

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

LUIS FELIPE NUNES

**Caracterização genética das linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes
circulantes no estado de Santa Catarina nos anos de 2013 a 2017**

FLORIANÓPOLIS
2019

LUIS FELIPE NUNES

**Caracterização genética das linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes
circulantes no estado de Santa Catarina nos anos de 2013 a 2017**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito para a obtenção do título de Bacharel em
Farmácia
Orientador: Profa. Dra Maria Luiza Bazzo

FLORIANÓPOLIS
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nunes, Luis Felipe
Caracterização genética das linhagens de Mycobacterium
tuberculosis multirresistentes circulantes no estado de
Santa Catarina nos anos de 2013 a 2017 / Luis Felipe Nunes
; orientador, Maria Luiza Bazzo, 2019.
50 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, , Programa de Pós-Graduação em , Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. . 2. Tuberculose. 3. TB-MDR. 4. Spoligotyping. 5.
MIRU. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em . III. Título.

Dedico este trabalho ao meu tripé de sustentação: minha mãe (Andréa); minha avó (Lourdes); meu noivo (Diego). Que estiveram comigo em todos os momentos, com amor incondicional, suportando cada abalo e me permitindo seguir.
Ao Nick, *in memoriam*, mais que um cão, um amigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à vida e aos astros por todas as pessoas maravilhosas que foram trazidas para a minha vida e que de alguma forma ajudaram a construir quem eu sou hoje. Essa conquista também é de vocês.

Agradeço ao meu noivo, Diego, por ter estado ao meu lado em momentos de alegrias e momentos nebulosos. Por me encorajar a continuar em todas as incertezas e minhas dúvidas de que eu era capaz. Por ter oferecido amor e carinho nos momentos necessários e os puxões de realidade quando estava viajando em pensamentos negativos. Por ter entrado em minha vida, em um momento difícil e ter mostrado que é possível enxergar a luz no fim do túnel. Com fé e amor. Amo você!

Agradeço à minha família, principalmente minha mãe e minha avó, por proporcionarem aquilo que é de mais puro e verdadeiro, o amor incondicional. Por me apoiarem durante todos esses anos de vida, da maternidade até mais essa conquista, a tão sonhada e esperada graduação. Meu mais sincero e profundo “Obrigado, por tudo!”, literalmente TUDO! Não posso esquecer de citar o pedacinho de gente que veio alegrar nossas vidas, a minha afilhada, Lara. Meu irmão, que sempre esteve presente nos momentos que eu precisei, incomodando como sempre. E minhas cunhadas, Regina e Indianara, pelos momentos de risos e descontração.

Ao meu cão, Nick, pelos longos anos de companhia na vida e nos estudos. Por estar sempre com sono estava coladinho ao meu corpo nas noites de estudo intenso, apenas para dizer “estou aqui, vai dar tudo certo”. Você é a estrela mais linda e brilhosa do céu. Saudades! E ao Darth, o cão que em pouco tempo em minha vida foi capaz de aloprar ainda mais ela. Ao pug mais doido e que me faz muito feliz.

Agradeço aos amigos que a vida me proporcionou durante as diferentes caminhadas e jornadas de minha vida. Por compreenderem os momentos de ausência, ou não compreenderem, mas aceitarem meu jeito. Por estarem sempre prontos por me escutarem quando as coisas não iam bem, ou convidarem para dar uma distraída das provas e trabalhos intermináveis da graduação em Farmácia.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza, por proporcionar a realização deste trabalho e poder participar do LBMMS. Aproveito para agradecer aos meus colegas de laboratório pelos ensinamentos durante todos esses anos de laboratório e pesquisa.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do HEMOSC, onde tive a oportunidade de fazer estágio. Agradecer pela dedicação, carinho, ensino e descontração proporcionados.

RESUMO

O estado de Santa Catarina apresenta uma taxa de incidência de tuberculose de 26,8 casos por 100 mil habitantes no período de 2010 a 2015. Entretanto, algumas regiões apresentam taxas maiores que a média nacional (>33,5/100 mil habitantes). Estudos anteriores realizados no estado de Santa Catarina mostraram predominância da família LAM circulante, inclusive em isolados resistentes, sendo essencial estudo de isolados para entender a dinâmica de transmissão de isolados multirresistentes no estado. Este estudo é uma parceria do Laboratório de Biologia Molecular Microbiologia e Sorologia (LBMMS/CCS/UFSC) com o Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC). O estudo incluiu isolados MDR do Estado de Santa Catarina no período avaliado (2013-2017), correspondendo a 63 isolados de *Mycobacterium tuberculosis*. A resistência simultânea à rifampicina e isoniazida, caracterizam a multirresistência. A epidemiologia molecular foi caracterizada pela análise combinada do *spoligotyping* e MIRU. Os 63 isolados foram classificados em 14 SITs, 13 subfamílias e quatro famílias, sendo que três isolados apresentaram perfil desconhecido e um isolado perfil *Orphan* (subfamília T2). A família LAM foi a mais prevalente (75%), seguida pela família T (14%), Harleem (5%) e EAI (2%). Quatro SITs (2263, 42, 106 e 73) compreenderam 71% dos isolados, sendo todos correspondentes à família LAM (LAM9, LAM7 e LAM5); já a subfamília LAM9 foi responsável por 52% dos isolados. O dendrograma construído pela análise combinada do MIRU e *spoligotyping* identificou nove *clusters* (100% similaridade) e 13 GIR (Grupo de Infecção Recente) (90-99% de similaridade). O maior *cluster* foi formado por 18 isolados do SIT2263 (LAM9), o segundo maior formado por oito isolados do SIT106 (LAM7). Sendo que os maiores GIRs são formados por nove isolados da subfamília LAM7 e outro com 31 isolados da LAM9 e um T1, correspondendo a 52,3% do total de isolados (33/63). A classificação dos isolados manteve proporções semelhantes durante os quatro anos estudados. O trabalho foi fundamental para determinar os perfis epidemiológicos de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes no estado de Santa Catarina, identificando a família LAM como principal família e como subfamílias LAM9 (SIT2263 e SIT42) e LAM7 (SIT106).

Palavras chave: Tuberculose, TB-MDR, *spoligotyping*, MIRU.

ABSTRACT

Santa Catarina State has a tuberculosis incidence rate of 26.8 cases per 100 thousand inhabitants. However, some regions have higher rates than the national average (>33.5/100 thousand inhabitants). Previous studies conducted in Santa Catarina State showed predominance of the LAM lineage circulating strains, including resistant isolates, being essential study of isolates to understand the transmission dynamics of multiresistant isolates in the state. This study is a partnership between the Laboratório de Biologia Molecular Microbiologia e Sorologia (LBMMS / CCS / UFSC) and the Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN / SC). The study included MDR isolates from Santa Catarina State during the evaluated period (2013-2017), corresponding to 63 isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Simultaneous resistance to rifampicin and isoniazid characterizes multidrug-resistance. Molecular epidemiology was characterized by the combined analysis of spoligotyping and MIRU. The 63 isolates were classified into 14 SITs, 13 sublineages and four lineages, and three isolates had unknown profile and one isolate Orphan profile (sublineage T2). The LAM lineage was the most prevalent (75%), followed by the T superfamily (14%), Harleem (5%) and EAI (2%). Four SITs (2263, 42, 106 and 73) comprehended 71% of isolates, all corresponding to the LAM lineage (LAM9, LAM7 and LAM5); The LAM9 sublineage was responsible for 52% of isolates. The dendrogram constructed by the combined analysis of MIRU and spoligotyping identified nine clusters (100% similarity) and 13 Recent Infection Group (GIR) (90-99% similarity). The largest cluster consisted of 18 isolates from SIT2263 (LAM9), the second largest consisting of eight isolates from SIT106 (LAM7). The largest GIRs consisted of nine isolates of the LAM7 sublineage and one with 31 isolates of LAM9 and one T1, corresponding to 52.3% of the total isolates (33/63). The isolates classification maintained similar proportions during the four years studied. The work was fundamental to determine the epidemiological profiles of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina State, identifying the LAM lineage as the main family and as sublineages LAM9 (SIT2263 and SIT42) and LAM7 (SIT106).

Keywords: Tuberculosis, TB-MDR, *spoligotyping*, MIRU.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE	17
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO	17
2.3	EPIDEMIOLOGIA	18
2.4	TRATAMENTO	19
2.5	DIAGNÓSTICO	20
2.6	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	21
3	OBJETIVOS	25
3.3	OBJETIVO GERAL	25
3.4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	AMOSTRAS UTILIZADAS	27
4.2	METODOLOGIA	27
4.2.1	Cultura	27
4.2.2	Extração de DNA	28
4.2.3	Spoligotyping	28
4.2.4	MIRU-VNTR	29
4.2.5	Análise dos resultados	32
5	RESULTADOS	33
5.1	AMOSTRAGEM	33
5.2	SPOLIGOTYPING	33
5.3	ANÁLISE COMBINADA DO MIRU COM O SPOLIGOTYPING	35
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa e transmissível, causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, que afeta primordialmente os pulmões (BRASIL, 2018). É um microrganismo de forma bacilar com a característica de ser álcool ácido resistente (BARRERA, 2007). A doença pulmonar que possui como forma de transmissão a via aérea, ocorre por inalação de aerossóis produzidos pela tosse, fala ou espirro do paciente bacilífero. A TB está entre as dez principais causas de morte no mundo, acometendo milhões de pessoas a cada ano, sendo a terceira causa de mortes por doenças infecciosas no Brasil (BRASIL, 2017; CAMPOS, 2006; YATES et al., 2016).

