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* 6: 946-959.

Repique CJ, Li A, Brickey WJ, *et al.* (2003). Susceptibility of mice deficient in the MHC class II transactivator to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 58: 15-22.

Ruffino-Netto A (2002). Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 51-58

Sahin F, Yildiz P (2013). Distinctive biochemical changes in pulmonary tuberculosis and pneumonia. *Arch Med Sci* 9: 656-661.

Salgame P (2005). Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol* 17: 374-380.

Saunders BM, Britton WJ (2007). Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 85: 103-111.

Shenoy AR, Wellington DA, Kumar P, *et al.* (2012) GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science* 336:

481-485.

Small PM, Pai, M (2010). Tuberculosis diagnosis: time for a game change. *N Engl J Med* 363: 1070-1071.

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

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (2004). II Consenso Brasileiro de tuberculose. Diretrizes brasileiras para tuberculose 2004. *J Bras Pneumol* 30: 1-55.

Stenger S, Modlin RL (2002). Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 14: 452-457.

SVS (2010). Tuberculose no Brasil: avanços e perspectivas. Programa nacional de controle da tuberculose, PNCT/SVS. Comunicação pessoal. São Paulo, 02 de Setembro de 2010.

Tailleux L, Gicquel B, Neyrolles O (2003). DC-SIGN, a key receptor of *Mycobacterium tuberculosis*? *Med Sci (Paris)* 19: 658-660.

Taylor GM, Stewart GR, Cooke M, *et al.* (2003). Koch's Bacillus: a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology* 149: 3213-3220

te Velde AA, de Waal Malefijt R, Huijbens RJ, *et al.* (1992). IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J Immunol* 149: 4048-4052.

Teixeira HC, Munk ME, Kaufmann SH (1995). Frequencies of IFN gamma- and IL-4-producing cells during *Mycobacterium bovis* (BCG) infection in two genetically susceptible mouse strains: role of alpha/beta T cells and

NK1.1 cells. *Immunol Lett* 46: 15-19.

Thuong NT, Dunstan SJ, Chau TT, *et al.* (2008). Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles. *PLoS Pathog* 4: e1000229.

Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, *et al.* (1999). *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol* 163: 3898–3906.

Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, *et al.* (2004). Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 204: 217-228.

van Crevek R, Ottenhoff TH, van der Meer JW (2003). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Exp Med Biol* 531: 241-247.

Vanham G, Edmonds K, Qing L, *et al.* (1996). Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection. *Clin Exp Immunol* 103: 30–34.

Wallis RS, Kim P, Cole S, *et al.* (2013). Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges. *Lancet Infect Dis* 13: 362-372.

Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, *et al.* (2011). Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 11: 343-354.

Weiner J, Maertzdorf J, Kaufmann SH (2013). The dual role of biomarkers for understanding basic principles and devising novel intervention strategies in tuberculosis. *Ann NY Acad Sci* 1283: 22-29.

WHO. World Health Organization (2013). Global Tuberculosis Control - Epidemiology, Strategy, Financing. Annual Report 2013. Geneva,

Switzerland.

Winau F, Weber S, Sad S, *et al.* (2006). Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24: 105-117.

Zhang M, Yue J, Yang Y, *et al.* (2005). Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 43: 5477-5482.

Capítulo 8

ANEXOS

Tuberculosis in a southern Brazilian prison

Daniele Kuhleis^{1,2}, Andrezza Wolowski Ribeiro^{1,3}, Elis Regina Dalla Costa³,
 Patrícia Izquierdo Cafrune¹, Karen Barros Schmid^{1,3}, Lucas Laux da Costa^{1,3},
 Marta Osório Ribeiro³, Arnaldo Zaha¹, Maria Lucia Rosa Rossetti^{3,4/+}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil ²Penitenciária Estadual do Jacuí, Charqueadas, RS, Brasil ³Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, RS, Brasil ⁴Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil

The occurrence of tuberculosis (TB) in prisons has been described as an alarming public health problem in many countries, especially in developing nations. The objective of this study was to conduct a survey among prisoners with TB respiratory symptoms in order to estimate the incidence of the disease, to analyze the drug susceptibility profile and genotype the isolates of Mycobacterium tuberculosis in the city of Charqueadas, southern of Brazil. The TB incidence was 55/1,900 inhabitants in the prison; this corresponds to an incidence of 3,789/100,000 inhabitants, with a prevalence of 72/1,900 (4,960/100,000 inhabitants). Drug susceptibility test was performed and, among the analyzed isolates, 85% were susceptible to all drugs tested and 15% were resistant to at least one drug, of which 89% were resistant only to isoniazid (INH) or in combination with another drug. The genotype classification of spoligotyping analysis showed that 40% of the isolates belong to LAM family, 22% to T family, 17.5% to Haarlem family, 12.5% to U family and 3% to X family. The shared international spoligotypes most frequently found were 729 (27%), 50 (9.5%), 42 (8%), 53 (8%) and 863 (8%). In conclusion, it was observed that TB in this specific population had been caused, mostly, by strains that have been transmitted in the last few years, as demonstrated by the large level of genotype clustering. In addition, it was found specific large clusters, which were not often found in the general population from the same period and in the same region.

Key words: Brazilian prison - genotyping - prevalence - tuberculosis

The occurrence of tuberculosis (TB) in prisons has been described as an alarming public health problem in many countries, particularly in developing nations (Banu et al. 2010, Todrys et al. 2011). Furthermore, the TB incidence rate is higher in prisons than at the national level in Azerbaijan (61 times higher), Spain and Germany (10 times higher) and France (4 times higher) (Aerts et al. 2006). Data from Brazil are scarce; however, the TB prevalence in prisons in the city of São Paulo (SP) was 70 times higher than among the general Brazilian population (Abrahão et al. 2006). In a Rio de Janeiro (RJ) state prison, the prevalence was 35 times higher than in the state-wide general population (Legrand et al. 2008).

The prison population is predominantly young and male with a low education level and prisoners usually originate from disadvantaged communities with high TB rates (March et al. 2000). The prisoners usually live in unhealthy settings and do not have the resources or habits to keep themselves healthy. The prisoners may also have unhealthy habits or addictions that contribute to their poor health and have risk factors for developing TB, such as alcoholism, smoking and drug use. For these reasons, inmates enter prison with pre-existing illnesses

or with a higher risk of becoming ill compared to the general population (Dara et al. 2009). When the inmates enter the prison system, they are exposed to several factors that contribute to TB evolution, such as incarceration, overcrowding, a higher prevalence of human immunodeficiency virus (HIV) infection and malnourishment (Lobacheva et al. 2007, Banu et al. 2010, Abebe et al. 2011, Todrys et al. 2011).

