

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

**EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE EM UMA PENITENCIÁRIA
DO
RIO GRANDE DO SUL**

DANIELE CHAVES KÜHLEIS

Porto Alegre, março de 2013.

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

Daniele Chaves Kühleis

**EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE EM UMA PENITENCIÁRIA
DO
RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Co-Orientadora: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Porto Alegre, março de 2013.

Dedico este trabalho a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, meus pais, Daniel e Rosana.

Aos meus avós, Diva e Derly; Tereza e Marcos, pelo amor, incentivo e exemplo durante toda a minha vida. Amo vocês demais!

A você Xande, companheiro no amor, na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou e incentivou nas horas difíceis e compartilhou alegrias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, a quem devo tudo o que sou.

Aos meus pais, por tudo. Amo vocês!! Pai, obrigada por ter me proporcionado a oportunidade de estudar, sem medir esforços para que eu chegasse ao fim de mais essa jornada. Mãe, obrigada pelo amor incondicional durante toda a minha vida, você além de minha mãe é minha melhor amiga!

As minhas amigas irmãs, Maevi, Raka, Lu e Lê, obrigada por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos da minha vida, amo vocês!

As pessoas presas expostas diariamente a tuberculose, que perderam o direito de ir e vir, mas não o direito a saúde. Cidadãos negligenciados, razão deste projeto, que me permitiram que estivesse presente em seus espaços de convivência e sobrevivência, oferecendo informações e colaborando na execução desse estudo.

A UFRGS pela oportunidade de poder apresentar esse trabalho.

Ao meu orientador Dr. Arnaldo Zaha, em primeiro lugar pela paciência. Meu eterno agradecimento pela oportunidade e confiança.

A Dr^a. Maria Lúcia Rossetti, co-orientadora, pelo suporte na realização deste trabalho. Minha gratidão pelo incentivo, ensinamentos e carinho disponibilizados nos últimos anos.

À FEPPS, em especial ao CDCT e ao Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Martinha, pela disponibilidade, apoio e disponibilização do laboratório de bacteriologia.

Aos colegas do CDCT, em especial a Andrezza, Karen e Elis, pela contribuição e suporte na realização desse trabalho.

A colega e amiga, Patricia Cafrune, pela ajuda, ensinamentos e boas discussões.

A PEJ pelo apoio e confiança incondicional. Sem vocês esse trabalho não sairia. Um beijo especial aos “parceiros de cadeia”: Jôse, Bráz e Lannes.

Ao Hospital Sanatório Partenon, em especial ao laboratório. Vânia, obrigada por manter as portas abertas! Moa, obrigada pelos ensinamentos e pelo carinho dispensado.

As amigas queridas, Marcelinha e Carol, pela disponibilidade constante de me auxiliar a atualizar os dados de tuberculose.

A Bê, pelo super apoio na revisão da tese.

Ao PNCT/MS, em especial ao Dr. Draurio Barreira pelo incentivo para a finalização desse projeto.

A todos que de alguma maneira e em algum momento contribuíram e incentivaram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Se quisermos progredir, não devemos
repetir a história, mas fazer uma história
nova.”

(Mahatma Gandhi).

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS).

Hospital Sanatório Partenon (HSP).

Laboratório de Tuberculose do Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (IPB-LACEN/FEPPS).

Penitenciária Estadual do Jacuí

Superintendência dos Serviços Penitenciários

Secretaria de Segurança Pública do Estado do Rio Grande do Sul.

FONTES FINANCIADORAS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).

Resumo

A ocorrência de tuberculose (TB) nas penitenciárias de muitos países tem sido descrita como um problema de saúde pública, especialmente naqueles em fase de desenvolvimento sócio-econômico. No Brasil, a dimensão do problema é pouco conhecida, entretanto a introdução, em 2007, da informação sobre a origem prisional do caso de TB na ficha de notificação do SINAN aumentou a visibilidade do problema e permitiu a primeira avaliação nacional. Em 2011, a população privada de liberdade representou 0,2% da população geral, porém contribuiu com 6,8% dos casos de tuberculose notificados. Somada à alta endemicidade, também é particularmente elevada a frequência de formas resistentes e multirresistentes, relacionadas ao tratamento irregular e à detecção tardia de casos de resistência.

Este trabalho teve como objetivo realizar um inquérito entre a população privada de liberdade com sintomas respiratórios de tuberculose, a fim de estimar a incidência da doença, analisar o perfil de sensibilidade aos fármacos e o genótipo dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*), em uma penitenciária, na cidade de Charqueadas, Rio Grande do Sul.

Foi aplicado um questionário de triagem entre os 1900 privados de liberdade da penitenciária, a fim de identificar os sintomáticos respiratórios (SR) que apresentavam tosse por mais de três semanas. Os SR identificados e que concordaram em participar do estudo, responderam a questionário epidemiológico, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e forneceram duas amostras de escarro em dias consecutivos para a realização dos exames de baciloscopia, cultura e teste de sensibilidade. Essas amostras também foram utilizadas para a extração do DNA e aplicação da técnica de *spoligotyping*.

Com TB, foram identificados 72 pacientes (3,8%). Dezesete (23,6%) tiveram pelo menos um episódio de TB anterior, e neste caso, foram considerados como casos de retratamento. Assim sendo, a incidência de novos casos foi de 2,9% (55/1900 habitantes), o que corresponde a 3789 casos de tuberculose por 100.000 habitantes.

Os testes de sensibilidade identificaram, entre os isolados testados, resistência de 15% a pelo menos uma droga, dos quais 89% eram resistentes apenas à isoniazida (INH) ou em combinação com outra droga. A classificação dos genótipos após a análise por *spoligotyping* mostrou que 40% dos isolados pertencem à família LAM; 22% à família T; 17,5% à família Haarlem, 12,5% à família U; 3% à família X. Os SITs mais frequentemente encontrados foram 729 (27%), 50 (9,5%), 42 (8%), 53 (8%) e 863 (8%). Já relatados em outros estudos, os SITs 729 e 863 podem ter relação com a situação de encarceramento. Além disso, pelo número elevado de genótipos agrupados, podemos concluir que a TB nesta população específica tenha sido causado principalmente, por linhagens que foram transmitidas nos últimos anos (transmissão recente). Além do mais, foi possível identificar grupamentos específicos não relatados na população em geral no mesmo período e na mesma região.

Abstract

The occurrence of tuberculosis (TB) in prisons in many countries has been described as a public health problem, especially in those in the process of socio-economic development. In Brazil, the dimension of the problem is poorly understood, however by introducing, in 2007, the information about the origin of the prison TB case in the notification form from SINAN, increased the visibility to the issue and allowed the first national evaluation. In 2011, the prison population represented 0.2% of the general population, but contributed with 6.8% of reported cases of tuberculosis. Added to the high endemicity it is also especially high the frequency of multidrug resistant forms and related to the irregular treatment and late detection of cases of resistance.

The objective of this work 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 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) isolates from a prison of Charqueada City, southern of Brazil.

A screening questionnaire was applied to 1900 persons deprived of freedom, in order to identify patients with respiratory symptoms (RS) who had a cough for more than three weeks. The identified patients with RS who agreed to participate in the study answered an epidemiological questionnaire, signed a consent form and provided two sputum samples in consecutive days for the examinations of bacilloscopy, culture and sensitivity test. The samples were also used for DNA extraction spoligotyping analysis.

Seventy-two patients (3.8%) were identified as TB positive. Seventeen (23.6%) had at least one episode of TB, and in this case, were considered for retreatment. Thus, the incidence of new cases was 2.9% (55/1900 inhabitants), which corresponds to 3789 cases of tuberculosis per 100,000 inhabitants.

The sensitivity tests identified, among the isolates tested, 15% resistant to at least one drug, of which 89% were resistant only to isoniazid (INH) or in combination with another drug. The classification of genotypes after analysis by spoligotyping showed that 40% of the isolates belong to the family LAM, 22% from family T; 17.5% from family Haarlem, 12.5% from family U and 3% from family X. The SITs more frequently found were 729 (27%) 50 (9.5%), 42 (8%), 53 (8%) and 863 (8%). Has already reported in other studies, the SITs 729 and 863 may be related to the situation of incarceration. In addition, with the large number of genotypes grouped, we can conclude that this specific TB population was caused especially by strains that were transmitted in recent years (recent transmission). Furthermore, it was possible to identify specific clusters often not reported in the general population from the same period and the same region.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAN	Amplificação de Ácidos Nucléicos
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AMTD	<i>Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct</i>
ATS	<i>American Thoracic Association</i>
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo de <i>Calmette Guérin</i>
BK	Bacilo de Koch
C	Citosina
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CFZ	Clofazimina
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CONRAS	<i>Colorimetric Nitrate Reductase-based Antibiotic Susceptibility</i>
COM	Ciprofloxacina
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DNTPs	Desoxinucleosídeos Trifosfatos
DOTS	<i>Directly Observed Treatment Strategy</i>
DR	<i>Direct Repeat</i>
EAI	<i>East African-Indian</i>
EHR	Ensaio de Hibridização Reversa
EMB	Etambutol
EMTD	<i>Enhanced Mycobacterium tuberculosis Direct</i>
ETH	Etionamida
ETR	Repetição Exata em Tandem
FAS I	<i>Fatty Acid Synthetase I</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
G	Guanina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
INH	Isoniazida

IS	<i>Insertion Sequence</i>
IUATLD	<i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i>
K	<i>Kappa</i>
LAM	<i>Latin American Mediterranean</i>
LJ	<i>Löwenstein-Jensen</i>
MDR	Multidrogarresistente
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i>
MODS	<i>Microscopic Observation Broth Drug Susceptibility Assay</i>
MPTR	<i>Major Polymorphic Tandem Repeat</i>
MS	Ministério da Saúde
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NRA	<i>Nitrate Reductase Assay</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido p-Aminossalicílico
Pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-SSCP	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
PCR-RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
PZA	Pirazinamida
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RHA	<i>Reverse Hybridization Assay</i>
RHZ	Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida
RHZE	Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida, Etambutol
RMP	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucléico
Rna	RNA ribossomal
RNTA	<i>Royal Netherlands Tuberculosis Association</i>
rpoB	sub-unidade beta da RNA polimerase
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SM	Estreptomicina
SIT	<i>Shared International Type</i>
SpoIDB4	<i>Spoligotyping DataBase 4</i>
ST	<i>Shared Type</i>
TB	Tuberculose
TBMDR	Tuberculose Multidrogarresistente
TB MR	Tuberculose Multirresistente
TBXDR	Tuberculose Extensivamente Multidrogarresistente
TDO	Tratamento Diretamente Observado
TSA	Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos
TZ	Tiacetazona
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
VNTR	Número Variável de Repetições em Tandem
VT	Virgem de Tratamento
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

PARTE I	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Um Panorama Geral	14
1.2 Um breve histórico sobre a tuberculose	14
1.3 Epidemiologia da tuberculose no mundo	16
1.4 Epidemiologia da tuberculose no Brasil	18
1.5 Epidemiologia da tuberculose no Rio Grande do Sul	21
1.6 Agente etiológico da tuberculose	23
1.7 Características gerais da tuberculose	26
1.8 Formas de transmissão	27
1.9 Coinfecção tuberculose/HIV	28
1.10 Tratamento	29
1.11 Resistência às drogas antituberculose	31
1.11.1 Resistência a isoniazida	32
1.11.2 Resistência a rifampicina	34
1.11.3 Resistência a pirazinamida	35
1.11.4 Resistência ao etambutol	36
1.11.5 Resistência a estreptomicina	37
1.12 Diagnóstico da tuberculose	37
1.12.1 Baciloscopia	37
1.12.2 Cultura	39
1.12.2.1 Realização de cultura com uso de métodos automatizados	41
1.12.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	42
1.12.3.1 Métodos automatizados para teste sensibilidade aos antimicrobianos	43
1.12.3.1 Métodos Colorimétricos	44
1.12.4 Diagnóstico radiológico	45
1.12.5 Diagnóstico com prova tuberculínica	46
1.12.6 Outros meios diagnósticos	46
1.13 Epidemiologia molecular da tuberculose	50
2. A TUBERCULOSE NO SISTEMA PRISIONAL BRASILEIRO	57
3. JUSTIFICATIVA	61
4. OBJETIVOS	63
4.1 Geral	63
4.2 Específicos	63
PARTE II	64
5. Artigo Científico	65
PARTE III	73
6. DISCUSSÃO	74
6.1 Atributos dos pacientes	74
6.2 Prevalência de TB	74
6.3 Meios diagnósticos e resistência aos antimicrobianos	76
6.4 A aplicação do <i>spoligotyping</i>	78

7. CONCLUSÕES	81
8. PERSPECTIVAS	83
9. REFERÊNCIAS	84
ANEXOS	114
ANEXO 1 - LISTA DE TABELAS	115
ANEXO 2 - LISTA DE FIGURAS	116
ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM	117
ANEXO 4 - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	118
ANEXO 5 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	121

Parte I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Panorama geral

Embora a tuberculose esteja documentada há séculos, continua a afligir a humanidade, representando um grave problema de saúde pública. A doença tem deixado em estado de alerta as autoridades de saúde, no mundo todo. A situação torna-se mais alarmante entre as populações privadas de liberdade, as quais apresentam índices de infecção mais elevados que a população geral e contribuem para a disseminação da doença além dos muros das penitenciárias.

A incidência elevada da tuberculose pode estar relacionada com as condições de confinamento, já que é uma doença causada por *Mycobacterium tuberculosis* cuja transmissão é principalmente nosocomial, tendo sua disseminação facilitada em ambientes fechados, mal ventilados e com aglomeração de pessoas, situação comum encontrada em grande parte dos presídios brasileiros (XAVIER, 2008). Devido às condições precárias de grande parte das penitenciárias, o sistema prisional brasileiro encontra-se em colapso devido à superlotação, aliada às condições insalubres de higiene, além da precariedade da assistência médica. Essas são as características mais comuns encontradas por quem cumpre medida socioeducativa no país (NOGUEIRA & ABRAHÃO, 2009).

Mesmo sendo considerada como um grave problema de saúde, pouco se sabe sobre a real magnitude da tuberculose no sistema prisional, em decorrência da ausência de programas específicos de vigilância epidemiológica nas unidades prisionais, na maioria dos estados brasileiros.

A possibilidade da aplicação de técnicas de biologia molecular para detecção e identificação do *M.tuberculosis* entre a comunidade carcerária é de grande valia para a prevenção e o controle da doença, pois permite a obtenção de informações que seriam difíceis de serem obtidas por métodos laboratoriais convencionais e rotineiros (SUPPLY *et al.*, 2000, 2001).

1.2 Um breve histórico sobre a tuberculose

Estima-se que a tuberculose exista desde a época que o homem começou a passar à condição de bípede. Relatos evidenciam a existência de tuberculose em ossos humanos pré-históricos datados de 8.000 anos antes de Cristo. Documentos antigos, hindus e chineses, já descreviam quadros de uma doença pulmonar muito semelhante à tuberculose. Hipócrates, na antiga Grécia, definiu a tuberculose como doença natural e por levar o indivíduo à consumpção ele a denominou de tísica (do grego *phthisikos*). Na realidade, em muitos textos clássicos, em várias culturas e desde a antiguidade, aparecem descrições que sugerem a presença dessa enfermidade. Grande parte dos médicos da antiguidade tinha a crença que a tuberculose era hereditária. Mais tarde, Aristóteles, Galeno e outros, chegaram à conclusão que era uma enfermidade infecciosa e contagiosa (FARGA & CAMINERO, 2011).

A partir dos séculos XVII e XVIII e através de estudos de cadáveres, observaram-se vísceras que traziam aspectos de tubérculos, principalmente em pulmões de cadáveres acometidos pela tísica. A partir dessa época, a doença tornou-se mais estudada e ocorreu a distinção da tuberculose de outras enfermidades pulmonares (KRITSKI *et al.*, 2000).

Após uma sucessão de relatos e com a evolução da ciência, em 1882, o microbiologista alemão Robert Koch identificou o agente etiológico da tuberculose, denominando-o *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch (BK) (KAUFMANN, 2003), fato que lhe conferiu o Prêmio Nobel em Medicina em 1905 (BLOOM & MURRAY, 1992). Ainda em 1882, Paul Ehrlich propôs um método de coloração do bacilo da tuberculose ao descobrir que ele tinha a propriedade de resistir à descoloração por uma solução de álcool-ácido. O método de coloração foi aperfeiçoado por Franz Ziehl e Friedrich Neelsen, resultando no conhecido método de coloração Ziehl-Neelsen (BECK, 2000), utilizado até os dias de hoje para o diagnóstico da tuberculose (BRASIL, 2001).

Em 1906, Albert Calmette e Camille Guérin atenuaram a virulência de linhagens de *Mycobacterium bovis*, para o desenvolvimento de uma vacina (DANIEL, 2006). A vacina foi chamada de BCG (bacilo de Calmette-Guérin) e ainda é a única existente até hoje, amplamente utilizada para prevenir formas graves da doença em crianças.

No Brasil, a vacina BCG oral foi aplicada pela primeira vez em recém-nascidos em 1927. Os avanços não pararam por aí. Com o descobrimento do raio X por Roentgen, o diagnóstico da tuberculose pulmonar foi simplificado consideravelmente. A partir dali, já se podia conhecer a extensão da lesão e seguir a evolução, além de evidenciar as temidas cavidades tuberculosas (FARGA & CAMINERO, 2011).

A partir da década de 40 o Brasil iniciou a utilização dos fármacos antituberculose: estreptomicina (SM), a partir de 1948; ácido paramino-salicílico (PAS), a partir de 1949 e em 1952, a isoniazida (INH). A utilização de esquemas terapêuticos padronizados começou efetivamente a partir da década de 60 inicialmente com duração de 18 meses (RUFFINO-NETTO, 2002).

As taxas de morbidade e mortalidade devido à tuberculose foram reduzidas gradativamente durante o século XX, no mundo sócioeconomicamente desenvolvido, auxiliado por melhores práticas de saúde pública, melhorias nas condições socioeconômicas e programas de imunização com a vacina BCG, bem como pelo desenvolvimento dos antimicrobianos na década de 50. Essas novas tecnologias determinaram sensível redução do número de casos de tuberculose nos países economicamente desenvolvidos. Pensou-se que com o advento da quimioterapia a doença desapareceria. No entanto, essas expectativas foram frustradas, principalmente pelo surgimento da pandemia de *aids*, aumento das populações vulneráveis e migrações derivadas das guerras, além do descuido dos programas de controle da tuberculose. No final do século XX, a doença eclodiu novamente, sendo considerada pela OMS, em 1993, como uma doença de emergência global (TAYLOR *et al.*, 2003; OMS, 1993).

1.3 Epidemiologia da tuberculose no mundo

Mundialmente a tuberculose continua sendo um grave problema de saúde, exigindo a criação de diversas estratégias para seu controle.

Metas globais e indicadores para o controle da enfermidade foram desenvolvidos na perspectiva das metas do milênio, objetivando-se reduzir pela

metade, até 2015, a incidência e mortalidade em relação ao ano de 1990. Espera-se também que, até 2050, a incidência de tuberculose ativa seja menor que 1 por 1.000.000, eliminando-a como um problema de saúde pública (WHO, 2009).

Os casos de tuberculose vem diminuindo a cada ano. A taxa de queda entre 2010 e 2011 foi de 2,2%. A taxa de mortalidade diminuiu 41% desde 1990 e no mundo está a caminho de atingir a meta global de redução de 50% até 2015. As taxas de incidência e mortalidade também estão caindo em todas as regiões, e principalmente entre os 22 países que concentram 80% da carga mundial da doença (WHO, 2012).

Apesar desses avanços, a carga global da doença continua grande. Segundo a OMS, a estimativa para 2011, é de 8,7 milhões de novos casos de TB, mundialmente equivalente a 125 casos por 100.000 habitantes; 13% desses casos são coinfectedados pelo vírus da imunodeficiência humana, HIV (WHO, 2012). Aproximadamente 1,4 milhões de pessoas morreram em decorrência da doença, incluindo quase um milhão de mortes em indivíduos HIV negativos e 430 mil em pacientes sorologicamente positivos para o HIV. Globalmente, 3,7% dos novos casos e 20% dos casos tratados anteriormente são estimados para ter TB multidrogaressistente (MDR) (WHO, 2012).

Geograficamente, o peso da doença é maior na Ásia (59%) e na África (26%). Índia e China, juntos, respondem por quase 40% dos casos mundiais de tuberculose. A região Africana tem 24% dos casos mundiais, e as mais altas taxas de casos e óbitos por habitante. Quase 80% dos casos de tuberculose entre pessoas vivendo com HIV residem na África (WHO, 2012).

Declarando a tuberculose como emergência global, a OMS, em 1993, passou a recomendar a estratégia *Directly Observed Treatment Strategy* (DOTS). Essa estratégia consiste em um conjunto de boas práticas para o controle da tuberculose, fundamentada em cinco eixos: compromisso político e mobilização social, diagnóstico com qualidade, tratamento padronizado e diretamente observado, fornecimento e gestão eficaz de medicamentos, e fortalecimento do sistema de monitoramento e avaliação (WHO, 2009).

Visando ao alcance das metas globais, em 2006, a OMS lançou a Estratégia STOP TB/OMS, que compreende seis componentes: expansão e aperfeiçoamento da estratégia DOTS; tratamento da coinfecção TB/HIV, TB MDR e populações

vulneráveis (população privada de liberdade, população em situação de rua, abrigados, etc); fortalecimento do sistema de saúde; envolvimento de todos os provedores de saúde; empoderamento dos portadores de tuberculose e comunidades, e, por fim, a promoção de pesquisas levando em consideração as necessidades dos programas e o desenvolvimento de novos meios de diagnóstico, medicamentos e vacinas (OMS, 2009).

Nos países que adotaram as estratégias recomendadas pela OMS, entre 1995 e 2011, 51 milhões de pessoas foram tratadas com sucesso para a tuberculose, salvando 20 milhões de vidas. Em 2010 (o mais recente ano para o qual os dados sobre resultados de tratamento estão disponíveis), a taxa de sucesso da terapêutica entre todos os casos diagnosticados foi de 85% e entre os pacientes com TB pulmonar e com baciloscopia positiva (casos infecciosos), 87%. Melhorou consideravelmente também a resposta ao tratamento entre os casos de resistência aos medicamentos (WHO, 2012).

1.4 Epidemiologia da tuberculose no Brasil

Segundo a OMS, o Brasil ocupa o 17º lugar, dos 22 países que concentram aproximadamente 80% dos casos de tuberculose no mundo e a 22ª posição em relação ao coeficiente de incidência, prevalência e mortalidade (WHO, 2011).

Para 2011 foram estimados aproximadamente 83.000 novos casos de tuberculose, com uma incidência de 42 casos por 100.000 habitantes. A taxa de detecção da doença está em torno de 91% dos casos investigados. Essa é a maior taxa de detecção entre os 22 países com alta carga da doença. Existe uma tendência de queda da estimativa realizada pela OMS para o Brasil em relação à taxa de incidência e mortalidade, a última estimada em 5,6 mil casos (2,9 casos por 100.000 habitantes), conforme as figuras abaixo.

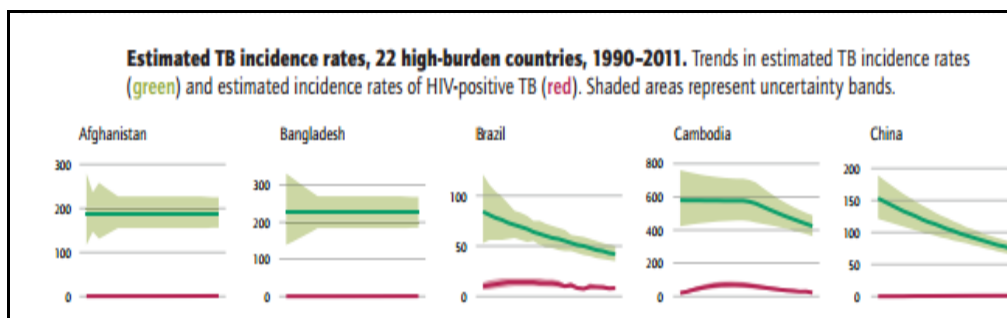


Figura 1: Estimativa das taxas de incidência, entre os 22 países de alta carga

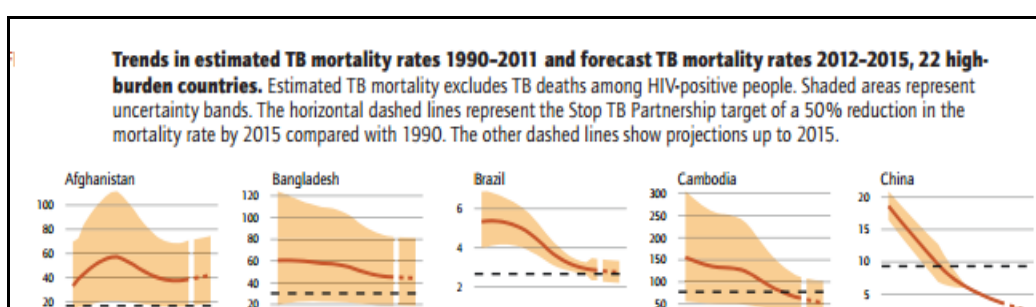


Figura 2: Tendências nas taxas de mortalidade de TB estimadas em 1990-2011 e previsão de taxas de mortalidade de TB (2012 – 2015) nos 22 países com alta carga.