Em 2018, cerca de 10 milhões de pessoas desenvolveram TB no mundo, e a estimativa de óbitos foi de 1,2 milhão em pessoas HIV soro-negativas, com acréscimo de cerca de 250 mil mortes de pessoas HIV soro-positivas (WHO, 2019). No Brasil, foram diagnosticados, em 2018, 95 mil casos da doença, sendo que desses, 4,8 mil (HIV soro-negativas) e 1,9 mil (HIV soro-positivas) evoluíram a óbito (WHO, 2019). Nesse cenário, pela nova classificação da OMS 2016-2020, o Brasil ocupa a vigésima colocação entre os 30 países prioritários para TB, responsáveis por 80% dos casos mundiais e a 19ª posição na lista dos 30 países prioritários para TB-HIV (BRASIL, 2017). Já a incidência de casos no estado de Santa Catarina (SC), entre os anos de 2010-2015, foi de 26,8 casos por 100 mil habitantes (geral) e 22,5/100.000 habitantes (pulmonar) (TABNET/DIVE/SC).

Os antimicrobianos de primeira linha (esquema básico) recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tratamento da TB são: Rifampicina (R), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z) e Etambutol (E). Dividido em duas fases, o esquema básico dura seis meses, nos primeiros dois meses (fase de ataque) há a combinação dos quatro antimicrobianos (2RHZE), seguido por quatro meses (fase de consolidação) com a utilização simultânea de rifampicina e isoniazida (4RH) (BRASIL, 2011; RABAHI et al., 2017; WHO, 2018).

O fenótipo TB MDR (TB-*multi-drug-resistant* ou TB-multirresistente aos fármacos) é caracterizado pela resistência simultânea à rifampicina e isoniazida, que são os dois fármacos mais efetivos no tratamento da infecção (WHO, 2016, 2018). Estima-se que em 2017, 558 mil pessoas no mundo desenvolveram TB resistente à Rifampicina (RR-TB), sendo 82% desses classificados como resistente à múltiplas drogas (TB-MDR). Assim, a resistência aos fármacos continua sendo um problema de saúde pública (WHO, 2018). De 2008 a 2017 houve aumento

de 212% no número de casos notificados de TB-MDR no Brasil e de 169% no estado de Santa Catarina (TABNET/DIVE/SC, 2017).

O diagnóstico laboratorial da TB baseia-se nos métodos bacteriológicos clássicos de baciloscopia e cultura, e mais recentemente em metodologia molecular com amplificação de ácidos nucleicos. O teste rápido molecular (TRM) é recomendado pela Organização Mundial da Saúde por melhorar a sensibilidade e por diminuir, pela metade, o tempo médio de diagnóstico da TB (BOEHME et al., 2011; BRASIL, 2011).

Por outro lado, a genotipagem de isolados clínicos de *M. tuberculosis* tem se tornado uma ferramenta padrão no estudo epidemiológico e investigação da estrutura populacional de isolados clínicos locais e globais (NIEMANN; SUPPLY, 2014; SUPPLY et al., 2006). Em 1997, Kamerbeek e colaboradores (1997) descreveram a técnica denominada *Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping)*, que é baseada em amplificação de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de hibridização, e possibilita o agrupamento de padrões de acordo com a similaridade, explorando o polimorfismo existente no *locus* DR entre os diferentes isolados. Já a genotipagem baseada no MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) caracteriza as estirpes de *M. tuberculosis* pelo número e tamanho das unidades de repetição intercaladas (JAGIELSKI et al., 2016; NIEMANN; SUPPLY, 2014; SUPPLY et al., 2000, 2006). Sendo assim, as metodologias de *spoligotyping* e MIRU-VNTR têm sido muito utilizadas simultaneamente por aumentar o poder discriminatório da genotipagem (JAGIELSKI et al., 2016).

A genotipagem de isolados clínicos de *M. tuberculosis* pode contribuir para a compreensão da epidemiologia da TB e ajudar a aprimorar informações a respeito da dinâmica de transmissão, diferenciar recidiva de reinfecção, investigar e confirmar a ocorrência de surtos, detectar contaminação cruzada laboratorial e identificar os clones de maior ocorrência, inclusive aqueles de TB-MDR (BARNES; CAVE, 2003; TESSEMA et al., 2013).

O presente estudo é uma colaboração da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com o Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC) que propôs avaliar a dinâmica de transmissão dos isolados de TB-MDR em Santa Catarina utilizando as metodologias de *Spoligotyping* e MIRU-VNTR. Com isso, pode colaborar com o desenvolvimento de estratégias para controle da disseminação da multirresistência no Estado, resultando em ações práticas para identificar as rotas de transmissão e identificar possíveis grupos clonais de resistência aos antimicrobianos, contribuindo para o controle da doença, além de poder apontar estratégias para melhorar a eficácia do tratamento, visto que o monitoramento genético é uma ferramenta importante para os programas de controle da TB.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE

A forma de transmissão da TB pulmonar é por via aérea, através da inalação de aerossóis produzidos pela tosse, fala ou espirro do paciente bacilífero (CAMPOS, 2006; YATES et al., 2016). Os bacilos são carregados através das gotículas formadas de 1,0 a 5,0 μm de diâmetro (aerossóis) contendo normalmente entre um e dois microrganismos, que, ao serem inaladas, passam pela árvore brônquica, chegando aos alvéolos pulmonares. Assim que os bacilos atingem os alvéolos, alcançam a circulação sanguínea e no retorno do bacilo ao pulmão, local onde iniciará o processo infeccioso, e se conseguirem sobreviver às defesas primárias, podem ser capazes de causar, em 5% dos casos, infecção aguda (TB primária) ou serem fagocitados por macrófagos e seus antígenos são apresentados aos linfócitos T. Na tentativa de conter a disseminação dos bacilos os macrófagos e linfócitos T formam o granuloma, que pode evoluir para a cura (*ghost*) ou pode sofrer um processo de necrose, causando a depressão da atividade metabólica dos bacilos, levando a forma de infecção latente. Entretanto, eles são capazes de multiplicar-se dentro do granuloma e assim reativar a infecção caso haja comprometimento da atividade imune do indivíduo, levando à infecção aguda. A evolução da TB latente para doença ativa pode levar anos após a infecção primária. A probabilidade de o granuloma evoluir para tuberculose pulmonar ativa depende de fatores relacionados às características do bacilo e às defesas imunes do indivíduo (CAMPOS, 2006; CDC, 2013; PANDOLFI et al., 2007).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

M. tuberculosis pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) (*M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygis*), agentes causais de TB. *M. tuberculosis* é o principal agente causador de TB em humanos (ALEXANDER et al., 2010; CDC, 2013; COSCOLLA et al., 2013; JAGIELSKI et al., 2016; PANDOLFI et al., 2007; VAN INGEN et al., 2012).

É um microrganismo de forma bacilar, levemente curvado ou reto, imóvel, não esporulado, não encapsulado, de 0,2 a 0,6 µm de largura e 1 a 10 µm de comprimento e pode apresentar fragmentações quando submetido a estresse (CAMPOS, 2006; MAGEE; WARD, 2015; PANDOLFI et al., 2007). Assim como, o grupo é caracterizado por serem bacilos álcool ácido resistentes (BARRERA, 2007).

Em cultura, na maioria dos meios sólidos, suas colônias são ásperas, elevadas e grossas com superfície enrugada e com coloração esbranquiçada a amarelo fraco. Possui temperatura ótima de crescimento a 37°C e, a maioria das espécies, não coram bem pelo método de Gram, mas podem ser consideradas Gram-positivas, pelas semelhanças na parede celular (CAMPOS, 2006; MAGEE; WARD, 2015).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A TB é uma doença infecciosa e transmissível, causada pela bactéria *M. tuberculosis*, que afeta primordialmente os pulmões, embora seja capaz de acometer outros órgãos e sistemas (TB extrapulmonar) ou até se disseminar (TB miliar) (BRASIL, 2018; ZINK et al., 2007). Em 2015, a tuberculose pulmonar foi responsável pelo óbito em 76,7% dos casos, seguido da respiratória extrapulmonar (15,3%), miliar (4,5%), tuberculose de outros órgãos (2,0%) e do sistema nervoso (1,6%) (BRASIL, 2017).

A TB está entre as dez principais causas de morte no mundo, acometendo milhões de pessoas a cada ano, sendo a terceira causa de morte por doenças infecciosas no Brasil. Em pessoas vivendo com HIV/AIDS, esse número é ainda maior, sendo a primeira causa de morte (BRASIL, 2017). Segundo a Portaria Ministerial nº 204 (2016), a TB é uma doença de notificação compulsória e de investigação obrigatória em todo o território nacional.

Em 2018, 10 milhões de pessoas desenvolveram TB no mundo. Dessas, 5,8 milhões eram homens, 3,2 milhões mulheres e os demais, crianças (1,0 milhão), sendo que a estimativa de óbitos foi cerca de 1,5 milhão, incluindo 251 mil pessoas HIV soro-positivas (WHO, 2019). No Brasil, foram diagnosticados, em 2018, 95 mil casos da doença, sendo que desses, 6,7 mil evoluíram a óbito (WHO, 2019).