A biomolecular approach used in several countries has proven that TB transmission inside prisons contributes significantly to the high TB incidence rates observed in prison populations (Clark et al. 1997, Ijaz et al. 2004). Methods such as spoligotyping are less discriminatory than other genotypic analysis systems such as minimum inhibitory concentration-variable-number tandem-repeat; however, spoligotyping can be useful when patterns from TB cases are compared with the international bank (SpolDB4) of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) isolates or the data from other countries or communities. This approach has shown that some emerging Mtb strains induce more severe forms of TB or manifest higher failure or relapse rates than other strains (Zhang et al. 2005, Brudey et al. 2006, Lazzarini et al. 2008). Additionally, this approach has helped to explain the spread of Mtb worldwide and revealed the predominance of different geographical genotypes (Brudey et al. 2006, Filliol et al. 2006, Gagneux et al. 2006). Moreover, a quick identification of mycobacteria within the Mtb complex (MTC) is enabled by this approach and the transmission and evolution of these microorganisms can be examined (Supply et al. 2001, Ignatova et al. 2006). In Spain, one institution characterised

+ Corresponding author: mrossett@terra.com.br

Received 31 October 2011

Accepted 9 July 2012

the transmission as recent and determined that it was acquired within the institution in two-thirds of the identified cases (Clark et al. 1997).

In addition, difficulty in accessing health care and poor adherence to treatment plans contribute to delayed diagnosis, disease transmission and the emergence of multidrug-resistant TB (MDR-TB) strains (Aziz et al. 2006), which are particularly common in prisons (Banu et al. 2010).

Prison overcrowding and the circulation of visitors and workers in prisons, between prisons and within the general population can lead to the swift transmission of TB, including drug-resistant forms, both inside and outside of the prison setting. Released prisoners can infect people in their communities; this transmission represents a serious health public risk (Mac Neil et al. 2005, Todrys et al. 2011). The prison population has increased considerably in Brazil over the years, making prisons the perfect places for TB transmission (Baptista et al. 2002). These circumstances reveal that urgent actions must be taken to detect and treat TB in inmates and trace the TB transmission routes in the community and in prisons (Abebe et al. 2011).

In this study, a survey was conducted among prisoners with TB respiratory symptoms in the metropolitan region of the city of Porto Alegre, the capital of the state of Rio Grande do Sul (RS), South Region of Brazil. The objectives of this work were to estimate the prevalence of the disease, to analyse the drug susceptibility profile of the prison population and to genotype the isolates of *Mtb* to better understand disease transmission among prison.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Setting - RS is the most southern Brazilian state and its capital, Porto Alegre, has 1.4 million inhabitants (Brazilian Institute of Geography and Statistics) (ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1). RS has a TB incidence of 47 per 100,000 inhabitants [State Centre for Health Surveillance of RS (CEVS/RS) (saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=organograma&cod=4442) and Porto Alegre has an incidence of 120 per 100,000 inhabitants, which is the highest incidence rate of TB in Brazil. Approximately one third of the TB patients in Porto Alegre are co-infected with HIV, which is considerably higher than the average rate of 8-10% nationally.

Patients - This is a descriptive epidemiological study and the study population included inmates of the State Penitentiary of Jacuí (PEJ), Charqueadas, RS, which receives prisoners from Porto Alegre and its metropolitan region.

From August 2007-August 2008, a screening questionnaire was given to 1,900 prisoners. The inclusion criteria were cough for more than three weeks, signing an informed consent form and answering the questionnaire. Two sputum samples were collected from each participant on different days and forwarded to and processed at the Centre for Scientific and Technological Development of the State Foundation of Production and Health Research (FEPPS). Each patient was included in the study only once and contributed only one isolate.

Ethics - This work has approval from the ethical committee on research of the FEPPS/RS (410528/2006-4) and was conducted within an ethical framework.

Bacteriological analysis - The samples were decontaminated and cultured in accordance with Kudoh and Kudoh (1974). To detect *Mtb*, Ziehl-Neelsen smears and staining were prepared (BK). The samples were classified according to the National Laboratory Guidelines for Surveillance of Tuberculosis and other Mycobacteria (MS/SVS 2008). After identification at the species level through an analysis of the morphologic and biochemical characteristics (MS/SVS 2008), the *Mtb* isolates were stored in a pH 6.8 phosphate buffer and frozen at -20°C.

Drug-susceptibility testing (DST) - DST was performed using the 1% proportion method on Lowenstein-Jensen medium as standardised by Canetti et al. (1969).

DNA extraction and genotyping by spoligotyping - The genomic DNA from the culture was extracted by the CTAB method (van Embden et al. 1993). The strains were spoligotyped following the Kamerbeek et al. (1997) method. The following definition was adopted: a cluster was a group of two or more patients whose genotypes had 100% identical spoligotypes.

RESULTS

Among 1,900 inmates of the PEJ, 392 (20.6%) had TB respiratory symptoms. Of these 392 inmates, 350 (89%) had contact with TB within the PEJ, 35 (8.9%) had a previous contact with TB outside the institution and, after their imprisonment, they had additional TB contact. Sixty-six prisoners (17%) had at least one episode of TB in the past and 11 (2.8%) were undernourished. Seventy-two patients (3.8%) were positive for TB. Of these 72 patients, 68 (94.4%) were both culture and smear sputum positive. Four (5.6%) inmates were only sputum smear positive. Twenty samples (27.8%) were paucibacillary (fewer than 20 colonies in the culture) and one sample was smear sputum positive.

The TB prevalence was 3.8% (72 of 1,900 inhabitants). Of the TB cases, 17 patients (23.6%) had at least one prior TB episode and were considered retreatment cases. Thus, the incidence of new cases was 2.9% (55 of 1,900 inhabitants). This incidence corresponds to an incidence of 3,789 TB cases per 100,000 inhabitants. The mean patient age was 30.64 years (ranging from 20-60) and 98.7% of cases were younger than age 45. The demographics for the 72 TB patients were as follows: 56 (77.7%) were white, three (4.16%) were illiterate, the average number of years of education was 5.38, 46 (63.8%) had a partner, 41 (56.94%) were smokers, 29 (40.27%) were drug users, five (6.9%) had HIV, 64 (89%) had contact with TB within the PEJ, eight (11%) had a previous contact with TB outside the institution and after imprisonment had additional TB contact, 17 (23.6%) had at least one episode of TB in the past and four (5.5%) were undernourished (body mass index < 18). Among the prisoners with respiratory symptoms, there was no significant difference between those with and without TB (regarding the above analysed characteristics).

DST was performed in 60 isolates of Mtb, as four culture samples were negative and eight isolates were not viable for the analysis. Fifty-one (85%) of the analysed isolates were susceptible to all of the tested drugs and nine (15%) were resistant to at least one drug. Eight (89%) of the resistant isolates were resistant to isoniazid (INH) either alone or in combination with another drug.

Sixty-three isolates were available for genotyping. Upon genotype classification by spoligotyping as defined by Brudey et al. (2006), 25 (40%) isolates belonged to the LAM family, 14 (22%) belonged to the T family, 11 (17.5%) belonged to the Haarlem family, eight (12.5%) belonged to the U family, two (3%) belonged to the X family and three (5%) had an unclassified spoligopattern (not listed in the worldwide spoligotypes bank SpolDB4). Further analyses evaluating shared international spoligotype (SIT) patterns showed 55 (87.3%) isolates clustering with 10 different SITs; 22 isolates formed LAM lineage bunches in two different clusters. The main cluster in the study had 17 (27%) isolates and belonged to SIT729 (LAM1) and a cluster of five isolates belonged to SIT42 (LAM9). The second most prevalent clustering was SIT65 [T1 (T4-CE1 ancestor?)] with seven (11%) isolates and the third most prevalent was SIT50 (Haarlem3) with six (9.5%) isolates. Eight (12.7%) isolates matched the eight individual SITs reported in our study as orphans by SpolDB4 (Table). Three isolates were segregated into three SITs that were not reported by SpolDB4. Of these three isolates, two could be defined as LAM by their similarity with this family, as shown in Table.