No último relatório, ainda é possível verificar que o Brasil está entre os sete países com menor proporção de cura dos casos bacilíferos no grupo dos 22 países de alta carga, apresentando 74% de sucesso de tratamento em 2011. Assim como Uganda as possíveis causas para essa ocorrência é o elevado percentual de casos sem informação e em abandono de tratamento (WHO, 2012).

No entanto, apesar das estimativas da OMS, para o ano de 2011, serem de 83.000 mil novos casos, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), foram notificados no Brasil 71 mil novos casos. Nos últimos vinte anos, o coeficiente de incidência do país vem caindo em 0,6% ao ano, e em 2011 foi de 37,1 casos por 100 mil habitantes, bem próximo às estimativas da OMS (BRASIL, 2012; WHO, 2012). Setenta por cento dos casos (70%) estão concentrados em 315 municípios do país. A região Sudeste concentra 44,6% dos casos novos bacilíferos, seguido pelas regiões nordeste (27,9%), sul (12,1%), norte (11%) e centro-oeste (4,3%). Em relação à taxa de incidência, os estados do Rio de

Janeiro (RJ), Amazonas (AM), Pará (PA), Pernambuco (PE), Acre (AC) e Rio Grande do Sul (RS) concentram as maiores taxas de incidência do país, respectivamente (BRASIL, 2012).

No Brasil, a doença atinge mais homens (66,5%) que mulheres (33,5%), com incidência de 49,1 casos por 100.000 habitantes entre os homens e 24,2 casos por 100.000 habitantes entre as mulheres. Em relação à faixa etária, 47,1% dos pacientes têm entre 35 a 64 anos e 40,2% entre 15 a 34 anos, idades de pessoas economicamente ativas. Um total de 60,4% tem escolaridade inferior a oito (8) anos de estudo. Quanto à etnia, essas pessoas se definem como: preta/parda em 59,8% dos casos, seguido por 37,9% branca e 2,2% da etnia amarela/indígena (BRASIL, 2012).

Com o objetivo de intensificar as ações voltadas para o controle da tuberculose pela esfera nacional, em 2009, o Ministério da Saúde (MS), por meio do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), estabeleceu novos critérios para priorização de municípios no controle da tuberculose no Brasil. Os critérios utilizados anteriormente foram revistos e atualizados, tendo como foco principal o alcance das metas de desenvolvimento do milênio relacionadas à tuberculose. A meta pactuada para 2015 é reduzir em 50% a taxa de incidência e mortalidade da tuberculose, em relação a 1990.

Os critérios atuais levam em consideração as seguintes características:

- 1 - Capitais;
- 2 - Municípios com população igualou maior que 100.000 habitantes;
- 3 - Taxa de incidência (todas as formas) superior a 80% da taxa nacional (32 casos novos por 100.000 habitantes) segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) em 2007;
- 4 - Taxa de mortalidade por tuberculose superior à taxa nacional (2,5 óbitos por 100.000 habitantes) segundo dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) em 2007.

Atualmente, 181 municípios estão incluídos na lista de prioritários para o PNCT, visto que atendem a um dos requisitos apresentados acima. A região Sudeste apresenta o maior volume de municípios considerados prioritários, seguida pela região Nordeste e Sul. Os estados de São Paulo e Rio de Janeiro abrangem 76,5% dos municípios prioritários da região sudeste. Na região Nordeste o maior

volume está no estado da Bahia e para a região sul, no Rio Grande do Sul. Para o Norte do país, o maior quantitativo está no estado do Pará e na região centro-oeste, no Mato Grosso do Sul.

Apesar dos avanços da descentralização das ações de tuberculose para as equipes da estratégia Saúde da Família, e a recomendação pelo PNCT da realização do tratamento diretamente observado (TDO), ainda existe um coeficiente de 10,9% de abandono do tratamento. Apesar de curável, infelizmente ainda vão a óbito, por tuberculose, aproximadamente 4,6 mil pessoas ao ano e em sua grande maioria essas mortes acontecem nas regiões metropolitanas e em unidades hospitalares, evidenciando a lacuna ainda existente entre a atenção primária e o paciente. Segundo o Sistema de Informações sobre Morte (SIM), a tuberculose é a quarta causa de morte por doenças infecciosas e a primeira causa entre os pacientes que vivem com *aids* (BRASIL, 2011; BRASIL, 2012).

1.5 Epidemiologia da tuberculose no Rio Grande do Sul

No Rio Grande do Sul 15 municípios se destacam como prioritários para o Ministério da Saúde, como pode ser visualizado na figura 3 a seguir.

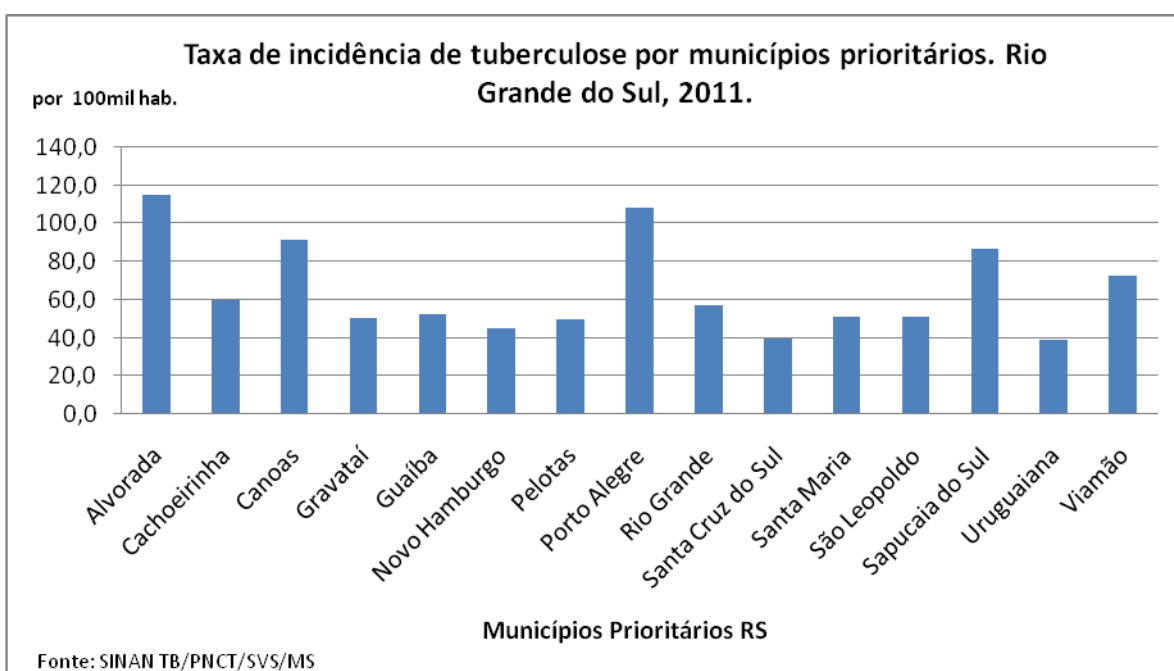


Figura 3: Taxa de Incidência de tuberculose por municípios prioritários no Rio Grande do Sul em 2011. Fonte: Brasil, 2012

O Estado, a partir dos dados de 2011, é o sexto estado em número de casos, com incidência de 45,9 casos por 100.000 habitantes. Apesar de esforços dos órgãos competentes, a taxa de incidência no estado vem se mantendo estável, desde o ano de 2001 (Brasil, 2012).

No Brasil, a taxa média de incidência de casos por tuberculose entre as 27 unidades federadas é de 37,1 casos por 100.000 habitantes. O objetivo do milênio pactuado, é que até o ano de 2015, o número de casos caia para 25,8 por 100.000 habitantes (BRASIL, 2012).

Avaliando a situação da tuberculose no Rio Grande do Sul, nos últimos dez anos, verifica-se um aumento no abandono de tratamento, atingindo picos de até 12,1% dos casos em 2010. No ano de 2011, a taxa de abandono fechou em 9,1% dos casos novos diagnosticados. Conseqüentemente, devido às altas taxas de abandono de tratamento, caem drasticamente às taxas de cura no estado. O ano de 2011, a taxa de cura do Rio Grande do Sul fechou em 31,9% dos casos, muito aquém da meta preconizada pela OMS, que é de curar 85% dos casos diagnosticados (BRASIL, 2012).

O município de Porto Alegre é líder no *ranking* de incidência quando avaliamos as capitais das 27 UFs, com 108,6 casos por 100.000 habitantes, quase o triplo da média nacional (37,1 casos por 100.000 habitantes). Quando avaliamos as taxas de coinfeção TB/HIV na capital gaúcha, a situação torna-se alarmante – o percentual de casos novos de tuberculose em pacientes com *aids* chega a aproximadamente 25% (BRASIL, 2012).

Porto Alegre vem extrapolando há alguns anos as metas de controle da tuberculose preconizadas no país. É a segunda capital do país com maior índice de abandono de tratamento, com um índice de 17,3% em 2011, três vezes superior as metas nacionais (5%). A capital gaúcha teve uma queda drástica na taxa de cura, e fechou o ano de 2011 com apenas 28,2% de cura entre os casos diagnosticados - bastante inferior a meta pactuada (85%). O número de mortes também sofreu um

incremento de 1% em três anos, saindo da média nacional (2,5%) e atingindo 3,5% (BRASIL, 2012).

Ainda sem tanta visibilidade nacional, mas de extrema importância, ao avaliar os dados de duas cidades gaúchas, elas se sobressaem a Porto Alegre - são os municípios de Alvorada e Charqueadas. Alvorada é um dos municípios prioritários no Rio Grande do Sul para o controle da tuberculose. A incidência em 2011 fechou em 115 casos de tuberculose por 100.000 habitantes, aproximadamente três vezes a média nacional. Já Charqueadas, que não é considerado município prioritário, em 2010 atingiu 311,4 casos por 100.000 habitantes, quase três vezes a média da capital gaúcha e oito vezes a média nacional de incidência, nesse pequeno município de 30 mil habitantes (BRASIL, 2011; BRASIL, 2012).

1.6 Agente etiológico da tuberculose

M. tuberculosis é o principal agente etiológico causador da tuberculose em humanos. É um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, juntamente com outros membros: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium icroiti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. A enfermidade causada por *M. tuberculosis* é a mais importante no ponto de vista sanitário, pois causa a grande maioria dos quadros patológicos em humanos. Os membros do complexo são identificados e diferenciados um dos outros com base nas características moleculares, fisiológicas, bioquímicas e de crescimento (ARANAZET *et al.*, 1999; FARGA & CAMINERO, 2011; CATALDI & ROMANO, 2007). Esse grupo de bactérias é geneticamente muito relacionado, o que dificulta a sua diferenciação por métodos de identificação convencionais. Essa relação taxonômica muito próxima também é refletida no seu alto grau de conservação evolutiva, sendo que a homologia em suas sequências de DNA é de quase 100% (VAN EMBDEN *et al.*, 1992).

As micobactérias pertencem à ordem dos *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. As bactérias que compõe esse 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, ácido desoxirribonucléico (DNA) com 61% a 71% de teor de guanina e citosina (G+C), e são consideradas bacilo álcool-ácido resistentes (BAAR) quando expostas à coloração tintorial pelo método de Ziehl-Neelsen (GOODFELLOW & MAGEE, 1998).

A parede celular bem desenvolvida contém peptidoglicano covalentemente ligado a um polissacarídeo ramificado, o arabinogalactano, cujas extremidades são esterificadas com ácidos graxos de alto peso molecular, os ácidos micólicos, conferindo importante barreira lipídica e impedindo a coloração pelo método Gram (BLACK, 2002). Essa barreira é responsável por muitas das características fisiológicas *M. tuberculosis*, incluindo resistência aos antibióticos e mecanismos de defesa do hospedeiro. A composição e quantidade dos componentes da parede celular afeta as taxas de crescimento e virulência da bactéria (BARRERA, 2007). Sob condições laboratoriais favoráveis, *M. tuberculosis* se divide de 12 a 24 horas. Esse tempo é extremamente lento quando comparado à maioria das bactérias, que se duplica em intervalos regulares que vão de 15 minutos a uma hora (BARRERA, 2007). O crescimento lento do bacilo tem um importante significado clínico, pois é um dos fatores que condiciona a evolução crônica da doença (KRITSKI *et al.*, 2005).

O genoma da linhagem H37Rv do *M. tuberculosis* foi completamente sequenciado em 1998. Sua análise mostrou que o DNA desse organismo é composto de 4.411.529 pb, contém em torno de 4.000 genes e conteúdo de guanina (G) + Citosina (C) de 65,5% (COLE *et al.*, 1998). Uma reavaliação completa desse genoma foi apresentada quatro anos após e foram incluídos 82 novos genes, e o tamanho da sequência passou a ser 4.411.532 pb (CAMUS *et al.*, 2002). Aparentemente, a maior parte da recombinação gênica ocorre por meio de transposons, que são elementos inerentemente instáveis e têm o potencial de causar muitos tipos de rearranjos tais como transposição, deleção, inversão e duplicação. Os transposons mais simples são as sequências de inserção (ISs) e mais de 14 tipos diferentes dessas sequências já foram identificadas no genoma do bacilo. As sequências de inserção são geradoras de polimorfismo genético e, portanto, são frequentemente utilizadas para discriminar cepas (COLE *et al.*, 1998; MOSTRÖM *et al.*, 2002).

Outra característica importante no genoma de *M. tuberculosis* é a presença de genes de síntese e degradação de quase todos os tipos de lipídios, de ácidos graxos simples a moléculas complexas, como os ácidos micólicos. Tal característica pode estar relacionada a sua habilidade de crescimento nos tecidos do hospedeiro (SMITH, 2003).

O bacilo tem a capacidade de entrar em períodos de latência com uma atividade metabólica limitada, dificultando a ação dos antimicrobianos utilizados durante o tratamento, contribuindo para a natureza crônica da doença e impondo um regime de tratamento mais longo. Além disso, existem, numa mesma infecção, populações de bacilos de comportamentos diferentes em função de sua localização e atividade. Assim, os bacilos presentes nas cavidades pulmonares multiplicam-se de forma ativa em um ambiente aeróbio; os bacilos do interior dos macrófagos o fazem em um ambiente microaerofílico, que induz a latência, e os bacilos que se encontram no interior da lesão caseosa têm, ocasionalmente, um ciclo replicativo. Por outro lado, *M. tuberculosis* pode multiplicar-se nos tecidos, onde a penetração dos antimicrobianos é mais simples, porém é mais dificultosa no material caseoso. Os antimicrobianos apresentam um perfil de atividade diferenciado frente a cada uma dessas localizações e populações, e é necessário assegurar-se de que o tratamento prescrito seja ativo contra todas essas possibilidades acima descritas (COLL, 2003).

Em condições desfavoráveis, como a diminuição de oxigênio e pH, o bacilo pode permanecer em estado de dormência, no qual se torna quiescente, sem infectar os tecidos. Isso pode ser resultado da ação de mediadores celulares da resposta imune que podem conter, mas não erradicar a infecção. Porém, quando a imunidade diminui, as bactérias dormentes reativam-se, causando a deflagração da doença, mesmo décadas após a infecção inicial (COLE, 1998). Tal propriedade tem um importante significado clínico, já que a tuberculose frequentemente representa a reativação de uma infecção antiga ocorrida há vários anos (CHAN & KAUFMANN, 1994). Segundo Farga & Caminero (2011), essa latência pode ser um dos principais condicionantes da manutenção da endemia, pois se torna difícil realizar intervenções prévias em “reservatórios” de infectados sadios. A pessoa infectada, sem sintomas e anormalidades não é facilmente identificada.

1.7 Características gerais da tuberculose

A tuberculose pode acometer uma série de órgãos e/ou sistemas. A apresentação da tuberculose na forma pulmonar, além de ser mais frequente, é também a mais relevante para a saúde pública, especialmente a bacilífera, pois é a responsável pela manutenção da cadeia de transmissão do bacilo.

Em aproximadamente 85% dos casos de tuberculose, o sítio envolvido é o pulmão, órgão com maior ventilação e oxigênio. Em 15% dos casos restantes, pode-se encontrá-la em outro órgão, (tuberculose extrapulmonar) ou envolvendo ambos os sítios pulmonar e não pulmonar (HOPEWEL, 1994; FARGA & CAMINERO, 2011). Essa distribuição é alterada em pacientes com *aids*, nos quais é relativamente maior o número de casos de tuberculose extrapulmonar (BLOOM, 1994).

Como a tuberculose é normalmente adquirida por inalação do bacilo, a localização inicial é no pulmão. A tuberculose pulmonar pode apresentar-se de forma primária, pós-primária (ou secundária) ou miliar. A tuberculose primária é mais comum em crianças, a pós-primária ocorre em todas as idades, mas é mais comum ser identificada em adolescentes e adultos jovens. Já a tuberculose miliar recebe essa denominação vinculada devido ao aspecto radiológico pulmonar. É uma forma grave da doença e em 1% dos casos ocorre em pacientes HIV negativos, e em até 10% dos casos em pacientes HIV positivos, em fase avançada de imunossupressão (BRASIL, 2011).

A apresentação clínica clássica da doença é a aguda, mais comum em crianças e em adultos jovens. Os sintomas gerais da tuberculose pulmonar, além da tosse acompanhada de expectoração mucopurulenta e/ou hemoptoica (em pacientes não imunodeprimidos), são febre, sudorese, perda ponderal, anorexia, adinamia e pode às vezes apresentar dor torácica (KRITSKI *et al.*, 2000). Não raramente, a tuberculose manifesta-se sob diferentes apresentações clínicas que podem estar relacionadas com o órgão acometido. Dessa forma, outros sinais e sintomas, além da tosse, podem ocorrer e devem ser valorizados na investigação diagnóstica (CONDE & MUZY DE SOUZA, 2009; KRITSKI & MELO, 2007).

Nos casos de tuberculose extrapulmonar, entre os pacientes não imunodeprimidos, os sinais e sintomas dependerão do órgão afetado. As localizações mais frequentes são: pleura, linfonodos, sistema nervoso central, rins e ossos. Na tuberculose miliar, que é a forma mais grave da doença, ocorre uma

disseminação hematogênica de um grande número de bacilos resultando em lesões granulomatosas por todo o organismo, podendo ser fatal se não tratada adequadamente (BLOOM, 1994). Esse tipo de tuberculose apresenta maiores problemas no diagnóstico que a tuberculose pulmonar, pois envolve sítios, relativamente inacessíveis e, pela natureza destes, pequenas quantidades de bacilos presentes podem causar sérios danos ao indivíduo infectado. O pequeno número de bacilos presentes na amostra clínica acarreta maior dificuldade da identificação bacteriológica e os procedimentos invasivos são frequentemente, requeridos para estabelecer o diagnóstico (KRITSKI *et al.*, 2000).

1.8 Forma de transmissão

A transmissão de *M. tuberculosis* acontece por via respiratória, pela inalação de aerossóis produzidos pela tosse, fala ou espirro de um doente com tuberculose pulmonar ativa de vias aéreas, salvo raríssimas exceções. São eliminadas pequenas gotículas que podem permanecer em suspensão por minutos ou horas após a expectoração. Apenas os núcleos de Wells (núcleos secos) contendo de um a dois bacilos em suspensão podem atingir os bronquíolos e alvéolos, onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares, podendo dar início a sua multiplicação (Brasil, 2005; Brasil, 2011).

A transmissão depende do número de bacilos nas gotículas; virulência dos bacilos; exposição destes à luz ultravioleta (UV); grau de ventilação e formação de aerossóis. A entrada da micobactéria nos pulmões leva à infecção do sistema respiratório, podendo o bacilo se disseminar para outros órgãos, como por exemplo, gânglios, pleura, ossos ou meninges, e assim causar a tuberculose extrapulmonar. Essas gotículas eliminadas pelo doente pulmonar bacilífero são estáveis e podem permanecer em suspensão por várias horas até atingir os alvéolos pulmonares e se multiplicarem. As gotículas mais pesadas caem no solo, não formam aerossóis e não são fontes de infecção (Brasil, 2011).

Segundo alguns autores, um paciente pulmonar bacilífero, se não tratado, pode infectar de 10 a 15 pessoas por ano. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectado pelo bacilo da tuberculose, mas apenas 2 a 5% destas

peças desenvolverão a doença dentro de dois anos. Nos demais casos, o bacilo fica em estado de dormência e pode ser reativado muitos anos após a infecção, ou até mesmo jamais se manifestar (BATES, 1980; ATS, 2000; KRITSKI *et al.*, 2005).

A evolução para a doença depende de múltiplos fatores relacionados com o microrganismo (virulência) e com o hospedeiro (imunidade, fatores genéticos e existência de outras doenças) (SMITH & MOSS, 1994; BLOOM, 1994).

A descoberta precoce dos doentes bacilíferos, entre os sintomáticos respiratórios e outros grupos de risco, somada à introdução de um tratamento antimicrobiano eficaz, além de curar o doente, reduz a capacidade de transmissão da doença e conseqüentemente quebra a cadeia epidemiológica da mesma (ATS, 2000; TRUJILLO & KRITSKI, 2000).

1.9 Coinfecção tuberculose-HIV

O advento da epidemia de *aids* tem acarretado aumento significativo de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa e formas extrapulmonares, nos países endêmicos para tuberculose. Embora sejam menos infectantes que os pacientes com baciloscopia positiva, esses pacientes, em geral, são mais imunocomprometidos, apresentam mais reações adversas aos medicamentos e têm maiores taxas de mortalidade agravadas pelo diagnóstico tardio dessas formas. Entre os pacientes HIV positivos em fase avançada de comprometimento imunológico, existe maior ocorrência de tuberculose extrapulmonar disseminada, com apresentação radiológica atípica e maior ocorrência de micobactérias não tuberculosas, fatores que também dificultam o diagnóstico (KRITSKI *et al.*, 2005; PICON *et al.*, 2007a; de CARVALHO *et al.*, 2008). Segundo a OMS, no mundo morrem em torno de 430 mil pessoas coinfetadas pela tuberculose e pelo HIV (WHO, 2012). No Brasil, a tuberculose é a primeira causa de morte em pacientes com *aids* (BRASIL, 2012). Isso pode ser explicado pela deficiência do sistema imune dos pacientes com *aids*, que não consegue limitar a multiplicação de *M. tuberculosis*, o que ocorre normalmente nos estágios iniciais da infecção e em pacientes saudáveis.

A habilidade do HIV em infectar e debilitar os linfócitos T deixa o organismo susceptível às infecções oportunistas. Devido ao declínio dos linfócitos T e a insuficiência de fatores ativadores, os macrófagos tornam-se impotentes em suas

funções e os bacilos passam a se disseminar, através do sistema linfático, aos linfonodos (complexo primário) e então, atingindo a corrente sanguínea, chegam a sítios mais distantes (WHO, 2008; WAHL *et al.*, 1999).

A infecção por HIV exerce grande influência no curso natural da tuberculose. Indivíduos com infecção latente por *M. tuberculosis* que contraem HIV têm um risco de desenvolver tuberculose a uma taxa de 7 a 10% por ano, comparado a aproximadamente 8% ao longo da vida em indivíduos não infectados pelo vírus. Já, nos pacientes com HIV que recentemente foram infectados com *M. tuberculosis*, a taxa de progressão para doença ativa é superior a 35% nos primeiros seis meses, comparada a 2 a 5% nos primeiros dois anos entre os indivíduos soronegativos (DALEY *et al.*, 1992; SEPKOWITZ *et al.*, 1995).

Na maior parte dos países, inclusive no Brasil, a soropositividade para o HIV é descoberta durante a realização de exames de rotina para diagnóstico da tuberculose. Embora no Brasil a oferta de testagem seja de aproximadamente 70% dos casos, apenas 50% desses pacientes têm acesso ao resultado no momento oportuno. Portanto, urge a implantação de programas específicos que permitam reduzir a carga de ambas as doenças, baseados em rede de atenção integral, ágil e resolutiva, com oferta de teste de HIV a 100% dos pacientes com tuberculose e acesso imediato ao tratamento antirretroviral. Em contrapartida, os serviços de *aids* devem ofertar a todos os seus pacientes a prova tuberculínica e o tratamento da infecção latente quando oportuno, além de investigar tuberculose ativa em pacientes com manifestações clínicas sugestivas (BRASIL, 2011).

1.10 Tratamento

A BCG, vacina disponível atualmente, é indicada principalmente para prevenir as formas severas da tuberculose (miliar e meníngea) em crianças e não apresenta eficácia para reduzir o número de casos de infecções pulmonares em adultos (STYLBO & MEIJER, 1976). Como a vacina apresenta baixa eficácia para evitar a enfermidade, o correto tratamento assume o duplo papel de curar o enfermo e evitar a transmissão do bacilo (PETRINI & HOFFNER, 1999).

No Brasil, o tratamento para tuberculose é feito, obrigatoriamente, na rede pública de saúde e os fármacos são fornecidos gratuitamente pelo Ministério da

Saúde (BRASIL, 2002). Com a utilização dos tuberculostáticos estreptomicina (SM), ácido p-aminossalicílico (PAS) e isoniazida (INH) a partir da década de 40, houve diminuição da mortalidade por tuberculose. Esquemas terapêuticos mundialmente padronizados e readaptados aos dias de hoje começaram a ser utilizados a partir da década de 60. Desde 1979, o Brasil utilizava como tratamento quimioterápico um esquema de primeira linha, chamado “esquema 1” (E-1) ou RHZ de curta duração, composto de rifampicina (RMP), isoniazida (INH) e pirazinamida (PZA) por dois meses, seguidos RMP e INH por quatro meses. O E-1 era indicado para todas as formas de tuberculose sem uso prévio de medicação e para o retratamento após alta por cura (mínimo de cinco anos). O esquema I era reforçado por etambutol (2RHZE/4RHE) para os casos de retratamento após abandono. Já, os esquemas II (2RHZ/7RH) e III (3SZEEt/9EEt) eram utilizados para tratar a forma de tuberculose meningoencefálica e falências de tratamento, respectivamente (BRASIL, 2002).

