

Heloisa da Silveira Paro Pedro<sup>1</sup>  
 Susilene Maria Tonelli Nardi<sup>2</sup>  
 Amanda Juliane Finardi<sup>3</sup>  
 Eloise Brasil de Moraes<sup>4</sup>  
 Rosângela Siqueira Oliveira<sup>5</sup>  
 Maria Izabel Ferreira Pereira<sup>6</sup>  
 Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>7</sup>  
 Lilian Castiglioni<sup>8</sup>

## CENÁRIO ATUAL DA TUBERCULOSE

*Current scenario of tuberculosis*

### RESUMO

Mesmo após 133 anos desde a descoberta do *Mycobacterium tuberculosis*, a tuberculose continua ser uma das principais causas de morte por doenças infecciosas no mundo, principalmente em países em desenvolvimento. O objetivo deste estudo foi mostrar aspectos relevantes da doença visando uma atualização literária e a busca de um olhar mais atento à problemática da tuberculose no contexto atual. Foram utilizados 130 artigos advindos das bases LILACS, MEDLINE/PUBMED, Scielo, Paho, Biblioteca Cochrane, WHOLIS, IBECs e Scopus, com as principais palavras-chaves selecionadas em terminologia em saúde encontradas no DECS. As espécies pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* compartilham cerca de 99% de identidade do DNA, com sequências altamente conservadas, mas diferem

Pedro HSP, Nardi SMT, Finardi AJ, Moraes EB, Oliveira RS, Pereira MIF, Machado RLD, Castiglioni L. Cenário atual da tuberculose. *Hansen Int.* 2014; 39 (1): p. 40-55.

na distribuição geográfica, patogenicidade e hospedeiros. O mecanismo de resistência clinicamente significativo para rifampicina é uma mutação do gene *rpoB*, que codifica o alvo desse antibiótico. Há grandes avanços no diagnóstico da TB, com novos instrumen-

Artigo recebido em 18/3/2015

Artigo aprovado em 27/5/2015

- 1 Mestre em Microbiologia. Doutoranda em Genética UNESP, Campus de São José do Rio Preto-SP - Pesquisador Científico do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto.
- 2 Doutora em Ciências da Saúde - Epidemiologia pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP. Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto-SP.
- 3 Mestranda da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - UNESP - Campus de Botucatu-SP. Faculdade de Medicina de Botucatu- Departamento de Doenças Tropicais. Instituto Lauro de Souza Lima-SP
- 4 Mestranda da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - UNESP - Campus de Botucatu-SP. Faculdade de Medicina de Botucatu- Departamento de Doenças Tropicais. Instituto Lauro de Souza Lima-SP.
- 5 Doutora em Ciências pelo Departamento de Microbiologia/Imunologia da Universidade Federal São Paulo. Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Núcleo Tuberculose Micobacterioses.
- 6 Especialista em Saúde Pública pela UNAERP Ribeirão Preto, SP. Assistente à Pesquisa Científica Tecnológica do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto-SP.
- 7 Livre Docente em Ciências Biológicas. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP. Instituto Evandro Chagas, IEC, Brasil.
- 8 Doutora em Genética. UNESP, São José do Rio Preto-SP. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP - FAMERP/Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva. Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP)-SP.

tos de biologia molecular e testes rápidos, mas ainda não substituem os métodos clássicos bacteriológicos, apesar de suas conhecidas limitações. Atualmente, a associação de métodos moleculares, principalmente aqueles baseados em reações da PCR tem proporcionado grande impulso nos estudos da epidemiologia molecular do MT. Embora haja uma diminuição do número de casos no mundo, dentre os desafios da doença estão a necessidade de pesquisas na área, envolvimento político para solucionar as questões sociais atribuídas à TB, treinamento permanente dos profissionais e monitoramento de vigilância dos casos para eliminar a doença no cenário mundial.

**Palavras-chave:** Tuberculose Pulmonar; *Mycobacterium tuberculosis*; Diagnóstico; Técnicas de Laboratório Clínico; Biologia Molecular

## ABSTRACT

Even 133 years after the discovery of *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis continues to be one of the main causes of death due to infectious diseases worldwide, especially in developing countries. The objective of this study was, after a survey of recent publications, to show issues relevant to the disease and to take a closer look at the tuberculosis problem in the current context. A total of 130 articles were found in the LILACS, MEDLINE/PubMed, SciELO, Paho, Cochrane Library, WHOLIS, IBECs and Scopus databases using the main keywords selected from health terminology of MeSH. Species belonging to the *M. tuberculosis* complex have highly conserved sequences and share about 99% DNA identity, but differ in their geographic distribution, pathogenicity and host. The clinically significant mechanism of rifampicin resistance is due to a mutation of the *rpoB* gene which encodes the target of the antibiotic. Great advances in the diagnosis of tuberculosis have occurred, with new molecular biology tools and rapid tests, but without replacing classical bacteriological methods, despite their known limitations. Recently, the association of molecular methods, especially based on PCR, has provided great impetus in molecular epidemiology studies of *M. tuberculosis*. Although the number of cases in the world has decreased, among the challenges are the need for further research, political involvement to solve social issues linked to tuberculosis, permanent training and the surveillance of cases in order to eliminate the disease on the world stage.

**Keywords:** Tuberculosis, Pulmonary; *Mycobacterium tuberculosis*; Diagnosis; Clinical Laboratory Techniques; Molecular Biology

## INTRODUÇÃO

Doença bacteriana crônica, infectocontagiosa e de distribuição universal prevalente, a tuberculose (TB) exige, para o seu controle no mundo, o desenvolvimento de estratégias sob os aspectos humanitários, econômicos e de Saúde Pública<sup>1</sup>.

São fatores limitantes desse controle a ausência de um teste diagnóstico de baixo custo, a longa duração do tratamento, a falta de uma vacina efetiva e o surgimento, em países de poucos recursos econômicos da TB resistente<sup>2,3</sup>. Como responsáveis pela doença, apontam-se, ainda, os fatores ambientais, os fatores sociais, os componentes genéticos dos indivíduos<sup>4-6</sup>, a imunidade e doenças associadas<sup>3</sup>.

No final dos anos 70 do século XX, em razão da constatação de dados epidemiológicos favoráveis, relativos à TB, a Organização Mundial da Saúde (OMS) começava a preparar, para a erradicação da doença, um programa a ser implementado na década seguinte<sup>7</sup>. Entretanto, no início dos anos 80, a então recém-descrita Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*), causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus, HIV*), modificou a história natural da TB, reconduzindo esta doença ao *status* de ameaça à Saúde Pública, mesmo em países desenvolvidos<sup>8,9</sup>. Ainda, segundo a OMS<sup>3</sup>, as maiores taxas de coinfeção de TB e de AIDS (TB/HIV) aparecem no continente africano (44%) e, em seguida, no americano (17%). A infecção com HIV aumenta consideravelmente o risco de progressão para a TB sendo a principal causa de morte entre pessoas com HIV<sup>1,10</sup>.

A transmissão da TB é maior em locais de grande contingente de população como em grandes centros urbanos e em populações de instituições fechadas como asilos e presídios, onde há também populações vulneráveis. Tratar as pessoas privadas de liberdade, refugiados, pessoas vivendo em situação de rua e outras populações mais vulneráveis é um dos pilares da estratégia *Stop-TB* da Organização Mundial de Saúde (*Global Plan to Stop TB – 2006-2015*), que visa otimizar o alcance das metas globais para eliminação da doença<sup>11-13</sup>.

As estratégias dos planos de eliminação da doença e dos programas de cooperação internacional têm contribuído, ainda, para a capacitação de recursos humanos e para o fortalecimento de instituições dos países participantes, pela transferência de conhecimentos e de equipamentos e, também, pela busca de uma melhor qualidade das boas práticas laboratoriais e dos serviços<sup>12</sup>. Instituições como a *Foundation for Innovative New Diagnostics* (FIND), *Stop TB Partnership's World Health Organization* (WHO), *Bill & Melinda Gates*

*Foundation* dentre outras, têm contribuído para o desenvolvimento e otimização de métodos diagnósticos da TB em países de recursos limitados<sup>14</sup>.

A existência da TB foi registrada em esqueletos de múmias do Antigo Egito e em esqueleto de uma múmia pré-colombiana no Peru<sup>15</sup>. Estudo recente avança que a história da TB teria sido traçada por evidências de restos humanos derivados de sítios arqueológicos no mundo todo, com possível origem no norte da Europa, há quase oito mil anos<sup>16</sup>.

O agente etiológico causador da TB, o *Mycobacterium tuberculosis* (MT) foi identificado em 1882, pelo pesquisador e bacteriologista alemão Robert Koch (1843-1910), sendo esta descoberta um marco fundamental do conhecimento da doença<sup>17</sup>. Surpreende o fato de que, mesmo após 133 anos de pesquisas, desde então, a doença continue a ser uma ameaça, principalmente em países em desenvolvimento<sup>18</sup> e uma das principais causas de morte por doenças infecciosas no mundo.

A TB faz parte do rol das doenças negligenciadas, um grupo de afecções transmissíveis, cujo tratamento é inexistente, precário ou desatualizado<sup>19,20</sup>.