DISCUSSION

The TB prevalence found in the studied population was higher than in the general population. Despite inherent methodological study limitations (in comparing different size populations) and despite measuring incidence and prevalence in an unstable population (Rieder et al. 2011), when the incidence rates found in this study (3,789 per 100,000 inhabitants) were projected and compared to the number of RS cases reported during the same period (47 per 100,000 inhabitants), the PEJ prevalence was approximately 80 times higher than in the general population in RS and 32 times higher than in the general population of Porto Alegre (CEVS/RS). Several studies of prisons in SP and RJ have shown data similar to the results of the current study (Oliveira & Cardoso 2004, Abrahão et al. 2006, Fournet et al. 2006). The reasons for the higher TB prevalence rates observed in prisons could be explained by several factors. First, prisoners have a higher risk of becoming infected with TB than the general population, as most prisons are overcrowded and a high number of prisoners share a cell with inadequate ventilation, inadequate hygiene and inadequate nutrition; in addition, prisoners have limited access to health services and spend little time outdoors. Second, the life circumstances of most prisoners (low socioeconomic and education level, narcotic drug use, HIV infection and underfeeding) can predispose them to developing active TB once they are infected (WHO 1998, Lobacheva 2007, Dara et al. 2009, Todrys et al. 2011). In this study, five (6.9%) of the 72 TB-positive prisoners declared themselves to be HIV

positive on the questionnaire and the other 67 TB-positive prisoners were unaware of their HIV status or denied their status. This method of ascertaining HIV status may be considered a limitation of the study.

When evaluating the microscopy and culture techniques used as diagnostic criteria, 45.8% of samples were positive according to both techniques. Thirty-five patients (48.6%) were diagnosed only by culture and 20 samples (27.8%) had growth of less than 20 colonies (paucibacillary). These findings confirm the importance of using culture, as recommended by the Brazilian Ministry of Health, which considers it the "gold standard" for detecting and identifying Mtb.

Despite its delay in producing results (approximately 4 weeks for non-automated samples) and the expected contamination rate (3-5%), culture has good sensitivity and specificity, which enables the identification of the etiologic agent in clinically paucibacillary specimens (Campos et al. 1996, Lee et al. 1999). According to the Handbook of National Tuberculosis Laboratory Surveillance (MS/SVS 2008), 20% more cases of pulmonary TB are found when sputum cultures are performed compared to smear-only case definitions. Culture also allows further identification of mycobacterial isolated species, susceptibility testing to anti-TB drugs and faster DNA access for molecular techniques. Culture specificity to TB diagnosis is higher than 99% and absolute specificity is achieved when the tests are performed to identify the MTC. The application of this diagnosis technique meets the recommendations of the new Guidelines of Recommendations for Tuberculosis Control (MS/SVS 2010) for vulnerable populations, which state that sputum culture should be performed whenever TB is suspected, regardless of the smear result.

Another important finding of this study concerns the resistance of Mtb to anti-TB drugs performed in 60 of 72 (83.33%) patients. Resistance was found in nine (15%) cases in which four (6.6%) had monoresistance (1 drug) and five (8.4%) had resistance to at least two drugs. This resistance prevalence was similar to the 11.1% drug resistance prevalence found in RJ prison (Sanchez et al. 2007). In both cases, the resistance prevalence was higher than the national resistance rate, which was 8.5%, according to the results of the First Survey of Resistance to Anti-Tuberculosis Drugs held in Brazil in 1996 (Braga et al. 2003). These findings emphasise that directly observed treatment should be prioritised with the offering of a culture test for all high risk patients, such as drug users, alcoholics, patients being retreated to avoid the emergence of MDR strains, the homeless and patients living in closed communities (e.g., prisons, hospices, nursing homes and psychiatric hospitals).

The spoligotyping analysis showed that the three major genotypic families (LAM, T and Harlem) comprised 84.5% of the tested isolates; however, the proportion of isolates in the LAM family was lower, although this family has been found more frequently in other studies. The family LAM, which was found in 40% of isolates, is common in Africa, Central America, Europe and South America and represents 80% of all isolates in the Brazilian SpolDB4 (Brudey et al. 2006, Lipin et al. 2007,

Dalla Costa et al. 2009, Ritacco et al. 2011, Perizzolo et al. 2012). The Mtb strains of the Beijing family have contributed largely to the global spread of TB (Parwati et al. 2010). However, Beijing strains were not observed in our specific population, which is in accordance with other South American studies, including Brazil (Dalla Costa et al. 2009, Ritacco et al. 2011); spoligotyping can be useful for identifying this possibility at an early stage.

LAM1 SIT729 (27%) and U SIT863 (8%) have been reported in other studies and have been associated with patients who have incarceration histories. Cafrune (2009) identified SIT863 in six patients who had a recent incarceration history. This spoligopattern is not often reported. One isolate was found in the United States of America, two were found in the city of Pelotas, RS and, more recently, two were found in Venezuela (Borsuk et al. 2005, Sequera et al. 2008). However, SIT729 was reported to be associated with incarceration by Cafrune (2009); 72% of the patients with this SIT were inmates. A study of MDR-TB strains from RS identified three isolates belonging to the U family SIT863 and one of these isolates was in a prisoner (Perizzolo et al. 2012). The spoligotyping analysis showed that the resistant strains are probably not being spread quickly among the inmates, as the resistant genotypes differed from each other, except for two INH-resistant isolates that belonged to SIT729 (LAM1). As shown in Table, most isolates were allocated to a few clusters (87.3% cluster rate). This finding demonstrates that only a few strains may be responsible for the colonisation of the hosts and they prevail due to the close proximity between inmates. This process was previously reported by Moreira-Oliveira et al. (2008). This cluster rate was slightly higher than the rate usually reported for the general population (Cafrune et al. 2009, Dalla Costa et al. 2009). In addition, the clusters found in this inmate population are not often found in the general population from the same period and region (Valim et al. 2000, Cafrune et al. 2009, Dalla Costa et al. 2009, Perizzolo et al. 2012).

Further analyses indicated that the evaluated SIT patterns showed that 55 (87.3%) isolates (clustered by spoligotyping) matched with 10 different SITs. Among these SITs, 22 were LAM lineage and bunched in two different clusters. The main cluster in the study had 17 (27%) isolates and belonged to SIT729 (LAM1); the other cluster of five isolates belonged to SIT42 (LAM9). The second most prevalent clustering was SIT65 [T1 (T4-CE1 ancestor?)] with seven (11%) isolates and the third most prevalent clustering was SIT50 (Haarlem3) with six (9.5%) isolates. The Haarlem presence [11 (17.5%)] was higher than in other studies performed only with strains from RS (Cafrune et al. 2009, Perizzolo et al. 2012). No correlation was found between the genotype families, which were defined by spoligotyping and resistance to any drug (Table).