No entanto, com base nos resultados preliminares do II Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos Antituberculose, o qual indicou aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6,0%), em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde (PNCT/MS), introduziu o etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do esquema básico (esquema I). A apresentação farmacológica desse esquema passou a ser em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos (RHZE, ou seja, R = rifampicina, H = isoniazida, Z = pirazinamida e E = etambutol), nas seguintes dosagens: R - 150mg, H - 75mg, Z - 400mg e E - 275mg. Essa recomendação e a apresentação farmacológica são as preconizadas pela OMS e já utilizadas na maioria dos países, para adultos e adolescentes. Para as crianças (abaixo de 10 anos) permanece a recomendação do esquema RHZ (BRASIL, 2011).

Outras mudanças no sistema de tratamento da tuberculose foram a extinção do esquema I reforçado e do esquema III, porque em todos os casos de retratamento a cultura deve ser solicitada. Além disso, deve ser solicitada a identificação do *M. tuberculosis* e a realização de teste de sensibilidade, iniciando-se o tratamento com o esquema básico até o resultado desses exames. Os casos que evoluem para falência do tratamento devem ser criteriosamente avaliados quanto ao histórico terapêutico, adesão a tratamentos anteriores e comprovação de resistência

aos medicamentos. Tais casos receberão o esquema padronizado para multirresistência ou esquemas especiais individualizados, segundo a combinação de resistências apresentada pelo teste de sensibilidade (BRASIL, 2011).

1.11 Resistência às drogas antituberculose

Existem três tipos principais de resistência do *M. tuberculosis* frente às drogas antituberculose: a natural, a adquirida ou secundária, e a primária. A primeira existe de forma espontânea entre a população bacilar, no processo de multiplicação do bacilo (mutação genética), a segunda aparece em pacientes com história prévia de tratamento anterior (incorreta administração da quimioterapia) e a terceira, pode aparecer em pacientes nunca antes tratados, infectados por cepas com resistência adquirida (FARGA & CAMINERO, 2011; BRASIL, 2011; DALCOLMO *et al.*, 2007; ISEMAN, 1999).

A partir da introdução da rifampicina aos esquemas terapêuticos, no final da década de 70, a incidência de tuberculose multirresistente foi crescente, tornando-se um importante problema de saúde pública e um dos grandes desafios para o controle da doença no mundo, pois se trata de resistência a um importante fármaco para o tratamento da tuberculose.

No Brasil e no mundo é aceito o conceito de tuberculose multidrogarresistente (MDR) quando a infecção acontece por uma cepa resistente a INH e RMP simultaneamente (MARTIN & PORTAELS, 2007; BRASIL, 2010). Esse estágio da doença gera grande preocupação, porque as taxas de cura são menores e os fármacos de segunda linha são menos efetivos, mais tóxicos, além de serem de custo elevado (MARTIN & PORTAELS, 2007; DYE, 2009).

Cepas de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes (*Extensive Drug Resistant - XDR*) foram caracterizadas e definidas como cepas que, além de serem MDR, também são resistentes a qualquer fluoroquinolona e ainda a mais um dos três fármacos injetáveis utilizados no tratamento da tuberculose (canamicina, capreomicina ou amicacina). Cepas de *M. tuberculosis* XDR já foram encontradas em mais de 50 países (inclusive no Brasil) e são especialmente preocupantes, pois podem representar uma doença incurável e altamente letal (CHAN & ISEMAN, 2008; DYE, 2009). Um levantamento feito em 49 países que realizaram teste de

sensibilidade para medicamentos de segunda linha revelou a existência de 20% de casos com bacilos multirresistentes (MDR) e 2% com bacilos extensivamente resistentes (XDR) (WHO, 2007). Quando são comparadas as taxas de resistência e multirresistência do Brasil com o cenário mundial, o país encontra-se em uma situação favorável, porém esforços devem ser constantemente implementados para prevenir a emergência e propagação dessas cepas no nosso território.

O I Inquérito de Resistência aos Medicamentos Antituberculose realizado no Brasil, em 1996, revelou taxa de resistência a qualquer medicamento de 8,5% e 21% para casos com tratamento prévio. Quando avaliada a isoniazida, a taxa de resistência foi de 4,4% para casos novos e 11,3% para os casos com tratamento prévio. Já, para a multirresistência, as proporções foram de 1,1% e 7,9% para os casos novos e com tratamento prévio, respectivamente (BRAGA *et al.*, 2003). A situação torna-se preocupante ao se avaliar os dados do II Inquérito: aumento nas taxas de resistência à isoniazida (de 4,4% para 6%).

Segundo dados de notificação, grande parte dos casos de resistência no país (96%) são oriundos de retratamentos, irregularidades de tratamento e coinfeção pelo HIV. Infelizmente, a efetividade do tratamento e cura do paciente nesses casos é diminuta – em torno de 60% (BRASIL, 2007).

1.11.1 Resistência à isoniazida

A isoniazida ou hidrazida do ácido isonicotínico (INH) é o mais antigo fármaco sintético efetivo contra tuberculose um dos principais quimioterápicos de primeira linha no tratamento da doença, sendo reconhecida, já em 1952, como potente agente contra *M. tuberculosis*. A concentração inibitória mínima (MIC) é muito baixa, o que contribui para sua eficácia (0,02-0,05 g/ml) (MIDDLEBROOK, 1952).

Sabe-se que a catalase-peroxidase bacteriana (KatG) é a enzima responsável pela sua ativação (ZHANG *et al.*, 1992; METCALFE *et al.*, 2008) e gera radicais reativos que atacam vários alvos em *M. tuberculosis* (ZHANG & TELENTI, 2000). Evidências sugerem que o principal alvo desse fármaco é a inibição da biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a parede celular, fazendo com que a bactéria

torne-se suscetível aos radicais de oxigênio e outros fatores do meio (KREMER *et al.*, 1997; ROSSETTI *et al.*, 2002; TIMMINS & DERETIC, 2006).

O metabolismo normal de ácidos micólicos é crucial para a sobrevivência de *M. tuberculosis*, uma vez que eles são considerados os componentes-chave da parede celular micobacteriana por formar uma barreira efetiva à penetração de antimicrobianos (KREMER *et al.*, 1997). Além disso, pelo menos duas enzimas, também envolvidas na síntese dos ácidos micólicos, Inh A (enoyl-ACP redutase) e Kas A (β -cetoacil ACP sintetase), foram identificadas como alvos da INH (ZHANG, 2005).

A resistência à INH está associada a uma variedade de mutações que afetam um ou mais genes, como os que codificam a catalase-peroxidase (*katG*), a enzima enoyl-ACP redutase, envolvida na biossíntese do ácido micólico (*inhA*), a alkyl hidroperóxidoreductase, envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo (*ahpC*) e a enzima β -ketoacyl ACP syntase (*kasA*) (ZHANG *et al.*, 2000; BANERJEE *et al.*, 1994; WILSON *et al.*, 1996; MDLULI *et al.*, 1998).

Os mecanismos genéticos determinantes da resistência à INH parecem ocorrer em diferentes níveis: (i) bloqueio da ativação do fármaco, relacionado com o gene *katG*, (ii) inativação do intermediário tóxico da INH, atividade associada com o gene *ahpC*, (iii) bloqueio da biossíntese do ácido micólico (*inhA* e *kasA*) (ZHANG & TELENTI, 2000).

Estudos realizados pelo Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Rio Grande do Sul em isolados de *M. tuberculosis* obtidos em diversas áreas geográficas do Brasil têm demonstrado que a maioria das mutações ocorre no gene *katG* (75%), seguida por mutações na região promotora de *ahpC* (14,6%). Apenas 1% dos isolados apresentou mutações no gene *inhA*. Também foi observado que 6,2% dos isolados apresentaram mutação nos genes *katG* e *ahpC* simultaneamente (ROSSETTI *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Silva *et al.* (2003) buscou caracterizar as mutações encontradas nos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à INH de diferentes regiões. Esse estudo observou mutações pontuais no códon 315 do gene *katG* em 87,1%, 60,9%, e 60% nos isolados do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, e São Paulo,

respectivamente. Mutações no gene *inhA* foram identificadas em apenas um isolado no estado do Rio de Janeiro, e a região promotora do gene *ahpC* revelou mutações em posições distintas em 12,9%, 21,7% e 6,7% nos isolados do RS, RJ e SP, respectivamente. Uma pequena proporção de linhagens resistentes não apresentou mutações nos genes *katG*, *inhA* ou *ahpC*, indicando que provavelmente outros genes e mecanismos poderiam estar envolvidos com a resistência à INH. Os resultados desse estudo demonstraram que a maioria dos isolados resistentes exibiu mutações pontuais e que o MIC, em 59,4% dos isolados, apresentou altos níveis de resistência ($\geq 16\mu\text{g/mL}$) à INH. Também não foi encontrada nenhuma relação epidemiológica entre os padrões de *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP) e a resistência dos isolados de *M. tuberculosis* com alteração no códon 315 (*katG*), sendo que essa heterogeneidade foi observada através do padrão obtido no RFLP.

Outro estudo realizado por Dalla Costa (2008) buscou caracterizar as mutações envolvidas na resistência à INH em isolados de *M. tuberculosis* do Brasil, Argentina e Peru. Mutações no gene *katG* foram observadas em 73,9% dos isolados, sendo que 72,7% apresentaram mutação no códon 315. Também foram encontrados 8,4% dos isolados com mutações em *ahpC*; 12,0% no *inhA* regulamentar e 1,2% dos isolados em *inhA* estrutural. Os resultados desse estudo sugerem haver associação entre níveis maiores de concentração mínima inibitória (CMI) *in vitro* para INH e a mutação S315T.

1.11.2 Resistência à rifampicina

A rifampicina, derivado semissintético da rifamicina B, é bastante efetiva contra *M. tuberculosis*, com MIC de 0,1 mg/ml a 0,2 mg/ml. Possui atividade bactericida rápida, eliminando bactérias persistentes (ação esterilizante). A RMP liga-se à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, inibindo a transcrição (BLANCHARD, 1996).

O número de casos de TB com cepas resistentes à rifampicina tem aumentado, alertando para o aumento na incidência de linhagens MDR. Difícilmente

a resistência à RMP ocorre isolada, e na maioria dos casos, está associada a outros fármacos, principalmente à INH. Nesse contexto, a resistência à RMP pode ser assumida como um marcador para a TB MDR (VARELDZIS *et al.*, 1994).

A caracterização do gene *rpoB* em *Echerichia coli* demonstrou que a rifampicina interage especificamente com a subunidade β da RNA polimerase e que mutações no *locus rpoB* conferem mudanças conformacionais, impedindo a ligação eficiente do fármaco e, conseqüentemente, a resistência. Essas informações auxiliaram na compreensão das bases de resistência à RMP em *M. tuberculosis* (JIN & GROSS, 1988; WILLIANS *et al.*, 1994).

Foram realizados vários estudos para caracterizar as linhagens resistentes e sensíveis à RMP. Uma compilação dos dados disponíveis indicou que 96% dos *M. tuberculosis* resistentes ao fármaco, isolados de pacientes epidemiologicamente não relacionados, apresentaram 35 mutações diferentes localizadas em uma região central de 81 pares de base (pb) no gene *rpoB* (KAPUR *et al.*, 1994; MUSSER, 1995; TELENTI & ISEMAN, 2000, VALIM *et al.*, 2000).

1.11.3 Resistência à pirazinamida

Um análogo estrutural da nicotinamida, a pirazinamida (PZA) tem sido usada no esquema primário de tratamento contra tuberculose, juntamente com INH e RMP, nos últimos 50 anos. A adição desse fármaco no esquema de tratamento fez com que este fosse reduzido de nove para seis meses (SCORPIO *et al.*, 1997).

A PZA tem grande influência no ataque de bacilos semidormentes, visto que esse fármaco tem alta atividade em meios ácidos (pH= 5,5). A atividade da PZA é altamente específica contra *M. tuberculosis*, apresentando pouco ou nenhum efeito em outras micobactérias, incluindo *M. bovis*, que demonstra um alto nível de resistência intrínseca ao fármaco (CUTLER *et al.*, 1997; HEWLETT *et al.*, 1995; KONNO *et al.*, 1959; MESTDAGH *et al.*, 1999).

Mais de 70% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à PZA (PZA) apresentaram mutações no gene *pncA*, que codifica a enzima pirazinamidase, a qual converte o fármaco PZA em sua forma ativa. Morlock e colaboradores (2000)

identificaram inúmeras mutações no gene *pncA* em linhagens de *M. tuberculosis*, que podem servir como indicador de resistência à PZA. Várias mutações encontradas estão associadas a uma pirazinamidase ineficiente (SOINI & MUSSER, 2001; MORLOCK *et al.*, 2000; SCORPIO *et al.*, 1997; SREEVATSAN *et al.*, 1996).

A ausência na correlação de mutações no gene *pncA* de isolados de *M. tuberculosis* PZA indica a possibilidade de pelo menos um mecanismo adicional mediador de resistência à PZA. Mestdagh *et al.* (1999) relataram a possibilidade de a resistência à PZA ser adquirida a partir de mutações existentes no alvo do ácido pirazinoico na micobactéria.

Em 2005, Rodrigues e colaboradores analisaram a sequência nucleotídica do gene *pncA* a partir de 59 isolados clínicos de *M. tuberculosis*. As mutações no gene *pncA* foram identificadas em 29 dos 40 isolados resistentes à pirazinamida e a não atividade da pirazinamidase foi detectada em 39 delas. Foram encontradas doze mutações não descritas anteriormente (RODRIGUES *et al.*, 2005).

1.11.4 Resistência ao etambutol

O EMB atua inibindo a biossíntese de lipoarabinomananos e arabinogalactanos que são importantes polissacarídeos da parede celular micobacteriana. É ativo somente contra bactérias em multiplicação (AÍNSA *et al.*, 2001). A resistência ao EMB está associada a mutações no operon *embCAB*, que codifica a enzima arabinosiltransferase (*embC*, *embA* e *embB* em *M. tuberculosis*), relacionada com a síntese de componentes da parede celular (COLL, 2003). Mutações em *embB*, identificadas em mais de 65% dos isolados clínicos são associadas com alto nível de resistência. Baixos níveis de resistência, achado em 35% das linhagens de *M. tuberculosis* resistentes ao EMB, não apresentam mutações no gene *embB* (ZHANG & TELENTI, 2000). A CMI para linhagens sensíveis é de 1 a 5 µg/mL (COLL, 2003). No entanto estas mutações tem sido discutidas, além de experimentos estarem sugerindo que mutações em *embB306*, a mais comum existente, não esta, isoladamente associada a altos níveis de resistência. Os pesquisadores sugerem que os testes de susceptibilidade EMB convencional, em combinação com a genotipagem de *embB306*,

podem orientar o ajuste da dose para evitar a falha do tratamento clínico nestas cepas resistentes de baixo nível (Plinke et al., 2011).

1.11.5 Resistência à estreptomicina

A estreptomicina (SM) é um aminoglicosídeo que interfere na síntese proteica, bloqueando a tradução do RNA mensageiro. Para micobactérias, o mecanismo de resistência se dá por mutações no alvo do fármaco, os ribossomos. O principal sítio de mutações é o gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12, cuja frequência de ocorrência está em torno de 59% das linhagens resistentes e produzem CMI altas (> 500 µg/mL). Outro mecanismo de resistência ocorre por mutações no gene *rrs* que codifica o RNA16S e se observa em 21% das linhagens resistentes, com CMI intermediária (50 – 500 µg/mL). Para um terço das linhagens resistentes existe um nível de resistência baixo (CMI 25 – 50 µg/mL) e não foram encontradas alterações nos genes *rrs* e *rpsL*, sugerindo haver um mecanismo de permeabilidade da micobactéria. A CMI para linhagens sensíveis é de 8 µg/mL (ROSSETTI et al., 2002; COLL, 2003; SPIES et al., 2008).

1.12 Diagnóstico da tuberculose

A tuberculose pode apresentar-se sob diferentes manifestações clínicas que podem estar relacionadas ao órgão acometido. Denomina-se “caso de tuberculose” todo o indivíduo com diagnóstico confirmado por baciloscopia e/ou cultura e aquele em que o médico, com base nos dados clínicos e epidemiológicos e no resultado de exames complementares, firma o diagnóstico de TB (BRASIL, 2002).

1.12.1 Baciloscopia

A pesquisa de BK ou baciloscopia é uma técnica padronizada que consiste em um esfregaço de amostra clínica, fixado em lâmina e corado por Ziehl-Neelsen (ZN) para visualização microscópica de campo claro do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). A metodologia é simples, rápida, de fácil execução, de baixo custo e

continua sendo de grande importância na vigilância da tuberculose, porque quando executada corretamente detecta de 60 a 80% dos casos bacilíferos (pacientes com baciloscopia positiva), responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão. É um método de diagnóstico de extrema importância epidemiológica, tanto para o diagnóstico, quanto para o controle do tratamento (BRASIL, 2008; 2010). Porém, a sensibilidade é baixa, variando de 25% a 65% em relação à cultura, sendo necessários de 5.000 a 10.000 bacilos/ml de escarro para um resultado positivo. Resultados de baciloscopia negativa não excluem a possibilidade de se tratar de um caso de tuberculose (DE WAARD & ROBLEDO, 2007; BRASIL, 2008). Esse fato é ainda mais marcante quando a infecção ocorre em outros órgãos (pleura, meninges), nos quais um número ainda menor de organismos pode causar manifestações clínicas. A baciloscopia de escarro é importante ainda no acompanhamento dos casos em tratamento, pois permite avaliar o sucesso ou a falência do mesmo, pela contagem dos bacilos, numa metodologia padronizada (ATS, 2000).

A baciloscopia de escarro deve ser solicitada sempre que um paciente seja considerado sintomático respiratório, em pacientes com suspeita clínica ou radiológica de tuberculose pulmonar, independente do tempo de tosse e em casos de suspeita clínica de tuberculose extrapulmonar, realizada por meio de materiais biológicos diversos. É importante salientar a importância da realização de baciloscopia de no mínimo duas amostras de escarro, uma coletada por ocasião da primeira consulta e a outra, independente do resultado da primeira amostra, na manhã do dia seguinte. Caso ambas as amostras sejam negativas e o paciente possua indícios clínicos e radiológicos de tuberculose, amostras adicionais podem ser solicitadas (BRASIL, 2010).

A tabela 1 apresenta os critérios para leitura e interpretação da baciloscopia segundo o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial de Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

Tabela 1: Critérios para leitura e interpretação da baciloscopia de escarro corada pelo método de Ziehl-Neelsen.

Leitura	Resultado
0 bacilos/100 campos	Negativo
1-9 bacilos/100 campos	Positivo - número exato de bacilos
10-99 bacilos/100 campos	Positivo +
1-10 bacilos/campo	Positivo ++
> 10 bacilos/campo	Positivo +++

Fonte: Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

1.12.2 Cultura

Meios de cultura específicos para micobactérias permitem a sua multiplicação e o isolamento dos bacilos para diagnóstico de doenças, principalmente da tuberculose. Os meios sólidos mais comumente utilizados são aqueles à base de ovos, o Löwenstein-Jensen (LJ) e Ogawa (BRASIL, 2008). O limite de detecção de bacilos da cultura é de 100 bacilos por ml de escarro, mas quando a cultura é realizada com qualidade técnica é capaz de detectar de 10 a 100 bacilos cultiváveis por ml de escarro. É um método sensível, específico e de referência (padrão-ouro) para o diagnóstico de tuberculose, podendo, portanto, servir para avaliar um novo método diagnóstico. Tem a vantagem de ser de menor custo e apresentar menor índice de contaminação. Após crescimento e isolamento, permite ainda a identificação da espécie de micobactéria isolada e o teste de sensibilidade aos fármacos antituberculose, assim como a realização de várias outras abordagens. Em geral a sensibilidade da cultura é de 80-85% e a especificidade é de aproximadamente 98%. Entretanto, o crescimento do bacilo só é detectável de 30 a 60 dias após a inoculação (ATS, 2000; DE WAARD & ROBLEDO, 2007; BRASIL, 2008).

No Brasil, a realização de cultura para micobactéria e investigação de tuberculose é recomendada nos seguintes casos:

- pacientes com evidências clínica e radiológica com baciloscopia negativa;
- pacientes com evidências de tuberculose e com amostras paucibacilares (poucos bacilos);
- pacientes com dificuldades de produzir a amostra;
- pacientes com indícios de tuberculose extrapulmonar e
- pacientes com indicativo de infecções causadas por micobactérias não tuberculosas (MNT). Nestes casos o teste de sensibilidade pode ser feito com concentração mínima inibitória (MIC).

A cultura com identificação e teste de sensibilidade, independentemente do resultado da baciloscopia, são indicados nos seguintes casos:

- contatos de pessoas com tuberculose resistente;
- pacientes com tratamento prévio, independentemente do tempo decorrido;
- pacientes imunodeprimidos, especialmente os soropositivos para o HIV;
- paciente que apresenta baciloscopia positiva no final do 2º mês de tratamento;
- falência ao tratamento quimioterápico;
- em populações vulneráveis com maior risco de adoecimento e consequente surgimento de cepas multidrogarresistente, além da dificuldade de abordagem e acesso aos serviços de saúde (pessoas privadas de liberdade, população de rua, indígenas, etc).

A tabela 2 apresenta os critérios para leitura e interpretação dos resultados da cultura.

Tabela 2: Critérios para leitura e interpretação dos resultados da cultura em meio sólido.

Leitura	Resultado
Sem crescimento	Negativo
Menos de 20 colônias	Positivo – numero exato de colônias
20 a 100 colônias	Positivo +
Mais de 100 colônias separadas	Positivo ++
Colônias confluentes (incontáveis)	Positivo +++

Fonte: Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008)

1.12.2.1 Realização de cultura com uso de métodos automatizados

Deve-se considerar que os meios de cultura semi-automatizados para micobactérias como um dos avanços diagnósticos mais importantes nos últimos 25 anos. Todos eles têm maior sensibilidade que os meios sólidos tradicionais e, sobretudo, maiores rapidez na detecção do crescimento bacteriano.

O tempo de crescimento de *M. tuberculosis* nos meios de cultura convencionais (30 a 60 dias) foi sensivelmente reduzido para 14 dias com o surgimento do BACTEC TB-460 (*Becton Dickinson Instruments System*) - primeiro sistema semiautomatizado disponível no mercado para cultura de micobactérias. Esse método baseia-se na detecção de gás carbônico (CO₂) radioativo liberado pela micobactéria quando da utilização de ácido palmítico marcado com carbono 14 (C¹⁴), presente no meio de cultura. O Bactec, além de detectar o crescimento mais rapidamente, tem maior sensibilidade e permite identificar o *M. tuberculosis* de quatro a cinco dias e em alguns casos permite realizar antibiograma dos fármacos de primeira linha, diferentemente dos meios sólidos que requerem de 21 a 42 dias. No entanto, sistemas alternativos foram criados para substituí-lo, porque a detecção utiliza sistema radioativo, o que gera dificuldade no seu descarte e altos custos de manutenção, além do risco de contaminações cruzadas e formação de aerossóis (KRITSKI *et al.*, 2005; TORTOLI & PALOMINO, 2007; FARGA E CAMINERO, 2011).

Após o Bactec, surgiram o MGIT960 (*Becton Dickinson Diagnostic Inst Systems, Sparks, MD*), o VersaTREK (*Ter kDiagnostic Systems*) e o BacT/Alert 3D (bio *Mérieux*) que utilizam meio líquido 7H9 enriquecido com OADC (*Oleicacid, Albumin Dextrose, Catalase*).

Esses sistemas mostraram-se mais rápidos e sensíveis que os meios sólidos (detecção de uma a três semanas), mas não foi observada diferença significativa entre eles. O custo elevado é a principal limitação para a sua implantação na rotina como teste diagnóstico, principalmente nos países em desenvolvimento, com poucos recursos e um grande número de casos da doença (KRISTSKI *et al.*, 2005; de WAARD & ROBLEDO, 2007; TORTOLI & PALOMINO, 2007; NYENDAK *et al.*, 2009).

Outros métodos como o Microscopic Observation Broth Drug Suscetibility Assay (MODS) e o Thin Layer também tem sido utilizados. Esse é um método de detecção de microrcolônias. A metodologia utiliza meio sólido (7H-11) em placas de Petri, onde é inoculada a amostra clínica. Depois de 10 dias, as microcolônias são observadas no microscópio ótico (Megia *et al.*, 1999; Palomino & Portaels, 2000). O MODS é uma metodologia manual realizada em meio líquido em microplacas, que depois de 10 dias podem ser observadas no microscópio invertido com filtro para campo escuro para visualizar o fator corda formado pela micobactéria. É uma metodologia simples, fácil de ser implantada em laboratórios, porém ainda esta sendo testada no Brasil para validação (CAVIEDES *et. al*, 2000; PARK *et. al*, 2002).

1.12.3 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O método das proporções e os que utilizam meio líquido são as técnicas disponíveis para a realização do teste de sensibilidade nos laboratórios públicos do Brasil. O primeiro utiliza meio sólido e tem seu resultado final após 42 dias de incubação, e os métodos que utilizam o meio líquido fornecem resultados de cinco a treze dias. Os antimicobacterianos testados, em geral, são a estreptomicina, a isoniazida, a rifampicina, o etambutol e a pirazinamida.

