



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECIOSAS**



**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM PACIENTES ATENDIDOS EM UM
CENTRO DE REFERÊNCIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

HILDA FERREIRA DE MELO

**MANAUS
2022**



HILDA FERREIRA DE MELO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM PACIENTES
ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador (a): Prof^o. Dr. Marcelo Cordeiro

Coorientador (a): Prof. Dra. Isabela Neves de Almeida

MANAUS

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

F383ee Melo, Hilda Ferreira de
Epidemiologia molecular da Tuberculose em pacientes atendidos em um centro de referência na Amazônia brasileira / Hilda Ferreira de Melo. Manaus : [s.n], 2022. 69 f.: il., color.; 29 cm.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

Inclui bibliografia
Orientador: Santos, Marcelo Cordeiro dos
Coorientador: Almeida, Isabela Neves de

1. Tuberculose. 2. WGS. 3. Amazônia. 4. Epidemiologia. I. Santos, Marcelo Cordeiro dos (Orient.). II. Almeida, Isabela Neves de (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Epidemiologia molecular da Tuberculose em pacientes atendidos em um centro de referência na Amazônia brasileira

FOLHA DE JULGAMENTO**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM PACIENTES
ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA****HILDA FERREIRA DE MELO**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Cordeiro pela oportunidade de aprendizado por todo o período.

A Prof. Dra. Isabela Almeida por não ter aceito o convite para me coorientar e não ter soltado a minha mão.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e à Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

Aos colaboradores de Porto Alegre-RS, em especial a Dra. Maria Lucia Rossetti, Leonardo Esteves, Richard Salvato e Dra. Elis Regina por todo apoio e ensinamentos durante as etapas práticas da realização deste estudo.

A todos os colaboradores da UFMG, em especial Dra. Silvana Spindola e Dra. Lida Jouca.

Ao Dr. Afrânio Kritski e toda sua equipe que foram essenciais na realização de uma das etapas deste projeto.

Ao Dr. Marco Schito e sua equipe pela importante colaboração.

A todos os meus amigos presentes nesta jornada, em especial ao Dr. Rajendranath Ramasawmy por ter sido sempre solícito e por ter me apresentado o meio científico.

A toda minha família pela paciência e compreensão.

À Deus por ter me ajudado a manter minha saúde, principalmente, mental.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Esse estudo foi desenvolvido através de recursos disponibilizados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e financiamento ReporTB Brazil.

RESUMO

A Tuberculose (TB) continua sendo a principal doença infecciosa a atingir mais de 10 milhões de pessoas por ano, ameaçando a saúde global, e a principal coinfeção que acomete os pacientes HIV/AIDS. Em 2021, o Amazonas registrou 2.728 novos casos de TB, destes 339 possuíam coinfeção TB/HIV. Manaus, a Capital do estado, registrou 1.999 novos casos, e incidência de 90,1 casos/100.000 mil habitantes, superior à média nacional. O Sequenciamento do Genoma Completo (WGS) é uma ferramenta poderosa para o fornecimento de informações do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), capazes de detectar variantes da sequência genômica para identificar fenótipos de resistência aos fármacos para TB, identificar as linhagens das cepas e reconhecer cepas geneticamente relacionadas para fins de monitoramento epidemiológico. O objetivo desse estudo foi caracterizar os genótipos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) isolados de amostras clínicas provenientes de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), utilizando três ferramentas moleculares distintas: MIRU-VNTR 24 *loci*, *Spoligotyping* e WGS. Foram analisados 68 isolados com predominância da Linhagem 4 (97,05%) e Linhagem 1 em dois isolados. As sublinhagens predominantes foram LAM (50%), Haarlem (19,11%) e X (11,76%). As mutações *rpoB* Ser450Leu e *katG* Ser315Thr, foram as mais frequentes entre os isolados resistentes a RIF e INH. Este é o primeiro estudo no Amazonas envolvendo três técnicas moleculares distintas, dentre elas o WGS. Este estudo demonstra que os genótipos circulantes na Amazônia brasileira são semelhantes aos circulantes nas demais regiões do Brasil, mas destacam a maior frequência da linhagem X em relação a outras regiões do país. Estes achados ressaltam a importância da vigilância epidemiológica constante dos isolados circulantes para melhor compreensão da dinâmica de transmissão, relação das linhagens com genótipos de resistência e coinfeção com o HIV e a necessidade de aplicação das técnicas de epidemiologia molecular da TB como ferramenta para vigilância epidemiológica.

PalavrasChaves: Tuberculose, WGS, Amazônia.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains the leading infectious disease to reach more than 10 million people a year, threatening global health, and the main co-infection that affects HIV/AIDS patients. In 2021 Amazonas recorded 2.728 new tb cases, of which 339 had TB/HIV co-infection. Manaus, the state capital, recorded 1.999 new cases, and incidence of 90.1 cases/100,000 inhabitants, higher than the national average. Complete Genome Sequencing (WGS) is a powerful tool for providing genome information from *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), capable of detecting genomic sequence variants to identify phenotypes of resistance to TB drugs, identify strain lines and recognize genetically related strains for epidemiological monitoring purposes. The aim of this study was to characterize the genotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (CMTB) isolated from clinical samples from patients treated at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), using three distinct soft tools: MIRU-VNTR 24 loci, Spoligotyping and WGS. We analyzed 68 isolates with predominance of Lineage 4 (97.05%) and Lineage 1 in two isolates. The predominant underscores were LAM (50%), Haarlem (19.11%) and X (11.76%). The *rpoB* Ser450Leu and *katG* Ser315Thr mutations were the most frequent among RIF and INH resistant isolates. This is the first study in the Amazon involving three distinct molecular techniques, among them WGS. This study demonstrates that the genotypes circulating in the Brazilian Amazon are similar to those circulating in other regions of Brazil, but highlight the higher frequency of lineage X in relation to other regions of the country. These findings highlight the importance of constant epidemiological surveillance of circulating isolates to better understand transmission dynamics, relationship of strains with resistance genotypes and co-infection with HIV and the need to apply molecular epidemiology techniques of TB as a tool for epidemiological surveillance.

Keywords: Tuberculosis, WGS, Amazonia.

RESUMO LEIGO

A Tuberculose (TB) é uma doença contagiosa que pode afetar os pulmões e qualquer outra parte do corpo. Manaus é a capital brasileira em destaque por ter muitos casos da doença. O estudo tem como objetivo descrever as características moleculares da TB, destacando detalhes importantes da família de micobactéria que mais afeta as pessoas e o perfil de sensibilidade dessas famílias, através de três técnicas moleculares distintas: o MIRU-VNTR 24 *loci*, *Spoligotyping* e Sequenciamento Completo do Genoma. Como resultado, obtivemos que a família LAM foi a mais frequente dentre os 68 indivíduos estudados, seguidas das famílias Haarlem e X. A maioria dos indivíduos eram do sexo masculino, tinham teste de HIV positivo. Dentre os sessenta e oito isolados de micobactéria que foram realizados o Sequenciamento Completo do Genoma, 57 foram sensíveis aos fármacos de primeira linha usados no tratamento da TB, 2 resistentes a Estreptomicina, 4 resistentes a Isoniazida (INH), 2 resistente à Rifampicina (RIF) e três MDR. As mutações *rpoB* Ser450Leu e *katG* Ser315Thr, foram as mais frequentes entre os isolados resistentes a RIF e INH, respectivamente. Também identificamos um isolado fenotipicamente sensíveis ao fármaco com a mutação *rpoB* Ile491Phe e outros dois isolados sensíveis apresentando alteração C>T na posição -15 do promotor *inhA/fabG1*. O estudo teve como limitação o número de cepas recuperadas por se tratar de um estudo retrospectivo e o não sequenciamento de todas as cepas por material insuficiente, prejudicando a análise de transmissão recente entre os indivíduos. Este estudo demonstra que as famílias de micobactérias circulantes na Amazônia brasileira são semelhantes aos das demais regiões do Brasil, mas destaca-se a maior frequência da linhagem X em relação a outras regiões do país. Estes achados ressaltam a importância da vigilância epidemiológica constante dos isolados circulantes para melhor compreensão da dinâmica de transmissão, relação das linhagens com genótipos de resistência e coinfeção com o HIV e a necessidade de aplicação das técnicas de epidemiologia molecular da TB como ferramenta para vigilância epidemiológica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Coeficiente de incidência de tuberculose por Unidade Federada.....	3
Figura 2 - Bacilos Álcool-Ácido resistentes visualizados sob coloração de ZN	3
Figura 3 – Culturas de OK positivas	4
Figura 4 - Teste de Sensibilidade a Estreptomicina (S), Isoniazida (I), Rifampicina (R) e Etambutol (E). A imagem mostra resistência a Estreptomicina.....	5
Figura 5 - Estrutura do locus DR no genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG P3. Os retângulos verdes representam a DR de 36 bp.....	7
Figura 6 - Esquema Básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes (≥ 10 anos)	10

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Número de BAAR observados nas baciloscopias, concentrações de bacilos cultiváveis nos escarros e probabilidade de resultados positivos	4
--	---

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

CMTB	Complexo Mycobacterium tuberculosis
CTAB/NaCl	Brometo de cetiltrimetilamônio/Cloreto de Sódio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DR	Direct Repeat
EBM	Etambutol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ILTB	Infecção Latente por Tuberculose
INH	Isoniazida
IS6110	Sequência de Inserção do CMTB
IS1081	Sequência de Inserção do Mycobacterium bovis
kb	Kilobyte
LJ	Löwenstein-Jensen
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator
MIRU	Mycobacterial Intersperced Repetitive Units
mL	Mililitro
MNT	Micobactérias não Tuberculosa
MS	Ministério da Saúde
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
NGS	Next Generation Sequencing
OK	Ogawa-Kudoh
pb	Pares de base
PZA	Piramizamida
RD	Região de diferença
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF	Rifampicina
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
SM	Estreptomicina
SNPs	Single Nucleotide Polimorphism

SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistência
TRM-TB	Teste Rápido Molecular para Tuberculose
TS	Teste de Sensibilidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µm	Micrômetro
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
WGS	Whole Genome Sequencing
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tuberculose.....	1
1.2. Epidemiologia da doença	2
1.3. Diagnóstico laboratorial da TB.....	3
1.4. Técnicas de genotipagem do <i>Mtb</i>	6
1.5. Linhagens predominantes no Brasil	8
1.6. Tratamento	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Geral.....	12
2.2. Específicos	12
3. PRODUTO DE DISSERTAÇÃO.....	13
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS.....	28
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS.....	34

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) que se mantém ao longo de 70 mil anos infectando milhões de pessoas mundialmente (1). A doença pode afetar qualquer pessoa e em qualquer lugar, porém afeta mais homens que mulheres, e ainda é estigmatizada por ser considerada a doença da pobreza, marginalização e da vulnerabilidade (2).

As micobactérias são bacilos não capsulados, não esporulados, imóveis, comum comprimento de 2 a 5 µm, sensíveis ao calor e à luz solar, e resistentes ao frio. Apresentam parede celular, que é quimicamente complexa, sendo composta principalmente por três macromoléculas: peptidoglicano, arabinogalactano e ácido micólico (3).

O *Mtb* é membro do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB), que inclui *Mycobacterium. bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium. africanum*, *Mycobacterium. canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium mungi* e *Mycobacterium caprae* (4). Estas espécies possuem 99,9% de similaridade em nível de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e sequências idênticas de Ácido Ribonucleico Ribossômico (rRNA) 16S, mas apresentam diferenças fenotípicas, genotípicas e conseqüentemente da capacidade de virulência patogênicidade (5).

A transmissão do *Mtb* ocorre de pessoa para pessoa através da inalação de partículas contendo bacilos expelidos pela tosse, fala ou espirro do doente com a forma ativa da doença, considerados principal fonte de infecção. Somente as partículas muito finas, contendo de 1 a 3 bacilos, alcançam os pulmões, onde geralmente são fagocitadas por macrófagos nos alvéolos (6). Os macrófagos de pessoas saudáveis tornam-se ativados pela presença dos bacilos, formando o tubérculo, que geralmente é neutralizado e cicatrizado, podendo caracterizar-se como Infecção Latente por Tuberculose (ILTb). Se o sistema imune do indivíduo estiver comprometida, o tubérculo se rompe e libera bacilos, tornando-o doente (7– 9).

A reativação da TB comumente ocorre entre os dois primeiros anos após

a infecção primária. Pacientes que vivem com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) não tratada possuem vinte vezes mais chances de reativação da doença por conta do decréscimo de células T CD4+ (10,11).