In conclusion, it was observed that TB in this specific population had been caused primarily by strains that have been transmitted in the last several years, demonstrated by the large level of genotype clustering. In addition, specific large clusters, which were not often found in the general population, were observed. Actively searching for cases and the use of culture allowed for the early diagnosis of 25% of the expected cases in a hostile envi-

ronment where health access is restricted and the health system is not always accessed. The application of DST enabled the identification of MDR bacilli and the reorientation of correct treatment for these patients. SIT729 and SIT863 may correlate with a history of incarceration; however, further studies should be conducted using other techniques of genotyping with higher discriminatory power to confirm if the isolates of each SIT are a single strain spread throughout the prison system. These findings would be important because MDR isolates with the profile SIT863 have already been found and these SITs are associated with an important vulnerable group consisting of members who are deprived of liberty.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the research groups at CDCT/FEPPS and to PEJ staff, for their infrastructure and cooperation.

REFERENCES

- Abebe DS, Bjune G, Ameni G, Biffa D, Abebe F 2011. Prevalence of pulmonary tuberculosis and associated risk factors in eastern Ethiopian prisons. *Int J Tuberc Lung Dis* 15: 668-673.
- Abrahão RM, Nogueira PA, Malucelli MI 2006. Tuberculosis in county jail prisoners in the western sector of the city of São Paulo, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 203-208.
- Aerts A, Hauer B, Wanlin M, Veen J 2006. Tuberculosis and tuberculosis control in Europeans prisons. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 1215-1223.
- Aziz MA, Wright A, Laszlo A, De Mynck A, Portaels F, Van Deun A, Wells C, Nunn P, Blanc L, Raviglione M 2006. WHO/International Union against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Epidemiology of anti-tuberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis. *Lancet* 16: 2142-54.
- Banu S, Hossain A, Uddin MK, Uddin MR, Ahmed T, Khatun R, Mahmud AM, Hyder KA, Lutfor AB, Karim MS, Zaman K, Khan MA, Barua PC, Luby SP 2010. Pulmonary tuberculosis and drug resistance in Dhaka central jail, the largest prison in Bangladesh. *PLoS ONE* 21: e10759.
- Baptista IMFD, Oelemann MC, Opromolla DVA, Suffys PN 2002. 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1147-1152.
- Borsuk S, Dellagostin MM, Madeira SG, Lima C, Boffo M, Mattos I, Almeida da Silva PE, Dellagostin AO 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. *Microbes Infect* 7: 1338-1344.
- Braga JU, Werneck BA, Hajar MA 2003. Inquérito epidemiológico de resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil. *Bol Pneumol Sanit* 11: 76-81.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune PI, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia DE, Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Guttierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofonana R, Razanampanany V, Rasolonavalona T, Rossetti MLR,

- Rüsch-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somooskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6: 23.
- Cafrune PI 2009. *Avaliação da técnica de spoligotyping aplicada diretamente em amostras clínicas de pacientes com suspeita de tuberculose e caracterização epidemiológica*, PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 105 pp.
- Cafrune PI, Possuelo LG, Ribeiro AW, Ribeiro MO, Unis G, Jarczewski CA, Rossetti MLR, Zaha A 2009. Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. *Can J Microbiol* 55: 895-900.
- Campos JM, Simonetti JP, Pone MV, Carvalho LA, Pereira AC, Garrido JR 1996. Disseminated bacillus Calmette-Guérin infection in HIV-infected children: case report and review. *Pediatr AIDS HIV Infect* 7: 429-432.
- Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N, Smelev NA 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* 41: 21-43.
- Clark PA, Cegielski JP, Hassell W 1997. TB or not TB? Increasing door-to-door response to screening. *Public Health Nurs* 14: 268-271.
- Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PE, Fonseca LS, Ho JL, Kritski AL, Rossetti MLR 2009. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and *in vitro* susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol* 19: 39.
- Dara M, Grzemska M, Kimerling ME, Reyes H, Zagorskiy A 2009. Guidelines for control of tuberculosis in prisons. Available from: pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADP462.pdf.
- Fillipi I, Motiwala AS, Cavatore M, Qi W, Hazbon MH, Bobadilla del Valle M, Fyfe J, Garcia-Garcia L, Rastogi N, Sola C, Zozio T, Guerrero MI, Leon CI, Crabtree J, Angiuoli S, Eisenach KD, Durmaz R, Joloba ML, Rendon A, Sifuentes-Osornio J, Ponce de Leon A, Cave MD, Fleischmann R, Whittam TS, Alland D 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems and recommendations for a minimal standard SNP. *Set J Bacteriol* 188: 759-772.
- Fournet N, Sanchez A, Massari V, Penna L, Natal S, Biondi E, Larouze B 2006. Development and evaluation of tuberculosis screening scores in Brazilian prisons. *Public Health* 120: 976-983.
- Gagneux S, de Riemer K, Van T, Kato-Maeda M, Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* 103: 2869-2873.
- Ignatova A, Dubiley S, Stepanshina V, Shemyakin I 2006. Predominance of multidrug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula region, Russia. *J Med Microbiol* 55: 1413-1418.
- Ijaz K, Yang Z, Templeton G, Stead WW, Bates JH, Cave MD 2004. Persistence of a strain of *Mycobacterium tuberculosis* in a prison system. *Int J Tub Lung Dis* 8: 994-1000.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907-914.
- Kudoh S, Kudoh TA 1974. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull World Health Organ* 51: 71-82.
- Lazzarini LC, Spindola SM, Bang H, Gibson AL, Weisenberg S, da Silva Carvalho W, Augusto CJ, Huard RC, Kritski AL, Ho JL 2008. RD¹⁰ *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitary pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 46: 2175-2183.
- Lee ASG, Lim IHK, Tang LLH, Telenti A, Wong SY 1999. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2087-2089.
- Legrand J, Sanchez A, Le Pont F, Camacho L, Larouze B 2008. Modeling the impact of tuberculosis control strategies in highly endemic overcrowded prisons. *PLoS ONE* 3: 2100.
- Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM 2007. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin Microbiol Infect* 13: 620-626.
- Lobacheva T, Asikainen T, Giesecke J 2007. Risk factors for developing tuberculosis in remand prisons in St. Petersburg, Russia - a case-control study. *Eur J Epidemiol* 22: 121-127.
- Mac Neil RJ, Mc Rill C, Steinhauer G, Weisbuch JB, Williams E, Wilson ML 2005. Jails, a neglected opportunity for tuberculosis prevention. *Am J Prev Med* 28: 225-228.
- March F, Coll P, Guerrero RA, Busquets E, Cayla JA, Prats G 2000. Predictors of tuberculosis transmission in prisons: an analysis using conventional and molecular methods. *AIDS* 14: 525-535.
- Moreira-Oliveira MS, Oliveira HB, Pace F, Stelling EG, Rocha MMM, Aily DCG, Brocchi M, Silveira WD 2008. Molecular genotyping and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained from inmates of correctional institutions of Campinas, Southeast Brazil. *Braz J Infec Dis* 12: 487-493.
- MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 2008. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Available from: portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1133.
- MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 2010. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Available from: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf.
- Oliveira HB, Cardoso JC 2004. Tuberculose no sistema prisional de Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 15: 194-199.
- Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D 2010. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis* 10: 103-111.
- Perizzolo PF, Dalla Costa ER, Ribeiro AW, Spies FS, Ribeiro MO, Dias CF, Unis G, Silva PA, Gomes HM, Suffys PN, Rossetti MLR 2012. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. *Tuberculosis* 92: 56-59.
- Rieder HL, Anderson C, Dara M, Hauer B, Helbling PK, Kam M, Zwahlen M 2011. Methodological issues in quantifying the magnitude of the tuberculosis problem in a prison population. *Int J Tuberc Lung Dis* 15: 662-667.
- Ritacco V, Iglesias MJ, Ferrazoli L, Monteserin J, Dalla Costa ER, Cebollada A, Morcillo N, Robledo J, de Waard JH, Araya P, Ari-