No final da década de noventa, surgiu o MGIT960R, método automatizado, com desempenho similar ao método das proporções, com tempo médio de detecção de sete dias, passando a ser considerado padrão ouro (GIAMPAGLIA, *et al.*, 2007).

O teste está validado e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e é utilizado para investigar resistência à estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol.

Outros métodos foram surgindo com o passar dos anos, como o MB/BacTR, para cepas sensíveis e resistentes a rifampicina e isoniazida e para as cepas sensíveis a estreptomicina. Para detecção da resistência à rifampicina e à isoniazida, o Versatrek R. No entanto, ambos os testes de sensibilidade não são recomendados pela OMS. Uma boa opção para países em desenvolvimento, pelo baixo custo e diagnóstico rápido de resistência micobacteriana (cinco a dez dias após crescimento do *M. tuberculosis*), é o ETESTR (AB BIODISK, Solna, Suécia). Outros testes foram selecionados para avaliação e recomendação pela OMS, como o ensaio do nitrato redutase e o ensaio de rezasurina em microplaca. Ambos são testes colorimétricos e classificados como métodos *in house* (MARTIN& PORTAELS, 2007; MARTIN *et al.*, 2008).

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos é indicado quando há necessidade de realização de cultura e investigação de resistência a multidrogas.

1.12.3.1 Métodos automatizados para teste sensibilidade aos antimicrobianos

Ha vários métodos que oferecem agilidade e acurácia nos resultados de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), como métodos moleculares de genotipagem e métodos automatizados como o BACTEC 460. A base deste teste em caldo consiste na detecção radiométrica de ^{14}C , liberado do meio líquido 7H12 contendo ácido 1- ^{14}C palmitico pelo metabolismo das bactérias. Este equipamento foi adaptado para realização de TSA, tendo como princípio a aspiração do gás e consequente detecção quantitativa da radioatividade do aspirado. A radioatividade reflete o grau de crescimento dos bacilos viáveis no frasco e sendo comparado com um valor basal predeterminado, estabelecendo assim o índice de crescimento. O nível de concordância entre os métodos padrões e o radiométrico ultrapassa 90%. A utilização de radioatividade torna seu uso limitado e caro. Outros instrumentos como o MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) e o ESP II Metodos System (Trek Diagnostic), são também utilizados com níveis de concordância altos (KONEMAN *et al.*, 2008), porém são tecnologias caras que necessitam de insumos importados,

equipamentos sofisticados, complexa estrutura laboratorial e de uma equipe técnica altamente qualificada, fatores limitantes para sua utilização. (PALOMINO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2004; SANCHOTENE et al., 2008; PALMERO, 2008).

1.12.3.2 Métodos Colorimétricos

Metodologias colorimétricas rápidas, de execução simples e de baixo custo para teste de sensibilidade frente às drogas anti-tuberculosas de primeira e segunda linhas, têm sido utilizadas. Nesses métodos são utilizados indicadores de oxirredução como Alamar Blue (YAJKO, et al., 1995), MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MSHANA et al., 1998) e REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate) (Palomino et al., 2002) para estudo do MIC (Concentração Inibitória Mínima) e o método qualitativo NRA (Nitrate Reductase Assay) (ANGEBY et al., 2002).

Alguns estudos demonstraram o alto potencial do método da nitratase (NRA) em testes de sensibilidade, principalmente frente às drogas rifampicina e isoniazida, marcadoras de resistência e as mais importantes para o tratamento da TB. Soma-se a estas vantagens a possibilidade de obtenção de resultado em até 14 dias; comparável aos métodos automatizados. Além desses benefícios, o teste apresenta baixo custo (ANGEBY et al., 2002; WHO, 2010).

Testes de NRA realizados diretamente da amostra já foram estudados, com bons resultados, evidenciando 100% de sensibilidade e especificidade para rifampicina e 93% e 100% para isoniazida, respectivamente. Há necessidade de mais avaliações para sua utilização como teste diagnóstico em laboratórios clínicos (MUSA et al., 2005). A OMS faz algumas considerações sobre a utilização do método NRA em laboratórios de micobactéria, como: os reagentes não são patenteados, o que os tornam mais baratos e acessíveis; não necessita de equipamentos complexos ou de equipe técnica altamente capacitada; e sua realização é compatível com os procedimentos técnicos de biossegurança nível II; a leitura dos resultados é muito fácil e visual, pois o aparecimento da cor é imediato e permite a realização de maior número de testes ao mesmo tempo, sendo altamente promissor e aplicável (WHO, 2010).

Outros métodos também são descritos, como o REMA e MTT. Princípios dos métodos colorimétricos - indicadores de oxi-redução: os sais de resazurina mudam de cor azul (não fluorescente) quando está no seu estado oxidado a rosa intenso (fluorescente) frente a ambiente redutor como o gerado durante o metabolismo celular, pela ação da enzima desidrogenase (LIU, 1981; PALOMINO *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2003; PALOMINO *et al.*, 2006). O azul de tetrazolio funciona como substrato cromogênico de enzimas desidrogenases mitocondriais, agindo como indicador de oxi-redução quando é reduzido pelo ganho de hidrogênio, por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular. No teste do MTT, existe formação de precipitado chamado formazana, que é extraído de dentro das células através de um solvente (MOSMANN, 1983). A produção de formazana tem sido empregada como medida indireta da viabilidade celular do *M. tuberculosis* após exposição às drogas anti-tuberculosas (ABATE *et al.*, 1998; MSHANA *et al.*, 1998). A mudança de cor de ambos os corantes pode ser lida visualmente ou por espectrofotometria e a concentração inibitória mínima (MIC) é então determinada (MIC por definição é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microorganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou meio líquido) (NCCLS, 2003).

1.12.4 Diagnóstico radiológico

A realização de radiografia de tórax pode indicar suspeita de doença ativa ou doença existente no passado, além de mostrar a extensão e o comprometimento da lesão pulmonar. Todos os pacientes com suspeita de tuberculose devem realizar o exame (BURRIL, 2007; ALEY; GOTWAY; JASMER, 2009).

A utilização da radiografia como método auxiliar é de extrema importância porque permite a diferenciação de imagens sugestivas de tuberculose ou de outra doença e também auxilia no diagnóstico das formas iniciais da doença, já que até 30% dos pacientes não apresentam expectoração espontânea, dificultando o diagnóstico por baciloscopia direta de escarro. Porém, é indispensável a confirmação da doença por baciloscopia e/ou cultura, como por exemplo nos casos de BK negativo. Assim sendo, a radiografia de tórax, na abordagem inicial de

peças sintomáticas respiratórias (SR), tem grande impacto na detecção precoce dos casos de tuberculose pulmonar (ATS, 2005; MORRONE & ABE, 2007; dos SANTOS *et al.*, 2005). No entanto, alguns casos de tuberculose pulmonar (até 15%) podem não apresentar alterações radiológicas, como é o caso dos pacientes imunodeprimidos. Nesses pacientes, a realização de Rx é de suma importância para se detectar tuberculose atípica ou outras pneumopatias. Já nos pacientes com BK positivo, o Rx permite a avaliação da evolução radiológica dos pacientes, bem como a resposta negativa ao tratamento (BRASIL, 2011).

1.12.5 Diagnóstico com prova tuberculínica

A prova tuberculínica é baseada na resposta imune celular desenvolvida pelo indivíduo exposto ao bacilo da tuberculose, por meio da inoculação intradérmica de um derivado protéico purificado (PPD) de *M. tuberculosis*. A prova tuberculínica positiva, isoladamente, indica apenas infecção ou contato prévio (ILTb) e não é suficiente para o diagnóstico da tuberculose como doença (BRASIL, 1997). Porém, em crianças é um importante método coadjuvante no diagnóstico da doença (SBPT, 2009).

A interpretação da prova e a conduta que deve ser tomada dependem do critério epidemiológico, risco de adoecimento, tamanho do endurado e idade do paciente (MENZIES *et al.*, 2008)

A prova tuberculínica é indicada na investigação de infecção latente (ILTb) no adulto, para os contatos de pacientes bacilíferos, pacientes que vivem com HIV/*aids*, transplantados e outros imunodeprimidos, além de profissionais de saúde, principalmente os que atuam em áreas de maior risco, como laboratórios e instituições fechadas.

1.12.6 Outros métodos diagnósticos

Testes como os de imagem, fenotípicos, moleculares e imunossorológicos têm sido descritos na literatura e testados em diversos países, inclusive no Brasil. Tais tecnologias de diagnóstico da tuberculose vão além dos recomendados pelo

Ministério da Saúde, porém a utilização e incorporação na rotina dependem do impacto e da relação custo-benefício do seu uso no sistema de saúde de cada país (WHO, 2008).

Foram desenvolvidos testes de amplificação de ácidos nucléicos (AAN) para diagnosticar mais rapidamente a tuberculose. São específicos para o complexo *M. tuberculosis* e detectam o organismo diretamente de amostras clínicas. Os testes de AAN podem ser categorizados em:

- *In house* - desenvolvidos e padronizados nos diferentes laboratórios de pesquisa e diferem na preparação das amostras, no alvo a ser amplificado e no método de detecção.
- Os *kits* comerciais são produzidos em larga escala e geralmente caracterizam-se pela maior reprodutibilidade de resultados (PIERSIMONI & SCAPARO, 2003; FLORES *et al.*, 2005).

Para a amplificação, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é utilizada na maioria dos testes AAN *in house*, tendo grande diversidade de sequências utilizadas como alvo. Entre elas estão o gene que codifica a proteína MPB 64 (MANJUNATH *et al.*, 1991), a proteína de choque térmico de 65 kDa (BRISSON-NOEL *et al.*, 1989), a proteína antigênica de 38 kDa (ANDERSEN & HANSEN, 1989), que estão presentes em uma única cópia no genoma do *M. tuberculosis*. A sequência de inserção IS6110 (EISENACH *et al.*, 1990) geralmente está presente de uma a 20 cópias no genoma de *M. tuberculosis* e sua utilização foi associada com uma maior sensibilidade em testes *in house* para o diagnóstico de *M. tuberculosis* (FLORES *et al.*, 2005).

A acurácia e principalmente a sensibilidade dos testes AAN podem ser influenciadas durante a preparação da amostra clínica. Para extração do DNA, a lise celular apenas pode ser realizada com elevadas temperaturas (VICTOR *et al.*, 1992), ou com tampões de lise contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (THIERRY *et al.*, 1990), tween 20 (BRISSON-NOEL *et al.*, 1991), triton X-100 (SHAWAR *et al.*, 1993), nonidet P40 (ZAMBARDI *et al.*, 1993), tiocianato de guanidina (Boom *et al.*, 1990), por exemplo. A utilização de processos mecânicos com partículas de vidro (SANTOS *et al.*, 1992) ou zircônio (KOX *et al.*, 1994), além de ultrassom para o rompimento da parede celular, podem ser alternativas (NOLTE *et al.*, 1993). A

purificação do DNA remove substâncias presentes nas amostras clínicas que podem atuar como inibidores do DNA polimerase.

Entre os métodos já descritos, existem aqueles que utilizam as amostras sem purificação (SHAWAR *et al.*, 1993), a utilização de fenol/clorofórmio ou clorofórmio/álcool isoamílico (BRISSON-NOEL *et al.*, 1989; HERMANS *et al.*, 1990; MANJUNATH *et al.*, 1991; NOLTE *et al.*, 1993) e a utilização de partículas de sílica (ANDERSEN *et al.*, 1993; ROSSETTI *et al.*, 1997) ou sacarose (VICTOR *et al.*, 1992).

A detecção do produto amplificado pode ser realizada através de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (KOX *et al.*, 1994; ROSSETTI *et al.* 1997), gel de poliacrilamida (VICTOR *et al.*, 1992), ou hibridização dos fragmentos amplificados com sondas específicas. A detecção por hibridização pode ser realizada pelo uso de biotina (ANDERSEN *et al.*, 1993; SPERHACKE *et al.*, 2004; SCHERER *et al.*, 2007) ou digoxigenina (WILSON *et al.*, 1993; KOX *et al.*, 1996) incorporadas às moléculas de DNA.

Os testes de AAN *in house* apresentam custos mais baixos que os testes comerciais e rendimentos promissores, mas as estimativas de acurácia são muito heterogêneas (FLORES *et al.*, 2005; GRECO *et al.*, 2009). Para sua utilização na rotina de diagnóstico da tuberculose, devem ser padronizados e validados em cada laboratório e ensaios clínicos devem ser realizados (SPERHACKE *et al.*, 2004; KRITSKI *et al.*, 2005; GRECO *et al.*, 2009).

Entre os *kits* comerciais disponíveis, apenas três foram amplamente difundidos e avaliados: o Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTD test; Gen-Probe, San Diego, CA, USA), o Amplicor MTB (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA), e o BD ProbeTec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD) (KRITSKI *et al.*, 2005; TORTOLLI & Palomino, 2007). Inicialmente os dois primeiros foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização em amostras clínicas pulmonares com baciloscopia positiva, mas uma nova versão do teste AMTD (EMTD – Enhanced *M. tuberculosis* Direct Test) foi aprovada para a utilização em amostras de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar tanto com baciloscopia positiva e como negativa (DROBNIEWSKI *et al.*, 2003; CHENG *et al.*, 2005). O BD ProbeTec ET (Becton Dickinson Sparks, MD) ainda não foi aprovado pelo FDA e apenas o Amplicor MTB (Roche Molecular Systems,

Branchburg, NJ, EUA) possui registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008).

Os testes AMTD e EMTD são baseados na amplificação mediada por transcrição reversa e têm como alvo o RNA ribossômico (rRNA) 16S de uma região específica do complexo *M. tuberculosis*. O processo é realizado em um único tubo, o que minimiza o risco de contaminação, pode ser completado em 02h30min e não possui controle interno para avaliação de inibição (TIWARI *et al.*, 2007; TORTOLI & PALOMINO, 2007).

O Amplicor MTB test é baseado na PCR do gene do rRNA 16S do gênero *Mycobacterium*. Para reduzir a contaminação é utilizado dUTP e N-uracil-glicosilase. O teste pode ser concluído entre seis a sete horas e possui controle interno para detectar possível inibição da reação (CHENG *et al.*, 2005; TORTOLI & PALOMINO, 2007).

O BD ProbeTec ET é baseado na amplificação isotérmica por deslocamento de fita utilizando o DNA polimerase e tem como alvo a sequência de inserção IS6110. Através de um controle interno a amplificação pode ser monitorada em tempo real. Quatro horas é o tempo médio de realização do teste (TORTOLI & PALOMINO, 2007). O desempenho dos testes em um estudo de meta-análise é mostrado na tabela 3, segundo GRECO e colaboradores (2006).

O teste Xpert MTB/RIF, destinado a ser utilizado com o sistema GeneXpert da Cepheid, é um teste diagnóstico *in vitro*, semi-quantitativo de *nested* PCR em tempo real, criado para detectar o DNA do complexo *M. tuberculosis* diretamente de amostras oriundas de expectoração, de pacientes não tratados, além de detectar mutações associadas com a resistência à rifampicina. Os resultados do teste podem ser obtidos em menos de 2 horas. O sistema GeneXpert DX integra e automatiza o processamento de amostras, a amplificação dos ácidos nucléicos e a detecção das sequências alvo em amostras simples ou complexas, utilizando ensaios de PCR e RT PCR (transcriptase reversa) em tempo real. O sistema é composto por um instrumento, computador, leitor de códigos de barras e software pré-intalado para efetuar o teste nas amostras e visualizar os resultados. O sistema requer o uso de cartuchos GeneXpert descartáveis, com utilização única e autônoma, eliminando o risco de contaminação cruzada.

Tabela 3: Desempenho dos testes comerciais de AAN.

Teste (método)	BK +		BK -	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
EMTD (TMA)	95 - 98%	93 - 97%	70 - 80%	98 - 98,5%
Amplicor MTB (PCR)	94 - 97%	80 - 86%	57 - 65%	96 - 97%
BD ProbeTec ET (SDA)	96 - 99%	84 - 93%	66 - 76%	96 - 97%
GeneXpert (PCR)	100%	100%	90,9%	98,3%

BK: bacilo de Koch; TMA: *transcription mediated amplification*; PCR: *polymerase chain reaction*; SDA: *strand displacement amplification*.

A maior vantagem da utilização dos testes de AAN, tanto comerciais como *in house*, é a rapidez em sua realização, no entanto eles não devem substituir os métodos convencionais de diagnóstico da tuberculose. Somente a detecção de DNA de *M. tuberculosis* não significa necessariamente doença ativa, portanto, os dados moleculares precisam ser interpretados juntamente com os dados clínicos (LING *et al.*, 2008). O alto custo dos *kits* comerciais são as maiores desvantagens, o que acaba dificultando sua utilização em países com menos recursos e grande carga da doença (KRITSKI *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2008; LING *et al.*, 2008; GRECO *et al.*, 2009; NYENDAK *et al.*, 2009).

1.13 Epidemiologia molecular da tuberculose

Em epidemiologia, um passo essencial no estudo de uma doença é "*descrever precisamente sua ocorrência na população*". Essa descrição tem como categorias básicas a distribuição temporal, a distribuição espacial e a distribuição segundo atributos pessoais visando a identificar o padrão geral de ocorrência e os grupos sob risco. A descrição metódica do comportamento da doença permite a elaboração de hipóteses "causais" com base na ocorrência usual de doenças conhecidas e possibilita o uso da analogia tanto no estudo das doenças novas quanto na explicação de doenças anteriormente conhecidas (FOX *et al.*, 1970).

A integração de técnicas baseadas na caracterização de sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos de um patógeno, com abordagens epidemiológicas convencionais, para identificar determinantes como distribuição, transmissão e manifestação de doença na população, objetivando as possibilidades de intervenções e prevenção, é denominada *Epidemiologia Molecular* (SMALL & VAN EMBDEN, 1994; FOXMAN & RILEY, 2001).

A tuberculose é um exemplo de doença infecciosa em que as técnicas de biologia molecular permitiram a obtenção de informações difíceis ou impossíveis de serem descritas utilizando metodologias convencionais de diagnóstico da TB. A epidemiologia molecular revolucionou a compreensão da epidemiologia da tuberculose, possibilitando a comparação de linhagens do bacilo da tuberculose em diferentes áreas geográficas; confirmação de surtos em instituições, identificação de fatores de risco em comunidades, transmissão nosocomial, identificação de fatores de risco para transmissão recente, rastreamento de clones de importância em saúde pública e avaliação de contaminação cruzada em laboratórios (SEPKOWITZ *et al.*, 1995, SUFFYS *et al.*, 1997, FOXMAN & RILEY, 2001).

A possibilidade de aplicação das técnicas de biologia molecular em estudos epidemiológicos ao mesmo tempo que a epidemiologia clássica, tem trazido enormes contribuições para o entendimento das relações entre os microrganismos e as doenças infecciosas. A compreensão da etiologia e da dinâmica da transmissão de doenças infecciosas é de fundamental importância para que se estabeleçam precisamente os alvos das medidas de controle da doença. Para reduzir a transmissão de tuberculose, é importante delinear os padrões pelos quais a doença se espalha na população (ROSS & DWYER, 1993, YANG *et al.*, 1996, COHN & O'BRIEN, 1998).

As técnicas convencionais de diferenciação de cepas de *M. tuberculosis* incluem tipificação por fagos e teste de susceptibilidade aos antibióticos. Apesar de essas técnicas fornecerem informações sobre a transmissão e patogênese da tuberculose, o potencial de diferenciação é muito baixo, devido ao número limitado de tipos micobacteriófagos e padrões de resistência, além de serem técnicas demoradas e de difícil realização (VAN EMBDEN *et al.*, 1993; SAMLL & VAN EMBDEN, 1994; SUFFYS *et al.*, 1997).

As técnicas de diferenciação de cepas podem ser caracterizadas em termos de capacidade de tipificação, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de realização e de interpretação dos resultados (TENOVER *et al.*, 1997).

Diversas técnicas moleculares estão sendo utilizadas atualmente na genotipagem do *M. tuberculosis*, e, quando avaliadas, apresentam características particulares, apresentando vantagens e desvantagens, sendo importante selecioná-las em cada questão epidemiológica a ser abordada para a obtenção de melhores resultados (KREMER *et al.*, 1999; MOSTRÖM *et al.*, 2002).

O desenvolvimento das ferramentas de epidemiologia molecular desde o início da década de 90 contribuiu muito para o conhecimento da genética populacional da tuberculose através de métodos confiáveis para identificar cepas diferentes de *M. tuberculosis* (MATHEMA *et al.*, 2006; GILLESPIE, 2007). Diversas metodologias podem ser utilizadas para verificar polimorfismos no DNA de *M. tuberculosis*. Esses métodos incluem o polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), hibridização de DNA, PCR e diferentes combinações deles (KREMER *et al.*, 1999).

As três técnicas mais utilizadas para esse propósito incluem a genotipagem utilizando o Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) da sequência de inserção IS6110, Mycobacteria interspersed Repetitive Units (MIRUs) e *Spoligotyping* (MATHEMA *et al.*, 2006; GILLESPIE, 2007; VANDER SPUY *et al.*, 2009).

Padronizada em 1993 por van Embden e colaboradores, a técnica de RFLP do IS6110, considerada padrão-ouro entre as técnicas de genotipagem para tipificação de *M. tuberculosis*. A técnica avalia a presença da sequência de inserção IS6110 pela detecção do polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length polymorphism – RFLP). A IS6110 é um transposon exclusivo do complexo *M. tuberculosis*, representado por uma sequência de 1.361pb, que pode ser encontrado em grande variedade de número de cópias (0 a 25) e em diferentes posições no genoma, de acordo com a espécie. O perfil encontrado em cada isolado é determinado pelo padrão de bandas eletroforéticas geradas em gel de agarose (Van EMBDEM *et al.*, 1993; FOXMAN e RILEY, 2001).

Limitações foram demonstradas para essa técnica, dentre elas, baixo poder discriminatório para isolados que apresentam poucas cópias de IS6110 (<6) em seu genoma e por não ser uma técnica suficientemente precisa para identificar algumas linhagens genéticas, ocasionando frequentemente o uso de uma tipagem secundária baseada em outro marcador genético. A técnica é demorada e trabalhosa: requer semanas de incubação para cultivar um número de organismos que possam fornecer quantidades de DNA suficientes para sua realização, mão-de-obra intensiva e qualificada além de possíveis erros na interpretação dos resultados e por ser um método baseado em gel. Os padrões obtidos são difíceis de serem comparados entre laboratórios distintos, pois requerem programas especializados para análise dos complexos padrões de bandas gerados (FOXMAN e RILEY, 2001; KAMERBEEK *et al.*, 1997; KREMER *et al.*, 2005; MATHEMA *et al.*, 2006; van SOOLINGEN *et al.*, 2007; COWAN & CRAWFORD, 2002; MATHEMA *et al.*, 2006; van SOOLINGEN *et al.*, 2007).

No entanto, apesar das limitações, a técnica tem sido utilizada por pesquisadores em diferentes questões epidemiológicas, como estudos de transmissão do bacilo da tuberculose, detecção de surtos esporádicos, verificação da disseminação clonal de linhagens MDR, identificação de fatores de risco para transmissão do agente infeccioso, detecção de contaminação cruzada em laboratórios e estudos que diferenciam a tuberculose causada por transmissão recente ou reativação endógena (KREMER *et al.*, 2005; van SOOLINGEN *et al.*, 2007, SMALL *et al.*, 1994; DIEL *et al.*, 2002; GLYNN *et al.*, 2008, BIFANI *et al.*, 1996; DAHLE *et al.*, 2003; SAMPER *et al.*, 2005, FANDINHO *et al.*, 2000; HAASE *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2008, GUTIÉRREZ *et al.*, 1998; CLARK *et al.*, 2006, DIEL *et al.*, 2002; LILLEBAEK *et al.*, 2002).

A segunda técnica é semelhante ao RFLP, porém possibilita identificar mais facilmente focos de contágio de tuberculose na população e conseqüentemente utilizar métodos mais eficazes para interromper a cadeia de transmissão da doença. Técnica mais rápida que o RFLP, bastante reprodutível. Genótipos confiáveis são gerados, baseado no estudo detalhado de 12 *loci* semelhantes a minissatélites contendo VNTRs do genoma do complexo *M. tuberculosis* (SUPPLY *et al.*, 2001). O método tem sido utilizado em alguns estudos de epidemiologia molecular e também

em estudos filogenéticos, assim como para avaliar a transmissão de *M. bovis*. Foi proposto que o conjunto de 15 *locus* seja utilizado como o novo padrão para diferenciação epidemiológica de *M.tuberculosis* e o sistema de 24 *locus* seja utilizado como ferramenta de alta resolução para estudos filogenéticos (SUN *et al.*, 2004; WARREN *et al.*, 2004; STRAVUM *et al.*,2009; RORING *et al.*, 2004; SUPPLY *et al.*, 2006)

Desenvolvida por Magdalena e colaboradores (1998), a técnica de MIRU é baseada na amplificação por PCR e no estudo de VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), que são sequências que se repetem (*tandem repeats*) até centenas de vezes (PANDOLFI *et al.*, 2007.) A vantagem da técnica é que ela possibilita uma comparação entre linhagens de diferentes áreas geográficas e permite o rastreamento da movimentação de linhagens individuais (SUPPLY *et al.*, 2000; MAZARS *et al.*, 2001; SUPPLY *et al.*, 2001) de forma semelhante à técnica de RFLP sendo, no entanto, de execução muito mais fácil. Este tipo de abordagem torna possível maior número de análises e identificação de mais focos de contágio na população, podendo assim estudar-se métodos mais adequados para interromper a transmissão da doença.