Diante destes fatores, há necessidade de investimentos em conhecimentos e em pesquisas para acelerar o progresso da eliminação da TB<sup>1</sup>. Nesse sentido, esta revisão de artigos científicos publicados sobre aspectos relevantes da doença tem, por objetivo, apontar algumas nuances da doença visando uma atualização literária e a busca de um olhar mais atento à problemática da tuberculose no cenário atual.

## MATERIAL E MÉTODO

A busca pela literatura deu-se por meio da realização de pesquisa exploratória bibliográfica, na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), e a pesquisa das palavras-chave incluiu artigos integrantes das bases de dados da Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), do Sistema Online de Pesquisa e de Análise da Literatura Médica (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online, MEDLINE/PubMed*), Biblioteca Eletrônica e Científica Online (*Scientific Electronic Library Online, SciELO*), Organização Pan-Americana da Saúde (*Pan American Health Organization, PAHO*), Biblioteca Cochrane, Sistema de Informação da Biblioteca da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization Library Information System, WHOLIS*), Índice Bibliográfico Espanhol de Ciências da Saúde (*IBECIS*), e Elsevier *Scopus*. O conjunto das fontes pesquisadas integra artigos científicos, publicados em revistas nacionais e internacionais.

Partindo-se da terminologia em Saúde, encontrada nos Descritos em Ciências da Saúde (DECs), selecionaram-se as principais palavras-chave, que foram pesquisadas de forma associada ou não, empregando-se, quando necessário, os boleadores AND, OR e \$, nas palavras-chave seguintes: TB pulmonar, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, Técnicas de Laboratório Clínico, transmissão, quimioterapia combinada, meios de cultura, resistência a medicamentos; Biologia Molecular.

Para ampliar a busca nos sítios eletrônicos oficiais de universidades, de bancos de dissertações de mestrado e de teses de doutorado, no *Scholar Google* e em órgãos governamentais, foram ainda utilizados os termos seguintes: *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number (MIRU-VNTR)* e *Spoligotyping*.

A busca resultou na inclusão de 130 estudos com cerne na problemática da TB, incluindo publicações originais, portarias, manuais, teses e demais investigações baseadas em evidências científicas e/ou de caráter investigativo epidemiológico-operacional, nas línguas portuguesa, espanhola e inglesa. Livros, manuais, artigos e outros documentos impressos fizeram parte da metodologia, com o propósito de sustentar teoricamente esta revisão, sendo a referência científica mais antiga a de 1985, e as mais atuais, as de 2015. Com vistas a conferir um caráter mais didático ao texto, optou-se por dividi-lo nos tópicos seguintes, que abordam os aspectos gerais da TB: epidemiologia; etiologia; transmissão, sintomatologia e prevenção; tratamento e resistência; aspectos socioeconômicos; diagnóstico laboratorial e uso de técnicas de Biologia Molecular para o estudo de perfil molecular.

## ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE

### 1 - EPIDEMIOLOGIA

No ano de 2012, cerca de 8,6 milhões de pessoas desenvolveram TB, e 1,3 milhões delas morreram da doença, incluindo 320 mil mortes entre os pacientes coinfectados com TB e com o HIV<sup>1</sup>.

A maioria dos casos de TB ocorridos em 2012 está em países localizados na Ásia (58%) e na África (27%); menores proporções de casos ocorreram na região leste do Mediterrâneo (8%), na Europa (4%) e nas Américas (3%). Índia, China, África do Sul, Indonésia e Paquistão ocupam, respectivamente, as primeiras posições em países com os maiores em números de casos da doença<sup>1</sup>. No entanto, dados epidemiológicos mostram que 82% dos casos de TB do mundo estão

concentrados em 22 países do globo (por ordem alfabética): Afeganistão, África do Sul, Bangladesh, Brasil, Camboja, China, Etiópia, Filipinas, Índia, Indonésia, Quênia, Moçambique, Mianmar, Nigéria, Paquistão, República Democrática do Congo, República Unida da Tanzânia, Rússia, Tailândia, Uganda, Vietnã e Zimbábue<sup>1</sup>. A última avaliação dos 22 países com alta carga sugere que as taxas de incidência estão caindo na maioria deles<sup>21</sup>. Em número absoluto de casos, o Brasil ocupa a 16ª posição, mas cai para a 22ª posição, se for considerado o coeficiente de incidência<sup>10</sup>.

Nas Américas, o Brasil e o Peru notificaram 49% do total de casos do continente<sup>22</sup>. Nesse contexto, o Brasil diagnosticou 71.123 casos novos de TB em 2013, perfazendo um coeficiente de incidência de 35,4/100 mil habitantes. Em sua maioria, tais casos ocorrem nos grandes centros urbanos brasileiros e de forma heterogênea nas diferentes Unidades da Federação<sup>10</sup>, que somam 27 divisões do território, entre Estados e Distrito Federal. Comparados os anos de 2003 e de 2013, o país apresentou, em dez anos, uma redução de 20,4% nas ocorrências. Apesar da queda significativa de casos de TB no intervalo de uma década e apesar dos esforços empregados para o controle da TB pulmonar no Brasil, persiste como preocupante o número de casos da doença no País, seja considerado como um todo ou, apenas por regiões. Quando analisadas as regiões brasileiras, para o ano-base de 2013, verifica-se que as Regiões Norte, Sudeste e Nordeste, apresentam os mais altos coeficientes de incidência por 100 mil habitantes<sup>10</sup>.

No Brasil, a doença afeta, principalmente, as periferias ou aglomerados urbanos e, geralmente, mostra-se associada às más condições de moradia e de alimentação, à falta de saneamento básico, ao abuso do álcool, tabaco e de outras drogas<sup>22</sup>. A TB tem sido relacionada como a quarta causa de morte, por doença infecciosa no País, sendo a maior causa entre os indivíduos portadores de *AIDS*<sup>22,23</sup>. No Brasil, de conformidade com os dados fornecidos pelo MS<sup>10</sup>, os moradores de rua do País representam a população mais vulnerável à TB, com um risco de contraírem a infecção da ordem de 44 vezes maior do que a população em geral, seguidos das pessoas com *HIV/AIDS*, que têm risco 35 vezes maior, em seguida, está a população carcerária, com risco 28 vezes maior, e, por fim, a população indígena, com risco três vezes maior.

São duzentos e noventa os municípios considerados prioritários<sup>24</sup> para o controle da TB, dentre os 5.570 municípios atualmente existentes no País, e a doença está entre as Doenças de Notificação Compulsória<sup>25</sup> da Portaria do Ministério da Saúde (MS) de número (nº) 104, datada de 25 de janeiro de 2011. É

fundamental que a informação seja introduzida com qualidade, nos sistemas de vigilância, para que possam ser identificados os grupos populacionais que necessitem de ações de intervenção<sup>26</sup>.

O Estado de São Paulo notificou 19.550 casos em 2011<sup>27</sup>, e necessita de atenção devido ao alto número de pacientes multiresistentes (1.056 casos, em 2007) e alta prevalência de HIV (12%) em pacientes com TB<sup>28</sup>.

## 2 - ETIOLOGIA

O *MT* é uma bactéria aeróbia estrita, em forma de bacilo, álcool-ácido-resistente (BAAR), imóvel, medindo de 0,2 a 0,6 µm de diâmetro por 1,0 a 4,0 µm de comprimento, que não possui cápsula, nem esporos e que não produz toxinas<sup>2,29</sup>.

Muitas características do bacilo da TB, como a álcool-ácido resistência, a resistência aos fármacos, a patogenicidade e a taxa de crescimento lento, estão relacionadas à estrutura lipídica complexa da parede celular. A parede é formada, em sua porção externa, por ácidos micólicos, que formam uma camada cérea, resistente à água, o que torna o bacilo capaz de sobreviver a situações adversas, como o ressecamento e a administração de algumas drogas antimicrobianas<sup>30,31</sup>. A coloração mais comum utilizada é a de *Ziehl-Neelsen (ZN)*<sup>32</sup>. Uma característica importante é o agrupamento dos bacilos, de modo a formarem ramos alongados e tortuosos, conhecidos como cordas, devido à presença de ésteres de trealose-dimicolato 6,6' trealose<sup>33</sup>.

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis (CMT)* é constituído pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pini-pedii*, que compartilham cerca de 99% da identidade do *DNA*, apresentando seqüências altamente conservadas, mas diferem na distribuição geográfica, na patogenicidade e nos hospedeiros<sup>34,35</sup>. Em estudos recentes, outras espécies têm sido atribuídas ao *CMT*: *M. mungi*; *M. orygis*; *M. chimpanzee*<sup>36,37</sup>.

O genoma é circular e apresenta teor de guanina e de citosina da ordem de 65,6%<sup>30</sup>, seu tamanho variando, de espécie para espécie, de 4 a 7 milhões de pares de bases (pb)<sup>38</sup>, sendo que a cepa de referência *MT H37Rv - ATCC 27294* apresenta 4.411.529 pb.

Também é característico do genoma ser rico em Elementos de Inserção (IS) e em seqüências repetidas, podendo o Complexo *M. tuberculosis (CMT)* ser diferenciado, das outras micobactérias, pela presença das seqüências genéticas IS6110<sup>33</sup>.