Nesse cenário, pela nova classificação da OMS 2016-2020, o Brasil ocupa a vigésima colocação entre os 30 países prioritários para TB, responsáveis por 80% dos casos mundiais e a 19ª posição na lista dos 30 países prioritários para TB-HIV (BRASIL, 2017). Já a incidência de casos no estado de Santa Catarina (SC), entre os anos de 2010-2015, foi de 22,5/100.000

habitantes (pulmonar). A tuberculose é uma das principais causas de mortalidade entre pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA), sendo que a infecção pelo HIV configura-se importante fator de risco para infecção ativa por *M. tuberculosis* em pessoas com infecção latente causada por *M. tuberculosis* (WHO, 2012, 2017).

A incidência de casos no estado de Santa Catarina (SC), entre os anos de 2010-2015, foi de 26,8/100.000 habitantes (todas as formas de TB) e de 22,5/100.000 habitantes (pulmonar) (TABNET/DIVE/SC). O estado apresenta baixas taxas de incidência de TB, entretanto algumas regiões possuem números iguais ou superiores aos da média dos estados brasileiros (33,5 casos/100.000) (BRASIL, 2018). É o caso de cinco regiões que também apresentaram incidência maior que a taxa do estado: Foz do Rio Itajaí (49,2/100.000 habitantes), Grande Florianópolis (40,2/100.000 habitantes), Carbonífera (32,5/100.000 habitantes), Nordeste (31,9/100.000 habitantes) e Médio Vale do Itajaí (28,3/100.000 habitantes) (BRASIL, 2016b; TABNET/DIVE/SC).

2.4 TRATAMENTO

Os antimicrobianos de primeira linha (esquema básico) recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tratamento da TB são: Rifampicina (R), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z) e Etambutol (E). O tratamento, que dura seis meses, é dividido em duas fases, nos primeiros dois meses (fase de ataque), há a combinação dos quatro antimicrobianos (2RHZE), seguida por quatro meses (fase de consolidação) com a utilização simultânea de dois antimicrobianos (4RH). Esse esquema é o mesmo adotado pelo Ministério da Saúde no Brasil (BRASIL, 2011; RABAHI et al., 2017; WHO, 2018). Em 2018, das 10 milhões de pessoas acometidas pela TB no mundo, 7 milhões reportaram ter acesso ao tratamento, mais que os 6,4 milhões em 2017. E estima-se que três milhões de pessoas não foram diagnosticadas ou não reportaram a doença (WHO, 2019).

A não adesão ao tratamento e/ou a falha terapêutica representam as maiores ameaças ao controle da disseminação da doença, podendo promover a seleção de bactérias mutantes resistentes. O fenótipo TB-MDR (TB-*multi-drug-resistant* ou TB-multirresistente aos fármacos) é simultaneamente resistente à rifampicina e isoniazida, que são os dois fármacos mais efetivos para o tratamento da doença, sendo que, a utilização de antimicrobianos alternativos tem resposta mais lenta e menos efetiva na eliminação do bacilo (WHO, 2016, 2018). Os casos de resistência a esses dois fármacos (TB-MDR), associados à resistência a uma fluoroquinolona e ainda a pelo menos um dos três fármacos injetáveis de segunda linha

(amicacina, canamicina ou capreomicina) são classificados como TB extensivamente resistente (XDR-TB) (RABAHI et al., 2017; WHO, 2018).

Estima-se que em 2017, 558 mil pessoas no mundo desenvolveram TB resistente à Rifampicina (RR-TB), sendo 82% classificados como resistente à múltiplas drogas (TB-MDR). Assim, a resistência aos fármacos continua sendo um problema de saúde pública (WHO, 2018).

Com a demora na negativação da baciloscopia a TB-MDR tem grande potencial de disseminação, devido à persistência do bacilo viável no escarro por tempo prolongado, aumentando a probabilidade de contaminação dos contatos (WHO, 2016). Desta forma, os casos de TB-MDR estão aumentando gradativamente com os passar dos anos. De 2008 a 2017 houve aumento de 212% no número de casos notificados de TB-MDR no Brasil. Nesse mesmo período, especificamente no estado de Santa Catarina, houve um aumento de 169% no número de casos de TB MDR (TABNET/DIVE/SC, 2017).

O tratamento para multirresistência tem tempo mais longo que o esquema básico. O regime para a maioria dos pacientes com TB-MDR leva de 18 a 24 meses de tratamento, sendo que nos primeiros seis meses, fase intensiva, é associado pelo menos um fármaco injetável e em algumas situações é necessário utilizar antimicrobianos injetáveis por períodos maiores (BRASIL, 2011).

Em 2018, 500 mil pessoas contraíram TB resistente aos fármacos, sendo que uma em cada três pessoas não tiveram acesso ao tratamento de segunda linha. Dos tratados, apenas 56% obtiveram sucesso terapêutico (WHO, 2019).

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial da TB baseia-se nos métodos bacteriológicos clássicos de baciloscopia e cultura, e mais recentemente em metodologia molecular com amplificação de ácidos nucleicos. A baciloscopia consiste na pesquisa de bacilos em esfregaço da amostra clínica corado pelo método de Ziehl-Neelsen (BRASIL, 2011). É uma técnica adotada em muitos laboratórios clínicos por ser bastante simples e de baixo custo, porém apresenta sensibilidade limitada (40-60%) (STEINGART et al., 2006).

A cultura, considerada padrão ouro para diagnóstico laboratorial de TB, é realizada a partir da semeadura de diversos tipos de amostras clínicas e possibilita a identificação, a diferenciação de micobactéria não tuberculosa (MNT) e realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA). Entretanto, é uma técnica mais laboriosa e demorada, sendo possível

detectar o crescimento a partir da 3ª semana após a inoculação em meio de cultura sólido (à base de ovo, principalmente os meios Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh) e a partir do 5º dia em meio líquido. É um método mais sensível e específico que a baciloscopia e pode detectar a partir de 10 a 100 bacilos viáveis por mL de amostra. (BRASIL, 2002).

O teste rápido molecular (TRM) é recomendado pela Organização Mundial da Saúde por melhorar a sensibilidade e poder diminuir o tempo médio de diagnóstico da TB pela metade. O Ministério da Saúde (MS) fez investimentos para implementação dessas tecnologias a fim de realizar um diagnóstico rápido com início imediato do tratamento dos casos de TB. Dois testes são citados pelo MS: LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) (Hain Lifescience, GMBH, Alemanha) que utiliza técnica de amplificação isotérmica, mostrando sensibilidade de 48% nas amostras negativas à baciloscopia e com especificidade de 94 a 99%, todas em amostras respiratórias; e Xpert™ MTB/Rif da plataforma GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) que apresentou sensibilidade de 90% em amostras de TB pulmonar negativas à baciloscopia e especificidade de 97,9%. Esse último, por sua vez, foi implantado pelo Ministério da Saúde no Brasil. É um teste automatizado baseado em metodologia de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real capaz de fornecer resultados de identificação de *M. tuberculosis* em menos de duas horas, essencial para diminuir transmissão e morbidade da TB. Além disso, identifica a presença ou ausência de mutações que caracterizam resistência à Rifampicina, sendo extremamente importante para conduta de tratamento imediato a fim de ter maior sucesso terapêutico de casos de TB-MDR (BOEHME et al., 2011; BRASIL, 2011).

2.6 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A genotipagem de isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* tem se tornado uma ferramenta padrão no estudo epidemiológico e investigação da estrutura populacional de isolados clínicos locais e globais (NIEMANN; SUPPLY, 2014; SUPPLY et al., 2006).

Um dos primeiros testes descritos foi baseado na técnica Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP-PCR) utilizando enzimas de digestão em sequências de inserção (ISs) das micobactérias. Essas sequências são pequenos elementos genéticos móveis que codificam apenas a sua capacidade de transposição e regulação. O ensaio RFLP mais utilizado para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* – CMTB, utiliza a IS6110. Desde quando essa metodologia foi descrita, laboratórios por todo o mundo a implementaram na rotina, já que possui um elevado poder discriminatório, fácil reprodutibilidade e por isso vem

sendo considerada “padrão ouro” na tipagem de bactérias do CMTB. Entretanto, é um método trabalhoso e demorado, além de necessitar grandes quantidades de DNA de alta qualidade para digestão pela enzima de restrição, necessitando cultura e *softwares* caros (JAGIELSKI et al., 2016; NIEMANN; SUPPLY, 2014; SUPPLY et al., 2006).

Em 1997, Kamerbeek e colaboradores utilizaram como marcadores a estrutura do *locus* DR (*Direct Repeats*), que representa uma grande família de repetições de DNA, denominadas CRISPR (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas), subdividindo *M. tuberculosis* em famílias ou linhagens. O grupo descreveu a técnica denominada *Spacer oligonucleotide typing* (*Spoligotyping*), que é baseada em reação de amplificação (reação em cadeia da polimerase – PCR) seguida de hibridização, e possibilita o agrupamento de padrões de acordo com a similaridade, explorando o polimorfismo existente no *locus* DR entre os diferentes isolados. Mudanças neste *locus* são quase neutras e ocorrem por consecutivas deleções irreversíveis de uma única unidade ou em blocos contíguos. Porém, *Spoligotyping* é menos discriminatório que o IS6110-RFLP para isolados com elevados números de cópias da IS6110 e sua limitação deve-se ao fato de usar um único *locus* como alvo, cobrindo apenas 0,1% do genoma do CMTB, enquanto IS6110 se distribui por todo o genoma das micobactérias. O *Spoligotyping* sozinho geralmente não é suficiente para estudos epidemiológicos, sendo recomendada outra técnica associada (JAGIELSKI et al., 2016; NIEMANN; SUPPLY, 2014; SUPPLY et al., 2000, 2006).