Apesar de promissora, essa nova seleção de *locus* MIRU-VNTR ainda necessita ser avaliada em diferentes ambientes e populações, pois a variabilidade de *locus* específicos de MIRU depende dos isolados analisados, sua origem geográfica e diversidade genética inerente das cepas (MATHEMA *et al.*, 2006).

Em 1995, o *spoligotyping* foi pela primeira vez mencionado no artigo que descreve o genótipo Beijing de *M.tuberculosis* (van SOOLINGEN, 1995). Kamerbeek e colaboradores (1997) padronizaram o método para diferenciar estirpes do complexo *M. tuberculosis*. Logo após, membranas de hibridização começaram a ser comercializadas (KAMERBEE *et al.*, 1997; BRUDEY *et al.*, 2006) Desde então, vários estudos têm utilizado o *spoligotyping* muitas vezes combinado com outros marcadores para avaliar a diversidade de cepas do complexo *M.tuberculosis*. A obtenção de informações sobre a identidade das cepas precocemente é importante para que tais informações possam ter utilidade clínica e possam ser utilizadas no manejo da doença durante seu curso (HAYWARD & WATSON, 1998; GORI *et al.*, 2005).

A técnica é uma ferramenta simples e barata para distinguir os genótipos desta bactéria. Quase todos os resultados do *spoligotyping* foram submetidos a um banco de dados internacional, o SpolDB (webcite <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>) que já foi atualizado quatro vezes (BRUDEY *et al.*, 2006). Ao longo dos anos muitas famílias de cepas foram identificadas baseadas no padrão de *spoligotyping* e essas famílias foram agrupadas em três grupos genéticos principais (PGG – *Principal Genetic Group*). O PGG1 inclui as famílias *East African-Indian* (EAI), *Beijing* e *Central Asian* (CAS) ou Dheli. O PGG2, as famílias *Harleem*, *Latin American and Mediterranean* (LAM) e X. A família T e outras famílias ainda não muito bem caracterizadas são classificadas no PGG3 (RASTOGI & SOLA, 2007).

Esta técnica baseia-se na amplificação do locus DR (Direct Repeat) do complexo *M. tuberculosis*, ou seja, este método detecta a presença ou ausência de espaçadores no locus DR, diferenciando as amostras isoladas, podendo ser empregado na investigação epidemiológica, permitindo a identificação do curso da infecção e das rotas de transmissão da doença, ou mesmo da compreensão epidemiológica da infecção, que são fundamentais para um melhor controle e erradicação da doença (ROMANO *et al.*, 1996; LIÉBANA *et al.*, 1997; ZANINI *et al.*, 2001; RODRIGUEZ, 2005).

O *spoligotyping* não tem o mesmo poder discriminatório do RFLP ou MIRU, mas possui várias vantagens (KREMER *et al.*, 1999; KREMER *et al.*, 2005): a amplificação por PCR requer quantidades muito menores de DNA do que IS6110-RFLP de modo que pode ser utilizada diretamente em amostras clínicas, em esfregaços corados por ZN e ou tecidos preservados em parafina (HEYDERMAN *et al.*, 1998; GOYAL *et al.*, 1999; van der ZANDEN *et al.*, 2003; GORI *et al.*, 2005; SURESH *et al.*, 2007; van der ZANDEN *et al.*, 1998; QIAN *et al.*, 1999); até 40 amostras de DNA podem ser analisadas em um dia com o método clássico e até 186, com o *spoligotyping* usando-se microesferas (ver <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/index.htm>), que provou ser muito viável (COWAN *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2009); a técnica ainda tem melhor poder discriminatório que o RFLP em isolados com menos de 6 cópias do elemento de inserção IS6110 e ainda pode distinguir entre as principais

linhagens e sublinhagens do complexo *M. tuberculosis* e *M. bovis* (SAKAMOTO, 2001), tornando-se filogeneticamente informativo, exceto nos raros casos em que as mesmas exclusões (abrangendo os mesmos espaçadores) ocorreram por evolução convergente, podendo surgir padrões idênticos em cepas não relacionadas (MOKROUSOV *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009; TANAKA *et al.*, 2006). Assim, grupos de isolados do complexo *M. tuberculosis* compartilhando o mesmo padrão podem representar cadeias de transmissão recente, mas também podem representar similaridades genéticas mais amplas (ancestral comum distante), enquanto isolados com padrões diferentes de *spoligo*typing podem seguramente ser considerados genótipos distintos (HAYWARD & WATSON 1998). Por isso a tipagem de cepas por *spoligo*typing tem sido aplicada principalmente para descartar relações epidemiológicas ao invés de confirmá-las. Entretanto, é muito útil para realização de screening em um grande número de isolados, e pode ser associado a uma técnica secundária de genotipagem, fornecendo informações epidemiológicas mais rapidamente (FERDINAND *et al.*, 2002; KREMER *et al.*, 2005; NICOL & WILKINSON, 2008), e já foi demonstrada a habilidade dessa técnica em determinar o mecanismo patogênico de recidiva da doença (WARREN *et al.*, 2002b). Essa metodologia é rápida, de simples execução (KAMERBEEK *et al.*, 1997), e sua reprodutibilidade é uma das mais altas entre as técnicas rápidas, baseadas na PCR e produz padrões de fácil análise através de programas de computador, permitindo a realização de estudos com grande número de amostras (GOYAL *et al.*, 1997; KREMER *et al.*, 1999; KREMER *et al.*, 2005; DRISCOLL, 2009).

2. A TUBERCULOSE NO SISTEMA PRISIONAL BRASILEIRO

A forma de transmissão nosocomial da tuberculose torna-se um grave problema de saúde para os grupos que convivem em conglomerados, especialmente em presídios.

Segundo dados do Departamento Penitenciário Nacional (DEPEN, do Ministério da Justiça), a população carcerária do País saltou de 232.755 em 2000 para 496.251 em 2010. Num período de dez anos (2000 a 2010) a população privada de liberdade cresceu em 109%. Os detentos brasileiros são, em sua maioria, homens (82%), na faixa etária de 20 a 49 anos, com baixa escolaridade e provenientes de grupos de baixo nível socioeconômico (BRASIL, 2011).

A tuberculose entre a população privada de liberdade, em alguns estados, chega a ser 35 vezes superior à sua ocorrência na população em geral. A superlotação, pouca ventilação, falta de iluminação solar, higiene precária, nutrição inadequada, uso de álcool, uso de drogas (com ou sem consentimento) e alta prevalência do HIV são alguns dos fatores que contribuem para alta endemicidade (SANCHEZ *et al.*, 2010).

Outros agravantes para as altas taxas da doença intramuros seriam a grande circulação de pessoas de uma prisão para outra e os antecedentes frequentes de encarceramento, o que coloca também em situação de risco as suas comunidades de origem quando do retorno ao convívio social (NOGUEIRA & ABRAHÃO, 2009).

O acesso aos serviços de saúde é precário apesar de ser garantido à população privada de liberdade sob a responsabilidade compartilhada dos Ministérios da Justiça e de Saúde, pela Portaria Interministerial 1.177, de 09 de setembro de 2003 (HRW, 2010; BRASIL, 2004). Tal portaria prevê a formação de equipes de saúde multidisciplinares, compostas por médicos, enfermeiros, técnicos de enfermagem, odontólogos, psicólogos e assistentes sociais. Lamentavelmente, essa integração dos ministérios ainda é insuficiente para o combate à doença dentro dos presídios. Além disso, o controle social dos serviços de saúde nas prisões ainda está mal definido. Some-se a isso o baixo número de profissionais de saúde que atuam nas prisões, com baixa remuneração e com contratos precários.

Todas essas condições particulares dos presídios permitem o desenvolvimento, a transmissão do agente etiológico, a complicação e a perpetuação da doença, o que explica a alta porcentagem de casos de pacientes com tuberculose dentro do sistema prisional.

Em 2011 foram notificados 4.790 casos da doença nos presídios. Ao se comparar a taxa nacional de incidência da doença entre a população geral (37,1/100.000 hab.) em relação à taxa de incidência nacional das pessoas privadas de liberdade (993,5/100.000 hab.) foi possível constatar o aumento de aproximadamente 27 vezes desse indicador (BRASIL, 2012).

Em 2011, 91,4% dos casos de tuberculose em pacientes do sistema carcerário foram do sexo masculino. As maiores frequências dos casos (48,6%) concentraram-se na faixa etária de 35 a 64 anos, até 8 anos de escolaridade (32,44%) e para o item raça/cor, 52,3% declararam-se “pretos/pardos” e 34,7% “brancos”. Para a população geral o perfil da doença é semelhante ao encontrado entre essa população. Como vimos, a tuberculose atinge principalmente as pessoas em idade produtiva, entre 15 e 59 anos, do sexo masculino e escolaridade inferior a oito anos de estudo (BRASIL, 2012).

Os estados do Rio de Janeiro, Maranhão, Rio Grande do Sul, Bahia, Pernambuco, Espírito Santo, Pará, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul apresentaram as maiores taxas de incidência de tuberculose entre a população do sistema penitenciário respectivamente, conforme a figura 4.

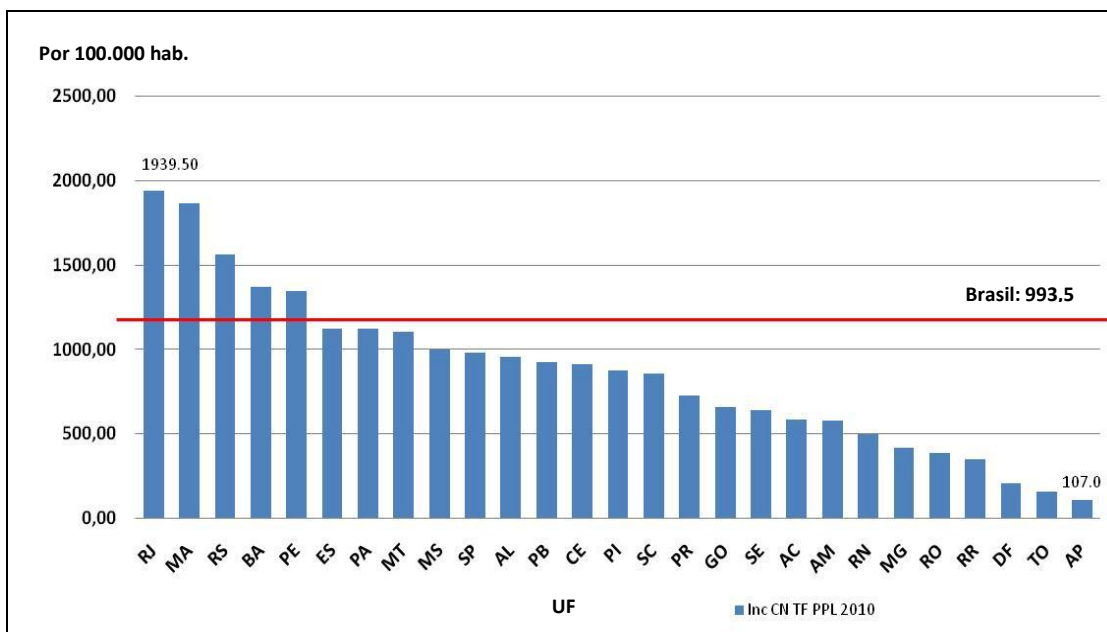


Figura 4: Taxa de incidência de tuberculose (por 100.000 habitantes) entre a população privada de liberdade (BRASIL, 2011).Fonte: Sinan, 2012.

O Estado do Rio Grande do Sul tem a incidência de 1.561,9 casos por 100.000 habitantes, 34 vezes superior à taxa de incidência entre a população geral do estado. Aproximadamente 90% dos casos identificados são pulmonares bacilíferos – a forma transmissível e perpetuadora da doença (BRASIL, 2011).

O município de Charqueadas-RS, onde se desenvolveu este estudo, é uma cidade próxima a Porto Alegre e possui 35.320 habitantes (IBGE, 2011). Aproximadamente 12,6% da população residente no município é privada de liberdade, e representa 67,3% dos casos de tuberculose do município. A taxa de incidência de tuberculose nesse pequeno município é de 311,4 casos por 100.000 habitantes, quase três vezes maior que a da capital gaúcha e oito vezes a média nacional. Quando avaliado apenas os casos do sistema prisional, os dados chegam a 1.658 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2012).

Os dados mostram-se extremamente relevantes, pois os elevados índices de tuberculose no sistema penitenciário não só representam risco à saúde dos detentos, bem como aumentam as chances de proliferação da doença intra e extramuros, já que a população prisional se relaciona com seus familiares, servidores penitenciários e, mais cedo ou mais tarde, vai se reinserir na comunidade de origem.

Em grande parte dos centros de cumprimento de pena, nota-se que as diretrizes básicas para o controle da tuberculose não são observadas. Não existe uma rotina de identificação dos sintomáticos respiratórios no momento da admissão no sistema prisional, conforme orientações do Conselho Nacional de Política Criminal e Penitenciária, do Ministério da Justiça, que recomenda o exame sistemático de ingressos como uma das estratégias para o controle da tuberculose em prisões. Além disso, ainda existem muitas pessoas já encarceradas e doentes, sem o devido diagnóstico e tratamento da tuberculose. Somado a isso, ocorre ainda o descumprimento do tratamento preconizado pelo PNCT, realizado sem acompanhamento e conseqüentemente com altos índices de abandono, podendo gerar, assim, a multirresistência às drogas (OLIVEIRA & CARDOSO, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2006, 2007; DIJANA *et al.*, 2008; NOGUEIRA & ABRAHÃO, 2009).

Esse quadro demonstra que há necessidade de se colocar em prática as recomendações para o controle de tuberculose no sistema penitenciário; de se melhorar a infraestrutura dos serviços de saúde penitenciários; de se otimizar as ações de controle por meio da articulação com outros programas de tuberculose na saúde pública; de se melhorar as condições de encarceramento, possibilitando assim controle mais efetivo da tuberculose dentro e fora das prisões.

3. JUSTIFICATIVA

Um fator importante para explicar o aumento da tuberculose em escala mundial, pode ter relação com a distribuição cada vez menos uniforme da enfermidade, concentrando-se cada vez mais entre as camadas populacionais em situação de vulnerabilidade social ou consideradas de risco, como a população privada de liberdade.

Embora subestimada, a taxa média de incidência de tuberculose no sistema penitenciário do Rio Grande do Sul, em 2006, foi de 725/100.000 – 18 vezes superior à taxa da população geral do estado (48/100.000), segundo informações do Programa Estadual de Controle da Tuberculose (CEVS, 2007).

A inclusão do Sistema Penitenciário do Rio Grande do Sul tendo como projeto-piloto uma penitenciária com contingente de 1.900 presos atende à necessidade crescente de distribuição dos recursos e ações destinados às medidas de Saúde Pública para o controle efetivo da tuberculose, além da obtenção de dados referentes ao perfil da doença dentro do cárcere, ainda pouco conhecidas no estado e no país. A Penitenciária Estadual do Jacuí é a segunda maior unidade prisional do Estado do Rio Grande do Sul. Têm estrutura física debilitada, superlotação que ultrapassa 100% da sua capacidade e uma equipe de saúde deficitária, fatores que influenciam no diagnóstico tardio e propagação da doença.

Apesar de esforços feitos pelos órgãos de saúde para o controle da tuberculose, ações de controle da tuberculose serão otimizadas, sobretudo se forem articuladas com outros programas de saúde e acompanhadas pela melhoria das condições de encarceramento (SANCHEZ *et al.*, 2006). Ainda é fundamental a obtenção de dados referentes ao perfil da doença, transmissão, fatores de risco e resistência para que se possa auxiliar nas decisões sobre estratégias de prevenção e tratamento dessa enfermidade. Os centros de cumprimento de pena não têm sido considerados como participantes importantes nas intervenções de saúde pública. A tuberculose nas prisões já foi rotulada como uma praga esquecida e as inúmeras ações preconizadas para o controle da tuberculose nesse ambiente não são adotadas rotineiramente, evidenciando descaso e negligência (JONES *et al.*, 1999; DROBNIEWSKI *et al.*, 1995; WHO, 1998).

Infelizmente a saúde no sistema prisional ainda é tida não como um direito, mas como uma concessão da administração penitenciária. Isso vale para a tuberculose que continuará sendo uma fatalidade enquanto os detentos não se tornarem os atores centrais de sua saúde. Promover a saúde, e especialmente a prevenção da tuberculose nas prisões, implica uma reflexão conjunta dos atores da “comunidade carcerária” (detentos, familiares, agentes de segurança, profissionais de saúde, professores...) – todos eles expostos à doença –, sobre estratégias participativas adaptadas às especificidades epidemiológicas, sociais e psicológicas desse meio altamente hierarquizado. Dessa forma ações de controle da tuberculose serão otimizadas, sobretudo se forem articuladas com outros programas de saúde e acompanhadas pela melhoria das condições de encarceramento (SANCHEZ *et. al.*, 2006).

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Este estudo tem por objetivo realizar um inquérito entre indivíduos sintomáticos respiratórios para diagnosticar tuberculose, verificar o perfil de susceptibilidade e conhecer os genótipos de *M. tuberculosis* isolados de internos da Penitenciária Estadual do Jacuí, localizada em Charqueadas, Rio Grande do Sul.

4.2 Objetivos específicos

- Estimar a incidência de tuberculose na Penitenciária Estadual do Jacuí;
- Analisar o perfil epidemiológico dos pacientes;
- Estimar a prevalência de resistência;
- Analisar os isolados de *M. tuberculosis* pela técnica de *spoligotyping* e correlacionar com as informações epidemiológicas;

Parte II

5. Artigo científico

Os principais resultados foram descritos em forma de artigo científico, publicado na revista “Memórias do Instituto Oswaldo Cruz”.

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 (Bamu 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, Bamu 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 (Spol-DB4) 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 (Bann 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 mono-resistance (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 European prisons. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 1215-1223.
- Aziz MA, Wright A, Laszlo A, De Muynck A, Portaels F, Van Deun A, Wells C, Nunn P, Blanc L, Ravignione 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, Lutfur 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 IMF, 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, 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, Mokrousov I, Narvskia O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofon-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti MLR,

- Rüsch-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.
- 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.
- Fillioli 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.
- 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. RD⁵⁰ *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 *katA* 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, Steinhilber 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, Stehling 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 Infect 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, Espinola 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.

Parte III

6. DISCUSSÃO

6.1 Atributos dos pacientes

Não houve diferença entre os pacientes com e sem tuberculose em relação às características avaliadas no estudo, no entanto é importante destacar alguns dados.

Foi observado que 98,7% dos pacientes tinham de 18 até 45 anos de idade, semelhante ao encontrado por Costa *et al.*, (1998) em estudo realizado em Pelotas, no qual quase 80% dos pacientes tinham até 49 anos de idade. Rosso (2008) avaliando a tuberculose pleural também observou que os pacientes com outro diagnóstico (não TB) tinham uma média de idade mais alta. Esses dados sugerem que pacientes idosos sejam acometidos, com mais frequência, por outros agravos respiratórios com sintomas semelhantes ao da tuberculose. A média de idade dos pacientes está de acordo com a relação da doença entre a população geral - pacientes jovens e em idade produtiva, geralmente de 15 a 59 anos de idade. Além de se aproximar bastante da relação de jovens adultos em situação de privação de liberdade (SNIDER *et al.*, 1994; AERTS & JOBIM, 2004; TINDÓ *et al.*, 2004, BRASIL, 2012).

Quanto à escolaridade, a média que este estudo registrou confirma os dados nacionais registrados no SINAN para a população privada de liberdade: a maior frequência é de pessoas que estudaram entre 1 a 8 anos (32,44%). E por fim, em relação a raça/cor, cabe destacar que no RS, 80% da população é branca, assim como 77,7% dos nossos pacientes com tuberculose (BRASIL, 2012; IBGE, 2000).

6.2 Prevalência de tuberculose

Apesar de se tratar de populações de tamanhos extremamente diferentes, quando se projeta a prevalência da tuberculose deste estudo (3.789/100.000 habitantes) e se compara ao número de casos notificados no Rio Grande do Sul no mesmo período (47/100.000 habitantes), nota-se que a prevalência da doença na penitenciária é aproximadamente 80 vezes superior à prevalência da doença na população geral do estado e 32 vezes superior à população geral de Porto Alegre,

que é o município líder no *ranking* nacional em número de casos da doença (BRASIL, 2009). Os dados encontrados neste estudo servem de alerta para a sociedade como um todo para que sejam tomadas medidas efetivas de controle da doença dentro do sistema penitenciário.

Chama a atenção ainda, quando se avalia os dados do pequeno município de Charqueadas, onde se encontra a penitenciária. Nos anos de 2007 e 2008 (período em que aconteceu este estudo), o número de casos no município, segundo o Sistema de Informação e Notificação de Agravos (SINAN), foi de 72 casos (209,4 casos por 100.000 habitantes) e 78 (219,7 casos por 100.000 habitantes) respectivamente. O município de Charqueadas tem seis unidades prisionais e quase 12% da sua população é privada de liberdade, ainda assim, por não obedecer aos critérios demográficos, não é considerado pelo Ministério da Saúde como prioritário para o controle da tuberculose, apesar de ter incidência aproximadamente três vezes superior à incidência do município de Porto Alegre (BRASIL, 2009).

Ao examinar os dados contidos no SINAN entre os anos de 2007 e 2008, entre a população privada de liberdade foram notificados apenas 63 e 64 casos, respectivamente. Pode-se concluir que existiu subnotificação, pois os dados notificados são diferentes aos encontrados no estudo, que registrou 72 pacientes com tuberculose. Pode-se inferir ainda, que as demais cinco unidades prisionais localizadas no complexo de Charqueadas onde se localiza a PEJ, ou não identificaram casos, ou não realizam busca de sintomáticos respiratórios, ou ainda não fazem a notificação dos casos encontrados. Existe uma lacuna entre o serviço e a vigilância epidemiológica. Interessante citar, que os casos de tuberculose registrados no SINAN do município de Charqueadas, apenas 12,5% e 18% são da população geral, o restante sendo totalizado pela população privada de liberdade (BRASIL, 2009).

Alguns estudos em prisões de São Paulo e Rio de Janeiro indicam dados semelhantes ao deste inquérito (OLIVEIRA *et al.*, 2004, ABRAHÃO *et al.*, 2006, FOURNET *et al.*, 2006, SANCHEZ *et al.*, 2006, 2007). Em 2005, no Rio de Janeiro, a taxa de incidência de tuberculose (3.532/100.00 habitantes) entre a população privada de liberdade foi 30 vezes superior à daquele estado (RJ/SEAP, 2004, RJ/SES, 2004). Um inquérito realizado no Presídio Central de Porto Alegre identificou que 9% da população privada de liberdade tinham a doença, e que,

apesar das populações serem distintas, a incidência dessa enfermidade no presídio foi 37 vezes superior à da população geral do município de Porto Alegre (KUHLEIS, resultados não publicados).

Vários fatores podem contribuir para a alta incidência da tuberculose nas prisões. Em primeiro lugar, pelas características da população privada de liberdade (adultos jovens, do sexo masculino, com baixo nível de escolaridade, oriundos de comunidades desfavorecidas), as quais coincidem com os dados de tuberculose notificados no sistema de informação para a população geral e com os dados encontrados neste estudo (REYES & CONINX, 1997; CONINX *et al.*, 1998; MARCH *et al.*, 2000; BRASIL, 2012). Em segundo lugar, as condições de convivência desfavoráveis oferecidas aos internos, como celas superlotadas, condições precárias de iluminação e de ventilação. Em terceiro lugar, a existência de maior prevalência de HIV entre a população carcerária, além de condições alimentares adversas, que predispõem ao desenvolvimento da tuberculose ativa (CHAVES *et al.*, 1997; WHO, 1998; 2000; LOBACHEVA 2007, TODRYS *et al.* de 2011). Somado a isso, nota-se a frequente dificuldade de acesso aos serviços de saúde, tanto fora quanto dentro das penitenciárias, o que vem contribuindo com o diagnóstico tardio da tuberculose e a propagação da doença. Além do mais, as diretrizes básicas para o controle da tuberculose, na maioria das penitenciárias, não são colocadas em prática. Os indivíduos não são avaliados e diagnosticados no momento da admissão (ingresso no sistema penitenciário) e ocorre o descumprimento do tratamento diretamente observado preconizado pelo Ministério da Saúde, propiciando assim altos índices de abandono e possibilidade de multirresistência às drogas (OLIVEIRA & CARDOSO, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2006, 2007; DIJANA *et al.*, 2008; NOGUEIRA & ABRAHÃO, 2009).

6.3 Meios diagnósticos e resistência aos antimicrobianos

A realização de cultura como um meio de diagnóstico da tuberculose é preconizado no Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil (BRASIL, 2011), para populações vulneráveis, na qual a cultura de escarro deve ser realizada sempre que houver suspeita de tuberculose, independentemente do resultado do esfregaço. Isso pode ser confirmado ao se avaliar os resultados das

técnicas de microscopia e cultura deste estudo: verificou-se que 45,8% das amostras foram positivas para ambas as técnicas, porém, 35 pacientes (48,6%) foram diagnosticados apenas pela cultura e 20 amostras (27,8%) tiveram crescimento de menos de 20 colônias (paucibacilar).