Apesar de o *Mtb* ter preferência pelo tecido pulmonar que é rico em oxigênio, a infecção pode se espalhar através de vasos linfáticos e circulação sanguínea para outros locais do corpo como pleura, meninges, ossos, sistema geniturinário, peritônio ou pele, também chamada de TB extrapulmonar (12).

1.2. Epidemiologia da doença

A TB continua sendo a principal doença infecciosa a atingir mais de 10 milhões de pessoas por ano, ameaçando a saúde global, apesar do número de mortes pela doença ter diminuído entre os anos 2000 e 2017 (13).

O Brasil encontra-se entre os 30 países com maior carga da doença no mundo. Este grupo corresponde a cerca de 90% dos casos de TB no mundo (2).

Em 2020, observou-se uma queda acentuada da incidência, podendo estar correlacionado ao momento de pandemia causada pela Covid19. Entre os anos de 2011 e 2016 já havia sido registrado uma diminuição no número de casos da doença. Porém, entre os anos de 2017 e 2019 o número de casos voltou a aumentar em comparação com os anos anteriores (14).

Em 2021, o Brasil notificou 66.271 novos casos de TB. O Amazonas registrou 3.065 novos casos da doença. Manaus, a capital do estado, registrou 2.223 novos casos, com uma incidência de 100,2 casos/100.000 habitantes, superior à média nacional. Do total de casos novos registrados na capital, 339 indivíduos eram coinfectados TB/HIV (15).

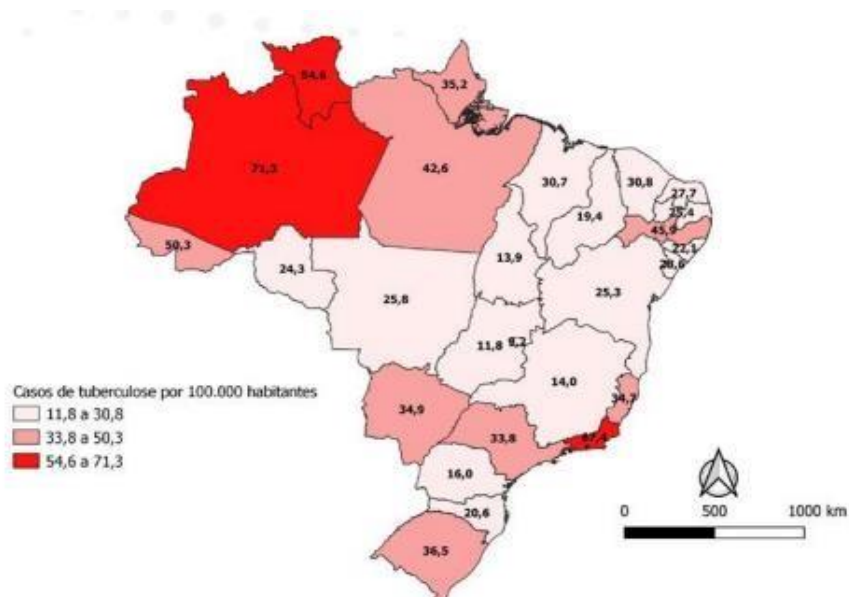


Figura 1 – Coeficiente de incidência de tuberculose por Unidade Federada (MS, 2022).

1.3. Diagnóstico laboratorial da TB

A TB pulmonar é diagnosticada principalmente por meio de baciloscopia e cultura, a partir de história clínica e achados radiológicos. A baciloscopia é um esfregaço contendo a amostra clínica corada pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) e observada em microscópio de campo claro. É um método bastante utilizado em países em desenvolvimento por ser de baixo custo, porém possui baixa sensibilidade em relação à cultura. A baciloscopia negativa não exclui a possibilidade de um caso de TB (16).

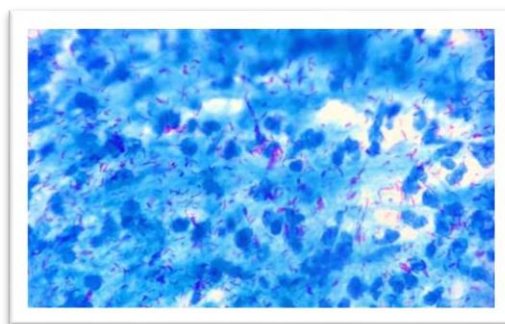


Figura 2- Bacilos Álcool-Ácido resistentes visualizados sob coloração de ZN (Melo, H.F, 20019).

Estima-se que o número de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) necessários para compor uma um esfregaço de escarro com resultado positivo tem sido de aproximadamente entre 5000 e 10000 por mL, conforme demonstrado no Quadro 1. A sensibilidade da baciloscopia pode ser melhorada

através da realização de mais de uma amostra por paciente (17).

Número de bacilos observados	Concentração estimada de bacilos por mL de escarro	Probabilidade de um resultado positivo
0 em 100 ou mais campos	Menos do que 1000	Menos do que 10%
1-2 em 300 campos	5000 – 10000	50%
1-9 em 100 campos	Aproximadamente 30000	80%
1-9 em 10 campos	Aproximadamente 50000	90%
1-9 por campo	Aproximadamente 100000	96,2%

Quadro 1 – Número de BAAR observados nas baciloscopias, concentrações de bacilos cultiváveis nos escarros e probabilidade de resultados positivos (Adaptado: Manual de Vigilância Laboratorial da Tuberculose MS, 2022).

A cultura utiliza os métodos clássicos de semeadura da amostra em meios decultura sólidos à base de ovos, Löwenstein-Jensen (LJ) e Ogawa-Kudoh (OK) que permite o crescimento *in vitro* e o isolamento do *Mtb*. Apesar de produzir resultado tardiamente (em até 8 semanas) é considerada método padrão para o diagnóstico de TB por ser um método sensível e específico, comparada a baciloscopia (6,17).

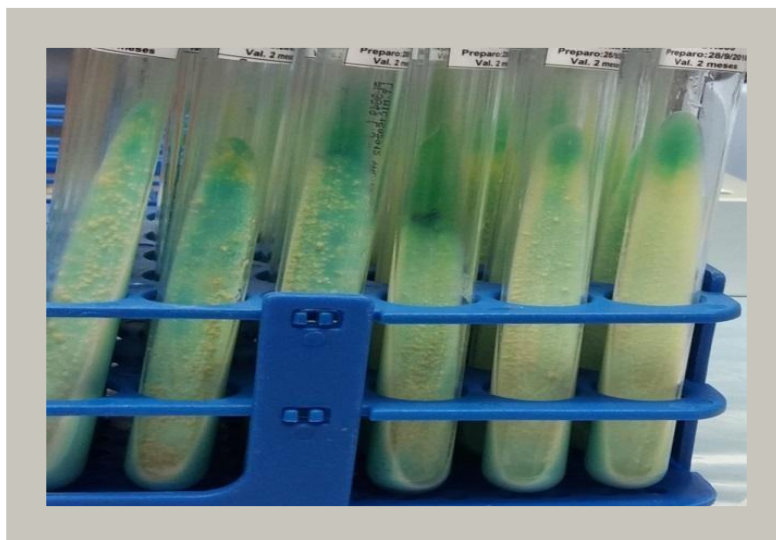


Figura 3 – Culturas de OK positivas (Melo, H. F., 2019).

A cultura líquida *Mycobacteria Growth Indicator* (MGIT) consiste em uma metodologia automatizada por meio do sistema BD BACTEC™ MGIT™ 960, que contém um caldo modificado de Middlebrook 7H9 em conjunto com um sensor de oxigênio à base de extinção de fluorescência para detectar o crescimento de micobactérias. À medida que as micobactérias crescem e consomem o oxigênio

presente, o indicador fluoresce quando submetido a luz ultravioleta (18). Em relação à cultura sólida, o sistema possui uma sensibilidade superior, além da diminuição do tempo de retorno e do atraso da realização do teste de sensibilidade (TS). Uma das principais desvantagens é a maior taxa de contaminação, principalmente com Micobactérias não Tuberculosas (MNT), e contaminação cruzada durante a inoculação da cultura, podendo haver o transporte de bacilos positivos para amostras negativas (19).

No BACTEC™ MGIT™ 960 é realizado, também, o TS aos fármacos de primeira linha Estreptomicina (SM), Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Etambutol (EBM) e Piramizamida (PZA), utilizadas no tratamento da TB, liberando resultados entre 4 e 19 dias (20) (Figura 4).

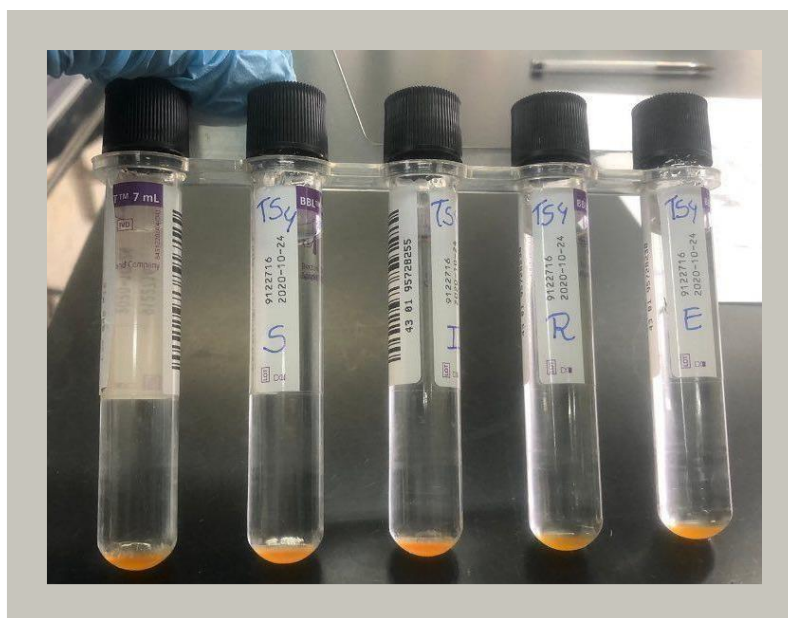


Figura 4- Teste de Sensibilidade a Estreptomicina (S), Isoniazida (I), Rifampicina (R) e Etambutol (E). Imagem mostra resistência a Estreptomicina (Melo, H. F., 2019).

Além do kit para detecção de resistência a drogas de primeira linha, há disponível, também, o kit GenoType MTBDRsl, que detecta drogas de segunda linha incluindo fluoroquinolonas e drogas injetáveis, como Canamicina, Capreomicina, Amicacina e Estreptomicina. O resultado final do teste designa o paciente para o melhor tratamento a ser realizado (21,22).

Em 2014, foi implantado na rede do Sistema Único de Saúde (SUS) o Teste Rápido Molecular para Tuberculose (TRM-TB) automatizado, que utiliza o sistema Xpert® MTB/RIF para detectar simultaneamente o *Mtb* e resistência a rifampicina. Em 2017, o teste recebeu uma nova versão Xpert® MTB/RIF Ultra,

na qual diminuiu o limite de detecção de 131 UFC/mL para 16 UFC/mL, podendo detectar duas inserções presentes no CMTB: *IS6110* e *IS1081*. Além disso, diminuiu o tempo total de execução do ensaio anteriormente de 120 minutos para 77 minutos, quando o teste for positivo. Apesar de ser um equipamento eficiente e rápido no diagnóstico da doença, a baciloscopia e acultura ainda são consideradas as principais ferramentas para a detecção da doença em cidades que não possuem a tecnologia (17,23).

Outra forma eficaz de detectar de forma rápida a resistência a RIF e INH é utilizando o kit GenoType MTBDR*plus*, que identifica as mutações mais significativas dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*, que estão relacionados a multirresistência. O método pode ser utilizado direto da amostra pulmonar ou do material de cultura, obtendo resultado em até 5 horas (24,25).

1.4. Técnicas de genotipagem do *Mtb*

O primeiro sequenciamento do genoma completo do *Mtb* foi realizado em 1905, quando foi isolada a cepa *M. tuberculosis* H37Rv, que codifica em seu genoma 4,4 megabase (Mb) cerca de 4 mil proteínas previstas e 50 moléculas de RNA, tornando-a referência por manter seu fator de virulência total ao longo dos anos (26).

Em 1969, Bates e Mitchinson foram os primeiros a mostrar a diferença nos tipos de cepas do *Mtb.*, assim como sua origem geográfica, por meio de uma técnica usando fago. A tipagem por fago também proporcionou evidenciar a contribuição da reinfecção em casos de TB recidiva (27).

A partir da década de 1990, a genotipagem do CMTB utilizando PCR ou metodologias alternativas começaram a ser realizadas a fim de auxiliar em estudos de saúde pública, além de explorar a evolução do patógeno e sua relação com o hospedeiro (28).