- stimuño L, Díaz R, Gavin P, Imperiale B, Simonsen V, Zapata EM, Jiménez MS, Rossetti MLR, Martin C, Barrera L, Samper S 2011. Conspicuous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain. *Infect Genet Evol* 12: 711-717.
- Sanchez AR, Massari V, Gerhardt G, Barreto AW, Cesconi V, Pires J, Espínola AB, Biondi E, Larouzé B, Camacho LAB 2007. Tuberculosis in Rio de Janeiro prisons, Brazil: an urgent public health problem. *Cad Saude Publica* 23: 545-552.
- Sequera CM, Delgado SV, Araque MW, Torrealba OM, Núñez MR, da Mata JO, Abadía PE, Takiff H, de Waard J 2008. *Mycobacterium tuberculosis*: espoligotipos en el estado Carabobo, Venezuela. *Rev Chil Infect* 25: 362-367.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39: 3563-3571.
- Todrys KW, Amon JJ, Malembeka G, Clayton M 2011. Imprisoned and imperiled: access to HIV and TB prevention and treatment and denial of human rights, in Zambian prisons. *J Int AIDS Soc* 14: 8.
- Valim ARM, Rossetti ML, Ribeiro MO, Zaha A 2000. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol* 38: 3119-3122.
- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans SP, Martin C, Mcadam R, Shinnick TM, Small PM 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-409.
- WHO - World Health Organization 1998. Guidelines for the control of tuberculosis in prisons, WHO, Geneva, 90 pp.
- Zhang M, Yue J, Yang Y, Zhang H, Lei J, Jin R, Zhang X, Wang H 2005. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 43: 5477-5482.

**Mycobacterium tuberculosis of the RD^{Rio}
Genotype Is the Predominant Cause of
Tuberculosis and Associated with
Multidrug Resistance in Porto Alegre City,
South Brazil**

Elis Regina Dalla Costa, Luiz Claudio Oliveira Lazzarini,
Paulo Fernando Perizzolo, Chyntia Acosta Díaz, Fernanda S.
Spies, Lucas Laux Costa, Andrezza W. Ribeiro, Caroline
Barroco, Sandra Jungblut Schuh, Marcia Aparecida da Silva
Pereira, Claudia F. Dias, Harrison M. Gomes, Gisela Unis,
Arnaldo Zaha, Pedro E. Almeida da Silva, Philip N. Suffys
and Maria L. R. Rossetti
J. Clin. Microbiol. 2013, 51(4):1071. DOI:
10.1128/JCM.01511-12.
Published Ahead of Print 16 January 2013.

Updated information and services can be found at:
<http://jcm.asm.org/content/51/4/1071>

These include:

REFERENCES

This article cites 39 articles, 18 of which can be accessed free
at: <http://jcm.asm.org/content/51/4/1071#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Mycobacterium tuberculosis of the RD^{Rio} Genotype Is the Predominant Cause of Tuberculosis and Associated with Multidrug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil

Elis Regina Dalla Costa,^a Luiz Claudio Oliveira Lazzarini,^b Paulo Fernando Perizzolo,^a Chyntia Acosta Díaz,^c Fernanda S. Spies,^a Lucas Laux Costa,^a Andrezza W. Ribeiro,^a Caroline Barroco,^a Sandra Jungblut Schuh,^e Marcia Aparecida da Silva Pereira,^c Claudia F. Dias,^e Harrison M. Gomes,^c Gisela Unis,^e Arnaldo Zaha,^f Pedro E. Almeida da Silva,^d Philip N. Suffys,^c Maria L. R. Rossetti^{a,g}

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, Brazil^b; Tuberculosis Research Unit, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil^b; Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil^f; Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande, Brazil^d; Hospital Sanatório Partenon (HSP), Porto Alegre, Brazil^e; Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil^f; Universidade Luterana do Brazil (ULBRA/RS), Porto Alegre, Brazil^g

Spoligotyping has shown *Mycobacterium tuberculosis* strains to be composed of different lineages, and some of them are not just geographically restricted but also affect specific ethnic populations and are associated with outbreaks and drug resistance. We recently described a particular subtype within the Latin American-Mediterranean (LAM) family, called RD^{Rio}, widespread in Brazil. Moreover, recent data also indicate that RD^{Rio} is present in many countries on all continents and is associated with cavity disease and multidrug resistance (MDR). To further explore the relationship between RD^{Rio} and MDR, we conducted a study in a tuberculosis (TB) reference center responsible for the care of MDR patients in Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian state. From a collection of 237 clinical isolates, RD^{Rio} alone was responsible for one-half of all MDR cases, including one large group composed of strains with identical IS6110-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and having the LAM5 signature. We additionally had complete data records for 96 patients and could make comparisons between the presence and absence of RD^{Rio}. No difference in clinical, radiological or laboratory features was observed, but a significantly greater number of cases with MDR were described in patients infected with an RD^{Rio} strain ($P = 0.0015$). Altogether, RD^{Rio} was responsible for 38% of all TB cases. These data support and confirmed previous findings that RD^{Rio} is the main agent responsible for TB in Brazil and is associated with drug resistance. Considering that RD^{Rio} is a globally distributed genotype, such findings raise concern about the increase in MDR in certain human populations.

Despite increasing efforts, tuberculosis (TB) continues to be a significant cause of morbidity and mortality around the globe, particularly in developing countries, where the increase in the number of multidrug-resistant (MDR) strains and the emergence of extensively drug-resistant (XDR) strains make the situation even more dramatic, posing a significant threat to the WHO goals of reducing the prevalence and deaths due to TB by 50% by 2015 and the elimination of TB as a public health problem by 2050 (http://www.who.int/tb/strategy/stop_tb_strategy/en/index.html). There are several factors responsible for this problem, most of them related to economic and social issues such as poverty, drug addiction, HIV-positive status, and difficult access to anti-TB drugs, among others. Although these factors are unquestionable, others directly related to the microorganism itself are also probably significant but less studied and understood.