Uma técnica de genotipagem indicada é o MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*). O genoma micobacteriano possui várias unidades de repetição intercaladas que são detectadas por essa técnica. A genotipagem baseada no MIRU caracteriza as estirpes de *M. tuberculosis* pelo número e tamanho das unidades de repetição. Pode ser baseada em 12, 15 e/ou 24 MIRUs independentes, utilizando PCR seguida de algum método de separação, como a eletroforese em gel, para determinação desses parâmetros. O método possui um alto poder discriminatório, é rápido, sensível, fácil, de elevada reprodutibilidade e possibilidade de automação (SUPPLY et al., 2000). A utilização em conjunto das duas metodologias, *spoligotyping* e MIRU-VNTR, aumenta o poder discriminatório da genotipagem (JAGIELSKI et al., 2016).

A genotipagem de isolados clínicos de *M. tuberculosis* pode contribuir para a compreensão da epidemiologia da TB e ajudar a aprimorar informações a respeito da dinâmica de transmissão, diferenciar recidiva de reinfecção, investigar e confirmar a ocorrência de surtos, detectar contaminação cruzada laboratorial e identificar os clones de maior ocorrência, inclusive aqueles de TB-MDR (BARNES; CAVE, 2003; TESSEMA et al., 2013).

Existe uma grande diversidade genética dentro do próprio complexo *M. tuberculosis*, sendo constituído por sete linhagens principais (COMAS et al., 2013). Entre elas destaca-se, pela relevância no Brasil, a linhagem Euro-Americana, que é composta pelas famílias Haarlem, LAM (Latino-Americana e Mediterrânea), S, T e X. As famílias LAM, Haarlem e T são as mais frequentes na América do Sul, América Central e África, correspondendo a 80% de todos os isolados brasileiros (BRUDEY et al., 2006; FURLANETO et al., 2013).

Um estudo realizado por Gomes e colaboradores (2012) demonstrou que a família LAM é predominante (46%) no Brasil. É possível observar números semelhantes em SC, demonstrado em estudos de epidemiologia da TB realizados no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia LBMMS/ACL/CCS/UFSC, nos quais se verificou que há predominância da família LAM na população catarinense em geral (47,5%) (NOGUEIRA et al., 2016), em isolados multirresistentes (45,3%) (PRIM et al., 2015) e em isolados provenientes das unidades prisionais do Estado (43,6%) (MEDEIROS et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar genotipicamente as linhagens de *M. tuberculosis* multirresistentes circulantes nas diferentes regiões do estado de Santa Catarina entre os anos de 2013 a 2017.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar os isolados de *M. tuberculosis* MDR circulantes no estado de Santa Catarina pelas técnicas de *spoligotyping* e MIRU-VNTR;
- Comparar os perfis genéticos de resistência identificados nos isolados MDR do estado de SC com os perfis de família mais frequentes no Brasil e no mundo;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo transversal analítico retrospectivo, com inclusão de todos os isolados TB-MDR circulantes no Estado de Santa Catarina de um período de quatro anos. Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia LBMMS/ACL/CCS, localizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) na cidade de Florianópolis, SC.

4.1 AMOSTRAS UTILIZADAS

O estudo incluiu todos os 63 isolados MDR de *M. tuberculosis* provenientes de todo o Estado de Santa Catarina, enviados ao Setor de Tuberculose do Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC), referência estadual para realização de antibiograma de TB, entre os anos de 2013 e 2017.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Cultura

As colônias obtidas de culturas puras em meio sólido ou líquido no LACEN, são armazenadas em *ependorf* com água ultrapura, e conservadas em freezer -20°C após a realização do antibiograma. Alíquotas provenientes do banco de *M. tuberculosis* do LACEN/SC, enviadas ao LBMMS, foram semeadas em meio sólido Ogawa-Kudoh - OK (Laborelin, Brasil) para isolamento da bactéria e posterior extração do DNA e realização dos testes moleculares. As culturas em meio OK foram incubadas inclinadas, a 37° +/-1°C por 20 a 30 dias, sendo observados semanalmente para verificação de crescimento bacteriano. As colônias puras foram submetidas à extração de DNA.

4.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pela metodologia descrita por van Soolingen e colaboradores (1994), método enzimático que utiliza CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Um inóculo bacteriano equivalente a uma alça de 10 µL foi transferido para 400 µL de TE 1X (10 mM Tris/1,0 mM EDTA, pH 8,0) em criotubos com tampa rosca. A suspensão foi inativada em bloco térmico a 90°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de lisozima (10mg/mL) e os tubos foram incubados *overnight* a 37°C. No dia seguinte, foram adicionados 75 µL da solução SDS (10%)/proteínase K (10 mg/mL) e os tubos foram incubados a 65°C por 10 minutos. Após, foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e 100 µL da solução CTAB/NaCl (10g/4,1g/100 mL), seguido de incubação a 65°C por 10 minutos. Passado o tempo de incubação foram adicionados 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), que com homogeneização por inversão e por vórtex, seguida de centrifugação (7250 x g por 5 minutos), possibilitou a separação das fases. A fase aquosa (contendo o DNA) foi transferida para um tubo tipo *ependorf*, sendo o DNA precipitado pela adição de 600 µL de isopropanol (proporção 1:1) seguido de resfriamento *overnight* a -20°C. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados (7250 x g) por 15 minutos. O isopropanol foi removido e ao DNA precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado (peso/peso), que após homogeneização delicada foi centrifugado e o sobrenadante desprezado. Após essa etapa de lavagem o *pellet* de DNA foi seco em temperatura ambiente e posteriormente reidratado em 50 µL de TE 1X e armazenado em alíquotas à temperatura de 4°C para uso imediato e a menos 80°C para estoque.

4.2.3 Spoligotyping

A técnica foi realizada como a descrita por Kamerbeek e colaboradores (1997), a partir de uma reação de PCR para amplificação das sequências espaçadoras entre duas DRs, utilizando-se os iniciadores DRa e DRb (Tabela 1). As condições da PCR foram 96°C por 3 minutos e 20 ciclos de 96°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos (KAMERBEEK et al., 1997).

Tabela 1: Iniciadores utilizados na PCR do *Spoligotyping*.

Iniciadores	Sequência do oligonucleotídeo
DRa	5'- GGTTTTGGGTCTGACGAC-3'-Biotina
DRb	5'- CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'

Para a hibridização na membrana de *spoligotyping*, os produtos amplificados foram incubados a 99°C por 10 minutos para abertura da dupla-fita e em seguida foram imediatamente resfriados em gelo. Após, foram diluídos em SSPE 2X (Na₂HPO₄.2H₂O 0,02 M, NaCl 0,36 M, EDTA 2 mM – pH 7,4) /SDS 0,1%. As amostras foram hibridizadas, com a ajuda de um *miniblotter*, com um conjunto de 43 oligonucleotídeos imobilizados em uma membrana de nylon comercial (Ocimun's Biosolutions - Índia), cada um correspondendo a uma das sequências únicas dos espaçadores dentro do *locus* DR. Após a aplicação, a membrana foi colocada em um forno giratório (Marconi, Brasil) por 60 minutos a 60°C. A membrana foi lavada 2 vezes em 250 mL de SSPE 2X/SDS 0,5% por 10 minutos a 60°C, em uma garrafa circular. Foi adicionada à garrafa estreptavidina- peroxidase (Roche – Suíça) diluída em SSPE 2X/SDS 0,5%, a qual foi incubada por 50 minutos a 35°C. Sucederam-se mais 2 lavagens da membrana em 250 mL de SSPE 2X-SDS 0,5% a 42°C por 10 minutos e 2 vezes com 250 mL de SSPE 2X à temperatura ambiente por 5 minutos. A detecção foi realizada pela sensibilização de um filme radiográfico, por meio de uma reação de quimiluminescência, utilizando o kit ECL™ (Amersham Biosciences - Inglaterra). A membrana foi transferida para um chassi/écran radiográfico (Konex – Brasil), colocada em contato com o líquido de detecção ECL™ e foi coberta com um filme radiográfico (Fujifilm - Japão). E após incubação de nove minutos realizou-se a revelação e fixação do filme.

Os dados foram inseridos em uma plataforma online para a obtenção dos resultados (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/) (KAMERBEEK et al., 1997).

4.2.4 MIRU-VNTR

Para realização do MIRU-VNTR foram realizadas as amplificações das sequências de 15 *loci* do genoma de *M. tuberculosis* a partir do DNA das estirpes isoladas (Tabela 2) (MAZARS et al., 2001; SUPPLY et al., 2006). As condições de amplificação compreendem uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 40 ciclos de 94°C (desnaturação) por 1 min, 59°C (pareamento) por 1 min e 72°C (extensão) por 1,5 min; e uma extensão final a 72°C por 10 min (SUPPLY et al., 2000, 2006). A separação por tamanho dos produtos amplificados foi realizada

por eletroforese em gel de agarose 2%. Os géis foram corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV) no ImagenQuant LAS500 (GE Healthcare, EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado em comparação com os marcadores de tamanho molecular 100 pb *ladder* (Ludwig – Brasil) utilizados juntamente na eletroforese. Para expressão dos resultados foram utilizados os números de alelos correspondentes aos produtos amplificados obtidos, formando 15 diferentes MIRUs. Cada um pode apresentar de 0 a 15 alelos por *locus* (Tabela 3).

Tabela 2 Iniciadores que foram utilizados na reação de PCR MIRU (SUPPLY et al., 2006).