O uso de técnicas moleculares tem sido útil para a investigação epidemiológica, pois é um meio de entender os mecanismos que influenciam a dinâmica de transmissão e investigação de fatores de risco à comunidade. Além disso, a identificação de linhagens possibilita a investigação de propriedades biológicas, como virulência e patogenicidade (29).

Os estudos por meio de métodos moleculares aplicados a TB, pressupõem que pacientes com cepas agrupadas genotipicamente estão ligados epidemiologicamente e representam transmissões recentes. Os marcadores genéticos precisam ser suficientemente polimórficos para distinguir as estirpes não relacionadas e estáveis o suficiente para identificar isolados das mesmas cepas (30).

A tipagem de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism) foi considerada o método padrão durante a década de 90. É uma técnica na qual o DNA bacteriano é clivado por uma enzima de restrição, e os fragmentos de restrição são separados em eletroforese em gel. Uma sonda de DNA marcada é aplicada à membrana em um ensaio de hibridização, complementar a sequências repetitivas de interesse. Uma sonda frequentemente aplicada contém uma sequência específica da *IS6110*, que é um elemento repetitivo de sequência de inserção móvel de 1,35 kb (31). É um método trabalhoso que requer semanas até o crescimento do isolado e para extração do DNA. Além disso, sofre problemas de reprodutibilidade por fornecer discriminação insuficiente entre os isolados com número baixo de cópias de *IS6110* (32).

O método *Spoligotyping* foi descrito pela primeira vez em 1993 e é baseado no polimorfismo de DNA presente em uma região particular do cromossomo chamada de "Repetição Direta" (Direct Repeat), que está exclusivamente presente no CMTB (33).

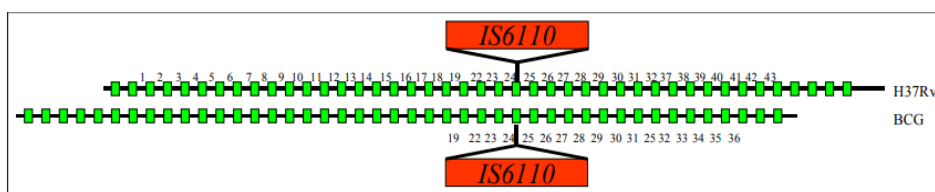


Figura 5 - Estrutura do locus DR no genoma de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG P3. Os retângulos verdes representam a DR de 36 bp (Kamerbeek J, et. al., 1997).

A associação de *Spoligotyping* e análise do número variável de repetições em tandem (Variable Number of Tandem Repeats), usando unidades repetitivas intercaladas de micobactérias (Mycobacterial Intersperced Repetitive Units), possui alto poder discriminatório e direcionamento para compreender melhor a distribuição da TB e a dinâmica de transmissão na população (34).

O genoma do *Mtb* é formado por minissatélites composto por uma sequência de 40-100 pb que se repetem em *tandem*. A técnica MIRU-VNTR é baseada no produto da amplificação por PCR de múltiplos loci usando primers específicos flanqueadores de cada locus de repetição e na determinação dos tamanhos dos amplicons (32,35,36). As análises dos produtos de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) são feitas utilizando sequenciador de DNA, que avaliam oito grupos de três loci simultaneamente. Para cada Multiplex, um iniciador por par de oligonucleotídeos é marcado com um corante fluorescente específico (37). O método é vantajoso em relação às outras técnicas por ser de fácil execução e análise, além da rapidez, sendo possível comparar os resultados com laboratórios do mundo inteiro por meio de base de dados (38).

A Inglaterra foi o primeiro país a fazer diagnóstico de TB em larga escala utilizando o Sequenciamento do Genoma Completo (Whole Genome Sequencing - WGS), proporcionando a identificação de resistência aos fármacos, proporcionando a dispensação dos medicamentos específicos para o tratamento eficaz da TB, acarretando na diminuição da cadeia de transmissão de TB e TB resistente (39).

O WGS é uma ferramenta eficaz para o fornecimento de informações do genoma do *Mtb*, capazes de detectar variantes da sequência genômica para identificar fenótipos de resistência aos fármacos para TB, identificar as linhagens das cepas e reconhecer cepas geneticamente relacionadas para a quebra de cadeia de transmissão (40).

1.5. Linhagens predominantes no Brasil

Os estudos moleculares voltados para a TB ainda são poucos no Brasil. As regiões Sul e Sudeste estão no topo de publicações utilizando ferramentas moleculares para descrever os genótipos circulantes (41).

Em 2011 foi realizado um grande estudo em 11 estados brasileiros, através de *Spoligotyping*, no qual evidenciou as linhagens mais predominantes no país: LAM, T, Haarlem e X. Além disso, foram encontrados genótipos específicos de outras regiões podendo estar ligadas ao fluxo de migração entre América do Norte, Europa de países africanos e asiáticos, incluindo viagens comerciais e

familiares entre Brasil, América do Norte e Europa (42).

No Rio Grande do Sul, os portadores de TB carregam uma inserção incomum de 12 nucleotídeos no gene *rpoB*, levando ao aumento de casos de resistência a RIF(43). Além disso, há em circulação de cepas TB-MDR em clusters genômicos constituídos por particularmente de perfis monorresistente e polirresistente (44).

O Rio de Janeiro, que é uma das capitais brasileiras com maior incidência da doença, possui características semelhantes ao do resto do Brasil (45). Em 2007, uma sublinhagem de *Mtb.* foi descoberta após 30% das cepas não amplificarem na Região de diferença (RD), podendo ser causadas exclusões, inserções, inversões e duplicações, e passou-se a chamar de RD^{Rio} (46).

Em Minas Gerais, identificou-se a frequência da sublinhagem RD^{Rio} através da predominância da linhagem LAM e LAM9, considerados progenitores da RD^{Rio}. Além disso, associaram esta sublinhagem a casos de TB-MDR (47).

A Linhagem 1 (Easter-African-Indian (EAI)) é pouco comum no Brasil, porém já foi relatada no Norte, Nordeste, Sul e Sudeste do país (48). Dentre todas as regiões encontradas, a maior frequência é no estado do Pará, possivelmente devido a transmissão durante o tráfico de escravos da região de Moçambique-Malawi para o Norte do Brasil (49).

Em Roraima, evidenciou-se que as linhagens predominantes são LAM, Haarlem e uma linhagem mal definida T, semelhante a países da América do Sul, incluindo Venezuela (50).

1.6. Tratamento

O tratamento da doença recomendado pela OMS é de no mínimo seis meses para a realização da antibioticoterapia, incluindo três ou quatro fármacos (7). Os fármacos antiTB interferem no sistema enzimático do bacilo ou bloqueiam a síntese de algum metabólito imprescindível para seu crescimento. Os medicamentos com maior ação bactericida precoce são: INH, SM e RIF. Os medicamentos com maior poder esterilizante são: RIF e PZA. O EMB é bacteriostático e é estrategicamente associado aos medicamentos mais potentes para prevenir a emergência de bacilos resistentes (18).

ESQUEMA	FAIXAS DE PESO	UNIDADE/DOSE	DURAÇÃO
RHZE 150/75/400/275 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	2 comprimidos	2 meses (fase intensiva)
	36 a 50 Kg	3 comprimidos	
	51 a 70 Kg	4 comprimidos	
	Acima de 70 Kg	5 comprimidos	
RH 300/150 mg ¹ ou 150/75 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	1 comp 300/150 mg ou 2 comp 150/75 mg	4 meses (fase de manutenção)
	36 a 50 Kg	1 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 3 comp 150/75 mg	
	51 a 70 Kg	2 comp 300/150 mg ou 4 comp 150/75 mg	
	Acima de 70 Kg	2 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 5 comp 150/75 mg	

Fonte: (RATIONAL PHARMACEUTICAL MANAGEMENT PLUS, 2005; WHO, 2003). Adaptado de BRASIL, 2011.

R – Rifampicina; H – isoniazida; Z – Pirazinamina; E – Etambutol.

¹A apresentação 300/150 mg em comprimido deverá ser adotada assim que disponível.

Figura 6 - Esquema Básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes (≥ 10 anos) (MS, 2018).

Fatores como a terapia de droga única, má adesão ao tratamento e diagnóstico incorreto podem levar o *Mtb* a adquirir resistência (51). A resistência a INH e RIF, conhecida como TB multidroga resistente (TB-MDR), reduz a possibilidade de cura, tornando o tratamento prolongado e mais caro, dificultando a escolha da quimioprofilaxia de comunicantes (52).

Os tipos de resistência a fármacos anti-TB são classificados em: monorresistência (quando há resistência a INH ou RIF); polirresistência: resistência a dois ou mais fármacos, exceto INH e RIF; TB-MDR: resistência aos dois principais fármacos importantes no tratamento da TB, INH e RIF; resistência extensiva (TB- XDR): é caracterizada pela resistência a INH e RIF, acrescido de uma fluoquinolona (qualquer delas) e aos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina e capreomicina); e por fim, a resistência a RIF (TB RR): quando a resistência a RIF é identificada, exclusivamente, por meio do TRM-TB (53).

Segundo o Plano Nacional de pelo fim da Tuberculose como problema de Saúde Pública, até 2035 a meta é diminuir a incidência para menos de 10 casos por 100 mil habitantes, e mortalidade para menos de 1 óbito por 100 mil habitantes, através de estratégias que visam diminuir o tempo de diagnóstico, oferecendo tratamento adequado aos doentes e intensificar as ações de prevenção (54).

A cidade de Manaus é uma das capitais com maior incidência de TB do

país. O sequenciamento do genoma dos isolados circulantes é importante para identificar as possíveis ligações epidemiológicas entre os casos da doença e identificar as linhagens e sublinhagens predominantes na região Amazônica, e auxiliar na compreensão da dinâmica de transmissão da doença, e a relação com capacidade de resistência e formas graves da TB.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar as linhagens e sublinhagens do complexo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de isolados de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2.2. Específicos

- Identificar as linhagens e sublinhagens mais prevalentes na região Amazônica;
- Comparar as linhagens e sublinhagens mais prevalentes na região Amazônica com o restante do Brasil;
- Descrever as frequências de mutações envolvidas na resistência à fármacos de primeira linha.

3. PRODUTO DE DISSERTAÇÃO

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EMPACIENTES ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Hilda Ferreira de Melo; Ana Carolina Oliveira; Lida Jouca Assis Figueiredo; Richard Stener Salvato; Maria Lúcia Rossetti; Elis Regina Dalla Costa; Afrânio Kritski; Marco Schito; Jaquelane Silva; Rossicleia Lins Monte; Silvana Spindola; Isabela Neves de Almeida; Marcelo Cordeiro dos Santos.

INTRODUÇÃO

A TB continua sendo a principal doença infecciosa a atingir mais de 10 milhões de pessoas por ano, ameaçando a saúde global (1). O Brasil encontra-se entre os 49 países com maior carga da doença no mundo e enquadra-se no grupo de países com maior carga de TB e coinfeção TB/HIV (2). Em 2021, o país notificou 66.271 novos casos de TB. O Amazonas registrou 3.065 novos casos da doença, destes 339 tinham coinfeção TB/HIV. Manaus, a capital do estado, registrou 2.223 novos casos, com uma incidência de 100,2 casos/100.000 habitantes, superior à média nacional (3).

O uso de técnicas moleculares tem sido útil para a investigação epidemiológica, pois é um meio de entender os mecanismos que influenciam a dinâmica de transmissão e investigação de fatores de risco à comunidade. Além disso, a identificação de linhagens possibilita a investigação de propriedades biológicas, como virulência e patogenicidade (4).

O WGS é uma ferramenta eficaz para o fornecimento de informações do genoma do *M.tb*, capazes de detectar variantes da sequência genômica para identificar fenótipos de resistência aos fármacos para TB, identificar as linhagens das cepas e reconhecer cepas geneticamente relacionadas para a quebra de cadeia de transmissão (5).

Os estudos moleculares voltados para a TB ainda são poucos no Brasil. As regiões Sul e Sudeste estão no topo de publicações utilizando ferramentas

moleculares para descrever os genótipos circulantes (6).

A cidade de Manaus é uma das capitais com maior incidência de TB do país. O sequenciamento do genoma dos isolados circulantes é importante para identificar as possíveis ligações epidemiológicas entre os casos da doença e identificar as linhagens e sublinhagens predominantes na região Amazônica, e auxiliar na compreensão da dinâmica de transmissão da doença, e a relação com capacidade de resistência e formas graves da TB.

MATERIAL E MÉTODO

Pacientes e isolados bacterianos

Foram incluídos 108 isolados por conveniência de pacientes que foram atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) no período de Janeiro de 2013 a Dezembro de 2016, que obtiveram sucesso no teste de viabilidade através de repique em meio sólido.

Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir das culturas identificadas como pertencentes ao CMTB utilizando Brometo de cetiltrimetilamônio/Cloreto de Sódio (CTAB/NaCl) (7).

MIRU-VNTR

O MIRU-VNTR foi realizado com colaboração do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, localizado em Porto Alegre — RS, de acordo com *Beer et al.* (8) . O tamanho dos fragmentos foi verificado em um analisador de sequência de DNA ABI 3130xl (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), posteriormente a determinação do número de cópias em cada locus foi realizada por meio de atribuição automatizada implementada no software Genemapper 3.2.1 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). *Locus* indefinido ou não amplificado, foram verificados duas vezes em géis de agarose e comparados

com uma tabela de referência descrita por Supply et al., (9). A identificação de linhagem de isolados de *Mtb* foi realizada por análise de melhor correspondência no banco de dados MIRU- VNTRplus.

Spoligotyping

O *Spoligotyping* foi realizado na Universidade Feredal do Rio de Janeiro (UFRJ) utilizando a técnica de microesferas Beamedex (Beamedex SAS, Orsay, França) no sistema Luminex-Bioplex-BioRad 200 (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA) de acordo com o protocolo descrito por Kamerbeek J *et. al.* (10). Linhagens e tipo internacional de *Spoligotype* (SIT) foram determinados por comparação com padrões disponíveis no banco de dados SITVIT2 (www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2) e padrões desconhecidos foram verificados em SpotClustdatabase (http://tbinsight.rpi.edu/run_spotclust.html) (10).

Sequenciamento do Genoma Completo (WGS)

O WGS foi realizado no Clinical Path Institute, utilizou-se aproximadamente um micrograma de DNA por amostra foi fragmentado usando um sonicador Q800R2 (QSonica, Newtown, CT, EUA), com os seguintes parâmetros: sonicação de 3 minutos com pulso de 15 segundos ligado, pulso desligado de 15 segundos e amplitude de 20%. O DNA fragmentado foi selecionado por tamanho para atingir 600-650 pb por separação de fragmentos usando as contas AgencourtAMPure XP (Beckman Coulter, Código A63882). O NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit para Illumina (New England BioLabs, Código E7645L) foi usado para preparações de biblioteca de DNA. Adaptadores e oligos de índice de 8 pb adquiridos da IDT® (Integrated DNA Technologies, San Diego, CA) com base em Weber KP, De S, Kozarewa I, Turner DJ, Babu MM, et al. (2010), foram utilizados no lugar daqueles fornecidos no kit de preparação NEB em uma abordagem de indexação dupla. O sequenciamento de extremidade emparelhada (2 × 150 pb) foi realizado em uma máquina Illumina NextSeq usando um kit de saída média ou alta saída 300 ciclos v2 (Illumina, Código FC-404-2003 ou Código FC-404-2004), usando Illumina® padrão procedimento (11).

RESULTADOS

Características da população do estudo

Foram incluídos 108 pacientes sendo 75,9% do sexo masculino e 24,07% do sexo feminino. Em relação a faixa etária, 59,3% se encontravam entre 26 e 45 anos. A TB pulmonar foi mais frequente acometendo 78,7% e 75,9% eram co-infectados por HIV. A maioria dos indivíduos (78,7%) era de casos novos de TB.

Em relação aos perfis de sensibilidade, 4,6% dos pacientes foram infectados com cepas TB-MDR, 5,6% apresentaram monorresistência, sendo 3 a Rifampicina (50%), 2 a Isoniazida (33,3%) e a Estreptomicina (16,7%). A resistência simultaneamente a estreptomicina e etambutol esteve presente em um único indivíduo.

Os dois principais desfechos entre os indivíduos foram cura 33,4% e óbito em 26,8%. Com a descentralização do tratamento de TB, inúmeros pacientes foram diagnosticados na FMT-HVD, que é referência no tratamento de paciente com TB/HIV, porém foram transferidos para outra unidade para dar continuidade por não estarem co-infectados. As demais características estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características da população com tuberculose dos pacientes atendidos na FMT-HVD (2013-2016)(n=108)

Características	n	%
Gênero		
Masculino	82	75,93%
Feminino	26	24,07%
Idade		
<18	5	4,63%
18-25	22	20,37%
26-45	64	59,26%
≥46	17	15,74%
Perfil de sensibilidade		
Sensível	96	88,89%
Monoresistente	6	5,56%
Poliresistente	1	0,93%
Multidroga resistente	5	4,63%

Desfecho		
Cura	36	33,34 %
Falha de tratamento	1	0,93%
Óbito	29	26,85%
Abandono	9	8,33%
Não iniciou tratamento	3	2,78%
Transferido para outra unidade	25	23,15%
De outra unidade hospitalar		
Não avaliado	2	1,85%
HIV		
Sim	82	75,93%
Não	21	19,44%
Não avaliado	5	4,63%
Tipo de TB		
Pulmonar	85	78,70%
Extrapulmonar	23	21,30%
TB prévia		
Sim	11	10,19%
Não	85	78,70%
Não avaliado	12	11,11%

Frequência das famílias e linhagens mais prevalentes na região Amazônica

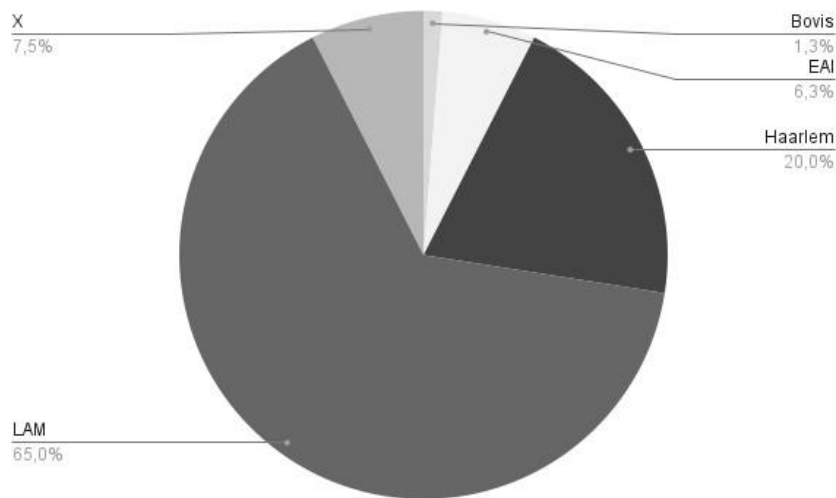
Após avaliação do perfil genotípico dos 108 DNA de *M.tb* por meio das técnicas MIRU-VNTR e *Spoligotyping*, 25,9% apresentaram resultados divergentes na classificação das famílias e linhagens.

Em relação aos resultados discordantes entre MIRU-VNTR, *Spoligotyping* e WGS, foram encontradas 14,7% por meio do MIRU-VNTR; 2,9% pelo *Spoligotyping* e 2,9% entre MIRU-VNTR e *Spoligotyping*, no qual o WGS foi discordante das duas técnicas.

Dos 80 isolados concordantes, 52 foram submetidos a WGS e tiveram 100% de concordância entre as técnicas MIRU-VNTR e *Spoligotyping*.

Entre os 80 isolados (47,1%) que apresentaram resultados convergentes entre *Spoligotyping* e MIRU-VNTR foi observado a predominância da família LAM (52/80) e da linhagem LAM6 (27/52), seguido da família Haarlem (16/80) e da linhagem H3 (12/16), família X com todos os isolados da linhagem X2 (6/80), família EAI com todos os isolados da linhagem EAI5 (5/80) e um isolado caracterizado como Bovis da linhagem BOV_1 (Gráfico 1).

Figura 1: Resultados convergentes entre MIRU-VNTR 24 loci e *Spoligotyping* (N=80).



No total, encontramos 44 padrões distintos de *Spoligotyping* compreendendo 35 SITs diferentes. Os mais frequentes foram: SIT95/LAM 6 (9,3%), SIT137/X 2 (8,4%), SIT64/LAM 6 e SIT42/LAM 9 (7,5%).

Tabela 2 - Perfil genotípico dos isolados de *M.tb* predominantes da Região Amazônica do Brasil, através de MIRU-VNTR 24 loci e *Spoligotyping* (n = 80)

Características clínicas e perfis de resistências das linhagens predominantes da região amazônica do Brasil

Em 80 DNA de isolados de *M.tb*, foram identificadas com maior frequência as linhagens LAM 6 em 20, LAM 9 em 9, H3 em 6, X2 em 4 e EAI5 em 3. Foram predominantemente relacionadas aos pacientes com TB pulmonar e sensíveis aos fármacos. A TB extrapulmonar estava presente em 18,7% dos indivíduos e a mais prevalente foi linfonodo cervical em 5% das amostras, onde a linhagem H3 (2/5) foi a mais frequente.

A cura foi o principal desfecho observado em 28 pacientes, seguido de óbito por TB em 20. A linhagem LAM 6 se destacou entre esses dois desfechos, sendo, em 13 e 9, respectivamente.

Entre 60 pacientes, a infecção por HIV estava presente em 75% dos indivíduos: LAM 6 em 20, LAM 9 em 9, H3 em 8, X2 em 5 e EAI5 em 4. Neste grupo de pacientes, os desfechos de cura e óbito foram em 25 e em 20 foram predominantes, além de que a maioria (n=50) ocorreu em amostras sensíveis, o perfil de resistência principal ter sido sensível.

Whole Genome Sequence

WGS foi realizado em sessenta e oito isolados de *M.tb*, foi utilizando o método SNPtyping baseado no código de barras SNP proposto por Coll et al. (2015) para classificar isolados *M.tb*. 97,1% estiveram pertencentes à Linhagem 4 e dois isolados à Linhagem 1. Em relação às sublinhagens, 50% dos isolados *M.tb* foram classificados como sublinhagem LAM, 19,1% como Haarlem e 11,8% como sublinhagem X.

Houve 15 resultados discordantes entre MIRU-VNTR e *Spoligotyping* que foram solucionados por WGS (tabela 2). Destaca-se quatro linhagens identificadas como Haarlem por meio do MIRU-VNTR e que foram concordantes entre *Spoligotyping* e WGS.

Tabela 2 – Resultados discordantes entre MIRU-VNTR 24 *loci* e *Spoligotyping* solucionados através de WGS.

Número de Isolados	Família	Linhagem	SIT
3	LAM	LAM 1	20
4	LAM	LAM 2	17
1	LAM	LAM 2	1661
1	LAM	LAM 3	33
1	LAM	LAM 4	828
1	LAM	LAM 4	1895
10	LAM	LAM 6	95
6	LAM	LAM 6	176
8	LAM	LAM 6	64
2	LAM	LAM 6	Orphan or New
1	LAM	LAM 6	1355
1	LAM	LAM 6	1768
1	LAM	LAM 8	Spotclust
8	LAM	LAM 9	42
1	LAM	LAM 9	1933
1	LAM	LAM 9	Orphan or New
2	LAM	LAM 9	Spotclust
5	EAI	EAI 5	924
1	Haarlem	H1	47
1	Haarlem	H1	62
2	Haarlem	H2	2
1	Haarlem	H3	3
6	Haarlem	H3	50
2	Haarlem	H3	512
1	Haarlem	H3	631
2	Haarlem	H3	741
1	Bovis	Bovi_1	482
6	X	X2	137

X3	92	Haarlem	Euro-American (X-type)
ATYPIC	2669	Haarlem	Euro-American
T3	37	Cameroon	Euro-American
unknown	2508	Cameroon	Euro-American (LAM)
T1	Orphan or New	X	Euro-American
T1	51	Cameroon	Euro-American (mainly T)
T1	2517	X	Euro-American (X-type)
T1	51	Ugandal	Euro-American (mainly T)
T1	Orphan or New	X	Euro-American
X3	92	Haarlem	Euro-American

Perfil genotípico do *M.tb* resistente por WGS – principais mutações relacionadas da resistência

Dentre os sessenta e oito isolados de *M.tb* que foram realizados o WGS, 57 foram sensíveis aos fármacos de primeira linha, 2 resistentes a Estreptomicina, 4 resistentes a Isoniazida, 2 resistente à Rifampicina e três MDR. As mutações *rpoB* Ser450Leu e *katG* Ser315Thr, foram as mais frequentes entre os isolados resistentes a RIF e INH, respectivamente. Também identificamos um isolado fenotipicamente sensíveis ao fármaco com a mutação *rpoB* Ile491Phe e outros dois isolados sensíveis apresentando alteração C>T na posição -15 do promotor *inhA/fabG1*.

Tabela 3 - Análise de Mutações relacionadas à resistência aos fármacos por meio do WGS.