A TB pulmonar é transmitida no contato interpessoal: a inalação de aerossóis expelidos por indivíduos bacilíferos constitui a principal fonte de infecção, principalmente durante a tosse, a fala ou o espirro, que os liberam no ar, sob a forma de gotículas infectantes<sup>25</sup>.

A principal forma clínica da TB é caracterizada pelo comprometimento pulmonar, acometendo de 80 a 85% dos casos<sup>25</sup>, uma vez que o *MT* tem predileção pelos pulmões e é a principal forma de transmissão e manutenção da cadeia de transmissão<sup>39</sup>.

Mesmo sendo a TB uma doença contagiosa, para o bacilo não é fácil encontrar condições favoráveis, intrínsecas ao hospedeiro ou ao ambiente, que lhe possibilitem invadir o organismo e estabelecer a doença, de forma ativa<sup>40</sup>.

Na maioria dos casos (95%), o sistema imunitário do hospedeiro competente controla a infecção primária, formando o granuloma caseoso, o qual não só contém o bacilo, mas controla, ainda, sua proliferação. O *MT* é considerado, no entanto, como um agente patogênico hábil na criação e na manutenção de um estado de latência que incluiu a opção de recuperação no futuro<sup>41,42</sup>. Fatores que influenciam na habilidade inicial de o *MT* replicar-se ou, alternativamente, de estabelecer infecção persistente, para possível reativação, ainda são desconhecidos<sup>43</sup>.

Os sintomas clássicos da TB pulmonar são: tosse persistente, produtiva ou não, com muco e, eventualmente, com sangue; febre vespertina; sudorese noturna; perda de apetite e emagrecimento<sup>2,25</sup>. Já a TB extrapulmonar pode afetar qualquer órgão do organismo humano, apresentando manifestações clínicas multiformes, dependendo da origem étnica, da idade, da presença ou da ausência de doença subjacente, do genótipo do *MT* e do *status* imunológico<sup>44</sup>. Na TB extrapulmonar, os sintomas variam, de acordo com os órgãos atingidos, podendo acometer, dentre outros, os rins, os ossos e as meninges, em função das quais se expressará clinicamente. Podem ocorrer, assim sendo, outros sinais e sintomas, além da tosse prolongada, e tais sinais adicionais devem ser valorizados na investigação individualizada, principalmente nas regiões com maior número de casos notificados<sup>25,45</sup>.

A vacina disponível (BCG) para a TB pulmonar apresenta baixa eficiência (variável entre 0 a 80%). Apesar dos contínuos esforços para se desenvolver vacinas mais eficazes contra a TB, uma nova vacina ainda não foi aprovada<sup>46</sup>.

O tratamento adequado da TB consiste na administração combinada de drogas, de modo a evitar o desenvolvimento de resistência medicamentosa, a prevenir complicações tardias e o óbito, a diminuir a transmissão e a assegurar a cura da doença. A esses princípios, soma-se a Estratégia do Tratamento Diretamente Observado (*Directly Observed Treatment Strategy, DOTS*), como tática fundamental a ser adotada, para o sucesso do tratamento<sup>25</sup>. A *DOTS* constitui mudança significativa na forma de administrar os medicamentos, com o profissional treinado passando a observar, desde o início do tratamento e até a cura da doença, a tomada da medicação pelo paciente<sup>25</sup>.

Com vistas a conter o aumento da Tuberculose Multidrogarresistente (*MDR-TB*), o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) reviu o sistema vigente de tratamento da TB no País, introduzido em 1979. Tal mudança baseou-se nos resultados preliminares do segundo Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos da Poliquimioterapia da TB (2007/2008), que mostrou o aumento da resistência primária à isoniazida (INH), de 4,4% para 6,0%, e consistiu na introdução do etambutol (EMB), como o quarto fármaco a ser administrado, na fase intensiva do tratamento, a qual compreende os dois primeiros meses do chamado Esquema Básico, com doses fixas e combinadas dos quatro medicamentos (RIF/INH/pirazinamida (PZA)/EMB), reunidas em um único comprimido. Na fase de manutenção do tratamento, que dura quatro meses, usa-se um comprimido contendo a associação da RIF com a INH<sup>25,47-49</sup>. O Esquema Básico é indicado para todos os casos novos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar, para todos os casos de reincidência e de retratamento por abandono, com exceção da TB meningoencefálica<sup>45</sup>.

Para todos os casos de retratamento, devem ser solicitados cultura, identificação e Teste de Sensibilidade aos Antibióticos (TSA), iniciando-se o tratamento com o Esquema Básico, até obterem-se os resultados desses exames<sup>25</sup>.

Para casos de falência do Esquema Básico, o tratamento é composto por medicamentos de segunda linha, com cinco fármacos na primeira fase (estrepomicina, etambutol, ofloxacina, pirazinamida e terizidona) as quais serão ministradas ao longo de seis meses, e, posteriormente, devendo ser ministradas, durante 12 meses da fase de manutenção do tratamento, três drogas, o etambutol, a ofloxacina e a terizidona<sup>45</sup>.

Problema crescente, a *MDR-TB* tornou-se preocupação global<sup>25,28,50</sup>. Mundialmente, em 2012, cerca de

450 mil pessoas desenvolveram MDR-TB, com estimativa anual de 170 mil mortes, mas existe uma grande diferença entre o número estimado de casos e o número diagnosticado e tratado<sup>51</sup>.

No Brasil, a última pesquisa nacional de *M. tuberculosis* resistente às drogas constatou que os casos de MDR-TB representaram uma estimativa de 0,90% dentre todos os casos de TB notificados, recentemente<sup>25</sup>. No entanto, segundo a Organização Mundial de Saúde, o Brasil faz parte dos cinco países (Afeganistão, Brasil, República do Congo, Indonésia e Federação Russa), com alta carga de TB e de MDR-TB que ainda possuem apenas dados parciais sobre a resistência e que devem, em razão disso, considerar a realização, a curto prazo, de levantamentos de casos de TB com resistência a drogas em todo o País, para melhor compreender o ônus da MDR-TB e, com isso, poder orientar o planejamento dos serviços de diagnóstico e de tratamento<sup>1</sup>.

O *MT* é naturalmente resistente a muitos antibióticos, trazendo dificuldade ao tratamento. Essa resistência é devida, principalmente, ao fato de o envelope da célula ser altamente hidrofóbico, agindo como se fosse uma barreira permeável. Muitos determinantes de resistência potenciais, porém, são também codificados no genoma<sup>30</sup>. Com o sequenciamento do genoma, torna-se cada vez mais acessível a disponibilização de uma tecnologia que detecte a resistência genotípica simultânea à rifampicina e isoniazida e fármacos de segunda linha<sup>51</sup>, mas para projetar ensaios de resistência baseados em testes moleculares rápidos, é necessário desvendar toda a base genética da resistência aos antibióticos<sup>52</sup>.

Dentre os desafios para alcançar o controle global da TB resistente à múltiplas drogas estão a identificação precoce dos casos, o tratamento não tóxico, de baixo custo, a minimização da transmissão e a vigilância epidemiológica eficaz<sup>51</sup>.

Os casos monorresistentes são considerados aqueles com resistência a, pelo menos, um antibiótico utilizado na poliquimioterapia para a TB e são o tipo mais comum de ocorrência. Os casos multirresistentes de MDR-TB são os que apresentam resultados de TSA resistente a, pelo menos, à INH e à RIF, os dois principais fármacos utilizados no tratamento da doença e a polirresistência, é a resistência a dois ou mais fármacos, exceto à RIF e à INH. A resistência denominada XDR-TB (*extensively drug resistant*) é definida como sendo o de resistência à INH e à RIF, acrescido de resistência a uma fluoroquinolona e, pelo menos, a um agente de segunda linha injetável (amicacina, canamicina e/ou capreomicina)<sup>25,51</sup>.

A aquisição de resistência a antimicrobianos em micobactérias é um evento aleatório, resultante de mutações espontâneas. É denominada de Resistên-

cia Natural, quando surge, naturalmente, no processo de multiplicação do bacilo e independe de contato prévio do bacilo com o fármaco. Já a Resistência Primária verifica-se em pacientes que se infectaram com bacilos previamente resistentes. Por fim, a Resistência Adquirida, também chamada de Resistência Pós-Primária ou de Resistência Secundária, verifica-se em pacientes com TB inicialmente sensível, que se torna resistente, após a exposição aos medicamentos. As principais causas do surgimento da Resistência Adquirida são o uso de esquemas inadequados de tratamento, o uso irregular do esquema terapêutico por má adesão ou a simples falta temporária de medicamentos, o que acaba, nos três casos, por privar o paciente da regularidade do seu seguimento<sup>25</sup>.

A história do tratamento de TB anterior continua a ser o risco mais importante para a resistência. No entanto, em pacientes *HIV* positivos, devido à interação dinâmica entre o *HIV* e a TB e apesar de ainda não estar completamente elucidada a relação da MDR-TB com o *HIV*, sabe-se que tal associação é de grande importância para a saúde pública, uma vez que tem sido associada com surtos de MDR-TB em ambientes institucionais, como hospitais e penitenciárias<sup>53</sup>.