MIRU	Iniciadores utilizados para a PCR
04	04F - 5'-GCGCGAGAGCCCCGAAGTGC -3' 04R - 5'-GCGCAGCAGAAACGCCAGC -3'
10	10F - 5'-GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC -3' 10R - 5'-GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT -3'
16	16F - 5'-TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA -3' 16R - 5'-CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC -3'
26	26F - 5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC -3' 26R - 5'-CATAGGCGACCAGGCGAATAG -3'
31	31F - 5'-ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA -3' 31R - 5'-GTGCCGACGTGGTCTTGAT -3'
40	40F - 5'-GGGTTGCTGGATGACAACGTGT -3' 40R - 5'-GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA -3'
Mtub04	Mtub04F - 5'-CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT-3' Mtub04R - 5'-GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC -3'
Mtub21	Mtub21F - 5'-AGATCCCAGTTGTCGTCGTC -3 Mtub21R - 5'-CAACATCGCCTGGTTCTGTA -3
Mtub30	Mtub30F - 5'-CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT -3 Mtub30R - 5'-ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA -3
Mtub39	Mtub39F - 5'-CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC -3' Mtub39R - 5'-TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG -3'
ETR A	ETR A F - 5'-AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT -3' ETR A R - 5'-CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT -3'
ETR C	ETR C F - 5'-CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT -3' ETR C R - 5'-AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA -3'
QUB-26	QUB-26F - 5'- AACGCTCAGCTGTCGGAT -3' QUB-26R - 5'-CGGCCGTGCCGCGCCAGGTCCTTCCCGAT -3'
QUB-11b	QUB-11bF - 5'-CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG -3' QUB-11bR - 5'-CGAAGTGAATGGTGGCAT -3'
QUB-4156	QUB-4156F - 5'-TGACCACGGATTGCTCTAGT -3 QUB-4156R - 5'-GCCGGCGTCCATGTT -3

Tabela 3: Expressão dos resultados do MIRU de acordo com o produto amplificado.

Alelo	Mtub 04	ETRC	MIRU 04	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	Mtub 21	QUB 11b	ETRA	Mtub 30	MIRU 26	MIRU 31	Mtub 39	QUB 26	QUB 4156
0	537	171	175	354	482	565	92	77	195	247	285	492	272	187	563
1	588	208	252	408	537	618	149	146	270	305	336	545	330	298	622
2	639	266	329	462	590	671	206	215	345	363	387	598	388	409	681
3	690	324	406	516	643	724	262	284	420	421	438	651	446	520	740
4	741	382	483	570	696	777	320	353	495	479	489	704	504	631	799
5	792	440	560	624	749	830	377	422	570	537	540	757	562	742	858
6	843	498	637	678	802	883	434	491	645	595	591	810	620	853	917
7	894	556	714	732	855	936	491	560	720	653	642	863	678	964	976
8	945	614	791	786	908	989	548	629	795	711	693	916	736	1075	1035
9	996	672	868	840	961	1042	605	698	870	769	744	969	794	1186	1094
10	1047	730	945	894	1014	1095	662	767	945	827	795	1022	852	1297	1153
11	1098	788	1022	948	1067	1148	719	836	1020	885	846	1075	910	1408	1212
12	1149	846	1099	1002	1120	1201	776	905	1095	943	897	1128	968	1519	1271
13	1200	904	1176	1056	1173	1254	833	974	1170	1001	948	1181	1026	1630	1330
14	1251	962	1253	1110	1226	1307	890	1043	1245	1059	999	1234	1084	1741	1389
15	1302	1020	1330	1164	1279	1360	947	1112	1320	1117	1050	1287	1142	1852	1448

A diversidade alélica do MIRU foi estimada pelo Índice Discriminatório de Hunter-Gaston (HGDI - *Hunter-Gaston Discriminatory Index*) (HUNTER; GASTON, 1988). A plataforma MIRU-VNTR *plus* foi utilizada para a análise molecular dos resultados, identificação de *cluster* e a construção de árvore filogenética (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>).

4.2.5 Análise dos resultados

Para a construção do dendrograma de similaridade da combinação dos métodos MIRU e *spoligotyping*, foi utilizado o site miru-vntrplus.org por meio do método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Para fins epidemiológicos, os perfis obtidos foram correlacionados com os dados de resistência aos antimicrobianos.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAGEM

Foram incluídos 63 isolados provenientes do Setor de Tuberculose do Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC) caracterizadas com resistência simultânea a Rifampicina e Isoniazida (TB-MDR) no período entre 2013 e 2017 de todo o estado de Santa Catarina. Todas as amostras foram submetidas à cultura, semeadas em ágar Ogawa-Kudoh (Laborclin, Brasil), dessas, 13 não evidenciaram crescimento e foram submetidas novamente à cultura e tiveram crescimento satisfatório. Todas as amostras seguiram para análise molecular.

5.2 SPOLIGOTYPING

Entre os 63 isolados incluídos no estudo, 59 foram agrupados em 14 SIT (Shared-types ou *Spoligotype International Type*) diferentes. Os outros 4 apresentaram perfis desconhecidos (3) ou perfil classificado como *Orphan* (1). Dentre os 63 *spoligotypes* foram identificadas 4 famílias, 13 subfamílias e 14 SITs diferentes.

Dentre as famílias às quais os isolados foram classificados, a mais prevalente foi a família LAM, com 47 isolados, seguida pelas famílias T e Harleem, com nove e três isolados respectivamente e família EAI com um isolado.

Em relação aos SITs, o mais prevalente foi o SIT 2263 (LAM9) com 21 isolados, seguido pelos SITs 42 (LAM9) com 12 isolados, 106 (LAM7) com nove isolados e 73 (T) com três isolados.

Os resultados agrupados por família e subfamília estão representados na Figura 1, já os resultados completos do *spoligotyping* constam na Tabela 4.

5.3 ANÁLISE COMBINADA DO MIRU COM O *SPOLIGOTYPING*

Além da análise por meio do *spoligotyping* foram determinados os alelos de cada MIRU para os 63 isolados incluídos no estudo. Para esses isolados foram obtidos 26 diferentes perfis, sendo um grande número de perfis únicos, verificou-se repetição apenas para um grupo de 20 isolados e para outro de oito isolados. Os diferentes perfis e o número correspondente à quantidade de isolados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5: Diferentes perfis de MIRU obtidos para os 63 isolados MDR circulantes em SC.

Perfil do MIRU	Número de isolados
3 4 3 2 3 3 1 4 4 2 5 2 3 9 2	1
4 4 2 3 4 3 2 4 2 2 3 3 1 7 2	8
2 4 2 3 4 3 2 4 2 2 3 3 1 7 2	1
3 2 2 3 4 3 3 4 2 2 5 3 1 4 2	1
4 4 2 1 4 1 3 3 2 1 5 3 2 8 2	20
4 4 2 1 4 1 2 3 2 1 5 3 2 8 2	2
4 4 2 1 4 1 3 3 2 1 5 2 2 8 2	1
4 4 2 1 4 1 3 3 2 1 5 3 2 6 2	1
0 4 2 1 3 1 3 4 2 1 4 3 2 9 2	3
0 4 2 1 2 1 3 4 2 1 4 3 2 9 2	1
3 4 2 1 3 1 3 4 2 1 4 3 2 9 2	4
0 4 2 1 3 1 3 4 2 1 4 3 2 4 2	1
3 4 2 6 4 3 3 2 2 1 5 3 2 7 3	1
3 4 2 5 4 3 3 2 2 1 5 3 2 7 3	1
3 4 2 4 4 3 2 2 2 1 4 3 2 3 3	1
3 4 2 1 4 3 2 2 2 1 4 3 2 3 3	1
3 4 2 1 4 2 3 2 2 1 6 3 2 6 2	1
3 4 2 4 2 3 3 2 2 1 5 2 2 5 2	1
3 4 2 2 4 3 3 2 2 1 4 2 2 3 2	3
3 2 2 3 5 3 2 3 3 4 5 3 3 5 3	2
2 4 2 4 3 3 2 3 3 2 5 3 3 5 2	1
2 3 2 5 4 2 3 4 3 4 5 4 6 8 3	1
2 4 2 1 4 3 2 4 3 4 6 2 2 7 3	1
2 4 2 1 4 3 2 4 3 4 6 2 2 8 3	3
2 3 2 3 4 3 5 5 3 4 4 3 3 7 3	1
2 3 4 3 4 3 5 9 9 2 3 3 4 1 1	1