ID	RESULTADOS DE TSA				CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS		LINHAGEM	MUTAÇÕES			
	RIF	INH	EBM	STR	HIV	DESFECHO CLÍNICO		RIF	INH	EBM	STR
1	R	R	S	S	Não	Transferido para outra unidade	LAM	<i>rpoB</i> Ser450Leu	<i>katG</i> Ser315Thr		
12	S	S	S	R	Sim	Falha	LAM				
17	S	S	S	S	Sim	Transferido para outra unidade	LAM				<i>rrs_r.888g>a</i>
28	R	R	R	R	Não	Transferido para outra unidade	X	<i>rpoB</i> Ser450Leu	<i>katG</i> Ser315Thr	<i>embB</i> Met306Ile	<i>gid</i> 351_351del
36	S	S	S	S	NI*	De outra unidade hospitalar	LAM				<i>rrs_r.888g>a</i>
62	S	R	S	S	Sim	Cura	Haarlem		<i>fabG1</i> -15C>T		
65	S	R	S	S	NI*	NI**	LAM		<i>katG</i> Ser315Thr	<i>embB</i> Met306Ile	
80	R	S	S	S	Sim	Transferido para outra unidade	Haarlem	<i>rpoB</i> Ser450Leu			
100	R	R	S	R	Sim	Transferido para outra unidade	X	<i>rpoB</i> Leu452Pro	<i>katG</i> Ser315Thr		
104	S	S	S	S	Sim	Morte	LAM		<i>fabG1</i> -15C>T		
106	S	S	S	S	Sim	Cura	LAM		<i>fabG1</i> -15C>T		
114	S	S	S	S	Sim	Morte	LAM	<i>rpoB</i> Ile491Phe			

*NI: Não informado.

RIF – Rifampicina ; INH – Isoniazida; EBM – Etambutol; STR – Estreptomicina.

DISCUSSÃO

O Amazonas é o estado brasileiro com maior incidência de TB do Brasil (3) e este é o primeiro estudo no estado envolvendo três técnicas moleculares distintas, dentre elas o WGS, e um número considerável de isolados de *M. tb*, descrevendo os genótipos em pacientes atendidos na FMT-AM.

A linhagem LAM, predominante no estudo, é comum de ser encontrada na América Latina, apresenta várias sublinhagens, e é uma das linhagens mais transmitida em todo o mundo (12).

Neste estudo, as linhagens predominantes foram LAM, Haarlem e X. Estes dados são semelhantes a outros estudo realizados no Brasil, em destaque outros estudos realizados em outras regiões da Amazônia brasileira, como o estudo realizado no estado de Roraima, no qual possui diversidade entre os genótipos, destacando-se as linhagens LAM, seguida de Haarlem e “ill-defined” T(13). No estado do Pará, também predominam as linhagens LAM, seguida da T e Haarlem. Porém, há uma frequência de linhagens EAI que pode estar fortemente ligada ao processo de migração de indivíduos da África para este estado brasileiro (14).

Entre os países da Amazônia Internacional, as linhagens LAM, Haarlem e T prevalecem entre Peru, Colômbia, Guiana Francesa, Bolívia e Venezuela (15). Dentre eles, o Peru é o país com maior incidência de TB-MDR e monorresistência a Rifampicina, com taxas de 9,5/100.000 habitantes (16). No Equador, há predominância da linhagem LAM, Haarlem e S, com cepas sensíveis às quatro principais fármacos de primeira linha (53,6%) e TB-MDR em 24,5% de 320 isolados estudados (17).

Num estudo realizado entre 11 estados das cinco regiões distintas do Brasil, incluindo 37 isolados de *Mtb* do Amazonas, foi identificada a predominância das linhagens LAM, T e Haarlem e uma baixa frequência da linhagem X (18). Já em nosso estudo, a linhagem T foi minoria entre os isolados e a linhagem X foi a terceira mais prevalente.

Em Santa Catarina, um dos estados da Região Sul do Brasil, num estudo realizado com 151 isolados, observou-se a predominância das linhagens LAM, “ill-defined” T e Haarlem. Foram encontrados 38 SITs diferentes, semelhante ao nosso estudo, porém com predominância dos SIT 216/LAM 5, SIT 42/LAM 9, SIT 17/LAM 2 e SIT 64/LAM 6 (19).

Na região Sudeste, o Rio de Janeiro é segundo estado com maior incidência de TB do país (3), os SIT predominantes reportados SIT18/X2, SIT37/T3, SIT156/Unknown, SIT370/T 1, SIT1163/T 3, SIT746/Unknown, SIT176/LAM, SIT534/LAM, SIT770/LAM 9 e SIT1106/LAM 4 em um estudo realizado com 1024 isolados (18). Em Minas Gerais, um dos estados brasileiros com baixa incidência de TB (3), a linhagem LAM foi predominante entre os 104 isolados de *Mtb* estudados, com prevalência da sublinhagem LAM 9/SIT42, seguida de T1 (SIT 53) e H3 (SIT 50) (20). Apesar disso, há dados de que no estado já circula a sublinhagem RD^{Rio}, que está diretamente ligada a TB-MDR (21).

A terceira região com maior incidência da doença é a Nordeste (3). Num estudo realizado entre a capital Salvador-Bahia e o país europeu Portugal

evidenciou-se LAM (60%), Haarlem (10%) e X (6%) as linhagens mais frequentes, semelhante aos achados do nosso estudo (22).

Em nosso estudo observamos que o perfil de sensibilidade entre os 69 indivíduos foram predominantemente sensível 61(88,4%) com apenas 3 (4,3%) MDR-TB, diferentemente da Região Sul do Brasil, na qual foi relatado uma inserção incomum de 12 nucleotídeos no gene *rpoB*, principalmente entre detentos, potencializando a transmissão dessa cepa entre a comunidade, com isolados identificados entre os anos 2011 e 2014 (23). Em Santa Catarina, foram encontradas monorresistência a Isoniazida (6/151), Rifampicina (3/151), Estreptomicina (2/151), Etionamida (1/151) e Piramizamida (1/151). Apenas um isolado de Mtb MDR foi identificado. As mutações Ser315Tr (*katG*) e Ser450Leu (*rpoB*) foram mais frequentes, similar a outros resultados. Na Região Sul do Brasil, na cidade de Porto Alegre foi descrita uma frequência maior de isolados TB-MDR, associadas a mutações nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*, predominante o sexo masculino, com idade entre 26 e 45 anos. Em relação às famílias circulantes, LAM e Haarlem são predominantes (24).

Entre os países Angola, Moçambique, Portugal, Brasil e Guiné-Bissau, membros da Comunidade de Países que falam a Língua Portuguesa, a linhagem LAM é predominante, seguida de T (25).

Em um estudo semelhante ao nosso realizado em Botswana (África), a maioria dos indivíduos era de coinfectados com TB/HIV, possuía um perfil de sensibilidade sensível aos quatro principais fármacos utilizados no tratamento da doença, porém as linhagens predominantes foram LAM, S, T e X (26).

Sendo a TB a principal coinfeção em indivíduos com HIV, em nosso estudo observamos uma proporção elevada de coinfeção TB/HIV, diferentemente da característica populacional do estado de Roraima, no qual apenas 8/72 (11,1%) dos indivíduos eram infectados por HIV (13). O Brasil está em primeiro lugar entre os países da América do Sul em relação TB/HIV, seguido de México e Haiti (16). Em um estudo epidemiológico retrospectivo que avaliou 2161 pacientes com TB-MDR e/ou RIF resistente foi observado que a infecção por HIV aumenta o risco de resistência à RIF durante o tratamento de primeira linha da TB em até cinco vezes. Nesse mesmo estudo, as linhagens de Mtb predominantes foram as Linhagens 2, 4, 3 e 1, respectivamente (27). Portanto, o indivíduo com imunodeficiência causada por HIV pode ser infectado com qualquer linhagem de TB já que *M.tb* é um patógeno em constante interação com o sistema imunológico do hospedeiro (28).

Em relação a desfecho clínico, em nosso estudo foi observado que a maioria dos pacientes evoluíram para cura (33,3%) ou óbito (26,9%). O Rio de Janeiro é o estado com maior número de casos de TB, depois do Amazonas, e o primeiro com desfecho óbito do país, com incidência de 4,4 por 100.000 habitantes, superando a taxa nacional (3). Em um estudo realizado na região metropolitana de São Paulo, a cura foi de 53,8% e óbito em 22,5% dos 6.092 indivíduos com coinfeção TB/HIV, no período de 2007 e 2015 (29). Recentemente, num estudo avaliou-se os desfechos de tratamento de TB em 915 indivíduos, distribuídos entre as regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil, entre os anos de 2015-2019, e observou-se que 79% obtiveram sucesso no tratamento, 118 perda do follow-up, 44 tiveram falha

no tratamento e o óbito acometeu 26 pacientes (30). Em nosso estudo o desfecho favorável a cura foi elevado, apesar da maioria dos indivíduos serem coinfetados com TB/HIV.

O WGS foi importante para solucionar as discordâncias entre as linhagens determinadas por MIRU-VNTR e *Spoligotyping*, por ser uma técnica de maior acurácia na detecção de genes específico, como por exemplo os genes resistência aos fármacos usados no tratamento da TB (31).

Além disso, é uma ferramenta que pode trazer benefícios no auxílio do diagnóstico da TB (32), já que é capaz de identificar surtos com alta resolução (33). Porém é uma técnica com custo elevado para a implantação numa rotina laboratorial (34).

Por se tratar de uma pesquisa retrospectiva, nem todos os isolados foram submetidos ao WGS por ter material insuficiente, prejudicando a análise mais profunda de clusters. Apesar disso, a expectativa é que esses resultados contribuam para estudos futuros, a fim de auxiliar para que a TB saia da lista de problema de Saúde Pública.

Este estudo demonstra que os genótipos circulantes na Amazônia brasileira são semelhantes aos circulantes nas demais regiões do Brasil, mas destacam a maior frequência da linhagem X em relação a outras regiões do país. Estes achados ressaltam a importância da vigilância epidemiológica constante dos isolados circulantes para melhor compreensão da dinâmica de transmissão, relação das linhagens com genótipos de resistência e coinfecção com o HIV e a necessidade de aplicação das técnicas de epidemiologia molecular da TB como ferramenta para vigilância epidemiológica.

REFERÊNCIAS

1. Christof C, Nußbaumer-Streit B, Gartlehner G. Guidelines on Tuberculosis Infection Prevention and Control [Internet]. CC BY-NC-S. Vol. 82, Gesundheitswesen. Geneva: WHO; 2019. 885–889 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/311259/9789241550512-eng.pdf>.
2. World Health Organization. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT [Internet]. Geneva, Switzerland; 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>.
3. Brasil M da S. Boletim Epidemiológico - Tuberculose [Internet]. Vol. 105. Brasília; 2022. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-tuberculose-numero-especial-marco-2022.pdf/view>
4. Santos LC, Paula A, Kipnis J. MÉTODOS APLICADOS À EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO *Mycobacterium tuberculosis*. Revista De Patologia Tropical. 2007;36(1):1–15.
5. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of

- mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.19). Licence: CC BY-NC-SA 3.
6. Conceição EC, Salvato RS, Gomes KM, Dos Santos Guimarães AE, Da Conceição ML, De Paula Souza E Guimarães RJ, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil before the whole genome sequencing era: A literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2021;116(1):1–14.
 7. Van Embden JDA, 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.
 8. De Beer JL, Kremer K, Ködmön C, Supply P, Van Soolingen D, Alexander D, et al. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):662–9.
 9. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol*. 2000;36(3):762–71.
 10. Kamerbeek J, Schouls LEO, Kolk A, Agterveld MVAN, Soolingen DVAN, Kuijper S, et al. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997;35(4):907–14.
 11. Weber KP, De S, Kozarewa I, Turner DJ, Madan Babu M, de Bono M. Whole genome sequencing highlights genetic changes associated with laboratory domestication of *C. elegans*. *PLoS One*. 2010;5(11).
 12. Reynaud Y, Millet J, Rastogi N. Genetic structuration, demography and evolutionary history of *mycobacterium tuberculosis* LAM9 sublineage in the Americas as two distinct subpopulations revealed by Bayesian analyses. *PLoS One*. 2015;10(10):1–15.
 13. Tatará MB, Perdigão J, Viveiros M, Kritski A, Da Silva KE, Sacchi FPC, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of *mycobacterium tuberculosis* in Roraima State, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;101(4):774–9.
 14. Conceição EC, Rastogi N, Couvin D, Lopes ML, Furlaneto IP, Gomes HM, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Pará, Brazil, reveals a higher frequency of ancestral strains than previously reported in South America. *Infect Genet Evol*. 2017;56(October):62–72.
 15. Woodman M, Haeusler IL, Grandjean L. Tuberculosis genetic epidemiology: A latin american perspective. *Genes (Basel)*. 2019;10(1).
 16. Health PA, Organization. Tuberculosis in the Americas - Regional Report [Internet]. Washington, D.C.; 2021. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55194>
 17. Garzon-Chavez D, Garcia-Bereguian MA, Mora-Pinargote C, Granda-Pardo JC, Leon-Benitez M, Franco-Sotomayor G, et al. Population structure and

- genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Ecuador. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–9.
18. Gomes HM, Elias AR, Oelemann MAC, Pereira MA da S, Montes FFO, Marsico AG, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012;12(4):649–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.027>
 19. Verza M, Scheffer MC, Salvato RS, Schorner MA, Barazzetti FH, Machado H de M, et al. Genomic epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, Southern Brazil. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–11.
 20. Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho W da S, Gomes HM, de Almeida IN, de Assis LJ, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1):1–11.
 21. De Almeida IN, Vasconcellos SEG, De Assis Figueredo LJ, Dantas NGT, Augusto CJ, Hadaad JPA, et al. Frequency of the *Mycobacterium tuberculosis* RDRio genotype and its association with multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):1–9.
 22. Lopes JS, Marques I, Soares P, Nebenzahl-Guimaraes H, Costa J, Miranda A, et al. SNP typing reveals similarity in *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity between Portugal and Northeast Brazil. *Infect Genet Evol.* 2013;18:238–46.
 23. Rossetti ML, Almeida da Silva PE, Salvato RS, Reis AJ, Schiefelbein SH, von Groll A, et al. A highly rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain emerging in Southern Brazil. *Tuberculosis.* 2020;125(June):1–7.
 24. Salvato RS, Schiefelbein S, Barcellos RB, Praetzel BM, Anusca IS, Esteves LS, et al. Molecular characterisation of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a high-burden tuberculosis state in Brazil. *Epidemiol Infect.* 2019;147.
 25. Perdigoão J, Silva C, Diniz J, Pereira C, Machado D, Ramos J, et al. Clonal expansion across the seas as seen through CPLP-TB database: A joint effort in cataloguing *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Portuguese-speaking countries. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019;72:44–58. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.011>
 26. Mogashoa T, Melamu P, Ley SD, Streicher EM, Iketleng T, Kelentse N, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in Botswana. *PLoS One.* 2019;14(5):e0216306.
 27. Cox H, Salaam-Dreyer Z, Goig GA, Nicol MP, Menardo F, Dippenaar A, et al. Potential contribution of HIV during first-line tuberculosis treatment to subsequent rifampicin-mono-resistant tuberculosis and acquired tuberculosis drug resistance in South Africa: a retrospective molecular epidemiology study. *The Lancet Microbe* [Internet]. 2021;2(11):e584–93. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00144-0](http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00144-0)
 28. Fenner L, Egger M, Bodmer T, Furrer H, Ballif M, Battegay M, et al. HIV Infection Disrupts the Sympatric Host-Pathogen Relationship in Human

- Tuberculosis. *PLoS Genet.* 2013;9(3).
29. Cavalin RF, Pellini ACG, de Lemos RRG, Sato APS. TB-HIV co-infection: spatial and temporal distribution in the largest Brazilian metropolis. *Rev Saude Publica.* 2020;54(112):1–13.
 30. Ridolfi F, Peetluk L, Amorim G, Turner M, Figueiredo M, Cordeiro-Santos M, et al. TB TREATMENT OUTCOMES IN BRAZIL: DIFFERENT PREDICTORS FOR EACH TYPE OF UNSUCCESSFUL OUTCOME. *Clin Infect Dis.* 2022 Jul;
 31. Iketleng T, Lessells R, Dlamini MT, Mogashoa T, Mupfumi L, Moyo S, et al. Mycobacterium tuberculosis Next-Generation Whole Genome Sequencing: Opportunities and Challenges . *Tuberc Res Treat.* 2018;2018:1–8.
 32. Pankhurst LJ, del Ojo Elias C, Votintseva AA, Walker TM, Cole K, Davies J, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: A prospective study. *Lancet Respir Med.* 2016;4(1):49–58.
 33. Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: A review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(5):1138–51.
 34. Takiff HE, Feo O. Clinical value of whole-genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(9):1077–90.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Por se tratar de uma pesquisa retrospectiva, nem todos os isolados foram submetidos ao WGS por ter material insuficiente, prejudicando a análise mais profunda de clusters. Apesar disso, a expectativa é que esses resultados contribuam para estudos futuros, a fim de contribuir para que a TB saia da lista de problema de Saúde Pública.

Espera-se que após a defesa de mestrado, o produto desta dissertação seja corrigido com o objetivo de publicação na revista científica Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

5. CONCLUSÃO

Apesar do pouco número de isolados sequenciados, foi possível perceber que o Amazonas possui genótipos circulantes semelhantes aos de diversas regiões do Brasil. Porém, nota-se que a terceira linhagem mais comum neste estudo foi a Linhagem X, demonstrando que pode haver uma particularidade da transmissão desse genótipo na Amazônia.

Em relação às mutações descritas, não foram encontradas nenhum perfil único da região e o perfil de sensibilidade sensível predominou entre os indivíduos.

Por fim, a integração de ferramentas moleculares no diagnóstico da TB é importante para que a vigilância da doença seja mais eficaz, contribuindo para a quebra de transmissão.

REFERÊNCIAS

1. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017;58(1):E9–12.
2. Organization WH. Tuberculosis Reports 2020 [Internet]. Vol. 188, World Health Organization. Geneva, Switzerland; 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
3. Souza MA de. Avaliação do desempenho da PCR Multiplex alelo específico para detecção de genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência a Rifampicina e Isoniazida, a partir de amostra clínica [Internet]. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS; 2013. Available from: <https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/2565/1/Dissertação - Márcia Alves de Souza.pdf>
4. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al. Novel mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. Mungi*. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(8):1296–9.
5. Brosch R, Gordon S V., Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002;99(6):3684–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122584&tool=pmc&rendertype=abstract>
6. BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Ações Programáticas Estratégicas B. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil [Internet]. 2nd ed. Ms/cGdi, editor. Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. 364 p. Available from: https://www.telelab.aids.gov.br/index.php/biblioteca-telelab/item/download/172_d411f15deeb01f23d9a556619ae965c9
7. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 10th ed. Porto Alegre: Artmed; 2012. 967 p.
8. Lyadova I. Inflammation and Immunopathogenesis of Tuberculosis Progression. In: Cardona DP-J, editor. *Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity* [Internet]. China: In Tech; 2012. Available from: https://www.researchgate.net/publication/221925670_Inflammation_and_Immunopathogenesis_of_Tuberculosis_Progression
9. Suárez I, Fünfer SM, Rademacher J, Fätkenheuer G, Kröger S, Rybniker J. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116(43):729–35.

10. Salgame P, Geadas C, Collins L, Jones-López E, Ellner JJ. Latent tuberculosis infection - Revisiting and revising concepts. *Tuberculosis*. 2015;95(4):373–84.
11. WHO. Guidelines on the management of latent tuberculosis infection [Internet]. 2015 [cited 2020 Nov 2]. p. 38.
Available from:
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/136471/9789241548908_eng.pdf?sequence=1
12. Mortaz E, Varahram M, Farnia P, Bahadori M, Masjedi M. New Aspects in Immunopathology of *Mycobacterium tuberculosis*. *ISRN Immunol*. 2012;2012:1–11.
13. Christof C, Nußbaumer-Streit B, Gartlehner G. Guidelines on Tuberculosis Infection Prevention and Control [Internet]. CC BY-NC-S. Vol. 82, *Gesundheitswesen*. Geneva: WHO; 2019. 885–889 p.
Available from:
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/311259/9789241550512-eng.pdf>
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Tuberculose | 2021. *Bol Epidemiológico*. 2021;3(1):44.
15. Brasil M da S. Boletim Epidemiológico - Tuberculose [Internet]. Vol. 105. *Brasiliavanc*; 2022. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-tuberculose-numero-especial-marco-2022.pdf/view>
16. Cafrune P, Possuelo L. Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. *Can J Microbiol* [Internet]. 2009;900(October):895–900.
Available from:
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/W09-033>
17. Ministério da Saúde do Brasil. MANUAL DE RECOMENDAÇÕES PARA ODIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE E MICOBACTERIAS NÃO TUBERCULOSAS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL [Internet]. 1st ed. MS — OS2022/0014, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2022. 492 p. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2022/manual-de-recomendacoes-para-o-diagnostico-laboratorial-de-tuberculose-e-micobacterias-nao>
18. Rodrigues C, Vadwai V. Tuberculosis Laboratory Diagnosis. *Clin Lab Med*. 2012;32(2):111–27.
19. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367–416.
20. Piersimoni C, Olivieri A, Benacchio L, Scarparo C. Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: The automated nonradiometric systems. *J Clin Microbiol*. 2006;44(1):20–8.

21. GenoType MTBDRsl VER 1.0 and VER 2.0.
22. WHO. Molecular Line-Probe Assay for the detection of resistance to second-line anti-tb drugs. World Health Organization. 2016.
23. Wu X, Tan G, Gao R, Yao L, Bi D, Guo Y, et al. Assessment of the Xpert MTB/RIF Ultra assay on rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2019;81:91–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.050>
24. Aurin TH, Munshi SK, Kamal SMM, Rahman MM, Hossain MS, Marma T, et al. Molecular approaches for detection of the Multi-Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB) in Bangladesh. *PLoS One*. 2014;9(6).
25. Lifescience H. GenoType MTBDRplus VER 2.0 [Internet]. 2013 [cited 2021 May 14]. p. 8–9. Available from: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdplus.html>
26. Bottai D, Stinear TP, Supply P, Brosch R. Mycobacterial Pathogenomics and Evolution. *Microbiol Spectr*. 2014;2(1):1–19.
27. Merker M, Kohl TA, Niemann S, Supply P. The evolution of strain typing in the mycobacterium tuberculosis complex. S. Gagneux, editor. Vol. 1019, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Germany; 2017. 43–78 p.
28. Nikolayevskyy V, Niemann S, Anthony R, van Soolingen D, Tagliani E, Ködmön C, et al. Role and value of whole genome sequencing in studying tuberculosis transmission. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(11):1377–82.
29. Santos LC, Paula A, Kipnis J. MÉTODOS APLICADOS À EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista De Patologia Tropical*. 2007;36(1):1–15.
30. Noguti EN, Leite CQF, Malaspina AC, Santos ACB, Hirata RDC, Hirata MH, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010;105(6):779–85.
31. Schürch AC, van Soolingen D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: From phage typing to whole-genome sequencing. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):602–9.
32. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsche-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.
33. Kamerbeek J, Schouls LEO, Kolk A, Agterveld MVAN, Soolingen DVAN, Kuijper S, et al. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997;35(4):907–14.
34. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB - A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012;12(4):755–66. Available

- from:<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.02.004>.
35. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000;36(3):762–71.
 36. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3563–71.
 37. Supply P. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. 2005;(May):73. Available from: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/miruinfo.faces>
 38. Pereira AM, Santos LC, Fernandes HB, Ávila Alves SL De, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. Análise molecular de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos em Goiânia, Goiás, por meio do RFLP-IS6110 e do 15 loci MIRU-VNTR. *Revista de Patologia Tropical* [Internet]. 2013;42(3):275–88. Available from: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/26925>
 39. Public Health England. England world leaders in the use of whole genome sequencing to diagnose TB - GOV.UK [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 31]. Available from: <https://www.gov.uk/government/news/england-world-leaders-in-the-use-of-whole-genome-sequencing-to-diagnose-tb>
 40. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.19). Licence: CC BY-NC- SA 3.
 41. Conceição EC, Salvato RS, Gomes KM, Dos Santos Guimarães AE, Da Conceição ML, De Paula Souza E Guimarães RJ, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil before the whole genome sequencing era: A literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2021;116(1):1–14.
 42. Gomes HM, Elias AR, Oelemann MAC, Pereira MA da S, Montes FFO, Marsico AG, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012;12(4):649–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.027>
 43. Rossetti ML, Almeida da Silva PE, Salvato RS, Reis AJ, Schiefelbein SH, von Groll A, et al. A highly rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain emerging in Southern Brazil. *Tuberculosis.* 2020;125(June):1–7.
 44. Salvato RS, Reis AJ, Schiefelbein SH, Gómez MAA, Salvato SS, da Silva LV, et al. Genomic-based surveillance reveals high ongoing transmission of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 2021;58(4):106401.
 45. Vasconcellos SEG, Acosta CC, Gomes LL, Conceição EC, Lima KV, De Araujo MI, et al. Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Brazil based on genotypes obtained by spoligotyping, mycobacterial