A despeito da demora na produção do resultado - cerca de quatro semanas (em meio não automatizado) – e taxa esperada de contaminação (3% a 5%), a cultura tem boa sensibilidade e especificidade, e permite a identificação do agente etiológico em espécimes clínicos paucibacilares, como foi o caso de 27,8% das amostras deste estudo identificadas precocemente como *M. tuberculosis* (CAMPOS *et al.* de 1996, LEE *et al.* de 1999). De acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, quando realizada cultura de escarro, normalmente é possível adicionar 20% do total de casos de tuberculose pulmonar, não confirmadas, se apenas fosse utilizado o esfregaço (baciloscopia de escarro). Além disso, a cultura permite ainda o isolamento e identificação das micobactérias, a realização de testes de susceptibilidade a drogas antituberculose, bem como o acesso mais rápido ao DNA para realização de técnicas moleculares. A especificidade da cultura para o diagnóstico da tuberculose é maior do que 99%, e a especificidade absoluta é alcançada quando os testes são feitos para identificar o complexo *M. tuberculosis* (CMTB) (BRASIL, 2008).

A resistência às drogas antituberculose foi um fator importante identificado no estudo, ao se avaliar 60 amostras viáveis dos 72 pacientes (83,33%): nove pacientes (15%) apresentaram resistência a pelo menos uma das drogas testadas (RMP, INH, PZA EMB, SM); quatro (6,6%) apresentaram monorresistência, isto é, foram resistentes a apenas uma droga e cinco (8,4%) indicaram resistência a pelo menos rifampicina combinada à outra droga. Sanchez e colaboradores encontraram resultados semelhantes em prisões do Rio de Janeiro (11,1%), porém inferiores aos dados deste estudo (SANCHEZ *et al.*, 2007). No entanto, ambos apresentaram taxas superiores às encontradas no inquérito de resistência realizado em todo o País. De acordo com os resultados da primeira pesquisa de resistência às drogas antituberculose, realizado em 1996, a taxa de resistência encontrada e descrita foi de 8,5% (BRAGA *et al.*, 2003). Esses achados enfatizam a necessidade de estratégias diferenciadas e a urgência da implantação e priorização do tratamento diretamente observado (TDO), bem como a realização de cultura e teste de

sensibilidade para todos os que pertencem a grupos de risco, especialmente com elevadas taxas de incidência e abandono de tratamento como é o caso da população privada de liberdade. A cultura e o teste de sensibilidade também são indicados a pessoas que vivem com HIV/*aids* e a pacientes em esquemas de retratamento, ou que se mantêm com baciloscopia positiva após o segundo mês de tratamento, para se evitar o surgimento de cepas resistentes a multidrogas. Além disso, chama a atenção o a subnotificação das formas resistentes encontradas, fato que é bastante preocupante e que exige estratégias diferenciadas, do ponto de vista da saúde pública. No SINAN, para o ano de 2007 não houve notificações de casos multirresistentes no sistema prisional de Charquedas, já em 2008, há apenas o registro de um. Neste estudo, foram registrados cinco casos (8,4%) multirresistentes. Caso tivessem sido notificados, os pacientes com multirresistência do sistema prisional representariam 1,4% do total de casos da base nacional de 2007 (BRASIL, 2009).

6.4 A Aplicação do *spoligotyping*

A distribuição das famílias de espoligotipos foi semelhante àquela descrita na América do Sul em geral. As três famílias genotípicas principais, LAM, T e Harleem englobaram 84,5% de todos os isolados analisados. Embora a família LAM tenha sido a mais frequente e representou 40% dos isolados, a proporção de SITs pertencentes a ela foi inferior ao relatado em outros estudos. Ela é comumente encontrada na África, América Central, Europa e América do Sul, e representa 80% de todos os isolados brasileiros no SpolDB4 (BRUDEY *et al.*, 2006, LIPIN *et al.*, 2007, DALLA COSTA *et al.*, 2009, RITACCO *et al.*, 2011, PERIZZOLO *et al.*, 2011).

A utilização do *spoligotyping* poderia ser útil para identificar precocemente a possibilidade da existência de cepas *M. tuberculosis* da família Beijing, que contribuiu largamente para a disseminação global da doença (PARWATI *et al.*, 2010). No entanto, não foram encontrados genótipos desse tipo neste estudo. Frequentemente estão associadas com resistência aos fármacos para tratamento da tuberculose e foram encontradas em várias partes do mundo, mas principalmente na Ásia e Europa Oriental (QIAN *et al.*, 1999, GLYNN *et al.*, 2002, KREMER *et al.*, 2004; MOKROUSOV, 2008). Raras cepas desse genótipo são relatadas na América do Sul

e no Brasil – foram identificadas apenas em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (DALLA COSTA *et al.*, 2009, RITACCO *et al.*, 2011).

A subfamília LAM 1 foi a mais prevalente no estudo (28,8%), seguida por LAM9 (9,6%) e LAM2 (1,6%). Em Portugal, também tem sido encontrado com maior frequência a subfamília LAM1, diferentemente dos resultados do Brasil, onde LAM9 é mais referida. (DAVID *et al.*, 2007; BRUDEY *et al.*, 2006). Tal fato pode refletir os efeitos de diferenças na colonização ou fluxos migratórios no sul do Brasil. Baethgen *et al.*, (2008), em um estudo de doença meningocócica no RS observaram que um dos genótipos mais frequentes no estado não havia sido relatado em outras regiões do Brasil, sugerindo que além de *M. tuberculosis*, outros agentes de doenças infecciosas podem ter características genéticas distintas no RS.

Dos 60 avaliados, 55 padrões de *spoligotyping* (87,3%) podem ser agrupados em seis linhagens e dez tipos diferentes com dois ou mais isolados. A maior representatividade no estudo foi pertencente à linhagem LAM, com 35% dos isolados dentro dessas características. Entre eles, 27% (17) são pertencentes a maior concentração do estudo, o SIT 729 (LAM1) e cinco (8%) ao SIT42 (LAM9).

Apesar de não constar entre os 50 tipos mais frequentes no banco mundial (BRUDEY *et al.*, 2006) e ser o sétimo mais frequente em estudo realizado por Borsuk *et al.*, (2005), o SIT 65 foi o segundo agrupamento mais observado, com sete (11%) isolados identificados. Essa alta frequência do SIT 65 pode sugerir que essa seja uma cepa emergente, que esteja sendo transmitida (TANAKA & FRANCIS, 2006). Porém, outra técnica de genotipagem deve ser aplicada para confirmar essa hipótese. O terceiro tipo mais frequente foi o SIT50 (Haarlem3), com seis (9,5%) isolados. É importante observar que a totalidade de 11 isolados da família Haarlem (17,5%) identificados no estudo foi mais elevada do que o encontrado em outros estudos realizados somente utilizando cepas do Rio Grande do Sul (CAFRUNE *et al.*, 2009, PERIZZOLO *et al.*, 2011).

O SIT 729 (27%) com maior representatividade no estudo, e o 863 (8%), da família U, já foram relatados em outros estudos e associados com doentes com história de encarceramento. O último *spoligotipo* citado não é relatado com frequência: um isolado foi encontrado nos EUA, dois em Pelotas-RS e mais recentemente dois na Venezuela (BORSUK, 2005; SEQUERA *et al.*, 2008). Cafrune (2009) identificou o SIT 863 em seis pacientes com histórico recente de

encarceramento. Ainda nesse mesmo estudo, a autora relatou que 72% dos pacientes identificados com o SIT 729 eram reclusos. Além disso, outro estudo realizado também no Rio Grande do Sul, utilizando cepas TB MDR, identificou três isolados pertencentes a família U- SIT863, sendo um desses isolados com origem de paciente privado de liberdade (PERIZZOLO *et al.*, 2011). Ambos os SITs podem ter relação com privação de liberdade, no entanto estudos devem ser realizados utilizando técnicas de genotipagem com maior poder discriminatório, a fim de se confirmar se os isolados de cada SIT são uma única estirpe espalhados por todo o sistema prisional. Isolados MDR com o perfil SIT863 já foram encontrados no Rio Grande do Sul e associados com este grupo populacional – as pessoas privadas de liberdade (CAFRUNE, 2009; PERIZZOLO *et al.*, 2011).

A análise dos spoligotipos mostrou que, provavelmente, as cepas resistentes não estão sendo rapidamente espalhadas entre os internos da PEJ, uma vez que os genótipos resistentes eram diferentes um dos outros, com exceção de dois isolados com SIT729 (LAM1) que eram resistentes a INH.

Apesar de ser superior à taxa relatada na população geral, a maioria dos isolados foram alocados em poucos *clusters*, representando uma taxa de 87,3% (CAFRUNE *et al.*, 2009, DALLA COSTA *et al.*, 2009). Isso indica que apenas poucas amostras podem ser responsáveis pela contaminação interna da penitenciária devido à proximidade e aglomeração entre os detentos, como também relatado por Moreira e colaboradores (2008). Do mesmo modo, pelo número elevado de genótipos agrupados, podemos concluir que a tuberculose nessa população específica tinha sido causada principalmente, por linhagens que foram transmitidas recentemente. Além disso, os *clusters* encontrados nessa população de detentos não são frequentemente encontrados na população em geral no mesmo período e região (VALIM *et al.*, 2000, DALLA COSTA *et al.*, 2009, CAFRUNE *et al.*, 2009, PERIZZOLO *et al.*, 2011).

7. CONCLUSÕES

A alta prevalência de tuberculose encontrada na penitenciária reafirma a necessidade de implementar e otimizar ações de controle de tuberculose entre a população privada de liberdade, considerada prioritária pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde. Se compararmos o número de casos identificados na população estudada (3.789/100.000 habitantes) com o número de casos notificados no Brasil entre a população geral, pode-se concluir que a prevalência da doença na unidade prisional é 102 vezes superior a prevalência da tuberculose na população geral do país.

Estratégias simples como a busca de sintomáticos respiratórios e coleta de expectoração permitiram que 18,4% das pessoas doentes fossem identificadas e tratadas. A realização de cultura como método adicional e complementar à baciloscopia para o diagnóstico da tuberculose é indispensável entre as populações em situação de vulnerabilidade. Foi possível adicionar 48,6% do total de casos de tuberculose pulmonar, não confirmadas, se apenas fosse utilizado o esfregaço (baciloscopia de escarro), minimizando o tempo de eliminação do *M. tuberculosis* e a propagação da doença intramuros. Além do isolamento e identificação das micobactérias, a cultura permitiu ainda a realização de testes de sensibilidade a drogas antituberculose, bem como o acesso mais rápido ao DNA para realização de técnicas moleculares.

A respeito do TSA, a identificação em larga escala de cepas resistentes a pelo menos uma droga se torna de extrema importância, pois representa um desafio aos programas de tuberculose – o tratamento torna-se mais complexo, com necessidade de uso de fármacos de segunda linha, mais dispendioso e frequentemente com menos sucesso que o tratamento com linhagens sensíveis.

A aplicação da técnica de *spoligotyping* permitiu verificar que as cepas resistentes identificadas tinham perfis diferentes na genotipagem, demonstrando que pode não haver transmissão dessas cepas na penitenciária. No entanto, a identificação em larga escala do perfil 729, mais a existência do SIT 863 entre a população privada de liberdade, neste e em mais dois estudos realizados no estado do Rio Grande do Sul, sugerem que esses perfis podem ter associação com a situação de encarceramento.

A formação de poucos *clusters* demonstra ainda que poucas linhagens são responsáveis pela transmissão de *M. tuberculosis* intramuros, reforçando a tese de que as condições de vida no cárcere, com a superlotação, pouca ventilação e iluminação favorecem a transmissão da tuberculose.

Por fim, este trabalho demonstra a importância da aplicação de estratégias diferenciadas e tecnologias inovadoras para se traçar o perfil da tuberculose na população privada de liberdade, além de evidenciar a necessidade da melhoria da estrutura física das prisões, com disponibilidade de recursos humanos para a área da saúde, recursos laboratoriais e financeiros, e compromisso político de forma a garantir o funcionamento de um programa de controle de tuberculose intramuros.

É natural a constatação de que a tuberculose no sistema prisional é um problema de saúde pública e se estratégias de controle não forem adotadas pelos órgãos competentes, urgentemente, os bacilos continuarão se propagando dentro e fora da prisão.

8. PERSPECTIVAS

Avaliação dos isolados deste estudo utilizando outras técnicas com maior poder discriminatório para identificar cada cepa e correlacionar as informações com os dados dos pacientes, a fim de identificar a relação epidemiológica entre os infectados com a mesma cepa.

Realização de um banco de perfis de *spoligotyping* e dados dos pacientes com os isolados do presente estudo, juntamente com os isolados de estudos prévios e estudos em andamento no CDCT.

Realização de pesquisas adicionais no sistema prisional do RS com a finalidade de entender melhor a epidemiologia da doença intramuros e consequentemente traçar estratégias de controle junto aos órgãos competentes.

Por fim, sensibilizar a sociedade e provocar mobilização eficaz face às condições de saúde insuficientes, ambientes superlotados e insalubres do sistema carcerário nacional. O quadro apresentado exige respostas imediatas na forma de políticas públicas que envolvam todas as instituições responsáveis e a sociedade civil. A tuberculose no sistema prisional não é um problema só dos detentos, é um problema de toda a sociedade. E, se nada for feito, todos sofrerão, mais cedo ou mais tarde, o agravamento das consequências dessa omissão.

9. REFERÊNCIAS

- ABATE G.; MSHANA R.N.; MIORNER H.** Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, v.2, p. 1011-1016. 1998.
- ABEBE DS, BJUNE G, AMENI G, BIFFA D, ABEBE F.** Prevalence of pulmonary tuberculosis and associated risk factors in Eastern Ethiopian prisons. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;**15**: 668-673.
- ABRAHÃO RM, NOGUEIRA PA, MALUCELLI MI.** Tuberculosis in county jail prisoners in the western sector of the city of São Paulo, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;**10**: 203-208.
- AERTS A, HAUER B, WANLIN M, VEEN J.** Tuberculosis and tuberculosis control in european prisons. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;**10**: 1215-1223.
- ÁINSA, J. A.; MARTIN, C.& GICQUEL, B.** Molecular approaches to tuberculosis. *Molecular Microbiology*. 2001;**42** (2): 561-570.
- ALLIX C, SUPPLY P, FAUVILLE-DUFAUX M.** Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis*. 2004;**39**(6):783-789.
- ANDERSEN AB, HANSEN EB.** Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1989;**57**(8):2481-2488.
- ANDERSEN AB, THYBO S, GODFREY-FAUSSETT P, STOKER NG.** Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993; **12**(12):922-927.
- ANGEBY, K.A.; KLINTZ, L.; HOFFNER, S.E .** Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *J Clin Microbiol*. 2002. 40:553-555.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.** ANVISA. Disponível em http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/rconsulta_produto_in.te.
- ARANAZ A, LIENANA E, GOMEZ-MAMPASO E, GALAN, JC, COUSIN D, ORTEGA A, BLANQUEZ J, BLAQUERO F, MATEOS A, SUAREZ G, DOINGUEZ**

L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; **49**Pt 3:1263-1273.

ARNOLD C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. 2006. *Clin Microbiol Infect.* 2007;**13**(12):120–128.

ATS. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. The official statement of the American Thoracic Society and the Centers of Disease Control and Prevention and the Council of the Infectious Disease Society of America. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2000; **161**: 1376-1395.

ATS. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Centers for Disease Control and Prevention; Infectious Diseases Society of America. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: controlling tuberculosis in the United States. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;**172**(9):1169-227.

AZIZ MA, WRIGHT A, LASZLO A, DE MUYNCK A, PORTAELS F, VAN DEUN A, WELLS C, NUNN P, BLANC L, RAVIGLIONE M. 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.* 2006;**16**: 2142-54.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; SUN UM, K.; WILSON, T.; COLLINS, D.; LISLE, G. & JACOBS JR, W. R. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 1994; **263**: 227-230.

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. Pulmonary tuberculosis and drug resistance in Dhaka central jail, the largest prison in Bangladesh. *PLoS One.*2010; **21**: 5: e10759.

BAPTISTA IMFD, OELEMANN MC, OPROMOLLA DVA, SUFFYS PN. 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.* 2002;**97**: 1147-1152.

BARRERA L. *IN: PALOMINO JC; LEÃO SC, RITACCO V.* Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 1ª ed. 2007.

BATES, J. H. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine.* 1980; **1**: 167-174.

BECK, R. W. A chronology of microbiology. Washington: ASM. 2000.

BLACK, J. G. Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BIFANI PJ, PLIKAYTIS BB, KAPUR V, STOCKBAUER K, PAN X, LUTFEY ML, MOGHAZEH SL, EISNER W, DANIEL TM, KAPLAN MH, CRAWFORD JT, MUSSER JM, KREISWIRTH BN. Origin and interstate spread of a New York city multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA.* 1996; **275**:452-457.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annual Review of Biochemistry.* 1996; **65**: 215-239.

BLOOM, B. R. & MURRAY C. J. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Scienc.* 1992; **257**: 1055-1064.

BLOOM, B. R. Tuberculosis: patogenesis, protection, and control. ASM. 1994.

BOOM R, SOL CJA, SALIMANS MMM, JANSEN CL, VAN DILLEN PMEW, VAN DER NOORDA J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990; **28**(3):495-503.

BORSUK S, DELLAGOSTIN MM, MADEIRA SG, LIMA C, BOFFO M, MATTOS I, ALMEIDA DA SILVA PE, DELLAGOSTINO A. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. *Microbes Infect.* 2005;**7**: 1338-1344.

BRAGA JU, WERNECK BARRETO A, HIJAR MA. Inquérito epidemiológico de resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil. *Boletim de Pneumologia Sanitária.* 2003;**11**: 76-81.

BRASIL. Ministério da Justiça. Departamento Penitenciário Nacional. Disponível em: <http://portal.mj.gov.br/depen/data/Pages/MJD574E9CEITEMIDC37B2AE94C6840068B1624D28407509CPTBRNN.htm>). Acessado em janeiro, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas, Área Técnica de Saúde do Sistema

Penitenciário. **Plano Nacional de Saúde no Sistema Penitenciário**.2004. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cartilha_pnssp.pdf>

BRASIL. Ministério de Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6 ed. Brasília: Ministério de Saúde, 2005. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação nacional de doenças sexualmente transmissíveis e aids: Tuberculose: diagnóstico laboratorial – baciloscopia. Brasília. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual Técnico para o Controle da Tuberculose: cadernos de atenção básica. 2002.

BRASIL. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1133.2008.

BRASIL. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_t_b_novo.pdf. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Descrição de relatórios emitidos pelo SINAN. 2009. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/relatorios/descricao.pdf>, acessado em 02 de maio de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Descrição de relatórios emitidos pelo SINAN. 2010. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/relatorios/descricao.pdf>, acessado em 02 de maio de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Descrição de relatórios emitidos pelo SINAN. 2012. Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/relatorios/descricao.pdf>, acessado em MAIO de maio de 2012.

BRISSON-NOEL A, AZNAR C, CHUREAU C, NGUYEN S, PIERRE C, BARTOLI M, BONETE R, PIALOUX G, GICQUEL B, GARRIGUE G. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet*. 1991; **338**(8763):364-6.

BRISSON-NOEL A, GICQUEL B, LECOSSIER D, LEVYFREBAULT V, NASSIF X, HANCE AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*. 1989; **2**(8671):1069-1071.

BRUDEY K, DRISCOLL JR, RIGOUTS L, PRODINGER WM, GORI A, AL-HAJOJ SA, ALLIX C, ARISTIMUÑO L, ARORA J, BAUMANIS V, BINDER L, CAFRONE 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, GUTTIEREZ 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, NARVSKAÏA O, NGEOW YF, NAUMANN L, NIEMANN S, PARWATI I, RAHIM Z, RASOLOFO-RAZANAMPARANY V, RASOLONAVALONA T, ROSSETTI MLR, RÜSCHGERDES 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. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Genetic Diversity: Mining the Fourth International *Spoligotyping* Database (Spolddb4) for Classification, Population Genetics and Epidemiology. *BMC Microbiol*. 2006;**6**: 23.

BURRIL, J. Tuberculosis: A radiologic review. *Radiographics*. 2007; v. 27, p. 1255-1273.

CAFRONE PI, POSSUELO LG, RIBEIRO AW, RIBEIRO MO, UNIS G, JARCZEWSKI CA, ROSSETTI MLR, ZAHA A. Prospective study applying *spoligotyping* directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. *Can J Microbiol*. 2009; **55**: 895-900.

CAFRONE PI. 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. 2009. Acesso em: <http://hdl.handle.net/10183/17589>.

- CAMPOS JM, SIMONETTI JP, PONE MV, CARVALHO LA, PEREIRA AC, GARRIDO JR.** Disseminated Bacillus Calmette-Guérin infection in HIV-infected children: case report and review. *Pediatr AIDS HIV Infect.* 1996;**7**: 429-432.
- CAMUS, J. C.; PRYOR, M. J.; MÉDIGUE, C. & STEWART T. C.** Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology.* 2002; **148**: 2967-2973.
- CANETTI G, FOX W, KHOMENKO A, MAHLER HT, MENON NK, MITCHISON DA, RISTN, SMELEV NA.** Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ.* 1969; **41**: 21-43.
- CARVALHO BM, MONTEIRO AJ, NETORJP, GRANGEIRO TB, FROTA CC.** Factors Related to HIV/Tuberculosis Coinfection in a Brazilian Reference Hospital. *Braz J Infect Dis.* 2008; **12**(4): 281-286.
- CATALDI, A. & ROMANO, M.** Tuberculosis caused by Other Members of the *M. tuberculosis* Complex (chapter 8). In: **PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C. & RITACCO, V.** *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care.* 1^a ed. 2007.
- CAVIEDES L.; DELGADO J.; GILMAN R.H.** Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, v. 40, n.5, p.1873-1874. 2002.
- RIO GRANDE DO SUL.** Secretaria Estadual de Saúde. Coordenação Estadual de Vigilância em Saúde. CEVS. Available from: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=organograma&cod=4442>.
- CHAN ED, ISEMAN MD.** Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; **21**(6):587–595.
- CHAN, J. & KAUFMANN, S.H. E.** Immune mechanisms of protection (chapter 24). In: Bloom, B. R. (Ed.). *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.* ASM. 1994.
- CHAVES F, DRONDA F, CAVE M, ALONSO-SANZ M, GONZALEZ-LOPEZ A, EISENACHKD.** A longitudinal study of transmission of tuberculosis in a large prison population. *Am J Respir Critic Care Med.* 1997; **155**:719-5.
- CHENG VCC, YEW WW, YUEN KY.** Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; **24** (11):711–720.

CLARK PA, CEGIELSKI JP, HASSELLW. TB or not TB? Increasing door-to-door response to screening. *Public Health Nurs.* 1997;**14**: 268-271.

CLARK CM, DRIVER CR, MUNSIF SS, DRISCOLL JR, KREISWIRTH BN, ZHAO B, EBRAHIMZADEH A, SALFINGER M, PIATEK AS, ABDELWAHAB J. Universal genotyping in tuberculosis control program, New York City, 2001–2003. *Emerg Infect Dis.* 2006; **12**(5):719–724.

COLE, S. T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHUCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HOMSBY, T.; JEGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; & BARREL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;**393**: 537-544.

CONDE, M.B.; MUZYDE SOUZA, G. R. *Pneumologia e fisiologia: uma abordagem prática.* Sao Paulo: *Atheneu.* 2009.

COLL, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2003; **21**(6): 299-308.

COLLINS C, GRANGEHJM, YATES MD. Tuberculosis bacteriology organization and practice. In *Public Health Mycobacteriology: A guide for a level III laboratory*, 2nd edition. Edited by: Kent PT, Kubica GP. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann; Atlanta, GA, USA: *Centers for Disease Control.* 1985.

CONSELHO NACIONAL DE POLITICA CRIMINAL E PENITENCIARIA. CNPCP (Brasil), Resolução nº 11, de 7 de dezembro de 2006. Recomenda a Diretriz Básica para Detecção de Casos de Tuberculose entre Ingressos no Sistema Penitenciário nas Unidades da Federação. Disponível em: <http://www.mp.sp.gov.br/portal/page/portal/cao_civel/cadeias/pe_legislacao/2006resolu11.pdf>. Acesso em 15 de outubro. 2011.

CUTLER RR, WILSON P, VILLARROELJ, CLARKE, FV. Evaluating current methods for determination of the susceptibility of mycobacteria to pyrazinamide, conventional,

radiometric Bactec and two methods of pyrazinamidase testing. *Lett Appl Microbiol.* 1997; **24**:127-32.

COHNDL.O'BRIEN RJ. The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; **2**: 16-26.

CONIX R, PFYFFER GE, MATHIEU C, SAVINA D, DEBACCKER M, JAFAROV F, JABRAILOVI, ISMAILOV A, MIRZOIEVF, DE HALLER R, PORTAELSF. Drug resistant tuberculosis in prisons in Azerbaijan. *BMJ.* 1998; **316**:1423-5

COWAN LS, CRAWFORD JT. Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. *Emerg Infect Dis.* 2002; **8**(11):1294-1302.

COWAN LS, DIEM L, BRAKE MC, CRAWFORD JT. Transfer of a *Mycobacterium tuberculosis* genotyping method, Spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**(1):474-477.

DALCOLMO, M.P.; ANDRADE, M.K.N.; PICON, P.D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. *Revista de Saúde Pública.* 2007; v.41, p.34-42.