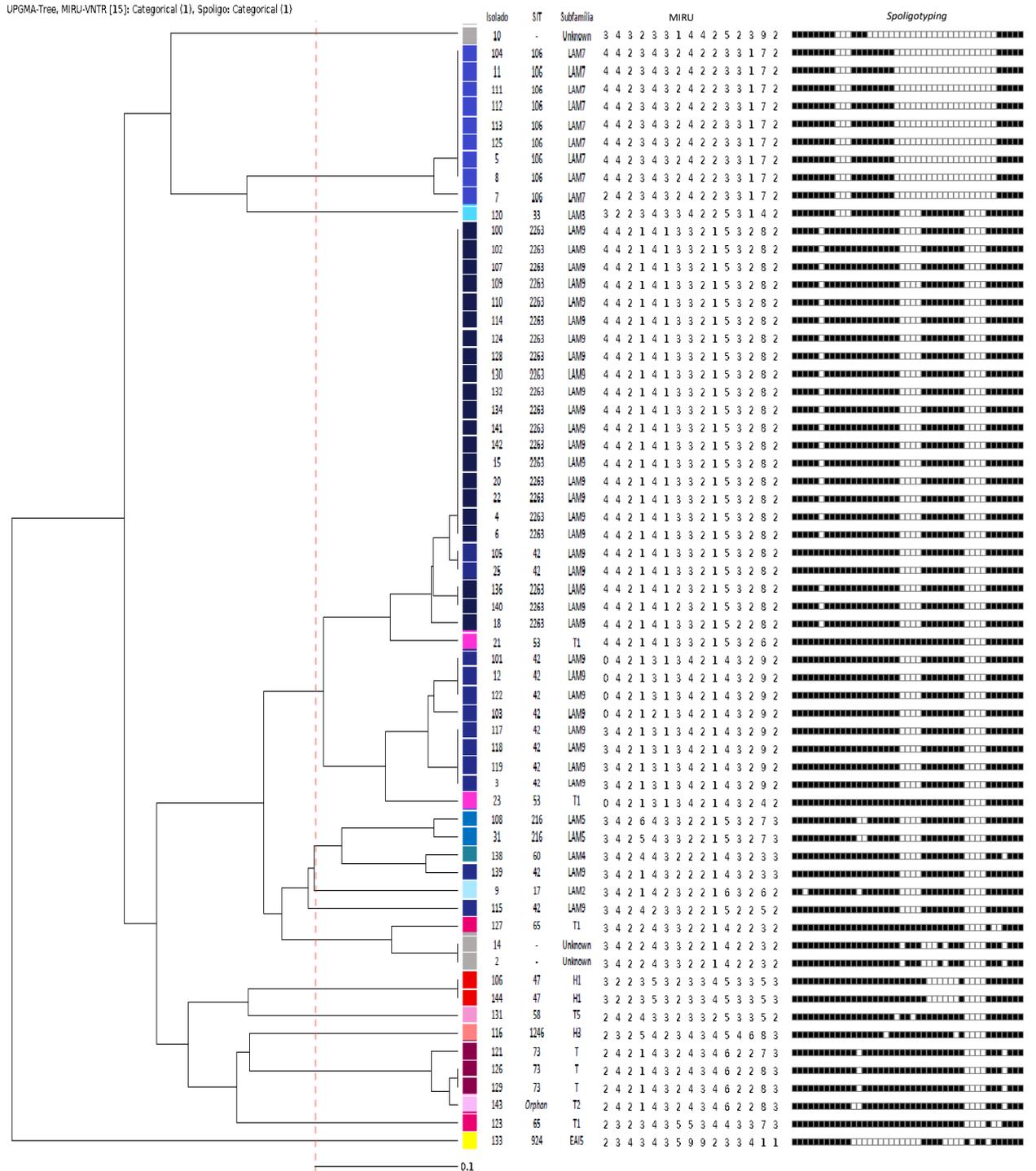
Com base no HGDI foi possível determinar grande diversidade alélica ($HGDI > 0,6$) no MIRU26, Mtub04, QUB-11b e QUB-26 ($HGDI \geq 0,6477$). Foram encontradas oito diversidades alélicas moderadas ($HGDI$ de 0,3 a 0,6) entre os *locus* do MIRU e três com baixa diversidade ($HGDI < 0,3$) com o MIRU04, MIRU31 e ETRC (DEMAY et al., 2012). Para cada um dos MIRUs é possível verificar o número de alelos, número de repetições e o HGDI estimado na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros relacionados à diversidade alélica para cada *locus* do MIRU.

MIRU	Número de alelos	Número de repetições	HGDI
04	3	2-3-4	0,063
10	4	2-3-4-5	0,3738
16	3	1-2-3	0,5356
26	4	3-4-5-6	0,6477
31	3	2-3-4	0,298
40	6	1-2-3-4-5-6	0,5689
Mtub 04	4	0-2-3-4	0,6528
Mtub 21	4	1-2-3-5	0,5028
Mtub 30	3	1-2-4	0,5049
Mtub 39	5	1-2-3-4-6	0,4419
ETRA	4	2-3-4-9	0,3026
ETRC	3	2-3-4	0,1797
QUB-11b	5	2-3-4-5-9	0,6482
QUB-26	8	1-3-4-5-6-7-8-9	0,7527
QUB-4156	3	1-2-3	0,339

Utilizando a plataforma MIRU-VNTR *plus* foi construído um dendrograma de similaridade para os 63 isolados que foram analisados pelo MIRU e *spoligotyping*, sendo possível verificar a formação de *clusters* (grupos clonais com 100% de similaridade) e GIR (Grupo de Infecção Recente) (similaridade de 90% a 99,9%). A partir dele foram obtidos 13 GIRs e 43 isolados formaram nove *clusters*. O primeiro *cluster* é formado por oito isolados da subfamília LAM7 – SIT 106. Já o segundo *cluster* é constituído por 18 isolados da subfamília LAM9 – SIT 2263. O terceiro, quarto, quinto e sexto *clusters* foram formados respectivamente por dois isolados da subfamília LAM9 - SIT 42; dois da LAM9 – SIT 2263; três da LAM9 – SIT 42 e quatro da LAM9 – SIT 42. O sétimo *cluster* é formado por dois isolados com perfil desconhecido. O oitavo *cluster* por dois isolados da subfamília H1 – SIT 47 e dois isolados da subfamília T – SIT 73 formam o último *cluster*. O agrupamento dos *clusters* e os 13 GIRs obtidos no dendrograma podem ser observados na Figura 2.

Figura 2: Dendrograma de similaridade UPGMA da análise combinada do *spoligotyping* com o MIRU dos 63 isolados MDR circulantes no estado de SC.



Legenda: A linha tracejada representa 90% de similaridade, definida como o valor mínimo para grupos de infecção recente (GIR). LAM: *Latin America Mediterranean*. H: Harleem. Cada uma das cores corresponde a uma família, apresentando variação de tonalidade para cada uma das subfamílias.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a família LAM foi a mais encontrada entre os 14 diferentes padrões de *spoligotyping* com 75% dos isolados (47/63), seguida pela família T com 14% (9/63), Harleem com 5% (3/63) e EAI com apenas um isolado (2%). Além disso, três isolados (5%) apresentaram perfil desconhecido. Sendo que as famílias LAM, T e Harleem representaram cerca de 94% dos isolados, o que se assemelha bastante ao perfil esperados para isolados Sul-americanos, visto que essas três famílias são responsáveis por mais de 90% dos isolados dessa região, conforme informação do próprio banco SITVITWEB que foi utilizado para nossas análises (DEMAY et al., 2012). Entretanto, a frequência da família LAM foi superior se comparada com outros estudos realizados no estado de SC, que encontraram 47,5% na população geral, 43,6% na população carcerária, 45,3% em isolados resistentes e 62,1% na população da região da capital do estado e cidade adjacente, Florianópolis e São José (NOGUEIRA et al., 2016; MEDEIROS et al., 2018; PRIM et al., 2015; SCHEFFER, 2017). Esse fato refletiu números inferiores no caso das famílias T e Harleem em comparação com esses estudos, apresentando uma variação de 18,5-25,9% e 2,1-12,3%, respectivamente. Porém, todos encontraram essas três famílias como as mais prevalentes e nessa mesma sequência, exceto o estudo de Medeiros e colaboradores (2018), que encontrou a família S como a terceira mais frequente e após a Harleem (NOGUEIRA et al., 2016; MEDEIROS et al., 2018; PRIM et al., 2015; SCHEFFER, 2017). Em estudos realizados em outros estados do país também pôde ser observado o mesmo padrão de prevalência da família LAM sobre as demais, como no Rio de Janeiro (43,6%), Rio Grande do Sul (47,61%), Pará (41,02%) e em um estudo nacional com isolados de 11 estados brasileiros (46%), não incluindo o estado de SC (CONCEIÇÃO et al., 2017; ESTEVES et al., 2018; GOMES et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014). Além disso, todos encontraram como mais prevalentes e na ordem decrescente as famílias LAM, T e Harleem (CONCEIÇÃO et al., 2017; ESTEVES et al., 2018; GOMES et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014). Em um estudo realizado com isolados da fronteira do Brasil com Paraguai e Argentina, essas proporções também se mantiveram (ALMEIDA et al., 2018).

A maioria desses estudos apresentou número predominante de isolados sensíveis aos antimicrobianos nas análises o que pode ser responsável pela diferença encontrada no presente estudo (75% LAM), o estudo de Perizzolo e colaboradores (2012) mostrou que há uma predominância da família LAM em isolados TB-MDR (58,8%). Estudos utilizando isolados TB-MDR no Rio Grande do Sul (65,6%), Minas Gerais (66,34%) e África do Sul (78%) mostram porcentagens superiores, o que poderia justificar a alta proporção de isolados

classificados como da família LAM neste estudo (DANTAS et al., 2015; LANZAS et al., 2013; SALVATO et al., 2019). No estudo com isolados TB-MDR realizado em Minas Gerais, as proporções das famílias LAM, T e Harleem assemelharam-se muito dos valores obtidos em nosso estudo, sendo: 66,34%; 14,42; 5,76; respectivamente (DANTAS et al., 2015).