The deciphering of the complete genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in 1998 (1) led to a better understanding of its biology, facilitating the analysis and further expanding the use of molecular tools for interrogation of the genome, such as IS6110-restriction fragment length polymorphism (RFLP), spoligotyping, and mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) typing (2–4). Among these methods, spoligotyping proved to be a particularly useful tool. It is a standardized amplification method targeting the polymorphic Mtb complex-specific direct repeat (DR) locus and is visualized as a binary 43-digit pattern or reduced to an octal form of 15 digits (2). Compared to IS6110-RFLP and MIRU-VNTR typing, spoligotyping is unable to achieve the same level of dis-

crimination; however, the assay is rapid, inexpensive, and robust, and the data can be easily exchanged between laboratories. Therefore, spoligotyping is often used as a first-line genotyping method and is the basis of the definition of the major genotype families of *M. tuberculosis* such as the Beijing, Haarlem, T, X, S, East African-Indian (EAI), Latin American-Mediterranean (LAM), and Central Asian (CAS) families, among others. Each of these patterns is included in the SpolDB4, an international database developed and maintained by the Pasteur Institute of Guadeloupe, which includes spoligotypes submitted by investigators from all over the world (5) and is available online (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo>). Some of the spoligotype families (also called spoligofamilies) are preferentially distributed in particular geographic regions, indicating that they are either spreading locally or better adapted to certain human populations (5–7). Importantly, some spoligofamilies have been associated with outbreaks and multidrug resistance, the Beijing (and Beijing-like) spoligofamily being the best-known example (8–11). Although

Received 11 July 2012 Returned for modification 13 August 2012

Accepted 5 December 2012

Published ahead of print 16 January 2013

Address correspondence to Luiz Claudio Oliveira Lazzarini, lazzarini@hucff.ufrj.br.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.01511-12

predominant in far-east Asia, the Beijing spoligofamily is much less frequently found in the Americas, Europe, and Africa, where LAM, Haarlem, T, and S families predominate (5). The LAM family, a member of single nucleotide polymorphism (SNP) cluster VI (12), appears to be the most prevalent *M. tuberculosis* lineage globally, accounting for ~15% of the global TB burden (5). Despite its success, little is yet known about the epidemiology, biological behavior, and clinical attributes of disease caused by strains of the LAM family. Similar to Beijing family strains, members of the LAM family have also been associated with drug resistance and outbreaks (13–16), including the recent description of a LAM strain as the leading cause of XDR-TB in South Africa (17).

An additional reason for studying the features of the spoligofamilies was the recent discovery of RD^{Rio}, a subfamily inside the larger LAM spoligofamily, which seems to be prevalent in several places in Brazil (18–23) but also in many other countries, particularly in Central and South America, Europe, and Africa (19). Analysis of TB isolates and registry data from New York, NY, between 2001 and 2005 showed that RD^{Rio} was responsible for 8% of all TB cases (24), a remarkably high rate considering the population diversity in that city. Moreover, RD^{Rio} was associated with cavitary disease in the Brazilian population (22) and a tendency (not statistically significant) to cause cavitary disease and increased transmission efficiency among U.S.-born blacks and Hispanics and persons of Latin American or Caribbean Heritage (24) as well as with drug resistance (24). To confirm and expand these findings, the present study was undertaken in Rio Grande do Sul (RS), the southernmost Brazilian state, for which no data on RD^{Rio} status and characteristics exist. In contrast to the other parts of the country, South Brazil received a high influx of Europeans (particularly Germans and Italians) in the beginning of the last century. This study was approved by the ethical committee of the School of Public Health of Rio Grande do Sul.

MATERIALS AND METHODS

Study setting. According to the World Health Organization, Brazil is on the list of high-burden TB countries and among the 22 nations in which 80% of the world's new TB cases occur. In Brazil, 81,946 new TB cases were reported in 2010, and this was translated to incidence, prevalence, and mortality rates of, respectively, 43, 47, and 2.6 per 100,000 inhabitants (25). Isolates from this study were obtained from cases diagnosed at the TB clinic of the "Sanatório Partenon Hospital" (HSP), a regional TB reference center located in Porto Alegre City, the capital of Rio Grande do Sul State, Brazil. The center is the only institution in the state to care for MDR patients. Porto Alegre City has a population of 1.44 million inhabitants and a TB incidence of 93 per 100,000 inhabitants, the highest in RS, with 1,506 new cases in 2008 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE]; http://www.saude.rs.gov.br/dados/1293727576139Situa%E7%E3o_TB_RS_2.pdf). Overall, Rio Grande do Sul State has a TB incidence of 47 per 100,000 inhabitants.

Mycobacterial strains. The present study comprises 237 *M. tuberculosis* isolates, each collected from different TB patients between 2004 and 2006. Testing of the isolates' drug susceptibility to isoniazid, rifampin, ethambutol, and streptomycin was performed at the Central Laboratory (LACEN) of Rio Grande do Sul State. MDR was defined as drug resistance to at least isoniazid and rifampin. The MDR isolates constitute the entire MDR collection available in the state at that time. The sensitive strains were a convenience sample chosen to match the MDR in terms of patient population and compliance with treatment. All strains were identified to the species level by morphological and biochemical analysis (26), and the tests for drug susceptibility were performed by the proportion method (27), using *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 as a susceptible control strain. Isolates with single-drug resistance were not included. The MDR

isolates were additionally submitted to sequence analyses for polymorphisms in the *katG* and *rpoB* genes, and part of the results were published elsewhere (28).

Nucleic acid extraction. Chromosomal DNA was extracted from cultures on Löwenstein-Jensen medium, using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method as previously described (29).

Spoligotyping. Spoligotyping was performed using a commercial kit, according to the manufacturer's instructions (Isogen Biosciences B.V., Netherlands). The spoligotype patterns were compared with the updated SITVIT database, which provides information on the shared type distributions of *M. tuberculosis* spoligotypes worldwide.

Detection of RD^{Rio}. A multiplex PCR was performed to differentiate RD^{Rio} from wild-type (WT) strains as previously described (19, 21, 22). Briefly, two sets of primer pairs were used to target either the IS1561 locus (positive only in WT strains and corresponding to a band size of 530 bp) or the region flanking the RD^{Rio} locus (positive only in RD^{Rio} strains and corresponding to a band size of 1,175 bp); the presence of both RD^{Rio} and WT strains in a single sample is indicated by the presence of both bands (22).

Clinical, radiological, and laboratory data. Complete data records were available for 103 patients, but for 7 of them both RD^{Rio} and WT bands were identified in the same clinical isolate, indicating either mixed infection or laboratory contamination. These seven cases were excluded, leaving 96 patients for analysis, including 25 drug-susceptible and 71 drug-resistant cases. The MDR group was from secondary drug resistance cases, with multiple treatments. To better match this group, the drug-sensitive cases were also from patients with irregular treatment but who had not developed drug resistance. Clinical data included gender, race, presence of hemoptysis, weight loss, fever, alcoholism, and HIV status. Radiological data included the presence of lung cavitation, homogenous infiltrate, miliary pattern, pleural effusion, and mediastinal adenopathy. Bacteriological data included smear staining for acid-fast bacilli (AFB), culture, and sensitivity to anti-TB drugs.

Statistical analysis. Continuous variables were compared by the *t* test and categorical variables by the X² or Z-test (proportions), as appropriate. The comparison relied on logistic regression. Results for continuous variables were means ± standard deviations (SD). The two-sided 0.05 threshold was used for statistical significance. Analysis was performed using the statistical software XLSTAT (Addinsoft, France).

RESULTS

Among the 237 *M. tuberculosis* isolates, 122 (51%) were sensitive to all drugs and 115 (49%) were resistant to at least both isoniazid and rifampin, and among the latter set, 18 strains were also resistant to streptomycin and another 3 strains were resistant to ethambutol. A single strain was resistant to all four drugs, but at that time no further tests were performed to evaluate whether this strain was XDR. All isolates were spoligotyped and classified according to the spoligopatterns available in the SITVIT website. All spoligotyping patterns and genotypes (RD^{Rio} or WT) for each *M. tuberculosis* isolate are listed in Table 1.