- interspersed repetitive unittyping and the presence of large sequence and single nucleotide polymorphism. *PLoS One*. 2014;9(10).
46. Lazzarini LCO, 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.
 47. De Almeida IN, Vasconcellos SEG, De Assis Figueredo LJ, Dantas NGT, Augusto CJ, Hadaad JPA, et al. Frequency of the *Mycobacterium tuberculosis* RDRio genotype and its association with multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–9.
 48. Duarte TA, Nery JS, Boechat N, Pereira SM, Simonsen V, Oliveira M, et al. A systematic review of East African-Indian family of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Brazilian J Infect Dis*. 2017;21(3):317–24.
 49. Conceição EC, Refregier G, Gomes HM, Olessa-Daragon X, Coll F, Ratovonirina NH, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 1 genetic diversity in Pará, Brazil, suggests common ancestry with east-African isolates potentially linked to historical slave trade. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019;73(May):337–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.06.001>
 50. Tatara MB, Perdigão J, Viveiros M, Kritski A, Da Silva KE, Sacchi FPC, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of *mycobacterium tuberculosis* in Roraima State, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;101(4):774–9.
 51. Pereira AM. Georreferenciamento e Genotipagem de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes atendidos na cidade de Goiânia — GO pelo método de MIRU-VNTR. Universidade Federal de Goiás; 2012.
 52. Brito RC. Resistência aos fármacos antituberculose em ceas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes antentidos em seis hospitais da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008.
 53. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose [Internet]. 2nd ed. Ministério da Saúde. Brasília; 2019. 364 p. Available from: https://www.telelab.aids.gov.br/index.php/biblioteca-telelab/item/download/172_d411f15deeb01f23d9a556619ae965c9
 54. Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saude, Departamentode Vigilancia de Doencas Transmissiveis, Coordenacao Geral do Prgrama Nacional de Controle da Tuberculose. Brasil livre da tuberculose. Plano Nacional pelo fim da Tuberculose como problema de Saude Publica. 2017;40.

ANEXOS

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORT-Brasil)

Pesquisador: Marcelo Cordeiro dos Santos

Área Temática:

Versão: 9

CAAE: 25102414.3.2004.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Ministério da Saúde
National Institute of Allergy and Infectious Diseases

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.318.788

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-012
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPÉCIMES RESPIRATÓRIOS		REVISÃO: 01
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Vitória Printes	Aprovado: Jaquelane Silva
Data: 14/06/2017	Data: 05/12/2018	Data: 10/12/2018
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

1. OBJETIVO

Padronizar os procedimentos para o preparo e criopreservação de espécimes respiratórios.

2. ALCANCE

Bioquímicos, técnicos e estagiários do laboratório de Tuberculose da FMT-HVD envolvidos na atividade.

3. DEFINIÇÃO DE SIGLAS

CBS – Cabine de Segurança Biológica

°C – Graus Celsius

DTT- Dithiothreitol

EPI – Equipamento de Proteção Individual

FLAB – Formulário do Laboratório

FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

N/A – Não se Aplica

POP – Procedimento Operacional Padrão

UV – Luz Ultravioleta

4. RESPONSABILIDADES

A responsabilidade pela realização da técnica e registros dos resultados é dos colaboradores executores do procedimento, treinados, capacitados e autorizados pela gerência de Tuberculose.

O responsável técnico responde pelos procedimentos escolhidos, pela validação dos mesmos e assegura a competência técnica dos executores.

Os documentos devem permanecer arquivados, sendo proibida a reprodução total ou parcial

deste sem autorização da chefia do laboratório.

5. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

5.1. Fundamento do Método

A criopreservação de materiais biológicos in natura permite a conservação de materiais biológicos sem a perda de suas propriedades a longo prazo. O tratamento das amostras respiratórias com o DTT promove a redução da viscosidade do escarro, permitindo a liquefação da amostra e sua distribuição em alíquotas para serem armazenadas a baixas temperaturas.

5.2. Materiais e Equipamentos

5.2.1 Materiais:

Tabela 1: Materiais necessários para criopreservação de UMA amostra

Material	Quantidade	Finalidade
Alcool 70%	1	Limpar os tubos e para desengordurar as lâminas
Criotubo estéril	1*	Se for amostra do estudo, vai precisar de no máx. 5 criotubos e de etiquetas do estudo.
Envelope grau (pequeno)	1	Descartar do material contaminado
Estante para tubos de ensaio	3	Apoiar os tubos
Gaze pequena 7,5 x 7,5	5	Limpar tubos, etc.
Hipoclorito 4%	1	Promover a desinfecção em caso de derramamento
Papel absorvente	6	Forrar o campo de trabalho no interior da CBS
Pincel permanente	1	Registrar cod., números nos tubos
Pipeta sorológica de 1 ou 2mL	1	Transferência de material
Pipeta sorológica de 5mL	1	Transferência de material (Somente se for criopreservar amostras do projeto Report)
Vasilha plástica	2	organizar material limpo e sujo

5.2.2 Reagentes:

Tabela 1: Reagentes necessários para criopreservação de UMA amostra

Reagentes	Quantidade	Finalidade
DTT – Dithiothreitol (Sigma, 43815)	1	Tratamento da amostra
Tampão PBS pH 7,4	1	Solubilizar o DTT (pó)

5.2.3 Equipamentos:

- Agitador tipo Vortex
- Agitador tipo shaker
- CBS
- Refrigerador
- Pipetador automático
- Cronômetro

5.3. Estabilidade

N/A

5.4. Critérios de Rejeição

- Amostras de diagnóstico com volume inferior a 3mL
- Amostra identificada de maneira errada;
- Amostra não identificada;
- Amostra sem requisição/mapa de trabalho;
- Amostra em recipiente inadequado;
- Amostra com volume transbordado ou vazado;
- Amostra com aspecto inadequado (restos alimentares, liquefeita).

5.5. Ação em Caso de Acidente

A conduta a ser adotada dependerá do tipo de ocorrência. Se houver contato dos olhos ou pele com algum dos reagentes, lavar o local com água abundante (em temperatura ambiente) por no mínimo 15 minutos. Caso haja derramamento de material biológico na área de trabalho, coloque hipoclorito de sódio a 4% sobre o líquido derramado, cubra com papel toalha e ligue a lâmpada UV por 30 min. Evacue a área. Passado esse tempo, retorne ao ambiente limpando a área como habitual e libere a área de trabalho. Comunicar imediatamente o supervisor ou chefia do laboratório.

5.6. Biossegurança

É obrigatório o uso de EPI (máscara N95, luvas, avental, propé, gorro). Este procedimento deve ser realizado em uma CSB, classe II B2 em laboratório nível 2.

5.7. Procedimentos gerais

5.7.1 Antes de iniciar a criopreservação:

a) Verificar quais amostras deverão ser criopreservadas. Todas as amostras do projeto RePORT deverão ser criopreservadas nas 24h que se sucedem a coleta.

b) Preparo solução de DTT 0,1%:

Pesar 0,01g de pó de DTT.

Dissolver em 10mL de tampão PBS pH7.4, previamente aliquotado em tubo cônico de 15mL, e homogeneizar a solução.

Identifique o tubo e coloque a data de preparo. Armazenar sob refrigeração de 2 a 8°C . **Utilizar a solução em até 48h.**

c) Na bancada, com o auxílio de um pincel permanente, identificar o criotubo com o número da requisição de exame e a data do procedimento. No caso de amostras do projeto RePORT as etiquetas que identificam os criotubos são exclusivas do estudo, não marcá-los com pincel. Localizar as etiquetas (4 alíquotas) de acordo com o PID e o mês da visita de estudo.

d) Preparar a CBS-02 com os materiais necessários para realização do procedimento.

e) Retirar a amostra do refrigerador e colocar sobre a bancada previamente limpa com álcool 70%. A amostra e a solução de DTT 0,1% devem estar a temperatura ambiente no momento do procedimento.

ATENÇÃO: Caso a amostra ainda não tenha sido processada (isto é, realizada cultura) deve-se transferir para um tubo cônico estéril o volume necessário para realização da criopreservação e devolver, O MAIS RÁPIDO POSSÍVEL, o pote da amostra para o refrigerador. Antes, porém, com o auxílio de um pincel, escrever no pote da amostra "crio ok", sinalizando para equipe que já foi retirado a alíquota para criopreservação do material. Realizar procedimento de transferência na CSB.

5.7.2. Tratamento do material biológico:

a) Filtrar a solução de DTT 0,1% (ver orientação de preparo no item 5.7.1) com membrana filtrante (0,22µm) acoplada a uma seringa 3 ou 5mL: Puxar o conteúdo a ser filtrado com a seringa, acoplar o filtro a seringa e filtrar a solução, transferindo-a para um criotubo de 2mL.

b) Com o auxílio de uma pipeta sorológica estéril de 1 ou 2mL, medir o volume de amostra a ser tratado. Desprezar a pipeta. Usando uma nova pipeta acrescentar o volume de DTT apropriado. P.ex.: Se o volume de amostra é de 2mL a quantidade apropriada da solução de

DTT é 200uL. Dessa forma a concentração final de DTT no material será de 0,01%. A solução de DTT pode ser adicionada no próprio pote da amostra.

- c) Homogeneizar a amostra em agitador tipo vortex (20 segundos).
- d) A seguir submeter a amostra a agitação automática (shaker) a 60 rpm (20 min).
- e) Após esse tempo, com o auxílio de uma pipeta sorológica estéril de 2 ou de 5mL, transferir 500uL da amostra tratada para o criotubo. Caso a amostra seja do projeto Report, fazer no mínimo 2 alíquotas para visita basal e no máximo 5. Amostras de acompanhamento de tratamento podem ser ou não criopreservadas, vai depender do volume total recebido.

ATENÇÃO: OS PROCEDIMENTOS DESCRITOS NOS ITENS ACIMA (LETRAS A,B, C,D,E) SÓ PODERÃO SER REALIZADOS DENTRO DA CSB.

- f) Fora da CSB, selar as tampas com parafilm e organizar a (s) alíquota(s) em criobox. Comece a guardar as alíquotas a partir da primeira célula localizada no canto superior esquerdo colocando as amostras na posição 1 da primeira fileira horizontal, organizando-as da esquerda para direita (zigue-zague) até a última posição. Passar uma liga para evitar que a caixa se abra durante o transporte.
- g) No caso de amostras do projeto Report as alíquotas deverão ser organizadas em caixas próprias do estudo. Essas caixas deverão ser identificadas com duas etiquetas (verdes) em dois lados (paredes) opostos da caixa e uma etiqueta (verde) no centro da superfície exterior da tampa da caixa (observar caixa espelho disponível no laboratório). Em caso de dúvidas, consultar o Manual do Laboratório do Projeto para informações quanto a organização das alíquotas dentro de cada caixa.
- h) Transportar as alíquotas em caixa apropriada com gelo até o freezer -80°C.
- i) No caso de amostras do projeto Report as caixas contendo as alíquotas serão armazenadas no freezer -80°C, localizado no Lab. Multidisciplinar até o momento do transporte para o biorrepositório.
- j) Realizar o registro da atividade no mapa de trabalho próprio do estudo, no caso das amostras do projeto.

5.8. Controle de Qualidade:

5.8.1 Controle de qualidade interno

N/A

5.8.2 Controle de qualidade externo

N/A

6. FORMULÁRIOS

Formulário de Controle da Produção de Tampão pH=7.4 (FLAB005)

Formulário de Controle da Produção de DDT 0,1% (FLAB043)

7. ANEXOS

N/A

8. REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1ª Edição – 2008. Brasília, DF 2008.
2. [Forbes, BA](#); [Hall, GS](#); [Miller, MB](#); [Novak, SM](#); [Rowlinson, MC](#); [Salfinger, M](#); [Somoskövi, A](#); [Warshauer, DM](#); [Wilson, ML](#). Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Jan 31;31(2). pii: e00038-17. doi: 10.1128/CMR.00038-17. Print 2018 Apr.
3. Kent, P.T.; Kubica, G.P. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta, 1985.
4. Lourenço, M.C. *et al.* Armazenamento a longo prazo de cepas do CMTb. Protocolo: Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORT-Brasil). Procedimento Operacional Padrão: POP BA 008. Rev. 02. Ano de emissão: 2014.
5. Mycobacteriology Laboratory Manual. First Edition, April 2014. Stop TB Partnership.
6. RePORT Lab Manual v02, fevereiro, 2017.