Embora a família LAM esteja bastante relacionada com a região Latino-Americana, Lopes e colaboradores (2013) encontraram similaridade de isolados circulantes em SC e em Portugal. Isso pode ser explicado devido ao grande fluxo migratório de portugueses para o Brasil no século XVI e da colonização de algumas regiões de SC por portugueses no século XVIII (DAVID et al., 2007; LOPES et al., 2013; MEDEIROS et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2016; SCHEFFER, 2017). No estudo realizado com a população geral do estado de SC verificou-se grande circulação de isolados da família LAM, especialmente da subfamília LAM9, na Região Metropolitana de Florianópolis (9,6%), Vale do Itajaí (7,9%) e Norte (7,7%), sendo que isolados TB-MDR dessa subfamília foram encontrados nessas regiões (NOGUEIRA et al., 2016). Já Scheffer e colaboradores (2017) identificaram 16,4% (36/219) de isolados da subfamília LAM9 nas duas principais cidades da Região Metropolitana de Florianópolis. Em nosso estudo observou-se que as regiões com mais isolados referentes à mesma subfamília estão situadas nestas mesmas macrorregiões do estado de Santa Catarina.

Outro fluxo migratório importante ocorrido no estado de SC foi o de italianos no século XIX. Estudos mostram grande prevalência das famílias T e Harleem na Itália, sendo essas as duas famílias mais frequentes em nosso estudo após a LAM (BONURA et al., 2014; GARZELLI et al., 2010; LARI et al., 2007). Corroborando com essa ideia de fluxos migratórios, em nosso trabalho, os isolados encontrados da família T são predominantemente de regiões que receberam imigrantes italianos. Assim como o isolado classificado como *Orphan* da família T2 é proveniente de uma dessas regiões, no sul do estado de SC, e segundo o dado depositado no banco de dados SITVITWEB o isolado *Orphan* apresenta resultados para o *spoligotyping* semelhantes a um isolado descrito na Itália, depositado em 2004 por Garzelli. O isolado é classificado como *Orphan* por ter sido descrito uma única vez, não apresentando um SIT próprio por não dividir (*shared-type*) com outro isolado. Quando outro padrão igual é descrito e comprovado, passa a dividir um mesmo padrão e terem um SIT único. Já a família EAI, que não é muito frequente no Brasil representando 0,85% dos isolados nacionais, se mostrou circulante em baixa frequência também no estudo realizado com a população geral de SC (2,5%) e em nosso estudo (2%), sendo todos os isolados de SC pertencentes à subfamília EAI5 (GOMES et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2016).

Os SITs mais encontrados foram o 2263, 42, 106 e 73 englobando cerca de 71% dos isolados, sendo que os três primeiros são classificados como sendo da família LAM. Os SITs 2263 (21/63; 33%) e 42 (12/63; 19%) juntos representam mais da metade dos isolados deste estudo, somando 52% e sendo ambos classificados como da subfamília LAM9. Desta forma, este estudo não só demonstra que a família LAM encontra-se mais prevalente no estado de SC em amostras TB-MDR, mas também que a subfamília LAM9 é a principal responsável por isolados MDR. Sendo assim, esse é outro fato que corrobora com a justificativa de que os isolados da família LAM, subfamília LAM9, e principalmente os SITs 42 e 2263, estão mais relacionados com isolados identificados como TB-MDR. Nos estudos realizados em SC que apresentaram algum isolado TB-MDR, em sua maioria foram classificados como pertencendo à família LAM, subfamília LAM9. Nos presídios três de quatro isolados TB-MDR eram da subfamília LAM9 (dois do SIT42 e um do SIT2263), na população em geral oito de 23 isolados TB-MDR eram da subfamília LAM9 (quatro SIT42 e quatro SIT2263), sendo que o SIT2263 só foi encontrado em isolados TB-MDR (MEDEIROS et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2016). No estudo de Prim e colaboradores (2015), que utilizou isolados resistentes do estado de Santa Catarina do período de 2008 a 2012, sete dos 53 isolados MDR corresponderam ao SIT2263 (13,2%), enquanto que em nosso estudo 21 dos 63 isolados corresponderam ao mesmo SIT (33,3%). Esses dados mostram um aumento da prevalência de 2,5 vezes para o SIT2263 entre esses dois períodos consecutivos, identificando um potencial crescimento e disseminação desse clone. No estudo realizado no período de 2008 a 2012, Prim e colaboradores (2015) já haviam encontrada correlação entre a mutação *rpoB* S531W (relacionada com resistência à rifampicina) com a família LAM, demonstrando também possível disseminação clonal por parte dos isolados do SIT2263. Nosso estudo conseguiu demonstrar que essa disseminação clonal realmente tem acontecido com potencial sucesso por parte deste SIT no estado de SC. As proporções dos outros SITs mantiveram-se semelhantes entre os dois estudos: SIT106 (18,5%); SIT42 (16,3%). Já o SIT 73 mostrou uma queda da prevalência pela metade, sendo em nosso estudo de 4,8% e no estudo anterior de 10,9% (PRIM et al., 2015).

O SIT106 também foi bastante predominante nos estudos realizados no estado, 17 isolados no estudo realizado em SC com *M. tuberculosis* resistentes e três dos 23 isolados TB-MDR do estudo sobre a população geral, sendo o primeiro e o terceiro SIT mais encontrados, respectivamente (NOGUEIRA et al., 2016; PRIM et al., 2015). Em nosso estudo, utilizando como base o SITVITWEB, o SIT106 foi classificado na subfamília LAM7. Entretanto, em estudos mais antigos, não foi agrupado por não se relacionar com nenhuma família bem caracterizada. Anteriormente o SIT106 era classificado como sendo da subfamília U (likelyH3),

em uma penúltima revisão passou a não ser classificado (*unknown*), sendo tratado em muitos estudos como um SIT isolado e em revisões recentes passou a ser classificado como pertencendo à subfamília LAM7 (MEDEIROS et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2016; PRIM et al., 2015). Assim, como o SIT106 foi o terceiro mais encontrado em nosso estudo, pode ter sido corresponsável por aumentar os valores de prevalência da família LAM.

Com o cálculo do HGDI foi possível determinar que a maioria dos *loci* de nosso estudo apresentaram diversidade moderada (8), alguns com diversidade baixa (3) e outros com diversidade elevada (4), segundo classificação do estudo de Devi e colaboradores (2015) que enquadra como baixa diversidade ($HGDI < 0,3$), diversidade moderada ($HGDI$ de 0,3 a 0,6) e elevada ($HGDI > 0,6$). Os *loci* MIRU26, Mtub04, QUB-11b e QUB-26 mostraram-se como sendo os melhores marcadores, apresentando maior diversidade alélica com quatro, cinco e nove alelos diferentes cada um e $HGDI \geq 0,6477$. Alguns *loci* apresentaram quatro alelos diferentes, porém uma baixa variabilidade, sendo considerados de moderada diversidade como nos MIRU10 (0,3738), Mtub21 (0,5028) e ETRA (0,3026).

Com base em nossos resultados que mostraram predominância da família LAM, em comparação com o estudo do banco de dados do SITVITWEB, os *loci* do MIRU16 (0,606), MIRU26 (0,644) e MIRU40 (0,782) deveriam apresentar uma elevada diversidade. O nosso estudo, apesar de reproduzir valores semelhantes ($HGDI = 0,5356$; $0,6477$; e $0,5689$, respectivamente), segunda essa escala, os *locus* MIRU16 e MIRU40 enquadraram-se como moderada diversidade (DEMAY et al., 2012). Já os *loci* do MIRU04, MIRU31 e ETRC foram os com piores índices de diversidade, sendo semelhante aos valores obtidos pelo estudo sobre a base SITVITWEB (DEMAY et al., 2012). No estudo realizado no estado de SC com isolados resistentes, não foi encontrada variabilidade no *loci* do MIRU04, semelhante ao nosso estudo, e diferente do estudo do banco de dados que mostrou baixa a moderada diversidade para a família LAM (DEMAY et al., 2012; PRIM et al., 2015). Entretanto, podemos verificar pequenas diferenças comparativas, visto que o estudo de Demay e colaboradores (2012) analisou os isolados separadamente por família e nós avaliamos um índice estimado, utilizando o padrão familiar mais comum de nossos isolados (apesar de 75% de nossos isolados serem da família LAM). Além disso, Demay e colaboradores (2012) utilizaram 92 isolados, enquanto o nosso estudo incluiu 63 isolados, podendo subestimar nossos valores.

Na análise combinada do MIRU com o *spoligotyping* foram formados nove *clusters* e 13 GIR. O primeiro GIR é formado por um único isolado com perfil não classificado. Já o segundo é formado por nove isolados da subfamília LAM7 – SIT106, sendo que os oito primeiros formam um *cluster*, apresentando diferença do outro isolado apenas no número de

alelos do *loci* Mtub21 (os primeiros tendo quatro e o isolado único tendo dois alelos). O terceiro GIR é composto por um único isolado da subfamília LAM3. O quarto é o maior GIR, englobando 52,3% dos isolados (33/63) compreendendo 31 isolados da subfamília LAM9 e dois da T1. Dentro dele há um *cluster* formado por 18 isolados do SIT2263, outro *cluster* formado por dois isolados do SIT42, um terceiro *cluster* contendo dois isolados do SIT2263 (diferindo do primeiro *cluster* por apresentar apenas dois alelos no *loci* do Mtub21 ao invés de três), um isolado SIT42 (com seis alelos em vez de oito no QUB-26), um *cluster* contendo três isolados do SIT42, um último *cluster* com quatro isolados do SIT42 (diferindo do anterior por conter três alelos no *loci* Mtub04, enquanto o anterior apresentou nenhum) e dois isolados únicos do SIT53. O quinto é composto por dois isolados da subfamília LAM5 (SIT206), um da LAM4 (SIT60), um da LAM9 (SIT42) e um da LAM2 (SIT17), nenhum deles formando *cluster*. O sexto GIR é composto por um isolado único do SIT42, apresentando diferença no Mtub04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, QUB-11b e QUB-26 em relação à maioria dos isolados do mesmo SIT. Já o sétimo GIR é formado por um isolado da subfamília T1 e dois isolados com perfil desconhecido, sendo que esses dois compõem um *cluster*. O oitavo GIR, que também forma um *cluster*, é composto por dois isolados da subfamília H1. O nono e o décimo GIRs são compostos por um único isolado da subfamília T5 e um da subfamília H3, respectivamente. O décimo primeiro GIR é composto por dois isolados da subfamília T (SIT73) que formam um *cluster*, um isolado da família T (SIT73) que difere dos outros dois por apresentar sete alelos no QUB-26 ao invés de oito, e um isolado da família T2 classificado como *Orphan*. O décimo segundo GIR é composto por um isolado da subfamília T1 e o décimo terceiro apresenta um isolado da subfamília EAI5 que não foi relacionado com nenhum outro isolado.