In total, LAM strains account for 53% of the MTB collection (RD^{Rio} alone accounts for 38%), whereas T and Haarlem families account for 21% and 7.6%, respectively. The other families are represented in <5% of the strains. Among the 122 susceptible isolates, 53 were LAM (43%), 29 belonged to the T family (24%), 13 were Haarlem strains (11%), 3 were of the S family, and another 3 were of the X family (2% each). In addition, nine strains were classified as U or unknown (7%) and 14 isolates (11%) had no described spoligotype and were classified as orphans. In total, the susceptible strains bunched into 9 different clusters. RD^{Rio} was exclusively responsible for 64% (34/53) of the susceptible LAM strains, 28% (34/122) of all susceptible strains, and 48% (56/115)

DISCUSSION

There is increasing evidence that specific *M. tuberculosis* strains possess unique genetic traits and virulence phenotypes. As examples, we mention strains within the W/Beijing spoligotype that produce a modified phenoglycolipid associated with an insertion in the *pks15/1* gene and dampened induction of interleukin-6 (IL-6), IL-12, and tumor necrosis factor (TNF) (30, 31) and the CDC1551 strain that is associated with inducing a higher proinflammatory response (32). One of the mechanisms of *Mycobacterium* that could underlie the evasion from the host immune response is alteration of expression of the genes belonging to the PPE/PE_PGRS family, encoding surface proteins associated with mycobacterial virulence and host immune response (1, 33, 34). We previously speculated that in *M. tuberculosis* strains with the RD^{Rio} deletion, the loss of two PPE genes (PPE55 and PPE56) could minimize host immune recognition, leading to enhanced virulence and/or transmissibility (21). Indeed, both PPE55 and PPE56 have been shown to be expressed *in vivo* and upon entry into interferon-activated macrophages and are immunogenic in humans (35, 36). In addition, polymorphisms in PPE55 and/or PPE56 have been noted in several clinical strains of *M. tuberculosis* and *M. tuberculosis* complex (MTC) species (26, 37).

Independent of the possible mechanisms of associated virulence modification, it is clear that RD^{Rio} is presently causing TB in many parts of the world (19). The high transmissibility of RD^{Rio} strains is also suggested by studies showing an elevated secondary case rate in San Francisco, CA (38), and New York, NY (24), while a higher active-TB case rate in persons infected by RD^{Rio} strains was described in The Gambia (30). In Brazil, strains carrying RD^{Rio} have been isolated from one-third of the TB cases from two geographically distant metropolises (21, 22), a rate similar to that observed in the present study. Notably, in all of them RD^{Rio} was the main agent responsible for causing TB cases among all other spoligofamilies.

Though these data strongly suggest that RD^{Rio} may have some biological advantage, there is no proof that the clinical picture or outcome of patients infected by these strains is characteristic or even more severe than that caused by other lineages. One possible strategy used by RD^{Rio} is to induce more cavitation, as was previously demonstrated (22), which is a known risk factor for transmissibility. In the current study, however, we were unable to show an association with cavitation, and this is probably related to population selection, as the former study involved TB patients with suspected drug resistance or comorbidities. In contrast, the current study involved known MDR and drug-sensitive tuberculosis cases, where both groups included patients with multiples treatments and advanced cases, with high rates of cavitory disease, which is probably the reason for the absence of statistical difference in the presence of cavitory disease. It is interesting that preliminary data suggest that close contacts of patients infected by LAM strains (no data are available regarding the RD^{Rio} status) have more positive tuberculin skin test (TST) reactions than patients infected by other spoligofamilies (our unpublished data). As RD^{Rio} is the main component of the LAM family in Brazil, it is possible that this finding reflects a feature of the RD^{Rio}; but this needs to be further confirmed with new studies.

Our present results demonstrate that about one-half of all MDR cases were caused by RD^{Rio} strains, including a large cluster of LAM5 MDR strains as proved by IS6110-RFLP analysis. It

should be noted that the number of patients infected by this cluster influenced the statistical result. To our knowledge, this is the first description of an outbreak of RD^{Rio} MDR strains. Additional data from other groups also indicate that RD^{Rio} could be associated with drug resistance. Gavin et al. described MDR strains of *M. tuberculosis* RD^{Rio} sublineage (LAM9 subfamily) in Spain from Equatorial Guinean patients (39), and Brown et al. showed that LAM1 (a marker for RD^{Rio}) was associated with resistance to both pyrazinamide and streptomycin in MTB cases from London, United Kingdom (33), while the study performed in New York, NY, demonstrated that RD^{Rio} was associated with resistance to isoniazid (24). Although this is a matter of speculation, it is interesting that a strain from LAM4, a subfamily that contains both WT and RD^{Rio} strains, is the major cause of XDR-TB in South Africa (17) and that both LAM9 (predominantly RD^{Rio} but also containing WT) and LAM1 (exclusively RD^{Rio}) subfamilies were major contributors to drug resistance in Russia (14, 16). Unfortunately, the status of RD^{Rio} in these strains is unknown, and the prevalence of RD^{Rio} in these places is yet to be defined. Our hypothesis is that RD^{Rio} strains are able to transmit more efficiently in certain ethnic populations such as U.S.-born blacks and Hispanics and persons who were born in Latin American and Caribbean countries as was previously demonstrated (24).

In summary, our data confirm that RD^{Rio} *M. tuberculosis* is also a major cause of TB in Southern Brazil. The mechanisms for such an impressive presence compared with other prevalent spoligofamilies are still undefined, and no particular clinical features have been associated with this genotype so far. Our hypothesis is that RD^{Rio} strains are able to transmit more efficiently in certain ethnic populations. In this context, the development of drug resistance in this successful lineage might bring additional obstacles to the control of tuberculosis, both in Brazil and in several other countries. Prospective cohort studies are needed to analyze the real contribution of the RD^{Rio} genotype to outbreaks, its role in the global TB burden, and the risk of significant development of MDR outbreaks caused by this lineage.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank FAPERGS, CNPq, Hospital Santorio Partenon, CDCT/FEPPS, and the Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria at IOC/FIOCRUZ for financial support and access to infrastructure.

REFERENCES

- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, III, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentile S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jegels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537–544.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35: 907–914.
- Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Degraeve WM. 1997. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92:297–316.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* 39:3563–3571.

5. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuno L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofoa-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rusch-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 6:23. doi:10.1186/1471-2180-6-23.
6. Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, Qi W, Hazbon MH, Bobadilla del Valle M, Fyfe J, Garcia-Garcia L, Rastogi N, Sola C, Zozio T, Guerrero MI, Leon CI, Crabtree J, Angiuoli S, Eisenach KD, Durmaz R, Joloba ML, Rendon A, Sifuentes-Osorio J, Ponce de Leon A, Cave MD, Fleischmann R, Whittam TS, Alland D. 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP Set. *J. Bacteriol.* 188:759–772.
7. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:2869–2873.
8. Hu Y, Ma X, Graviss EA, Wang W, Jiang W, Xu B. 2011. A major subgroup of Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* is associated with multidrug resistance and increased transmissibility. *Epidemiol. Infect.* 139:130–138.
9. Kubica T, Agzamova R, Wright A, Aziz MA, Rakishev G, Bismilda V, Richter E, Rüsich-Gerdes S, Niemann S. 2005. The Beijing genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9:646–653.
10. Niemann S, Diel R, Khechinashvili G, Gegia M, Mdivani N, Tang YW. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. *J. Clin. Microbiol.* 48:3544–3550.
11. Purwar S, Chaudhari S, Katoch VM, Sampath A, Sharma P, Upadhyay P, Chauhan DS. 2011. Determination of drug susceptibility patterns and genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kanpur district, North India. *Infect. Genet. Evol.* 11:469–475.
12. Gutacker MM, Mathema B, Soini H, Shashkina E, Kreiswirth BN, Graviss EA, Musser JM. 2006. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J. Infect. Dis.* 193:121–128.
13. Candia N, Lopez B, Zozio T, Carrivale M, Diaz C, Russomando G, de Romero NJ, Jara JC, Barrera L, Rastogi N, Ritacco V. 2007. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. *BMC Microbiol.* 7:75. doi:10.1186/1471-2180-7-75.
14. Ignatova A, Dubiley S, Stepanshina V, Shemyakin I. 2006. Predominance of multidrug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. *J. Med. Microbiol.* 55:1413–1418.
15. Jagielski T, Augustynowicz-Kopec E, Zozio T, Rastogi N, Zwolska Z. 2010. Spoligotype-based comparative population structure analysis of multidrug-resistant and isoniazid-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates in Poland. *J. Clin. Microbiol.* 48:3899–3909.
16. Shemyakin IG, Stepanshina VN, Ivanov IY, Lipin MY, Anisimova VA, Onasenko AG, Korobova OV, Shinnick TM. 2004. Characterization of drug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* derived from Russian inmates. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8:1194–1203.
17. Pillay M, Sturm AW. 2007. Evolution of the extensively drug-resistant F15/LAM4/KZN strain of *Mycobacterium tuberculosis* in KwaZulu-Natal, South Africa. *Clin. Infect. Dis.* 45:1409–1414.
18. Cardoso Oelemann M, Gomes HM, Willery E, Possuelo L, Batista Lima KV, Allix-Béguec C, Loch C, Goguet de la Salmonière YO, Gutierrez MC, Suffys PN, Supply P. 2011. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burdened country. *PLoS One* 6:e18256. doi:10.1371/journal.pone.0018256.
19. Gibson AL, Huard RC, Gey van Pittius NC, Lazzarini LCO, Driscoll J, Kurepina N, Zozio T, Sola C, Spindola SM, Kritski AL, Fitzgerald D, Kremer K, Mardassi H, Chitale P, Brinkworth J, de Viedma DG, Gicquel B, Pape JW, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Warren RM, van Helden PD, Rastogi N, Suffys PN, Lapa e Silva J, Ho JL. 2008. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover the global dissemination of the major RDRio sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J. Clin. Microbiol.* 46:1259–1267.
20. Gomes HM, Elias AR, Oelemann MA, Pereira LA, Montes FF, Marsico AG, Kritski AL, Filho LD, Caldas C, Possuelo LG, Cafrune P, Rossetti ML, Lucena N, Saad MH, Cavalcanti HR, Leite CQ, Warren RC, Lopes ML, Lima K, Souza M, Trindade RD, 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.* 12:649–656.
21. Lazzarini LC, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, Shashkina E, Mello FC, Gibson AL, Virginio MJ, Marsico AG, Butler WR, Kreiswirth BN, Suffys PN, Lapa e Silva JR, Ho JL. 2007. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 45:3891–3902.
22. Lazzarini LC, Spindola SM, Bang H, Gibson AL, Weisenberg S, da Silva Carvalho W, Augusto CJ, Huard RC, Kritski AL, Ho JL. 2008. RDRio *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitary pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 46:2175–2183.
23. Von Groll A, Martin A, Felix C, Prata PFS, Honscha G, Portaels F, Vandame P, da Silva PEA, Palomino JC. 2010. Fitness study of the RDRio lineage and Latin American-Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 58:119–127.
24. Weisenberg SA, Gibson AL, Huard RC, Kurepina N, Bang H, Lazzarini LC, Chiu Y, Li J, Ahuja S, Driscoll J, Kreiswirth BN, Ho JL. 2012. Distinct clinical and epidemiological features of tuberculosis in New York City caused by the RD(Rio) *Mycobacterium tuberculosis* sublineage. *Infect. Genet. Evol.* 12:664–670.
25. World Health Organization. 2011. WHO global report 2011. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf.
26. Nolte FS, Metchock B. 1995. *Mycobacterium*, p 403–437. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RI (ed), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. ASM Press, Washington, DC.
27. Canetti G, Rist N, Grosset J. 1963. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibiologic drugs by the method of proportions: methodology, resistance criteria, results, and interpretation. *Rev. Tuberc. Pneumol.* 27:217–272.
28. Perizzolo PF, Dalla Costa ER, Ribeiro AW, Spies FS, Ribeiro MO, Dias CF, Unis G, Almeida da Silva P, Gomes HM, Suffys PN, Rossetti ML. 2012. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in southern Brazil. *Tuberculosis* 92:56–59.
29. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* 235:196–205.
30. de Jong BC, Hill PC, Aiken H, Awine T, Antonio M, Adetifa IM, Jackson-Sillah DJ, Fox A, DeRiemer K, Gagneux S, Borgdorff MW, McAdam KPWJ, Corrah T, Small PM, Adegbola RA. 2008. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in The Gambia. *J. Infect. Dis.* 198:1037–1043.
31. Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE, III. 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response p84. *Nature* 431:84–87.
32. Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, Jones JS, Westmoreland H, Onorato IM. 1998. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* 338:633–639.
33. Brown T, Nikolayevskyy V, Velji P, Drobniowski F. 2010. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* strains and phenotypes. *Emerg. Infect. Dis.* 16:272–280.
34. Ramakrishnan L, Federspiel NA, Falkow S. 2000. Granuloma specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science* 288:1436–1439.

35. Talaat AM, Lyons R, Howard ST, Johnston SA. 2004. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:4602–4607.
36. Voskuil MI, Schnappinger D, Rutherford R, Liu Y, Schoolnik GK. 2004. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes. *Tuberculosis* 84:256–262.
37. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:7877–7882.
38. Friedman CR, Quinn GC, Kreiswirth BN, Perlman DC, Salomon N, Schluger N, Lutfey M, Berger J, Poltoratskaia N, Riley LW. 1997. Widespread dissemination of a drug-susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 176:478–484.
39. Gavín P, Iglesias MJ, Jiménez MS, Herrera-León L, Rodríguez-Valín E, Rastogi N, March J, González-Palacios R, Palenque E, Ayarza R, Hurra E, Campos-Herrero I, Vitoria MA, Lezcano MA, Revillo MJ, Martín C, Samper S. 2009. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain from Equatorial Guinea detected in Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1858–1860.
40. Brennan MJ, Delogu G. 2002. The PE multigene family: a “molecular mantra” for mycobacteria. *Trends Microbiol.* 10:246–249.
41. Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Thonnon J, Vincent V, Gutierrez MC. 2004. Molecular characteristics of strains of the Cameroon family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 42:5029–5035.