A RIF é um antibiótico valioso para o tratamento de micobactérias, e se usado em combinação adequada evita o aparecimento de resistência. O mecanismo de resistência clinicamente significativo é definido por meio de uma mutação identificada na região do gene *rpoB*, que codifica o alvo de RIF<sup>54</sup>.

A vigilância global e local da resistência do *MT* é essencial para os programas de controle da TB, com grandes implicações na saúde pública para a TB multi-resistente, uma vez que estas informações são importantes para evitar novas transmissões<sup>51</sup>.

## 5 - ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) assinala como uma das principais causas para a gravidade contemporânea global da TB, a desigualdade social e suas implicações, o envelhecimento da população, os grandes movimentos migratórios e a piora na qualidade dos programas de controle da doença<sup>55-57</sup>.

Na sociedade atual, a desigualdade social é fenômeno desencadeado pela má distribuição de renda, com a conseqüente diferença de acesso às variáveis econômicas, educacionais, de saúde e de segurança, que geram desigualdade em vários níveis para a população<sup>58</sup>.

Apesar de ser curável, existe um impacto na qualidade de vida da pessoa com TB. Estudos sobre a quali-

dade de vida dessa população não são tão frequentes; alguns resultados, porém, apontam para consequências físicas, psicológicas e sociais<sup>59</sup>. Uma doença, como a TB, pode significar mudança na qualidade de vida e nas relações pessoais e profissionais, haja vista que a doença e os medicamentos podem causar apatia, levando a uma menor disposição para o bom desempenho das atividades cotidianas<sup>59</sup>. Os profissionais de saúde que atuam nos serviços de atendimento a TB precisam estar atentos à importância da qualidade de vida do paciente e à necessidade de, por parte deles, de uma melhor compreensão das vivências daqueles que são acometidos pela doença, visto que a falta de aderência ao tratamento pode ser desencadeada pela falta de proximidade desses indivíduos com aqueles que lhes prestam o cuidado e os assistem do ponto de vista técnico<sup>60,61</sup>.

Para a manutenção da qualidade de vida dos sujeitos que contraem essa complexa doença é preciso investigar e dar atenção a fatores socioeconômicos, estigma, discriminação. Deve-se, também, tentar combinar o tratamento, preferencialmente, com a vida familiar, o trabalho e as atividades sociais do indivíduo com TB<sup>62</sup>. Oferecer ao usuário a baciloscopia, os exames complementares e a medicação não garantem atendimento com equidade, conforme preconizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A integralidade do atendimento pode colaborar para a redução do estigma do doente e pode, igualmente, prover ações assertivas para o tratamento, em especial nos casos de desigualdades socioeconômicas<sup>63</sup>.

Há de se considerar, também, os sistemas inadequados de saúde<sup>63</sup>, muitas vezes sem um assistente social disponível<sup>62</sup>. Para o controle da doença, é preciso organizar serviços para o diagnóstico e o tratamento, além de haver maior flexibilidade das equipes quanto ao tratamento diretamente administrado<sup>61</sup> e de melhorar a coleta das variáveis sociais nos sistemas de registro da TB<sup>64</sup>, objetivando, com tal procedimento, a busca de soluções consonantes com os recursos a serem disponibilizados em cada comunidade.

O deslocamento crescente de pessoas no mundo, devido à globalização, pode afetar o controle de TB nos países receptores de imigrantes, por causa do aumento das fontes de infecção. É de fundamental importância a avaliação da incidência de TB entre os imigrantes, segundo seu país de origem<sup>65</sup>. Quando chegam ao destino, eles podem tornar-se vulneráveis, devido à situação econômica, às diferenças culturais e linguísticas, à falta de conhecimentos sobre o acesso à assistência social e à saúde e às dificuldades com moradia no novo país, ocasionando problemas de ordem física, psicológica e social, o que pode acar-

retar piora nas condições de saúde e a diminuição da imunidade<sup>66</sup>.

No Brasil, um exemplo bastante claro desse tipo de adversidade pode ser visto junto à população de imigrantes bolivianos em algumas Subprefeituras do Município de São Paulo, uma vez que seu país de origem apresenta alta incidência de TB<sup>67</sup>. Clandestinos, eles se constituem em habitantes de segunda classe, que não têm acesso às facilidades dos imigrantes legais, tornando-se, assim, mais facilmente expostos, muitas vezes, a condições degradantes de trabalho na indústria de confecções, que lhes impõe carga horária abusiva, a ser cumprida em ambiente adverso, em lugares, como porões, nos quais há, geralmente, pouca luminosidade e quase nenhuma ventilação<sup>68</sup>, aumentando o risco do acometimento de doenças respiratórias e facilitando sua transmissão<sup>69</sup>. Dessa forma são necessárias políticas públicas específicas para o monitoramento e manutenção de sua saúde<sup>70</sup>.

## 6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

### *Diagnóstico bacteriológico*

A capacidade inadequada de diagnóstico da TB, de forma rápida e precisa, continua a ser um obstáculo para o controle global da doença<sup>3</sup>.

O diagnóstico precoce das micobactérias faz-se por exame direto, cultura, tipificação e teste de sensibilidade aos antimicrobianos, o que contribui para a interrupção do seu ciclo de transmissão e para o controle e a cura da doença<sup>71-75</sup>.

Embora os laboratórios desempenhem um papel fundamental no tratamento de TB, apenas 57% dos 4,6 milhões de casos novos de TB pulmonar, notificados em todo o mundo, em 2012, foram bacteriologicamente confirmados, por meio de um método diagnóstico recomendado pela OMS. Além disso, os 5,7 milhões de pacientes com incidência de TB, entre os casos novos da doença e aqueles em que a doença se apresenta de forma recidiva, diagnosticados e notificados em 2012, representam apenas 66% dos 8,6 milhões de casos de TB globalmente estimados. A diferença reflete tanto a subnotificação de casos de TB diagnosticados, quanto a incapacidade de diagnosticá-los de maneira rápida e eficaz, incapacidade esta, em parte, atribuída à falta de estrutura laboratorial de muitos países<sup>1</sup>.

Do ponto de vista epidemiológico, a **baciloscopia** direta do escarro é fundamental, uma vez que determina as mais importantes fontes da infecção: os indivíduos bacilíferos<sup>25</sup>. Por tratar-se de exame não invasi-

vo, rápido e econômico, é o método preconizado para o diagnóstico da TB pulmonar<sup>39</sup>, permitindo a visualização microscópica do bacilo, por meio de coloração específica Ziehl Neelsen (ZN)<sup>76</sup>. Outra técnica utilizada é a da fluorescência com auramina, que apresenta acurácia semelhante e que, segundo alguns autores, aumentaria a sensibilidade da microscopia, em relação ao ZN<sup>77,78</sup>, mas que, em casos positivos, precisa de confirmação, pelo ZN<sup>79,80</sup>. Em regiões carentes, como a África, a auramina tem sido largamente utilizada, com os microscópios com lâmpadas de Diodo Emisor de Luz (*Light Emitting Diode, LED*), uma alternativa recente, recomendada pela OMS<sup>81</sup>, para a substituição do microscópio convencional de fluorescência, que utiliza lâmpada de Vapor de Mercúrio (*Mercury Vapor Lamp, MVP*). Os microscópios com LED fornecem uma fonte de luz de custo menor, com vida útil de 150 mil horas, sem risco potencial de toxicidade<sup>82</sup> e sem o comprometimento das vantagens operacionais da técnica tradicional. A desvantagem, de acordo com Hänscheid (2008)<sup>83</sup>, é que esses microscópios, por serem monoculares, podem levar à fadiga ocular. Em dois estudos<sup>82,84</sup>, não foram encontradas diferenças de sensibilidade da fluorescência, por microscópio com MVP relativamente àquele com LED, e, no estudo conduzido por Alfred (2014)<sup>84</sup>, observou-se que houve diminuição da especificidade da técnica de coloração por auramina, com microscopia de LED, em relação à coloração por ZN.

A sensibilidade da baciloscopia é baixa, variando entre 60 e 80%, conforme o volume, o tratamento prévio da amostra e o número de campos examinados<sup>25</sup>. Assim sendo, pode apresentar resultados falso-negativos, em espécies paucibacilares, e/ou falso-positivos, pela presença de bacilos mortos, evidenciados na coloração<sup>35</sup>. No entanto, ainda é um exame muito utilizado no Brasil, dada a escassez de recursos, em grande parte do território nacional, para outros exames de alta complexidade.

O isolamento de micobactérias, a partir de espécimes clínicos, é o padrão-ouro, por ser técnica mais sensível e por permitir a identificação da espécie e o Teste de Sensibilidade (TS) aos medicamentos utilizados no tratamento da TB. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a **cultura** do escarro pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença<sup>25</sup>, sendo que o método apresenta especificidade acima de 98%<sup>3</sup>.

As células de *MT* multiplicam-se muito lentamente em laboratório e necessitam de três a oito semanas de incubação, em meios artificiais sólidos, os mais usados sendo aqueles à base de ovo, como o Löwenstein-Jensen e o Ogawa-Kudoh<sup>72</sup>.