Nosso estudo utilizou isolados TB-MDR de quatro anos consecutivos (2013-2017). Durante esse período foram evidenciadas proporções semelhantes entre o aparecimento de casos por macrorregiões específicas e também de subfamílias específicas, não sendo possível encontrar um aumento ou decréscimo de casos em determinadas regiões ou de subfamílias específicas causando a doença.

7 CONCLUSÃO

O *spoligotyping* identificou 14 SITs diferentes, três perfis desconhecidos (*unknown*) e um perfil *Orphan*. Dentre os 63 isolados deste estudo foi possível diferenciar 4 famílias, 13 subfamílias e 14 SITs diferentes. A família mais prevalente foi a LAM (47 isolados), seguida pela T (9) e Harleem (3), representando cerca de 94% do total de isolados. No *spoligotyping*, entre os SITs encontrados, o mais comum foi o SIT2263 (LAM9), seguido pelo SIT42 (LAM9) e SIT106 (LAM7).

Pelo cálculo do HGDI os *loci* MIRU26, Mtub04, QUB-11b e QUB-26 demonstraram maior diversidade alélica, enquanto os MIRU04, MIRU31 e ETRC obtiveram as menores diversidades.

Foram identificados 26 padrões diferentes de MIRU, sendo que 20 isolados apresentaram um padrão igual e muitos isolados apresentaram um padrão único. Na análise combinada entre *spoligotyping* e MIRU foi possível determinar 13 GIRs e nove *clusters*.

Este trabalho foi fundamental para determinar os perfis epidemiológicos moleculares dos isolados MDR de *M. tuberculosis* circulantes no estado de Santa Catarina entre os anos de 2013 e 2017, identificando a família LAM como principal família e as subfamílias LAM9 (SIT2263 e SIT42) e LAM7 (SIT106).

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, K. A. et al. Novel mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. Mungi. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1296–1299, 2010.
- ALMEIDA, A. L. DE et al. RDRio Mycobacterium tuberculosis lineage in the Brazil/Paraguay/Argentina triple border. **Tuberculosis**, 2018.
- BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis in Peru. **Epidemiologia molecular de la tuberculosis en el Peru.**, v. 15, n. 1, p. 6–16, 2003.
- BARRERA, L. The Basics of Clinical Bacteriology. In: PALOMINO, JUAN CARLOS; LEÃO, SYLVIA CARDOSO; RITACCO, V. (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires: [s.n.].
- BOEHME, C. C. et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: A multicentre implementation study. **The Lancet**, v. 377, n. 9776, p. 1495–1505, 2011.
- BONURA, C. et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Sicily , Italy : what has changed after a decade ? **BMC Infectious Diseases**, n. November, p. 1–9, 2014.
- BRASIL. **Manual Técnico para o Controle da Tuberculose Cadernos de Atenção Básica nº 6**. [s.l.] MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002.
- BRASIL. **MANUAL DE RECOMENDAÇÕES PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE NO BRASIL**. [s.l: s.n.].
- BRASIL. **PORTARIA no 204 DE FEVEREIRO DE 2016**, 2016a.
- BRASIL. **Boletim Epidemiológico: Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública** Boletim Epidemiológico. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/24/2016-009-Tuberculose-001.pdf>>.
- BRASIL. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Apresentação reduzida**. [s.l: s.n.].
- BRASIL. **Saúde de A a Z**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/tuberculose>>.
- BRUDEY, K. et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: Mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 1–17, 2006.
- CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29–35, 2006.
- CDC. **Core Curriculum on Tuberculosis, Chapter 2: Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. Sixth edition**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/minorityhealth/populations/atrisk.html>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

COMAS, I. et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1176–1182, 2013.

CONCEIÇÃO, E. C. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Pará, Brazil, reveals a higher frequency of ancestral strains than previously reported in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 56, n. March, p. 62–74, 2017.

COSCOLLA, M. et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 969–976, 2013.

DANTAS, N. G. T. et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais. **BMC Infectious Diseases**, p. 1–11, 2015.

DAVID, S. et al. Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 609–617, 2007.

DEMAY, C. et al. Infection, Genetics and Evolution SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 755–766, 2012.

DEVI, K. R. et al. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Assam, India: Dominance of Beijing Family and Discovery of Two New Clades Related to CAS1 _ Delhi and EAI Family Based on Spoligotyping and MIRU-VNTR Typing. **PLoS ONE**, p. 1–20, 2015.

ESTEVES, L. S. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid monoresistant and multidrug-resistant in Rio Grande do Sul, a tuberculosis high-burden state in Brazil. **Tuberculosis**, 2018.

FURLANETO, I. P. et al. Genotipagem por spoligotyping de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos de lâminas de Ziehl-Neelsen em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 1, p. 33–41, 2013.

GARZELLI, C. et al. Impact of immigration on tuberculosis in a low-incidence area of Italy: a molecular epidemiological approach. **European Society of Clinical Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1691–1697, 2010.

GOMES, H. M. et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 649–656, 2012.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of clinical microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465–6, 1988.

JAGIELSKI, T. et al. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 239–290, 2016.

KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 907–914, 1997.

LANZAS, F. et al. Multidrug-Resistant Tuberculosis in Panama Is Driven by Clonal Expansion of a Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strain Related to the KZN Extensively Drug-Resistant M. tuberculosis Strain from South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3277–3285, 2013.

LARI, N. et al. Three-Year Longitudinal Study of Genotypes of Mycobacterium tuberculosis Isolates in Tuscany, Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1851–1857, 2007.

LOPES, J. S. et al. Infection, Genetics and Evolution SNP typing reveals similarity in Mycobacterium tuberculosis genetic diversity between Portugal and Northeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 238–246, 2013.

MAGEE, J. G.; WARD, A. C. **Mycobacterium. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

MAZARS, E. et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1901–1906, 2001.

MEDEIROS, T. F. et al. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis strains from prison populations in Santa Catarina, Southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 58, n. November 2017, p. 34–39, 2018.

NIEMANN, S.; SUPPLY, P. Diversity and evolution of Mycobacterium tuberculosis: Moving to whole-genome-based approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1–18, 2014.

NOGUEIRA, C. L. et al. First insight into the molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Santa Catarina, southern Brazil. **Tuberculosis**, v. 97, n. 2016, p. 57–64, 2016.

PANDOLFI, J. R. et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 251–257, 2007.

PERIZZOLO, P. F. et al. Characteristics of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in southern Brazil. **Tuberculosis**, v. 92, n. 1, p. 56–59, 2012.

PRIM, R. I. et al. Molecular profiling of drug resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis in the state of Santa Catarina, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 618–623, 2015.

RABAHI, M. F. et al. Tratamento da Tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 16, n. 1, p. 21–31, 2017.

SALVATO, R. S. et al. Molecular characterisation of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from a high-burden tuberculosis state in Brazil. **Epidemiology and Infection**, 2019.

SCHEFFER, M. C. INFLUÊNCIA DE FATORES DE RISCO DO PACIENTE E DE

CARACTERÍSTICAS DE *Mycobacterium tuberculosis* NO DESFECHO DOS CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE PULMONAR TRATADOS COM ESQUEMA BÁSICO: UMA COORTE PROSPECTIVA DE DOIS ANOS NA GRANDE FLORIANÓPOLIS/SC. 2017.

STEINGART, K. R. et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis : a systematic review. v. 6, n. October, 2006.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762–771, 2000.

SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498–4510, 2006.

TABNET/DIVE/SC. **Barriga Verde, Informativo Epidemiológico**. [s.l: s.n.].

TESSEMA, B. et al. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Northwest Ethiopia: New phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. no pagination, 2013.

VAN INGEN, J. et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 653–655, 2012.

VAN SOOLINGER, D. ET AL. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 196–204, 1994.

VASCONCELLOS, S. E. G. et al. Strain Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Brazil Based on Genotypes Obtained by Spoligotyping , Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing and the Presence of Large Sequence and Single Nucleotide Polymorphism. v. 9, n. 10, 2014.

WHO. **Global tuberculosis Report 2012**. [s.l: s.n.].

WHO. **Global tuberculosis Report 2016**. [s.l: s.n.].

WHO. **Global Tuberculosis Report**. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 5 abr. 2018.

WHO. **Global Health TB Report**. [s.l: s.n.].

WHO. **Global tuberculosis Report 2019**. [s.l: s.n.].

YATES, T. A. et al. The transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in high burden settings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 227–238, 2016.

ZINK, A. R. et al. Book Reviews. **South Asia**, v. 646, n. November 2006, p. 641–642, 2007.