9. REVISÕES

Nº da revisão	Data	Item Alterado	Descrição da Alteração	Responsável pela Alteração	Justificativa
00	14/06/2017	-	Emissão inicial	-	-
01	05/12/2018	8 e cabeçalho: campo aprovação.	Mudança de responsável pela aprovação dos POPs.	Jaquelane Silva	Atualização da literatura e revisão anual.

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP-GTB-027
INATIVAÇÃO DE CEPAS DE MICOBACTÉRIAS ATRAVÉS DE TERMOBLOCO		REVISÃO: 00
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Hilda Ferreira	Aprovado: Jaquelane Silva
Data: 27/05/2017	Data: 06/06/2017	Data: 15/06/2017
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

1. OBJETIVO

Inativar cepas de do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (cMTB) através de termobloco.

2. ALCANCE

Bioquímicos, técnicos e estagiários do laboratório de Tuberculose da FMT-HVD envolvidos na atividade.

3. DEFINIÇÃO DE SIGLAS

CBS – Cabine de Segurança Biológica

cMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

mL – mililitro

N/A – Não se Aplica

µL – microlito

4. RESPONSABILIDADES

A responsabilidade pela realização da técnica e registros dos resultados é dos colaboradores executores do procedimento, treinados, capacitados e autorizados pela gerência de Tuberculose.

O responsável técnico responde pelos procedimentos escolhidos, pela validação dos mesmos e assegura a competência técnica dos executores.

Os documentos devem permanecer arquivados, sendo proibida a reprodução total ou parcial deste sem autorização da chefia do laboratório.

5. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

5.1. Fundamento do Método

É importante realizar a inativação de cepas do cMTB para o manejo mais seguro do microorganismo, afim de diminuir o risco de contamiç

5.2. Materiais e Equipamentos

5.2.1 Materiais:

- Pipeta automática 1 mL;
- Pipeta automática 500 µL;
- Ponteiras 1mL;
- Ependorff com tampa e resistente ao calor.

5.2.2 Reagentes:

- Água ultrapura esterilizada do tipo Milli-Q.

5.2.3 Equipamentos:

- CBS;
- Termobloco.

5.3. Estabilidade

N/A

5.4. Ação em Caso de Acidente

A conduta a ser adotada dependerá do tipo de ocorrência. Se houver contato com os olhos ou pele com algum dos reagentes, lavar o local com água abundante (em temperatura ambiente) por no mínimo 15 minutos. Caso haja derramamento de material biológico na área de trabalho, colocar hipoclorito de sódio a 4% sobre o líquido derramado, cubra com papel toalha e ligue a lâmpada UV por 30 min. Evacue a área. Passado esse tempo, retorne ao ambiente limpando a área como habitual e libere a área de trabalho. Comunicar imediatamente o supervisor ou chefia do laboratório.

5.5. Biossegurança

É obrigatório o uso de EPI (máscara N95, luvas, avental, gorro). Este procedimento deve ser realizado em uma CSB, classe II B2 em laboratório nível 3.

5.7. Procedimentos gerais

- 1- Retirar uma alça cheia do crescimento bacteriano em meio sólido e colocar em um ependorff contendo 500 µl de água ultrapura esterilizada;
- 2- Se for utilizar cultura em meio líquido, transferir 1,5 ml da cultura em um ependorff esterilizado, centrifugar a 12.000 x g por 5 minutos e ressuspender o sedimento em 100 µl de água purificada do tipo Milli-Q esterilizada;
- 3- Aquecer por 20 minutos a 99°C em termobloco localizado dentro da CSB.
- 4- Congelar a -20°C. No momento de uso, descongelar, centrifugar brevemente e usar 5 µl do sobrenadante.

6. ANEXOS

N/A

7. REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1ª Edição – 2008. Brasília, DF 2008.




9. REVISÕES

Nº da revisão	Data	Item Alterado	Descrição da Alteração	Responsável pela Alteração	Justificativa
00	15/06/2017	-	Emissão inicial	-	-



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

POP-GTB-028

EXTRAÇÃO DE DNA DE MICOBACTÉRIAS POR CTAB/NaCl		REVISÃO: 00
Elaborado: Jaqueline Silva	Revisado: Hilda Ferreira	Aprovado: Jaqueline Silva
Data: 07/05/2016	Data: 26/06/2016	Data: 01/07/2016
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

7. OBJETIVO

Extrair DNA cromossomal de cepas de micobactérias.

8. ALCANCE

Bioquímicos, técnicos e estagiários do laboratório de Tuberculose da FMT-HVD envolvidos na atividade.

9. DEFINIÇÃO DE SIGLAS

CBS – Cabine de Segurança Biológica

Cmtb – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

MI – mililitro

N/A – Não se Aplica

MI – microlito

4. RESPONSABILIDADES

A responsabilidade pela realização da técnica e registros dos resultados é dos colaboradores executores do procedimento, treinados, capacitados e autorizados pela gerência de Tuberculose.

O responsável técnico responde pelos procedimentos escolhidos, pela validação dos mesmos e assegura a competência técnica dos executores.

Os documentos devem permanecer arquivados, sendo proibida a reprodução total ou parcial deste sem autorização da chefia do laboratório.

10. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

5.2. Materiais e Equipamentos

5.2.1 Materiais:

- Ependorff;
- Pipeta automática 1ml;
- Pipeta automática 10 µL;
- Estante de apoio para ependorff;
- Abridor de tampa de ependorff.

5.2.2 Reagentes:

- Solução TE 1X;
- Proteinase K;
- SDS 10%;
- NaCl 5M;
- CTAB/NaCl
- Clorofórmio;
- Etanol absoluto gelado.

5.2.3 Equipamentos:

- CBS;
- Termobloco;
- Freezer;
- Vórtex;
- Termobloco;

5.3. Estabilidade

N/A

5.4. Ação em Caso de Acidente

A conduta a ser adotada dependerá do tipo de ocorrência. Se houver contato com os olhos ou pele com algum dos reagentes, lavar o local com água abundante (em temperatura ambiente) por no mínimo 15 minutos. Caso haja derramamento de material biológico na área de trabalho, colocar hipoclorito de sódio a 4% sobre o líquido derramado, cubra com papel toalha e ligue a lâmpada UV por 30 min. Evacue a área. Passado esse tempo, retorne ao ambiente limpando a área como habitual e libere a área de trabalho. Comunicar imediatamente o supervisor ou chefia do laboratório.

5.5. Biossegurança

É obrigatório o uso de EPI (máscara N95, luvas, avental, gorro). Este procedimento deve ser realizado em uma CSB, classe II B2 em laboratório nível 3.

5.7. Procedimentos gerais

ANTES DE COMEÇAR:

Ligar o banho à 37°C

Colocar o Etanol Absoluto no Freezer

- 1- Em um ependorff de 2ml, pipetar 567 µL de TE 1x;
- 1- Adicionar ao ependorff o máximo de colônias possível;
- 2- Adicionar 3 µL de Proteinase K (10mg/ml) e 30 µL de SDS 10%. Vortexar bem e por pelo menos 1 minuto **(Passo muito importante!)**;
- 3- Incubar em banho seco por 1 hora à 37°C (aqui a solução se torna clara, viscosa e ocorre a inativação da cepa);
- 4- Retirar os tubos do banho e ajustar a temperatura para 65°C
- 5- Adicionar 100 µL de NaCl 5M e 80 µL de CTAB/NaCl e vortexar bem;
- 6- Incubar por 10 minutos à 65°C;
- 7- Pipetar 750 µL de Clorofórmio, vortexar bem e centrifugar por 5 minutos em velocidade máxima;
- 8- Transferir o sobrenadante para um ependorff de 1,5ml **(cuidado para não deslocar a película que divide o sobrenadante da sujeira)**;
- 9- Adicionar 450 µL de etanol absoluto **GELADO** e mexer o tubo para precipitar o DNA (Aqui é possível enxergar o DNA);
- 10- Centrifugar por 5 minutos em velocidade máxima;
- 11- Descartar o sobrenadante e dar leves batidinhas em um papel absorvente para retirar o máximo possível do etanol. Depois disso, deixar os tubos virados apoiado no papel para que mais etanol seja absorvido;
- 12- Secar por 10 minutos à 70°C com a tampa do tubo aberta.
- 13- Ressuspender o DNA em 100 µL de água ultra pura caso o pellet esteja visível. Se o pellet não estiver visível, ressuspender em 50 µL;
- 14- Incubar por 10 minutos à 70°C. Depois, quantificar.

Observação: se usar o termobloco para inativação de DNA, é necessária a realização dos passos 6 ao 15 da extração por CTAB/NaCl para a obtenção de um DNA mais puro e livre de interferências.

6. ANEXOS

N/A

7. REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1ª Edição – 2008. Brasília, DF 2008.
2. Embden JANDAVAN, 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. Clin Microbiol. 1993;31(2):406–9.

9. REVISÕES

Nº da revisão	Data	Item Alterado	Descrição da Alteração	Responsável pela Alteração	Justificativa
00	01/07/2016	-	Emissão inicial	-	-



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

POP-GTB-029

IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DO cMTB ATRAVÉS DA TÉCNICA MIRU-VNTR		REVISÃO: 00
Elaborado: Jaquelane Silva	Revisado: Hilda Ferreira	Aprovado: Jaquelane Silva
Data: 01/08/2016	Data: 17/08/2016	Data: 01/09/2016
Assinatura: 	Assinatura: 	Assinatura: 

1. OBJETIVO

Padronizar a técnica de genotipagem do cMTB no laboratório.

2. ALCANCE

Bioquímicos, técnicos e estagiários do laboratório de Tuberculose da FMT-HVD envolvidos na atividade.

3. DEFINIÇÃO DE SIGLAS

CBS – Cabine de Segurança Biológica

cMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

mL – mililitro

N/A – Não se Aplica

µL – microlito

4. RESPONSABILIDADES

A responsabilidade pela realização da técnica e registros dos resultados é dos colaboradores executores do procedimento, treinados, capacitados e autorizados pela gerência de Tuberculose.

O responsável técnico responde pelos procedimentos escolhidos, pela validação dos mesmos e assegura a competência técnica dos executores.

Os documentos devem permanecer arquivados, sendo proibida a reprodução total ou parcial deste sem autorização da chefia do laboratório.

5. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

5.2. Materiais e Equipamentos

5.2.1 Materiais:

- Ependorff;
- Pipeta automática 1mL;
- Pipeta automática 10 µL;
- Estante de apoio para ependorff;
- Abridor de tampa de ependorff.

5.2.2 Reagentes:

- Solução TE 1X;
- Proteinase K;
- SDS 10%;
- NaCl 5M;
- CTAB/NaCl
- Clorofórmio;
- Etanol absoluto gelado.

5.2.3 Equipamentos:

- CBS;
- Termobloco;
- Freezer;
- Vórtex;
- Termobloco;

5.3. Estabilidade

N/A

5.4. Ação em Caso de Acidente

A conduta a ser adotada dependerá do tipo de ocorrência. Se houver contato com os olhos ou pele com algum dos reagentes, lavar o local com água abundante (em temperatura ambiente) por no mínimo 15 minutos. Caso haja derramamento de material biológico na área de trabalho, colocar hipoclorito de sódio a 4% sobre o líquido derramado, cubra com papel toalha e ligue a lâmpada UV por 30 min. Evacue a área. Passado esse tempo, retorne ao ambiente limpando a área como habitual e libere a área de trabalho. Comunicar imediatamente o supervisor ou chefia do laboratório.

5.5. Biossegurança

É obrigatório o uso de EPI (máscara N95, luvas, avental, gorro). Este procedimento deve ser realizado em uma CSB, classe II B2 em laboratório nível 3.

5.7. Procedimentos gerais

5.7.1. Preparação Mix PCR-MIRU

Nesta etapa deve-se preparar solução suficiente para 12 amostras, seguindo a distribuição dos primers para a obtenção de um volume final de 18 µl por amostra:

5.7.3. Sequenciamento

Após todos os passos acima, levar as amostras ao sequenciador e analisar os resultados posteriormente.

Todos os processos devem ser realizados com bastante cuidado e atenção para que não haja nenhum tipo de interferência nos futuros resultados.

Nunca se esqueça de dar spin nas amostras para que elas possam ocupar o fundo do tubo, para facilitar na corrida do amplificador e sequenciador, e também para diminuir aerossóis e possíveis contaminações.

6. ANEXOS

N/A

7. REFERÊNCIAS

1. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsç-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006 Dec;44(12):4498-510. doi: 10.1128/JCM.01392-06. Epub 2006 Sep 27. PMID: 17005759; PMCID: PMC1698431.

9. REVISÕES

Nº da revisão	Data	Item Alterado	Descrição da Alteração	Responsável pela Alteração	Justificativa
00	01/07/2016	-	Emissão inicial	-	-