No final da década de 90 do século passado, o sistema de cultura líquida, *Bactec*<sup>®</sup>MGIT<sup>®</sup> 960 *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (Becton & Dickinson, Baltimore, Maryland, EUA) passou a ser utilizado, tanto para o isolamento, quanto para a detecção de resistência a drogas, apresentando tempo médio de sete dias de detecção do bacilo causador da doença<sup>39</sup>, monitorando-se a incubação por sistema informatizado<sup>72,73</sup>.

A **tipificação** do *MT* é realizada, segundo características fenotípicas, a presença do fator corda por microscopia corada por ZN<sup>72</sup> e o teste imunocromatográfico rápido AG MPT-64, que é um imunoenensaio cromatográfico para a identificação qualitativa do *CMT*, que utiliza o anticorpo monoclonal MPTP-64. Este *kit* pode ser utilizado para a identificação rápida do *CMT*, em combinação com sistemas de cultura sólida (colônia e fluido de condensação) e de cultura líquida, com sensibilidade de 98,6% e com especificidade de 100%<sup>85</sup>.

O **TSA** é uma ferramenta recomendada pelo PNCT, para avaliar a resistência do bacilo frente aos fármacos, para detectar falência de tratamento e para monitorar a resistência primária e/ou adquirida, contribuindo, desta forma, para a interrupção do ciclo de transmissão de resistência e, também, para o controle e a cura da doença<sup>25,71-73</sup>. Os testes de sensibilidade aos quimioterápicos utilizados no tratamento são importantes para a prescrição dos antimicrobianos adequados, que reduzem a possibilidade de falha terapêutica e, portanto, contribuem para a melhora do quadro clínico<sup>25</sup>.

O método utilizado no Brasil é o das proporções, que utiliza concentrações fixas das drogas, e o sistema detecta resistência das cepas a determinadas drogas, utilizando a proporção crítica de 1%, associado ao sistema automatizado MGIT<sup>®</sup> 960 (Becton & Dickinson, Baltimore, Maryland, EUA; BRASIL, 2008)<sup>72</sup>, com algumas modificações sugeridas por Giampaglia *et al.* (2007)<sup>86</sup>. A incubação é realizada por, no mínimo, cinco e, no máximo, 12 dias, com frascos contendo as drogas. A leitura, programada para ser realizada a cada hora, é automaticamente interrompida, a partir do índice final de crescimento obtido no tubo controle, com posterior emissão de relatório final, no aparelho supracitado<sup>73,87,88</sup>.

Os fármacos de primeira linha utilizados para a realização do TSA são: SM, RIF, INH, EMB e PZA<sup>25</sup>.

#### *Outros métodos laboratoriais*

Na última década, os testes imunológicos também têm sido empregados no diagnóstico da TB. Alguns exemplos são a adenosinadeaminase e a replicação



de bacteriófagos, mas eles apresentam limitações. Devido à baixa especificidade e sensibilidade e à falta de valor clínico<sup>16</sup>, ainda não são recomendados, para o diagnóstico de TB, pelos programas oficiais no país<sup>39</sup>.

Dentre os testes moleculares, o PCR em tempo real destaca-se, por sua rapidez, tendo seu resultado liberado em de uma hora e meia a duas horas depois da extração do DNA, com baixo risco de contaminação, devido ao fato de, para fazê-lo, utilizar-se apenas um tubo de ensaio. No entanto, esse teste apresenta, como desvantagens, a necessidade de recorrer-se a equipamentos e a reagentes de custo elevado, além de dispor de profissional especializado em Biologia Molecular<sup>39</sup>.

Em 2010, recomendou-se o uso do teste molecular rápido *GeneXpert*<sup>®</sup> *MTB/RIF* (Cepheid, Sunnyvale, Califórnia, EUA), para o diagnóstico da TB pulmonar e da resistência à RIF, em adultos. Trata-se de método de amplificação de ácidos nucleicos, que permite a detecção simultânea de *MT* e a triagem de resistência à RIF, por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) em tempo real, que identifica corretamente 97,6% dos pacientes com resistência à RIF, sensibilidade muito melhor do que da baciloscopia e semelhante à da cultura, fornecendo resultados em menos de duas horas, sem necessitar de tratamento da amostra<sup>1</sup>. Essa tecnologia molecular deve ser cada vez mais utilizada em levantamentos de resistência a medicamentos, para simplificar a logística e, assim, reduzir a carga de trabalho dos laboratórios, além de reduzir o custo da triagem inicial por sistemas convencionais<sup>1</sup>, mas ela ainda não substitui a microscopia convencional, nem o cultivo do microorganismo, necessários para monitorar o tratamento e a detecção de resistência a outras drogas<sup>16</sup>.

Vários países já estão usando, ou, para breve, planejam usar o *GeneXpert*<sup>®</sup> *MTB/RIF*, como ferramenta de triagem, na resistência à droga, pois a resistência à RIF é o mais importante indicador de *MDR-TB*, com implicações clínicas graves para os pacientes afetados. Como a maior parte desses métodos não se faz disponível, na atualidade, em países nos quais a TB é altamente endêmica, estima-se que apenas 10% dos atuais casos de *MDR-TB* sejam diagnosticados em todo o mundo e que apenas a metade deles receba tratamento adequado<sup>89</sup>.

Devido às novas metodologias disponíveis, a OMS, em 2013, revisou e modificou a definição de caso de TB, do ponto de vista bacteriológico, baseando-se na utilização dos testes rápidos, como o *geneX-pert*, sendo considerado, caso novo todo paciente cuja amostra biológica apresentar-se positiva na baciloscopia, na cultura ou no método rápido, como o *GeneXpert*<sup>®</sup> *MTB/RIF*<sup>1</sup>.

## 7. USO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA O ESTUDO DE PERFIL MOLECULAR

O desenvolvimento e o aprimoramento do uso de técnicas de genotipagem de cepas de *MT*, nas últimas décadas, têm possibilitado a compreensão da estrutura populacional e da dinâmica de transmissão desse patógeno na comunidade, sendo frequentemente aplicadas tais técnicas, para compreender as variações genéticas e as possíveis relações filogenéticas entre as várias cepas de *MT*, o que permite esclarecer questões cruciais para a saúde pública<sup>90,91</sup>.

As técnicas utilizadas para estudos de tipagem molecular de membros do CMT são RFLP-IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) e *Spoligotyping*<sup>92</sup>.

Utilizando um fragmento de inserção IS6110, no ano de 1993, Van Embden *et al.*<sup>93</sup>, publicaram um protocolo-padrão, aceito internacionalmente, para a tipagem de isolados de *MT* pelo método RFLP. O fragmento IS6110 é um transpóson que se repete, várias vezes (em geral, de uma a 25 repetições), dentro do genoma da micobactéria<sup>94</sup>, com uma sequência de 1.361 pb que se tem mostrado bastante conservada entre os diferentes isolados<sup>92</sup>. O método tem, por base, a digestão do DNA genômico bacteriano por enzimas de restrição chamadas de endonucleases, que geram fragmentos de diferentes comprimentos, os quais são separados em gel de agarose e são, a seguir, hibridizados por uma sonda de DNA<sup>95</sup>. A diferença na localização e no número de cópias dessa sequência de inserção é o que define o polimorfismo entre os isolados. Na espécie *MT*, o número de cópias dessa sequência de inserção é frequentemente alto, conferindo à espécie, elevado poder de discriminação<sup>96</sup>. Com excelente poder discriminatório, essa metodologia foi considerada, na década de 90 do século XX, padrão-ouro para a tipificação de cepas de *MT*<sup>97</sup>.

Desde então, a genotipagem baseada em IS6110 vem, com sucesso, sendo utilizada, para rastrear a transmissão da TB, em surtos; para confirmar, em laboratório, a contaminação cruzada da doença; para identificar os fatores de risco da doença entre as populações de pacientes com TB e para investigar a dinâmica da transmissão da TB em populações<sup>93,98,99</sup>.

No entanto, esse método apresenta inúmeras limitações, pois, na presença de isolados com baixo número de cópias de IS6110 (menos do que seis cópias), seu poder discriminatório diminui, sendo necessária a utilização de métodos complementares de genotipagem. A metodologia requer ainda DNA com alto grau de pureza e de concentração, aliado à exigência de um trabalho laboratorial intenso<sup>92</sup>.

Outra técnica de tipagem molecular, o *Spoligotyping*, baseia-se na amplificação, por PCR, de um único locus. Trata-se de técnica rápida, de fácil execução, baseada no polimorfismo da região da região DR (*Direct Repeat*), presente exclusivamente no genoma de micobactérias do CMT. A micobactéria possui uma região cromossômica distinta, contendo múltiplas regiões de 36-pb (na região DR) intercaladas por sequências de DNA (35 a 41 pb) únicas de espaçadores<sup>100</sup>.

O método *Spoligotyping* consiste na detecção desses espaçadores na região DR do genoma das cepas de MT<sup>101</sup>. Os espaçadores podem ser representados por código binário, o qual pode ser ou positivo ou negativo, sendo considerado positivo, quando, na membrana hibridizada, há a presença de espaçador, e negativo, quando ausente o espaçador<sup>102</sup>. Os isolados de MT de amostras clínicas variam, de acordo com o número de DRs, e variam, ainda, com a presença ou com a ausência das sequências espaçadoras<sup>103</sup>.