DALLA COSTA, E. R. Caracterização das mutações envolvidas na resistência à isoniazida em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* do Brasil, Argentina e Peru. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

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 LDE S, HOJL, KRITSKI AL, ROSSETTI ML. 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.* 2009; **19**:39.

DALEY CL, SMALL PM, SCHECTER GF, SCHOOLNIK GK, MCADAM RA, JACOBS WR JR., HOPEWELL PC. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An

analysis using restrictionfragment- length polymorphisms. *N Engl J Med.* 1992; **326**(4):231–235.

DAHLE UR, SANDVEN P, HELDAL E, MANNSAAKER T, CAUGANT DA. Deciphering an outbreak of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**(1):67-72.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine.* 2006; **100**: 1862-70.

DIEL R, SCHNEIDER S, MEYWALD-WALTER K, RUF CM, RÜSCH-GERDES S, NIEMANN S. Epidemiology of tuberculosis in Hamburg: long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques. *J Clin Microbiol.* 2002; **40**(2):532-539.

DIJANA, V. Saúde em prisões: representações e práticas dos agentes de segurança penitenciária no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 2008; vol. 24, n.8 p.1887-1896.

DE WAARD JH, ROBLEDO J. IN: PALOMINO JC, LEÃO SC, RITACCO V. Chapter 12: Conventional Diagnostic Methods. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care.* 1ª ed. 2007.

DOS SANTOS MA, ALBUQUERQUE MF, XIMENES RA, LUCENA-SILVA L, BRAGA C, CAMPELOAR. Risk factors for treatment delay in pulmonary tuberculosis in Recife, Brazil. *MC Public Health.* 2005; **5**:25.

DRISCOLL JR. *Spoligotyping* for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Methods Mol Biol.* 2009; **551**:117-28

DROBNIOWSKI F. Tuberculosis in prisons – forgotten plague. *Lancet.* 1995; **346**:948-9.

DROBNIOWSKI FA, CAWS M, GIBSON A, YOUNG D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2003; **3**(3):141-147.

DYE C. Doomsday postponed? Preventing and reversing epidemics of drug-resistant tuberculosis. *Nat Rev Microbiol.* 2009; **7**(1):81-87.

EVANS JT, HAWKEY PM, SMITH EG, BOESE KA, WARREN RE, HONG G. Automated highthroughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by a combination of PCR andondenaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**(9):4175-80.

FANDINHO FCO, KRITSKI AL, HOFER C, CONDE JR H, FERREIRA RMC, SAAD MHF, SILVA MG, RILEY LW, FONSECA LS. RFLP patterns and risk factors for

recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; **94**(3):271-275.

FERDINAND S, SOLA C, VERDOL B, LEGRAND E, GOH KS, BERCHEL M, AUBÉRY A, TIMOTHÉE M, JOSEPH P, PAPE JW, RASTOGI N. Molecular Characterization and Drug Resistance Patterns of Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Patients in an AIDS Counseling Center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-Year Study. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**(2):694–702.

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-OSORNIO J, PONCE DE LEON A, CAVE MD, FLEISCHMANN R, WHITTAM TS, ALLAND D. 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.* 2006; **188**:759-772.

FILLIOL I, DRISCOLL JR, VAN SOOLINGEN D, KREISWIRTH BN, KREMER K, VALÉTIÉ G, DANG DA, BARLOW R, BANERJEE D, BIFANI PJ, BRUDEY K, CATALDI A, COOKSEY RC, COUSINS DV, DALE JW, DELLAGOSTIN OA, DROBNIOWSKI F, ENGELMANN G, FERDINAND S, GASCOYNE-BINZI D, GORDON M, GUTIERREZ MC, HAAS WH, HEERSMA H, KASSA- KELEMBHO E, HO ML, MAKRIATHIS A, MAMMINA C, MARTIN G, MOSTRÖM P, MOKROUSOV I, NARBONNE V, NARVSKAYA O, NASTASI A, NIOBE-EYANGO SN, PAPE JW, RASOLOFO-RAZANAMPARANY V, RIDELL M, ROSSETTI ML, STAUFFER F, SUFFYS PN, TAKIFF H, TEXIER-MAUGEIN J, VINCENT V, DE WAARD JH, SOLA C, RASTOGI N. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**(5):1963-1970.

FILLIOL I, DRISCOLL JR, VAN SOOLINGEN D, KREISWIRTH BN, KREMER K, VALÉTIÉ G, ANH DD, BARLOW R, BANERJEE D, BIFANI PJ, BRUDEY K, CATALDI A, COOKSEY RC, COUSINS DV, DALE JW, DELLAGOSTIN OA, DROBNIOWSKI F, ENGELMANN G, FERDINAND S, GASCOYNE-BINZI D, GORDON M, GUTIERREZ MC, HAAS WH, HEERSMA H, KÄLLENIOUS G, KASSA-

KELEMBHO E, KOIVULA T, LY HM, MAKRISTATHIS A, MAMMINA C, MARTIN G, MOSTRÖM P, MOKROUSOV I, NARBONNE V, NARVSKAYA O, NASTASI A, NIOBE-EYANGO SN, PAPE JW, RASOLOFO-RAZANAMPARANY V, RIDELL M, ROSSETTI ML, STAUFFER F, SUFFYS PN, TAKIFF H, TEXIER-MAUGEIN J, VINCENT V, DE WAARD JH, SOLA C, RASTOGI N. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002; **8**(11):1347-1349.

FILLIOL I, FERDINAND S, NEGRONI L, SOLA C, RASTOGI N. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2000; **38**(7):2520-2524.

FLORES LL, PAI M, COLFORD JM JR, RILEY LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol.* 2005; **5**:55.

Fournet N, Sanchez A, Massari V, Penna L, Natal S, Biondi E, Larouzé B. Development and evaluation of tuberculosis screening scores in Brazilian prisons. *Public Health.* 2006; **120**: 976-983.

FOMUKONG N, BEGGS M, EL HAJJ H, TEMPLETON G, EISENACH K, CAVE MD. Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. *Tuberc Lung Dis.* 1997; **78**(2):109-116.

FOURNET N, SANCHEZ A, MASSARI V, PENNA L, NATAL S. BIONDI E, LAROUZÉ B. Development and evaluation of tuberculosis screening scores in Brazilian prisons. *Public Health.* 2006; **120**(10):976–983.

FOX, W. Advances in the treatment of respiratory tuberculosis. *Practitioner.* 1970; **205**:502-13.

FOXMAN B, RILEY L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol.* 2001; **153**(12):7-13.

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. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; **103**:2869-2873.

GIAMPAGLIA, C. M. S. Multi-center Evaluation of Automated Bactec MGIT 960 System for testing susceptibility of *M. tuberculosis* as compared with BACTEC

460TB, Proportion and Resistance Ratio Methods in Southeast of Brazil. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2007; v. 1, n. 9, p. 986-991.

GLYNN JR, CRAMPIN AC, TRAORE H, CHAGULUKA S, MWAFULIRWA DT, ALGHAMDI S, NGWIRA BM, YATES MD, DROBNIEWSKI FD, FINE PE. Determinants of cluster size in large, population-based molecular epidemiology study of tuberculosis, northern Malawi. *Emerg Infect Dis*. 2008; **14**(7):1060-1066.

GILLESPIE SH. Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. *Biochem Soc Trans*. 2007; **35**(Pt5): 1217-1320.

GOODFELLOW, M. & MAGGE, J. G. Taxonomy of mycobacteria. In **GANGADHARAM P. R. J.; JENKINS, P. A.** Mycobacteria– Basic aspects. New York: Chapman & Hall, 1998.

GOYAL M, SHAW RJ, BANERJEE DK, COKER RJ, ROBERTSON BD, YOUNG DB. Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J*. 1997; **10**(5):1120-1124.

GOULDING JN, STANLEY J, SAUDERS N, ARNOLD C. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2000; **38**(3):1121-1126.

GOGUET DE LA SALMONIÈRE YO, LI HM, TORREA G, BUNSCHOTEN A, VAN EMBDEN J, GICQUEL B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1997; **35**(9):2210-2214.

GORI A, BANDERA A, MARCHETTI G, DEGLI ESPOSTI A, CATOZZI L, NARDI GP, GAZZOLA L, FERRARIO G, VAN EMBDEN JD, VAN SOOLINGEN D, MORONI M, FRANZETTI F. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*. 2005; **11**(8):1242- 1248.

GRECO S, RULLI M, GIRARDI E, PIERSIMONI C, SALTINI C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. *J Clin Microbiol*. 2009; **47**(3):569-576.

GRECO S, GIRARDI E, NAVARRA A, SALTINI C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax*. 2006; **61**(9):783-790.

GUTIÉRREZ MC, VINCENT V, AUBERT D, BIZET J, GAILLOT O, LEBRUN L, LE PENDEVEN C, LE PENNEC MP, MATHIEU D, OFFREDO C, PANGON B, PIERRE-AUDIGIER C. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors

for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol.* 1998; **36**(2): 486- 492.

HAASE I, OLSON S, BEHR MA, WANYEKI I, THIBERT L, SCOTT A, ZWERLING A, ROSS N, BRASSARD P, MENZIES D, SCHWARTZMAN K. Use of geographic and genotyping tools to characterize tuberculosis transmission in Montreal. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; **11**(6):632–638.

HAYWARD A C, WATSON J M. Typing of mycobacteria using spoligotyping. *Thorax* 1998;**53**:329–330

HERMANS PW, SCHUITEMA AR, VAN SOOLINGEN D, VERSTYNNEN CP, BIK EM, KOLK AH, VAN EMBDEN JD. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; **8**(6):1204-1213.

HEYDERMAN RS, GOYAL M, ROBERTS P, USHEWOKUNZE S, ZIZHOU S, MARSHALL BG, MAKOMBE R, VAN EMBDEN JDA, MASON PR, SHAW RJ. Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by spoligotyping. *Thorax.* 1998; **53**(5):346-350.

HEWLETT D, HORN DL, ALFALFA C. Drug resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. *JAMA.* 1995; **273**:916-7.

HOPEWELL, P. C. Overview of Clinical Tuberculosis. *In: BLOOM, B. R. (ed.).* Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM. 1994.

HUMAN RIGHTS WATCH. World report Chapter. Disponível em: <http://www.hrw.org/en/world-report-2011/brasil>, acessado em 02 de maio de 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>, acessado em 3 de agosto de 2011.

IGNATOVA A, DUBILEY S, STEPANSHINA V, SHEMYAKIN I. Predominance of multidrug-resistant LAM and Beijing family strains among *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from prison inmates in Tula Region, Russia. *J Med Microbiol.* 2006;**55**:1413-1418.

IJAZ K, YANG Z, TEMPLETON G, STEAD WW, BATES JH, CAVE MD. Persistence of a strain of *Mycobacterium tuberculosis* in a prison system. *Int J Tub Lung Dis.* 2004; **8**:994-1000.

JIN DJ, GROSS CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol.* 1988; **202**:45-58.

JONES TF, CRAIG AS, VALWAY SE, WOODLEY CL, SCHAFFNER W. Transmission of tuberculosis in a jail. *Ann Intern Med.* 1999; **131**(8):557-63

KAMERBEEK J, SCHOOLS L, KOLK A, VAN AGTERVELD M, VAN SOOLINGEN D, KUIJPER S, BUNSCHOTEN A, MOLHUIZEN H, SHAW R, GOYAL M, VAN EMBDEN J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997; **35**: 907-914.

KAUFMANN, S. H. E. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis.* 2003; **83**:86-90.

KAPUR V, LI LL, IORDANESCU S, HAMRICK MR, WANGER A, KREISWIRTH BN, MUSSER JM. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol.* 1994.

KAPUR, V.; LI, L. L.; HAMRICH, M. R.; PLIKAYTIS, B. B.; SHINNICK, T. M.; TELENTI, A.; JACOBS JR, W. R.; BANERJEE, A.; COLE, S. T.; YUEN, K. Y.; CLARRIGJE III, J. E.; KREISWIRTH, B. N. & MUSSER, J. M. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 1995; **119**: 131-138.

KONEMAN E.W. Diagnóstico Microbiológico-Texto e Atlas Colorido. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. Cap. 19, p.1057-1118.

KONNO K, NAGAYAMA H, OKA S. Nicotinamidase in mycobacteria: um method for distinguishing bovine type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Nature* 1959; **184**:1743-4.

KOX LF, NOORDHOEK GT, KUNAKOEN M, MULDER S, STERNBURG M, KOLK AH. Microwell hybridization assay for detection of PCR products from *Mycobacterium tuberculosis* complex and the recombinant *Mycobacterium smegmatis* strain 1008 used as an internal control. *J Clin Microbiol.* 1996; **34**(9):2117-20.

KOX LF, RHIENTHONG D, MIRANDA AM, UDOMSANTISUK N, ELLIS K, VAN LEEUWEN J, VAN HEUSDEN S, KUIJPER S, KOLK AH. A more reliable PCR for

detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1994; **32**(3): 672- 678.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D. & VAM ZETTEN, M. PCR + Reverse Line Blot Hybridization (PHL) to detect rifampin resistance. Laboratory Manual. National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, 1997.

KREMER, K; D. VAN SOOLINGEN, R. FROTHINGHAM, W.H.HAAS, P.W.M HERMANS, C. MARTIN, P. PALITTAPONGARNPIM, B.B. PLIKAYTIS, L.N. RILEY, M.A.YAKRUS, J.M. MUSSER, AND J.D.A. VAN EMBDEM. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproductibility. *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37**:2607-2618.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; SOUZA, G. R. M. TB na gestante. *Tuberculose: do ambulatorio a enfermaria.* Sao Paulo: Atheneu, 2000.

KRITSKI AL CONDE MB, MUZY-SOUZA G. Tuberculose: do ambulatório à enfermaria. 3ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu. 2005.

KRITSKI, A.; MELO, F. A. F. Tuberculosis in adults. In: **PALOMINO, J. C.; LEAO, S. C.; RITACCO, V. (Ed.).** *Tuberculosis 2007: from basic science to patient care:* www.TuberculosisTextbook.com. [S.l.]: BourcillierKamps, c2007. Cap. 15, p. 487-524. Disponível em: <<http://www.TuberculosisTextbook.com>>. Acesso em: 15 mar. 2010.

KUDOH S, KUDOH TA. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bulletin of the WHO.* 1974; **51**:71-82.

KUHLEIS, D.C Inquérito de tuberculose no Presídio Central de Porto Alegre. 2010.

LAZZARINI LC, SPINDOLA SM, BANG H, GIBSON AL, WEISENBERG S, DA SILVA CARVALHO W, AUGUSTO CJ, HUARD RC, KRITSKI AL, HO JL. *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitary pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2008; **46**:2175-2183.

LEE ASG, LIM IHK, TANG LLH, TELENTI A, WONG SY. Contribution of *kasA* Analysis to Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; **43**:2087-2089.

LEI DE EXECUÇÃO PENAL. LEP. Lei n. 7.210, de 11 de julho de 1984 : institui a Lei de Execução Penal, – Brasília : Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, 2008. p30(01): 120. – (Série Legislação; n. 11)

LEGRAND J, SANCHEZ A, LE PONT F, CAMACHO L, LAROUZE B. Modeling the Impact of Tuberculosis Control Strategies in Highly Endemic Overcrowded Prisons. *PLoS ONE*. 2008; **3**:2100.

LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; DOMINGUEZ, L.; MATEOS, A.; GONZÁLES-LLAMAZARES, O.; RODRIGUEZ-FERRI, E.F.; DOMINGO,M.; VIDAL, D.; COUSINS, D. The insertion element IS 6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. *Veterinary Microbiology*. 1997; v.54, p.223-233, 1997.

LILLEBAEK T, DIRKSEN A, BAESS I, STRUNGE B, THOMSEN VØ, ANDERSEN ÅB. Molecular evidence of endogenous reactivation *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. *J Infec Dis*. 2002; **185**(3):401-404.

LIMA SSS, CLEMENTE WT, PALACI M, ROSA RV, ANTUNES CMF, SERUFO JC. Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo. *J Bras Pneumol*. 2008; **34**(12):1056-1062.

LIPIN MY, STEPANSHINA VN, SHEMYAKIN IG, SHINNICK TM. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin Microbiol Infect*. 2007; **13**:620-626.

LIPIN MY,STEPANSHINA VN, SHEMYAKIN IG,SHINNICK TM. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin Microbiol Infect*. 2007; **13**(6):620-6.

LIU D. A Rapid Biochemical Test for Measuring Chemical Toxicity. *Bull. Environm. Contam. Toxicol*. 1981. v.26, p.145-149.

LOBACHEVA T, ASIKAINEN T, GIESECKE J. Risk factors for developing tuberculosis in remand prisons in St. Petersburg, Russia - a case-control study. *Eur J Epidemiol*. 2007; **22**:121-127.

MAC NEIL RJ, MC RILL C, STEINHAUSER G, WEISBUCH JB, WILLIAMS E, WILSON ML. Jails, a neglected opportunity for tuberculosis prevention. *Am J Prev Med*. 2005; **28**:225-228.

MANJUNATH N, SHANKAR P, RAJAN L, BHARGAVA A, SALULA S, SHRINIWAS. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle*. 1991; **72**(1):21- 27.

MARCH F, COLL P, GUERRERO RA, BUSQUETS E, CAYLA JA, PRATS G. Predictors of tuberculosis transmission in prisons: an analysis using conventional and molecular methods. *AIDS*. 2000; **14**:525-35.

MARTIN A, PORTALES F. IN: PALOMINO JC; LEÃO SC, RITACCO V. CHAPTER. Drug Resistance and Drug Resistance Detection. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 1^a ed. 2007.

MARTIN, A. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and metaanalysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; v. 62, n. 1, p. 56-64.

MARTIN, A.; MONTORO, E.; LEMUS, D.; SIMBOLI, N.; MORCILLO, N.; VELASCO, M.; CHAUCA, J.; BARRERA, L.; RITACCO, V.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J of Microbiological Methods*. 2005. **63**(2): 145-150.

MATHEMA B, KUREPINA NE, BIFANI PJ, KREISWIRTH BN. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clin Microbiol Rev*. 2006; **19**(4):658–685.

MAZARS E, LESJEAN S, BANULS AL, GILBERT M, VINCENT V, GICQUEL B, TIBAYRENC M, LOCHT C, SUPPLY P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; **98**(4):1901-1906.

MENDES JM, MACHADO SMA, LOURENÇO MC, FERREIRA RMC, FONSECA LS, SAAD MHF. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in a slum area of Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2008; **34**(12):1063-1068.

MENZIES, D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion and reversion. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999; v. 159, n. 1, p. 15-21.

MDLULI, K.; SLAYDEN, R. A.; ZHU, Y.; RAMASWAMY, S.; PAN, X.; MEAD, D., CRANE, D. D.; MUSSER, J. M. & BARRY III, C. E. Inhibition of a *Mycobacterium*

tuberculosis β -Ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science*. 1998; **280**:1607-1610, 1998.

MESTDAGH M, FONTEYNE PA, REALINI L, ROSSAU R, JANNES G, MIJS W, DE SMET KA, PORTAELS F, VAN DEN EECKHOUT E. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; **43**(9):2317-9.

METCALFE, C.; MACDONALD, I. K.; MURPHY, E. J.; BROWN, K. A.; RAVEN, E. L. & MOODY, P. C. The Tuberculosis Prodrug Isoniazid Bound to Activating Peroxidases. *The Journal of biological chemistry*. 2008; **283**:6193-6200.

MEJIA, G. I.; CASTRILLON, L.; TRUJILLO, H.; ROBLEDO, J. A. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3(2):138-42, 1999.

MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazid and the incidence of variants resistant to the drug *in vitro*. *American Review of Tuberculosis*. 1952; **65**:765-767, 1952.

MOKROUSOV I, LIMESCHENKO E, VYAZOVAYA A, NARVSKAYAO. *Corynebacterium diphtheria* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci. *Biotechnol J*. 2007; **2**(7):901-906.

MOREIRA-OLIVEIRA MS, OLIVEIRA HB, PACE F, STEHLING EG, ROCHA MMM, AILY DCG, BROCCHI M, SILVEIRA WD. Molecular Genotyping and Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained from Inmates of Correctional Institutions of Campinas, Southeast Brazil. *Braz J Infec Dis*. 2008; **12**:487-493.

MORLOCK GP, CRAWFORD JT, BUTLER WR, BRIM SE, SIKES D, MAZUREK GH. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;**44**:2291-5.

MORRONE N, ABE NS. Bronchoscopic findings in patients with pulmonary tuberculosis. *J Bronchol*. 2007; **14**(1):15-8.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods*. 1993. v.65, p.55-63.

- MOSTRÖM P, GORDON M, SOLA C, RIDELL M, RASTOGI N.** Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; **8**(11):694-704.
- MSHANA R.N.** Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide for rapid detection of Rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1998. v. 36, n.5, p.1214-1219.
- MUSSER, J. M.** Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular genetic insights. *Clinical Microbiology Review.* 1995; **8**:496-514.
- MUSA, H.R.; AMBROGGI, M.; SOUTO, A.; ANGEBY, K.A.** Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy positive sputum samples. *J Clin Microbiol.* 2005. 43:3159-3161.
- NCCLS.** National Committee for Clinical Laboratory Standard. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluicao para Bacterias de Crescimento Aerobico; Norma Aprovada – Sexta Edicao, M7-A6, v, 23.2003.
- NICOL MP, WILKINSON RJ.** The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; **102**(10):955-965.
- NOGUEIRA, PÉRICLES ALVES; ABRAHÃO, REGINA MAURA CABRAL DE MELO.** A infecção tuberculosa e o tempo de prisão da população carcerária dos Distritos Policiais da zona oeste da cidade de São Paulo. *Rev. bras. epidemiol.* 2009; vol.12, n.1, p. 30-38.
- NOLTE FS, METCHOCK B, MCGOWAN JE JR, EDWARDS A, OKWUMABUA O, THURMOND C, MITCHELL PS, PLIKAYTIS B, SHINNICK T.** Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol.* 1993; **31**(7): 1777-1782.
- NYENDAK MR, LEWINSOHN DA, LEWINSOHN DM.** New diagnostic methods for tuberculosis *Curr Opin Infect Dis.* 2009; **22**(2):174-82.
- OLIVEIRA, HELENICE BOSCO DE; CARDOSO, JANAINA CORRÊA.** Tuberculose no sistema prisional de Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev. panam. salud pública.* 2004; vol.15 n.3 p.194-199.
- PALMERO D.J.** Pautas latinoamericanas de diagnostico y tratamiento de la tuberculosis farmacorresistente. *Salud Ciencia,* v.16, n.1, p.1366-1375.2008.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. 46(8): 2720- 2722.

PALOMINO J.C.; ANANDI M.; PORTAELS F. Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods, *Clin Microbiol Infect*, v.13, p. 754-762. 2007.

PALOMINO, J. C.; PORTAELS, F. Microcolony detection for a rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. . *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 4(1):91, 2000.

PARK, W. G.; BISHAI, W.; CHAISON, R. E.; DORMAN, S. E. Performance of the microscopic observation drug susceptibility assay in drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002. 40(12):4750-4752,

.PANDOLFI, J.R.; MALASPINA, A.C.; SANTOS, A.C.B.; SUFFYS, P.N, OELLEMANN, M.A.C.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C.Q.F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev. Ciênc.* 2007; v.28, n.3p.251-257.

PARWATI I, VAN CREVEL R, VAN SOOLINGEN D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis.* 2010;**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. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Southern Brazil. *Tuberculosis. In press.* 2011.

PETRINI, B. & HOFFNER, S. Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agent.* 1999; **13**:93-97.

PICON PD, CARAMORI ML, BASSANESI SL, JUNGBLUT S, FOLGIERINI M, PORTO NDA S, RIZZON CF, FERREIRA RL, FREITAS TM, JARCZEWSKI CA. Differences in the clinical and radiological presentation of intrathoracic tuberculosis in the presence or absence of HIV infection. *J Bras Pneumol.* 2007a; **33**(4):429-436.

PIERSIMONI C, SCAPARO C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**(12):5355-5365.

- QIAN, L., VAN EMBDEN, J.D., VAN DER ZANDEN, A.G., WELTEVREDEN, E.F., DUANMU, H., AND DOUGLAS, J.T.** Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37**(2): 471–474.
- RASTOGI N, SOLA C. IN: PALOMINO JC; LEÃO SC, RITACCO V.** Chapter 2: Molecular Evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 1ª ed. 2007.
- REYES H., CONINX R.** Pitfalls of tuberculosis programmes in prisons. *BMJ.* 1997; **29**:1447-50.
- RIBEIRO M.O.** Avaliação de testes rápidos microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a isoniazida e rifampicina. *J Bras Pneumol*, v.30, n.4, p.455-460. 2004.
- RIO DE JANEIRO.** Secretaria de Estado de Administração Penitenciária. Secretaria de Estado de Saúde. Plano Operativo Estadual de Saúde no Sistema Penitenciário. Rio de Janeiro, 2004.
- RITACCO V, IGLESIAS MJ, FERRAZOLI L, MONTESERIN J, DALLA COSTA ER, CEBOLLADA A, MORCILLO N, ROBLEDO J, DE WAARD JH, ARAYA P, ARISTIMUÑO L, DÍAZ R, GAVIN P, IMPERIALE B, SIMONSEN V, ZAPATA EM, JIMÉNEZ MS, ROSSETTI MLR, MARTIN C, BARRERA L, SAMPER S.** Conspicuous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain. *Infect Genet Evol.* 2011.
- RODRIGUES VDE F, TELLES MA, RIBEIRO MO, CAFRUNE PI, ROSSETI ML, ZAHA A.** Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; **49**(1):444-6.
- RODRIGUEZ, C.A.R.** Sistema de Detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos. Tese (Doutorado) -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ROMANO, M. I.; ALITO, A.; FISANOTI, J. C.; BIGI, F.; KANTOR, I.; CICUTA, M. E.; CATALDI, A.** Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology.* 1996; v.50, p.59-71.