Essa metodologia é utilizada na identificação e na diferenciação dos membros do CMT e pode ser uma alternativa de tipagem para as amostras com poucas cópias de IS6110. O poder discriminatório do *Spoligotyping* é menor, quando comparado ao do RFLP IS6110<sup>103</sup>. Entretanto, vários grupos de pesquisadores reportaram que é um método secundário de genotipagem, que pode ser utilizado para rastreamento de um grande número de isolados, fornecendo respostas rápidas, na investigação epidemiológica<sup>100,104,105</sup>. Como pode superestimar as ligações epidemiológicas, é recomendado que tal metodologia, quando adotada, esteja associada a uma outra técnica<sup>106</sup>.

Os *Spoligotyping* comuns a mais de um isolado são designados como *Shared Types (ST)* e têm a si atribuído, individualmente, um número designado como *Shared International Type (SIT)*, de acordo com o banco de dados internacional do Instituto Pasteur de Guadalupe (*SITVITWEB*)<sup>107-109</sup>. Os SITs são então agrupados em famílias e subfamílias.

Outra proposta de tipagem molecular utilizada por vários grupos de pesquisadores é o "*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeats*"- MIRU-VNTR<sup>91, 110-112</sup>. Com efeito, na década de 90, Supply e colaboradores (2000)<sup>110</sup> identificaram, no genoma do MT, elementos repetitivos, similares às sequências de minissatélites anteriormente descritas no genoma humano. Os minissatélites no genoma dos eucariotos superiores encontram-se dispersos, em milhares de cópias, com tamanhos que variam entre 10 e 100 pb, e muitos desses loci são hipervariáveis em seres humanos e em outros animais, recebendo a denominação de *Variable Number Tandem Repeats (VNTRs)*.

Dentro do genoma micobacteriano, as regiões de VNTR são compostas por 40 a 100 pb de sequências repetitivas, chamadas Unidades Repetitivas Intercaladas (MIRUs), sendo algumas idênticas e outras que variam ligeiramente em sequência e comprimento, os quais podem ser denominados de acordo com sua localização no genoma bacteriano<sup>113</sup>.

Este método teve por base, inicialmente, a amplificação, pela PCR, de um sistema com 12 (MIRUs 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40) dos 41 loci identificados no genoma do MT, com condições de amplificação específicas de cada locus descritas por Mazars *et al.* (2001)<sup>114</sup>.

Supply *et al.* investigaram, em 2006<sup>111</sup>, o poder de resolução, a estabilidade clonal e a aplicabilidade da técnica em estudos de epidemiologia molecular e, então, propuseram, como uma ferramenta de alta resolução para estudos filogenéticos, a utilização de 24 loci. Os MIRUs propostos incluem os 12 sistemas já descritos acima, mais os recém-inseridos Mtub 04, ETRC, ETRA, Mtub 30, Mtub 39, QUB 4156, QUB 11b, Mtub21, QUB 26, Mtub 29, ETRB e Mtub34. Todos esses locos exibem polimorfismos, em número de cópias, entre os isolados de MT não relacionados, de diversas origens geográficas, além de serem altamente estáveis, entre isolados com ligação epidemiológica<sup>110-112,115</sup>.

Alguns autores relatam que, na discriminação de isolados de MT, o sistema com 24 locos demonstrou maior confiabilidade, em relação ao conjunto de 12 locos originalmente sugeridos, com resultados altamente replicáveis e fáceis de serem trocados entre laboratórios<sup>116,117</sup>. Já em outros estudos, o sistema de 15 loci vem apresentando um maior poder de discriminação, entre os isolados de MT, concluindo que esse tipo de estratégia pode ser útil na genotipagem do bacilo da TB<sup>118,119</sup>.

Atualmente, a associação de métodos moleculares, principalmente aqueles baseados em reações da PCR tem proporcionado grande impulso aos estudos da epidemiologia molecular do MT. A técnica de MIRU, quando aplicada, como primeira técnica de escolha de tipagem, associada com a técnica de *Spoligotyping*, tem apresentado, na grande maioria dos casos, excelente poder discriminatório<sup>101,120</sup>.

Embora o CMT seja considerado um táxon relativamente homogêneo, com relação à sua sequência de DNA, o aumento no número de espécies e de linhagens genéticas específicas revelou variações de elementos genéticos repetitivos, móveis. Essas diferenças têm sido exploradas, como marcadores, para fins epidemiológicos, ou para a identificação de estirpes, em nível de espécie, aumentando a compreensão da biodiversida-

de do *MT*, com relação à sua filogenia, às variações nas preferências geográficas, à virulência, à transmissibilidade, à resposta do hospedeiro, à resistência às drogas e à capacidade de induzir respostas imunes<sup>121</sup>.

Estudos epidemiológicos têm apontado, também, que a distribuição genotípica do *CMT* é fortemente relacionada à área geográfica, à população humana e à etnia<sup>122-125</sup>. Tais estudos permitiram definir o *CMT* em seis grandes linhagens filogeográficas mundiais, as quais foram ainda subdivididas em famílias: a Indo-Oceânica (EAI); a Leste Asiática, incluindo Pequim (W/Beijing); a Leste Africano-Indiana (CAS); a Euro-americana (Latino-Americana e Mediterrânea ou LAM); a África Ocidental ou *Mycobacterium africanum* I e a África Ocidental ou *Mycobacterium africanum* II.

Os padrões de *spoligotyping* permitem agrupar diferentes cepas de *MT*, em famílias (subespécies) epidemiologicamente importantes<sup>102</sup>. Uma das principais é a família LAM, que pertence à linhagem Euro-americana e é dividida em subfamílias, de LAM 1 a LAM 10<sup>126</sup>. A superlinhagem Euro-Americana possui, ainda, outras famílias menores, a S, a T e a X e a Toscana. A família dominante no Brasil e na América, em geral, tem sido a Euro-Americana<sup>91,127,128</sup>, em suas subfamílias, T e H<sup>116, 129,130</sup>.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Doença antiga e atual no contexto mundial, a TB merece atenção dos Poderes Públicos, por suas características de transmissibilidade, de necessidade de tratamento prolongado e de difícil adesão do paciente ao tratamento. Somam-se a esses fatores o advento da *AIDS* e a resistência às drogas, problemas globais que agravam a doença e complicam sua cura.

Em plena Era da Biologia Molecular, testes rápidos e microscopia por lâmpadas *LED*, a TB ainda apresenta forte estigma social e se encontra no rol das doenças negligenciáveis. Mesmo com os grandes avanços obtidos nos testes de diagnóstico da TB e apesar das conhecidas limitações dos métodos bacteriológicos clássicos, estes ainda se mostram a modalidade mais usual dentre os métodos de detecção da TB e seguem sendo muito utilizados para o diagnóstico da doença, principalmente em países com poucos recursos financeiros.

Para o desenvolvimento de ensaios de resistência baseados em testes moleculares rápidos ainda é necessário desvendar por completo a base genética da resistência aos antibióticos.

Embora a vacina atualmente disponível proteja das formas mais graves da doença, há a necessidade de uma forma mais efetiva de proteção contra a TB.

Houve, nos últimos anos, uma diminuição do número de casos no mundo todo, mas, dentre os desafios, ainda está a necessidade de pesquisas na área, de envolvimento político, de liderança estratégica e de treinamento permanente dos profissionais, além de monitoramento e vigilância dos casos, no sentido de eliminar a doença, ameaça de Saúde Pública mundial.

Os programas de cooperação internacional têm contribuído para a capacitação dos recursos humanos e para o fortalecimento das instituições dos países participantes do consórcio colaborativo, graças à transferência de conhecimentos técnicos e graças, ainda, à disponibilização de equipamentos visando ao desenvolvimento de estratégias transnacionais de eliminação da TB.

A presente revisão da literatura especializada não inclui todas as nuances relativas à TB, uma vez que seria impossível de fazê-lo neste espaço, diante das múltiplas facetas da doença. Embora apresente a limitação de não ter incluído todos os estudos concernentes aos temas aqui explorados, espera-se contribuir como uma abordagem geral dos temas relevantes sobre a doença, nos dias de hoje.

## REFERÊNCIAS

- 1 World Health Organization. Global tuberculosis report 2013. Geneva: WHO; 2013.
- 2 Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378(9785):57-72.
- 3 World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report. Geneva: WHO; 2011.
- 4 Correa PA, Gómez LM, Anaya JM. Polimorfismo del TNF- $\alpha$  en autoinmunidad y tuberculosis. *Biomédica*. 2004;24(Supl 1):43-51.
- 5 Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:593-617.
- 6 Fernando SL, Britton WJ. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol Cell Biol*. 2006;84(2):125-37.
- 7 World Health Organization. WHO expert special programme on AIDS. Geneva: WHO; 1987.
- 8 Rodrigues AL Jr, Ruffino-Netto A, Castilho EA. Distribuição espacial da co-infecção *M. tuberculosis*/HIV no Estado de São Paulo, 1991-2001. *Rev Saúde Pública*. 2006;40(2):265-70.
- 9 Ruffino-Netto, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(1):51-8.
- 10 Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e

- desafios. Bol Epidemiol [Internet]. 2013 [citado em 2014 Out 15];44(2):[aproximadamente 13 p.]. Disponível em: <http://www.vigilanciaensaude.ba.gov.br/sites/default/files/Boletim-Tuberculose-2014.pdf>
- 11 World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report. Geneva: WHO; 2009.
  - 12 Organização Pan-Americana da Saúde. O apoio à implementação da Estratégia de Tratamento Diretamente Supervisionado (DOTS) para o combate à Tuberculose. Brasília (DF): Organização Pan-Americana da Saúde; 2010.
  - 13 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Especial Tuberculose. Bol Epidemiol [Internet]. 2012 [citado em 2014 Out 10];43(1-12):[aproximadamente 12 p.]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/23/BE-2012-43-Mar--o--Especial-Tuberculose.pdf>
  - 14 Rossetti ML. Avanços no diagnóstico da tuberculose [Internet]. In: 2º Workshop da Rede TB: Apresentação do 2º Workshop da Rede TB; 2011; Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Universidade Gama Filho; 2011 [citado em 2014 Out 10]. Disponível em: [http://www.redetb.org/attachments/1537\\_diagn%C3%B3stico-Maria-Lucia\\_Rossetti.pdf](http://www.redetb.org/attachments/1537_diagn%C3%B3stico-Maria-Lucia_Rossetti.pdf)
  - 15 Gonçalves BD. Perfil epidemiológico da exposição à Tuberculose em um Hospital Universitário: uma proposta de monitoramento da doença [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2009.
  - 16 Davies PDO, Gordon SB, Davies G, editors. Clinical Tuberculosis [Internet]. New York: CRC Press; 2014 [citado em 2014 Jan 12]. Disponível em: <https://app.box.com/s/naah0lr0u4fuszdq8kzkg2y24ri158yi>
  - 17 Bertolli Filho, C. História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950 [Internet]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001 [citado em 2015 Mai 06]. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/4/pdf/bertolli-9788575412886.pdf>
  - 18 Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList - 10 years after. Tuberculosis (Edinb). 2011;91(1):1-7.
  - 19 Oliveira LSS. As doenças negligenciadas e nós. Saúde Coletiva. 2009;28:40-1.
  - 20 Santos FLA, Lyra MAM, Alves LDS, Silva KER, Rolim LA, Gomes TCBL, et al. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2012;33(1):37-47.
  - 21 World Health Organization. Tuberculosis: epidemiology, population surveillance: data interpretation, statistical. Geneva: WHO; 2014.
  - 22 World Health Organization. Global tuberculosis control. Geneva: WHO; 2012.
  - 23 Barbosa EL, Levino A. Análise da coinfeção TB/HIV como fator de desenvolvimento da tuberculose multidroga resistente: uma revisão sistemática. Rev Pan-Amaz Saude. 2013;4(4):57-66.
  - 24 Lopes RH, Menezes RMP, Costa TD, Queiroz AAR, Cirino ID, Garcia MCC. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose pulmonar: uma revisão integrativa. Rev Baiana Saúde Pública. 2013;37(3):661-71.
  - 25 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
  - 26 Duarte R, Carvalho A, Ferreira D, Saleiro S, Lima R, Mota M, et al. Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. Rev Port Pneumol. 2010;16(4):559-72.
  - 27 Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Controle da Tuberculose [Internet]. São Paulo: CVE-SES/SP; 2012 [citado em 2014 Abr 15]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve\\_tb.html](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_tb.html)
  - 28 Martins MC, Giampaglia CM, Oliveira RS, Simonsen V, Latrilha FO, Moniz LL, et al. Population structure and circulating genotypes of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in São Paulo state, Brazil. Infect Genet Evol. 2013;14:39-45.
  - 29 Waine LG, Kubica GP. The mycobacteria. In: Sneath PHA, Sharpe ME, Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology. 8th ed. Baltimore: Williams e Wilkins; 1986. p.1435-7.
  - 30 Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1988;393(6685):537-44.
  - 31 Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 8a ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
  - 32 Pfyffer GE, Palicova F. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Versalovic J, editor. Manual of clinical microbiology. 10th ed. Washington: ASM Press; 2011. p. 472-502.
  - 33 Coelho FS, Marques EA. Tuberculose. Rev Hosp Univ Pedro Ernesto. 2006;5:25-6.
  - 34 Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect Genet Evol. 2003;3(2):125-33.
  - 35 Almeida EA. Sensibilidade de bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* as drogas antituberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2009. 79p.



- 36 Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(4):653–5.
- 37 Coscolla M, Lewin A, Metzger S, Maetz-Rennsing K, Calvignac-Spencer S, Nitsche A, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(6):969-76.
- 38 Homolka S, Post E, Oberhauser B, George AG, Westman L, Dafaie F, et al. High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. *BMC Microbiol*. 2008;8:103.
- 39 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010
- 40 Stein CM. Genetic epidemiology of tuberculosis susceptibility: impact of study design. *PLoS Pathogens*, San Francisco. 2011;7(1):e1001189.
- 41 Glickman MS, Jacobs Junior WR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn a discipline. *Cell*. 2001;104(4):477-85.
- 42 World Health Organization. Global tuberculosis control. Geneva: WHO; 2010.
- 43 Maulén NP. Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Med Chile*. 2011;139(12):1605-10.
- 44 Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Lan NT, Thuong NT, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2008;4(3):e1000034.
- 45 Conde MB, Souza MGR. Pneumologia e fisiologia: uma abordagem prática. São Paulo: Atheneu; 2009.
- 46 Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *J Bras Pneumol*. 2007;33(3):323-4.
- 47 Ministério da Saúde (BR). Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
- 48 Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenação de Controle de Doenças. Divisão de Tuberculose. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Mudanças no tratamento da tuberculose. *Rev Saúde Pública*. 2010;44(1):197-9.
- 49 Paschualinoto AL, Ferro e Silva RR, Carmo AMS. Padrões de resistência a fármacos em pacientes com tuberculose pulmonar: IAL Santo André. *Rev Bras Ciênc Saúde*. 2012;10(31):67-70.
- 50 Said HM, Kock MM, Ismail NA, Baba K, Omar SV, Osman AG, et al. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. *BMC Infectious Diseases*. 2012;12:369.
- 51 Millard J, Ugarte-Gil C, Moore DA. Multidrug resistant tuberculosis. *BMJ*. 2015;350:h882.
- 52 Köser CU, Javid B, Liddell K, Ellington MJ, Feuerriegel S, Niemann S, et al. Comment: drug-resistance mechanisms and tuberculosis drugs. *Lancet*. 2015;385(9965):305-7.
- 53 Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A. Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review. *PLoS One*. 2009;4(5):e5561.
- 54 Goldstein BP. Resistance to rifampicin: a review. *J Antibiot*. 2014;67(9):625-30.
- 55 World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report on the tuberculosis epidemic: Tuberculosis (TB) annual report-dots (directly observed treatment, short-course) – a breakthrough in tb control. Geneva: WHO; 1997.
- 56 World Health Organization. Guidelines for implementing collaborative TB and HIV programme activities: World Health Organization Stop TB: Department and Department of HIV/AIDS, 2003. Geneva: WHO; 2003.
- 57 World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning financing. Geneva: WHO, 2006.
- 58 Camargo, Orson. Desigualdade social [Internet]. Goiânia: Brasil Escola; 2014 [citado em 2015 Fev 12]. Disponível em: <http://www.brasilecola.com/sociologia/classes-sociais.htm>
- 59 Farias SNP, Medeiros CRS, Paz EPA, Lobo AJS, Ghelman LG. Integralidade no cuidado: estudo da qualidade de vida dos usuários com tuberculose. *Escola Anna Nery*. 2013;17(4):749-54.
- 60 Sánchez M, Idaly A, Marínez C, Andrés O, Mesa R, Lida Y. Trabajadores de la salud y sus significados en torno a la adherencia al tratamiento de la tuberculosis. *Enfermería Global*. 2013;(31):86-108.
- 61 Monteiro S, Rodrigues V. A qualidade de vida da pessoa com tuberculose em regime de toma observada. *Acta Med Port*. 2011;24(Supl 2):523-30.
- 62 Villa TS, Andrade RLP, Arakawa T, Magnabosco GT, Beraldo AA, Monroe AA, et al. Satisfação do usuário com os serviços de atenção à tuberculose em Ribeirão Preto, 2008. *Cad.Saúde Colet*. 2012;20(2):234-43.
- 63 Musayon Oblitas Y, Loncharich Vera N, Castillo Rios R, Saravia Portuguez A. Inequidad en personas que padecen de Tuberculosis: estudio piloto en tres Centros de Salud de Lima (Perú). *Index Enferm [Internet]*. 2008 [citado em 2015 Fev 12];17(2):111-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4321/S1132-12962008000200007>
- 64 Quijano ED, Brugal MT, Pasarín I, Galdós-Tangís H, Caylà J, Borrel, C. Influencia de las desigualdades sociales, la conflictividad social y la pobreza extrema sobre la mortalida-

- de por tuberculosis em la ciudad de Barcelona. Rev Esp Salud Pública. 2001;75(6):517-27.
- 65 Farah MG, Meyer HE, Selmer R, Haldal E, Bjune G. Long-term risk of tuberculosis among immigrants in Norway. Intern J Epidemiol. 2005;34(5):1005-11.
- 66 Carballo M. The challenge of migration and health [Internet]. Switzerland: International Centre for Migration and Health;2007 [cited 2015 Feb 21]. Available from: [http://www.icmhd.ch/WebPDF/2007/WHA%20DISTRIBUTION%20ARTICLE%2018\\_05\\_2007formatted.pdf](http://www.icmhd.ch/WebPDF/2007/WHA%20DISTRIBUTION%20ARTICLE%2018_05_2007formatted.pdf)
- 67 Lindoso AAB, Waldman EA, Komatsu NK, Figueiredo SM, Taniguchi M, Rodrigues LC. Profile of tuberculosis patients progressing to death, city of São Paulo, Brazil, 2002. Rev Saúde Pública. 2008;42(5):641-8.
- 68 Silva SA. Bolivianos em São Paulo: entre o sonho e a realidade. Est Av. 2006;20(57):157-70.
- 69 Ianni AMZ, Quitério LAD. Promoção da saúde e meio ambiente no Programa de Saúde da Família: os casos da Barra Funda e Jardim Rio Claro, município de São Paulo. Rev Saúde Soc.2004;13(1):81-91.
- 70 Martinez VN. Equidade em saúde: o caso da tuberculose na comunidade de bolivianos no município de São Paulo [dissertação].São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2010.
- 71 Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, USA: Centers for Disease Control and Prevention; 1985. Chapter 4, Identification test techniques; p. 207.
- 72 Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional Vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008.
- 73 Parrish NM, Carrol KC. Role of the Clinical Mycobacteriology Laboratory in Diagnosis and Management of Tuberculosis in Low-Prevalence Settings. J Clin Microbiol. 2011;49(3):772-6.
- 74 Bento J, Silva AS, Rodrigues F, Duarte R. Métodos diagnósticos em tuberculose. Acta Med Port. 2011;24:145-54.
- 75 Lafaiete RS, Souza FBA, Motta MCS. O atraso no diagnóstico da tuberculose. J Res Fundam Care Online. 2013;5(3):174-80.
- 76 Campos H. Diagnóstico da tuberculose. Pulmão RJ. 2006;15(2):92-9.
- 77 Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis.2006;6(9):570-81.
- 78 Salfinger M, Morris AJ. The role of the microbiology laboratory in diagnosing mycobacterial diseases. Am J Clin Pathol. 1994;101(4 Suppl 1):S6-13.
- 79 Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia . II Consenso Brasileiro de tuberculose: diretrizes brasileiras para tuberculose. J Bras Pneumol. 2004;30(Supl1):S1-S56.
- 80 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. Bras Pneumol. 2008;34(12):1056-62.
- 81 World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement [Internet]. Geneva: WHO; 2011 [cited 2014 Apr 14].Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501613\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501613_eng.pdf?ua=1)
- 82 Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesselting AC, Beyers N, Wasserman E, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. Clin Infect Dis. 2008;47(2):203-7.
- 83 Hänscheid T. The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of Mycobacterium tuberculosis and Coccidia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102(6):520-1.
- 84 Alfred N, Lovette L, Aliyu G, Olusegun O, Meshak P, Jilang T, et al. Optimising Mycobacterium tuberculosis detection in resource limited settings. BMJ Open. 2014;4(3):e004093.
- 85 Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol.1999;37(11):3693-7.
- 86 Giampaglia CM, Martins MC, Vieira GB, Vinhas SA, Telles MA, Palaci M, et al. Multicentre evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2007;11(9):986-91.
- 87 Kruuner A, Yates MD, Drobniowski FA. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *M. tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006;44(3):811-8.
- 88 Rüsç-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, Chadwick M, Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing *Micobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobial. J Clin Microbiol. 2006;44(3):688-92.
- 89 Zumla A, Raviglione M, Hafner R, Von Reyn CF. Tuberculosis. N Engl J Med. 2013;368(8):745-55.
- 90 Choi GE, Jang MH, Cho HJ, Lee SM, Yi J, Lee EY, et al. Application of single-nucleotide polymorphism and mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats analyses to clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. Korean J Lab Med. 2011;31(1):37-43.

- 91 Cardoso Oelemann M, Gomes HM, Willery E, Possuelo L, Batista Lima KV, Allix-Béguec C, et al. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. *PloS One*. 2011;6(3):e18256.
- 92 Santos LC, Kipnis APJ, Kipinis A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Patol Trop*. 2007;36(1):1-15.
- 93 Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):406-9.
- 94 Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*. 1999;37(8):2607-18.
- 95 Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1990;28(12):2668-73.
- 96 Devallois A, Horgen L, Sola C, Rastogi N. Molecular typing of mycobacteria. *Pathol Biol (Paris)*. 1998;46(8):625-36.
- 97 Gibson AL, Huard RC, Gey van Pittius NC, Lazzarini LC, Driscoll J, Kurepina N, et al. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1259-67.
- 98 Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med*. 1994;330(24):1703-9.
- 99 Gencer B, Shinnick TM. Molecular Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. *Am J Infect Dis*. 2005;1(1):5-11.
- 100 Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology*. 2006;6:23.
- 101 Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(4):658-85.
- 102 Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8(11):694-704.
- 103 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997;35(4):907-14.
- 104 Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, van Soolingen D. Use variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):314-20.
- 105 Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutiérrez MC, Haas WH, Panaiotov S, et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5628-38.
- 106 Borsuk S, Dellagostin MM, Madeira Sde G, Lima C, Boffo M, Mattos I, et al. Molecular characterization of *mycobacterium tuberculosis* isolates in a region of Brazil with a high incidence of tuberculosis. *Microbes Infect*. 2005;7(13):1338-44.
- 107 Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, Mokrousov I, Vincent V, Rastogi N. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3):390-6.
- 108 Institut Pasteur de la Guadeloupe. The SITVIT database [Internet]. [cited 2015 Feb 15]. Welcome to SITVIT; [about 1 screens]. Available from: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>
- 109 Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. Sitvitweb: a publicly available international multi-marker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):755-66.
- 110 Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Loch C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol*. 2000;36(3):762-71.
- 111 Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(12):4498-510.
- 112 Oelemann MC, Fontes AN, Pereira MA, Bravin Y, Silva G, Degraeve W, et al. Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Community Health Centers of Rio de Janeiro City, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(4):455-62.
- 113 Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med*. 2003;349(12):1149-56.

- 114 Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1901-6.
- 115 Cowan A, Earnest DL, Ligozio G, Rojavin MA. Omeprazole-induced slowing of gastrointestinal transit in mice can be countered with tegaserod. *Eur J Pharmacol*. 2005;517(1-2):127-31.
- 116 Noguti EN, Leite CQ, Malaspina AC, Santos AC, Hirata RD, Hirata MH, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Parana in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(6):779-85.
- 117 Pereira AM, Santos LC, Fernandes HB, Alves SLA, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. Análise molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes em Goiânia, Goiás, por meio de RFLP-Is6110 e do loci MIRU-VNTR. *Rev Patol Trop*. 2013;42(3):275-88.
- 118 Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Herránz M, Sanchez-Benitez M, Barroso P, INDAL-TB group, et al. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol*. 2008;8:34.
- 119 Liu J, Tong C, Liu J, Jiang Y, Zhao X, Zhang Y, et al. First Insight into the Genotypic Diversity of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Gansu. Province, China. *PLoS One*. 2014;9(6):e99357.
- 120 Allix-Béguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1398-406.
- 121 Lazzarini LC, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, et al. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage That Is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):3891-902.
- 122 Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2869-73.
- 123 Dou HY, Tseng FC, Lu JJ, Jou R, Tsai SF, Chang JR, et al. Associations of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes with different ethnic and migratory populations in Taiwan. *Infect Genet Evol*. 2008;8(3):323-30.
- 124 Dou HY, Huang SC, Su IJ. Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan: a model for strain evolution linked to population migration. *Int J Evol Biol*. 2011;937434.
- 125 Coll F, Mc Nerney R, Guerra-Assunção JA, Glynn JR, Perdigão J, Viveiros M, et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat Commun*. 2014;5(4812).
- 126 Mendes NH. Genotipagem por Spoligotyping e MIRU de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar [dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2010.
- 127 Pitondo-Silva A, Santos AC, Jolley KA, Leite CQ, Darini AL. Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 2013;93(1):42-8.
- 128 Santos ACB, Gaspareto RM, Viana BHJ, Mendes NH, Pandolfi JRC, Cardoso RF, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-population structure shift in a 5-year molecular epidemiology surveillance follow-up study in a low endemic agro-industrial setting in São Paulo, Brazil. *Int J Mycobacteriol*. 2013;2(3):156-65.
- 129 Malaspina AC. Genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis* utilizando RFLP e Spoligotyping em associação com MIRU para avaliar a epidemiologia molecular da tuberculose no município de Araraquara-SP [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2009.
- 130 Von Groll A, Martin A, Stehr M, Singh M, Portaels F, Silva PE, et al. Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. *PLoS One*. 2010;5(4):e10191.