- RORING S, SCOTT AN, GLYN HEWINSON R, NEILL SD, SKUCE RA.** Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol.* 2004; **101**(1):65–73.
- ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N. & RODRIGUES, V. S.** Tuberculose resistente: revisão molecular. *Revista de Saúde Pública.* 2002. **36**: 525-532, 2002.
- ROSSETTI MLR, JARDIM SB, RODRIGUES VFS, MOURA AR, OLIVEIRA H, ZAHA.** A Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. *J Microbiol Met.* 1997; **28**:139-146.
- ROSS, BC AND DWYER, B.** Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31**:329-334. 128.
- RUFFINO-NETTO, A.** Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* **35**(1): 51-58, 2002.
- SANCHEZ AR, CAMACHO LAB, DIUANA V, LAROUZÉ B.**A tuberculose nas prisões: uma fatalidade? *Cad. Saúde Pública.* 2006; Vol.22, n. 12, p. 2510-2511.
- SANCHEZ AR, MASSARI V, GERHARDT G, BARRETO AW, CESCO NI V, PIRES J, ESPÍNOLA AB, BIONDI E, LAROUZÉ B, CAMACHO LAB.** Tuberculosis in Rio de Janeiro prisons, Brazil: an urgent public health problem. *Cad Saúde Pública.* 2007; vol.23, n.3, pp. 545-552
- SÁNCHEZ, AR.** Controle da tuberculose nas prisões brasileiras: Novas abordagens para um antigo problema. *Cad. Saúde Pública.* 2010; **26**(5):850-851.
- SANCHOTENE, K.O.; GROLL, VON A.; RAMOS, D.; SCHOLANTE, A.B.; HOSSCHA, G.; VALENCA, M.; SCAINI, C.J.; SILVA, P.E.A.** Comparative evaluation of the nitrate reductase assay and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of *mycobacterium tuberculosis*, against first line anti- tuberculosis drugs. *Brazilian J of Microbiol.* 2008. 3916-20.
- SAMPER S, IGLESIAS MJ, RABANAQUE MJ, GÓMEZ LI, LAFOZ MC, JIMÉNEZ MS, ORTEGA A, LEZCANO MA, VAN SOOLINGEN D, MARTÍN C.** The Spanish Working Group on MDRTB. Systematic Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates from Spain. *J Clin Microbiol.* 2005; **43**(3):1120-1127.

- SANTOS AR, MIRANDA AB, LIMA LM, SUFFYS PN, DEGRAVE WM.** Method for high yield preparation in large and small scale of nucleic acids from mycobacteria. *J Microbiol Met.* 1992; **15**: 83-94.
- SCHERER LC, SPERHACKE RD, JARCZEWSKI C, CAFRUNE PI, MINGHELLI S, RIBEIRO MO, MELLO FC, RUFFINO-NETTO A, ROSSETTI ML, KRITSKI AL.** PCR colorimetric dot-blot 88 assay and clinical pretest probability for diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in smearnegative patients. *BMC Public Health.* 2007; **7**:356.
- SCORPIO, A.; COLLINS, D. M.; WHIPPLE, D.; CAVE, D.; BATES, J. & ZHANG, Y.** Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *Journal Clinical Microbiology.* 1997; **32**: 106-110.
- SEPKOWITZ KA, RAFFALLI J, RILEY L, KIEHN TE, ARMSTRONG D.** Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol.* 1995; **8**(2):180-199.
- SEQUERA CM, DELGADO SV, ARAQUE MW, TORREALBA OM, NÚÑEZ MR, DA MATA JO, ABADÍA PE, TAKIFF H, DE WAARD J.** *Mycobacterium tuberculosis*: Espoligotipos en El Estado Carabobo, Venezuela. *Rev Chil Infect.*2008; **25**:362-367.
- SHAWAR RM, EL-ZAATARI FA, CLARRIDGE JE.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two step polymerase chain reaction and non-isotopic hybridization methods. *J Clin Microbiol.* 1993; **31**(:61-65.
- SILVA, M. S.; SENNA, S. G.; RIBEIRO, M. O.; VALIM, A. R.; TELLES, M. A.; KRITSKI, A.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C.; ZAHA, A. & ROSSETTI, M. L.** Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Clinical Microbiology.* 2003; **41**: 4471-4.
- SMALL PM, VAN EMBDEN JDA. IN BLOOM BR.** Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. *ASM Press.* 1994; 569-582.
- SMITH, P. G., and A. R. MOSS.** Epidemiology of tuberculosis. In: Bloom, B. R. (Ed.). Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. *ASM Press.*1994.
- SMITH I.** *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.*2003; **16**(3): 463-96.
- SNIDER JR. DE, RAVIGLIONE M, KOCHI A, IN BLOOM BR.**Tuberculosis: patogenesis, protection and control. *ASM Press.* 1994; 3-11.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Comissão de Tuberculose. 111 diretrizes em tuberculose da SBPT. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Brasilia, DF, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

SOINI, H. & MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry*. 2001; **47**(5): 809-814.

SPERHACKE RD, MELLO FCQ, ZAHA A, KRITSKI AL, ROSSETTI MLR. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004; **8**(3):312-317.

STYBLO, K. & MEIJER, J. Impact of BCG vaccination programmes in children and young adults on the tuberculosis problem. *Tubercle*. 1976; **57**(1):17-43.

STAVRUM R, MPHAAHLELE M, ØVREÅS K, MUTHIVHI T, FOURIE PB, WEYER K, GREWAL HMS. High Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes in South Africa and Preponderance of Mixed Infections among ST53 Isolates. *J Clin Microbiol*. 2009; **47**(6):1848-1856.

SUFFYS PN, IVENS DE ARAUJO ME, ROSSETI ML, ZAHA A, BARROSO EW, BARRETO AM, CAMPOS E, VAN SOOLINGEN D, KREMER K, HEERSMA H, DEGRAVE WM. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian Strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol*. 2000; **151**:343-51

SUN YJ, BELLAMY R, LEE AS, NG ST, RAVINDRAN S, WONG SY, LOCHT C, SUPPLY P, PATON NI. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *J Clin Microbiol*. 2004; **42**(5):1986–1993.

SUPPLY P, MAZARS E, SAVINE E, VICENT V, GICQUEL B, LOCHT C. Variable Human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol*. 2000; v. 36, n. 3, p. 762-771.

SUPPLY P, LESJEAN S, SAVINE E, KREMER K, VAN SOOLINGEN D, LOCHT C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*. 2001; **39**:3563-3571.

SUPPLY P, ALLIX C, LESJEAN S, CARDOSO-OELEMANN M, RUSCH-GERDES S, WILLERY E, SAVINE E, DE HAAS P, VAN DEUTEKOM H, RORING S, BIFANI P, KUREPINA N, KREISWIRTH B, SOLA C, RASTOGI N, VATIN V, GUTIERREZ

MC, FAUVILLE M, NIEMANN S, SKUCE R, KREMER K, LOCHT C, VAN SOOLINGEN D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006; **44**(12):4498-4510.

SREEVATSAN S, PAN X, STOCKBAUER K, WILLIAMS D, KREISWIRTH B, MUSSER JM. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographical localities. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; **40**:1024-6.

TANAKA MM, FRANCIS AR. Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006; **103**(41):15266-15271.

TAYLOR, G. M.; STEWART, G. R.; COOKE, M.; CHAPLIN, S.; LADVA, S.; KIRKUP, J.; PALMER, S. & YOUNG, D. B. Koch's Bacillus – a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology.* 2003; **149**:3213-3220.

TENOVER, F. C., R. D. ARBEIT, and R. V. GOERING. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1997; **18**: 426-439.

THIERRY D, BRISSON-NOEL A, VINCENT-LEVY-FREBAULT V, NGUYEN S, GUESDON JL, GIGQUEL B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990. **28**(12):2668-2673.

TIMMINS, G. S. & DERETIC, V. Mechanisms of action of isoniazid. *Journal of molecular microbiology and biotechnology.* 2006; **62**:1220-1227.

TIWARI RP, HATTIKUDUR NS, BHARMALB RN, KARTIKEYANC S, DESHMUKHD NM, BISEN PS. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: Promises and challenges ahead. *Tuberculosis.* 2007; **87**(3):193–201.

TODRYS KW, AMON JJ, MALEMBEKA G, CLAYTON M. Imprisoned and imperiled: access to HIV and TB prevention and treatment, and denial of human rights, in Zambian prisons. *J Int AIDS Soc.* 2011; **14**:8.

TORTOLLI E, PALOMINO J.C. IN: PALOMINO JC, LEÃO SC, RITACCO V. Chapter 14: New Diagnostic Methods. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 1ª ed. 2007.

TRUJILLO, W. F. C. & KRITSKI, A. L. Tuberculose. *In: Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias.* Rio de Janeiro: Ed Cultura Médica, 2001.

VALIM ARM, ROSSETTI ML, RIBEIRO MO, ZAHA A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol.* 2000; **38**:3119-3122.

VAN EMBDEN JD, VAN SOOLINGEN D, SMALL PM, HERMANS PWM. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Res Microbiol.* 1992; **143**(4):385-391.

VAN EMBDEN JD, CAVE MD, CRAWFORD JT, DALE JW, EISENACH KD, GICQUEL B, HERMANS SP, MARTIN C, MCADAM R, SHINNICK TM, SMALL PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; **31**:406-409.

VAN DER SPUY GD, WARREN RM, VAN HELDEN PD. The role of molecular epidemiology in low-income, high-burden countries. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009; **13**(4):419-420.

VAN SOOLINGEN D, KREMER K, AND HERMANS PWM. IN: PALOMINO JC; LEÃO SC, RITACCO V. Chapter 9: Molecular Epidemiology: Breakthrough Achievements and Future Prospects. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 1ª ed. 2007.

VAN SOOLINGEN D, QIAN L, DE HAAS PE, DOUGLAS JT, TRAORE H, PORTAELS F, QING HZ, ENKHSaikan D, NYMADAWA P, VAN EMBDEN JD: Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* 1995; **33**(12):3234-3238

VAN SOOLINGEN D, DE HAAS PE, HERMANS PWM, GROENEN PM, VAN EMBDEN JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1993; **31**(8):1987-1995.

VAN SOOLINGEN D, HERMANS PWM, DE HAAS PEW, SOLL DR, VAN EMBDEN JDA. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis*

complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991; **29**(11): 2578-2586.

VAN DER ZANDEN, A.G.M., HOENTJEN, A.H., HEILMANN, F.G.C., WELTEVREDEN, E.F., SCHOOLS, L.M., AND VAN EMBDEN, J.D.A. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Mol. Pathol.* 1998; **51**(4):209–214.

VAN DER ZANDEN, A.G., TE KOPPELE-VIJE, E.M., VIJAYA BHANU, N., VAN SOOLINGEN, D., AND SCHOOLS, L.M. Use of DNA extracts from Ziehl–Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; **41**(3): 1101–1108.

VARELDZIS BP, GROSSET J, DE KANTOR I, CROFTON J, LASZLO A, FELTEN M. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization Recommendations. *Tuber Lung Dis.* 1994; **75**:1-7.

VICTOR T, DU TOIT R, VAN HELDEN PD. Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; **30**(6):1514-1517.

VICTORINO FARGA E JOSÉ ANTONIO CAMINERO. *Tuberculosis.* 3ª Edição. 2011. Editorial Mediterrâneo Ltda.

WAHL, S. M.; GREENWELL-WILD, T.; PENG, G.; HALE-DONZE, H. & ORENSTEIN, J. M. Co-Infection with opportunistic pathogens promotes human immunodeficiency virus type 1 infection in macrophages. *Journal of Infectious Diseases.* 1999; **179**:457-460.

WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991; **10**(4):506-513.

WARREN RM, VICTOR TC, STREICHER EM, RICHARDSON M, VAN DER SPUY GD, JOHNSON R, CHIHOTA VN, LOCHT C, SUPPLY P, VAN HELDEN PD. Clonal expansion of a globally disseminated lineage of *Mycobacterium tuberculosis* with low IS6110 copy numbers. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**(12):5774–5782.

WARREN RM, STREICHER EM, SAMPSON SL, VAN DER SPUY GD, RICHARDSON M, NGUYEN D, BEHR MA, VICTOR TC, VAN HELDEN PD.

Microevolution of the direct repeat region 91 of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J Clin Microbiol.* 2002a; **40**(12):4457–4465.

WARREN RM, STREICHER EM, CHARALAMBOUS S, CHURCHYARD G, VAN DER SPUY GD, GRANT AD, VAN HELDEN PD, VICTOR TC. Use of spoligotyping for accurate classification of recurrent tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2002b; **40**(10):3851-385.

WILSON, T. M. & COLLINS, D. M. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Molecular Microbiology.* 1996; **19**: 1025-1034, 1996.

WILSON SM, MCNERNEY R, NYE PM, GODFREY-FAUSST PD, STOKER NG, VOLLER A. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1993; **31**(4):776-782.

WILLIAMS DL, WAGUESPACK C, EISENACH K, CRAWFORD JT, PORTAELS F, SALFINGER M. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; **38**:2380-6.

WHO. World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2012. WHO/HTM/TB/2012.

WHO. World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009. WHO/HTM/TB/2009.411.

WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing: WHO report 2008. WHO/HTM/TB/2008.393.

WHO - The Global MDR-TB and XDR-TB Response Plan 2007-2008. Geneva, 2007.

WHO - Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth global report. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 2002-2007. Geneva, 2008.

WHO. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva: World Health Organization. 2006.

WHO. World Health Organization. TB – A Global Emergency. WHO report on the tuberculosis epidemic, 1994. (WHO/TB/94.177).

WHO. World Health Organization. Guidelines for the control of tuberculosis in prisons. 1998.

WHO. World Health Organization. Tuberculosis control in prisons. A manual for

programme managers. 2000.

WHO. World Health Organization. Non-commercial culture and drug susceptibility testing methods for screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis. 2010.

XAVIER, Débora. Incidência de tuberculose nos presídios. Disponível em <http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2008/03/21/materia.21.1307782269/view>. -03-

YAJKO D.M. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, v.33, n.9, p.2324-2327.1995.

YANG Z, CHAVES F, BARNES PF, BURMAN WJ, KOEHLER J, EISENACH KD, BATES JH, CAVE MD. Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1996; **34**(12):3044-3048.

ZAMBARDI G, ROURE C, BOUJAAFAR N, FOUQUE B, FRENEY J, FLEURETTE J. Comparison of three primer sets for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin*. 1993; **50**(10-11):893-897.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C. FIORAVANTI, R.I.; ROXO, E.; ZUMÁRRAGA, M.; ROMANO, M.I. CATALDI, A.; SALAS, C.E. *Mycobacterium bovis* : Polymerase Chain Reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by Spoligotyping and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001; v.96, p.809-813, 2001.

ZHANG J, ABADIA E, REFREGIER G, TAJAJ S, BOSCHIROLI ML, GUILLARD B, ANDREMONTE A, RUIJMY R, SOLA C. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J Med Microbiol*.2009; **59**:285-294

ZHANG, M.; YUE, J.; YANG, Y. P.; ZHANG, H. M.; LEI, J. Q.; JIN, R. L.; ZHANG, X. L. & WANG, H. H. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Journal Clinical Microbiology*. 2005; **43**:5477-82.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005; **45**:529-564.

ZHANG, Y. & TELENTI, A. Genetics of drugs resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. Washington: ASM, 2000.

ZHANG Y, HEYM B, ALLEN B, YOUNG D, COLE S. The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of *M. tuberculosis*. *Nature*. 1992; **385**:591-3.

Anexos

ANEXO 1 – LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios para leitura e interpretação da baciloscopia de escarro corada pelo método de Ziehl Neelsen	38
Tabela 2: Critérios para leitura e interpretação dos resultados da cultura em meio sólido	41
Tabela 3: Desempenho dos testes comerciais de AAN	50

ANEXO 2 - LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa das taxas de incidência, entre os 22 países de alta carga	18
Figura 2: Tendências nas taxas de mortalidade de TB estimadas em 1990-2011 e previsão de taxas de mortalidade de TB (2012 – 2015) nos 22 países com alta carga.	18
Figura 3: Taxa de incidência de tuberculose nos municípios prioritários do Rio Grande do Sul	21
Figura 4: Taxa de incidência de tuberculose (por 100.000 hab.) entre a população privada de liberdade	59

ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM

TRIAGEM PARA BUSCA DE SINTOMÁTICOS RESPIRATÓRIOS

Nome:

Nome da mãe:

Data Nascimento:

- | | | |
|----------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1. Você está com tuberculose? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 2. Você está tomando remédio para tuberculose? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 3. Você já teve tuberculose no passado? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 4. Você está com tosse há mais de 3 semanas? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 5. Você está com catarro? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 6. Você já teve catarro com sangue? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 7. Você tem febre? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 8. Você tem suores durante a noite? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 9. Você emagreceu? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 10. Você tem dor nas costas? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 11. Você fuma? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 12. Você convive com alguém que tenha tuberculose? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 13. Você já fez o teste de HIV? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |
| 14. Você tem HIV? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não |

ANEXO 4 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Questionário Nº: _____ Prontuário Nº: _____

Data da entrevista: ____/____/____ Médico: _____

Nota: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será guardado em arquivos fechados. Seu número será a única conexão à informação coletada.

1. Nome completo: _____

2. Nome da mãe: _____

3. Endereço externo: _____

4. Bairro: _____

5. Cidade: _____

6. Estado civil: (1) Acompanhado (2) Não acompanhado (99) IGN

7. Escolaridade: () Analfabeto () _____ série do _____ grau (99) IGN

8. Data de Nascimento: ____/____/____

9. Cor da Pele: (1) branca (2) mulata clara (3) mulata média (4) mulata escura (5) negra (6) amarela (7) parda (8) outra: _____ (99) IGN

10. Profissão: _____ (99) IGN

11. Cicatriz vacinal (BCG): (1) sim (2) não (99) IGN

12. Tosse: (1) Sim (2) Não (99) IGN Quanto tempo? _____

13. Escarro: (1) Sim (2) Não (99) IGN Quanto tempo? _____

14. Tabagismo: (1) Sim (2) Não (99) IGN

Cigarros/dia: _____ () IGN

Ex-tabagista: (1) Sim (2) Não (99) IGN

Cigarros/dia: _____ () IGN

15. Usuário de drogas: (1) Sim (2) Não (99) IGN Qual? _____

16. Histórico de alcoolismo anterior ao aprisionamento:

Alcoolismo (critério CAGE): () Sim () Não () IGN

Qual tipo de bebida o senhor (a) prefere?

() Cachaça () Cerveja () Vinho () Whisky () Outra ()
Nenhuma

Caso o paciente admita o uso de qualquer bebida citada acima, responda as perguntas, relacionadas com alcoolismo, abaixo:

a) O sr. (a) tem facilidades de fazer amizades? () Sim () Não ()
IGN

b) Alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida?

() Sim () Não () IGN

c) Alguém critica ou já criticou o seu modo de beber? () Sim () Não ()
IGN

d) O sr. (a) costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca?

() Sim () Não () IGN

e) O sr. (a) sente-se culpado pela maneira que costuma beber?

() Sim () Não () IGN

Caso a resposta tenha sido SIM a pelo menos 02 das questões (b, c, d ou e), assinale alcoolismo como positivo.

17. Toma algum remédio? (1) Sim (2) Não (99) IGN

Qual (is)? _____

18. Diabetes Mellitus (dm): (1) sim (2) não (99) IGN

-uso de insulina? (1) sim (2) não (99) IGN

19. Doença crônica? (1) sim (2) não (99) IGN

Qual (is)? _____

20. Desnutrição (IMC<20): (1) Sim (2) Não (99) IGN

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

21. Tuberculose anterior: (1) sim (2) não (99) IGN
 Tipo: (1) Pulmonar (2) Extrapulmonar (3) Ambos (99) IGN
 Número de episódios: _____ (99) IGN
 Ano do último episódio: _____ (99) IGN
 Desfecho do último episódio: (1) Cura (2) Abandono (3) Falência (99) IGN
22. Contato com paciente com tuberculose na PEJ: (1) Sim (2) Não (99) IGN
23. Contato com paciente com tuberculose **FORA da PEJ**: (1) Sim (2) Não (99) IGN
 Relação com o contato: _____
 Época do contato (ano): _____
24. Quimioprofilaxia: (1) Sim (2) Não (99) IGN
 Desfecho: (1) Término (2) Abandono (99) IGN
25. Internação hospitalar nos últimos 2 anos: (1) Sim (2) Não (99) IGN
 Local: _____ Motivo: _____
26. HIV: (1) positivo (2) negativo (3) não realizado (99) IGN
27. Tipo de TB atual: (1) pulmonar (2) extrapulmonar
29. Tipo de TB extrapulmonar : _____
31. Medicamentos para TB atual: (1) RHZ (2) outro _____
32. Histórico de aprisionamento:
- Local: _____ Período: De ___/___/___ a ___/___/___
- Local: _____ Período: De ___/___/___ a ___/___/___
- Local: _____ Período: De ___/___/___ a ___/___/___
- Local: _____ Período: De ___/___/___ a ___/___/___
- Local: _____ Período: De ___/___/___ a ___/___/___
- Local: _____ Período: De ___/___/___ a ___/___/___
- Local: _____ Período: De ___/___/___ a ___/___/___

ANEXO 5 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Nome do paciente:

Número do prontuário:

Protocolo N^o: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: NOVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA A TUBERCULOSE: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E UTILIZAÇÃO NA ROTINA.

Financiamento: CNPq, CDCT/FEPPS

Coordenação: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Objetivos e relevância do estudo

O presente estudo tem como objetivos o desenvolvimento, a validação e aplicação de novos métodos moleculares de diagnóstico para tuberculose, com ênfase na detecção, na identificação de linhagens, inclusive de resistentes e na viabilidade de *M. tuberculosis* e sua utilização na rotina de sistemas públicos de saúde. O diagnóstico mais rápido desta doença, juntamente com o estudo do bacilo causador da tuberculose permite que o tratamento adequado seja iniciado evitando que a doença se espalhe. O estudo dos bacilos é importante para que se tenha um melhor conhecimento da doença e novas estratégias de combate possam ser desenvolvidas.

Procedimentos:

Os voluntários que decidirem participar do estudo serão entrevistados para responderem algumas questões relacionadas à sua saúde, seu perfil sócio-econômico, os fatores de risco que estão associados ao adoecimento por tuberculose, o consumo de bebidas alcoólicas e sintomas atuais. O voluntário será submetido à coleta de 2 amostras de escarro que serão utilizadas para realizar baciloscopia e cultura (diagnóstico convencional), aperfeiçoar um método de

detecção de *M. tuberculosis*, desenvolver e validar um método molecular para identificação de cepas resistentes a isoniazida e rifampicina, genotipagem e desenvolver um teste de análise de mRNA de *M. tuberculosis* para acompanhamento do tratamento.

Local do Estudo

Os procedimentos de coleta de escarro e entrevista serão realizados na Penitenciária Estadual do Jacuí (PEC) no município de Charqueadas, as análises bacteriológicas serão realizadas no IPB/LACEN (Instituto de Pesquisas Biológicas/Laboratório Central do estado) e as análises genéticas serão realizados no CDCT (Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da FEPPS).

Riscos e desconfortos

Os riscos e desconfortos aos participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima. A coleta de escarro pode resultar em irritação na garganta caso o paciente tenha que forçá-lo, na falta de ar momentânea e/ou náuseas passageiras. Os demais procedimentos (exames e testes) serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos aos participantes do estudo.

Desistência na participação do estudo

A participação de cada indivíduo neste estudo é voluntária, ou seja, quem não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito. Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia no decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

Benefícios

Os procedimentos aos quais o participante do estudo será submetido poderão gerar novos conhecimentos científicos com conseqüente melhoria no diagnóstico e tratamento de pacientes que estiverem contaminados pelo bacilo da tuberculose.

Compensação financeira

Não haverá nenhum pagamento aos indivíduos que concordarem em participar do estudo, bem como os participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos.

Confidencialidade das informações

Toda a informação que será fornecida pelos participantes do estudo e os resultados dos exames realizados serão considerados confidenciais e serão somente conhecidos pela equipe envolvida no estudo. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código (número) criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo. Este banco será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar, no entanto se houver dúvidas, estas poderão ser esclarecidas pela equipe do estudo, através da Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti em qualquer momento do estudo pelo telefone: 3352-0336.

Em caso de danos

Se o participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação no estudo, o tratamento será fornecido pelo SUS na instituição participante.

Autorização para estocagem de material biológico

1. Permito que minhas amostras de escarro sejam guardadas para posterior utilização em outra pesquisa, mediante protocolo de pesquisa autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS ficando, no entanto livre para solicitar a destruição da mesma, a qualquer momento, se assim desejar (sem a sua identificação e mantendo a privacidade).

() Sim, permito que minha amostra seja utilizada em outra pesquisa.

() Não permito que minha amostra seja utilizada em outra pesquisa.

O significado de sua assinatura

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do voluntário e/ou responsável (se menores de 18 anos) Data:

Assinatura do entrevistador Data:

Assinatura do coordenador do estudo Data:

Obs.: O presente documento, baseado no item IV das diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável.