

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DO COMPLEXO *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS ISOLADO NO DISTRITO FEDERAL DE 2014 A 2021

KARINA FERNANDES DE ARAÚJO

BRASÍLIA-DF

2023

KARINA FERNANDES DE ARAÚJO

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DO COMPLEXO *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS ISOLADO NO DISTRITO FEDERAL DE 2014 A 2021

Volume Único

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães.

Coorientadora: Dra. Glaura Regina Caldo e Lima.

BRASÍLIA-DF

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

KARINA FERNANDES DE ARAÚJO

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DO COMPLEXO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLADO NO DISTRITO FEDERAL DE 2014 A 2021

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2023.

Banca Examinadora:

Presidente: Dra. Pérola de Oliveira Magalhães

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Suplente: Dra. Glaura Regina de Castro e Caldo Lima

Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF)

Membro: Dr. Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior

Fundação Hemocentro de Brasília (FHB)

Membro: Dr. Natan Monsores de Sá

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Dedico este trabalho ao meu filho Gregório, para que desde cedo seja despertada a sua curiosidade e seu interesse em sempre aprender algo novo; ao meu marido Rafael, pelo apoio incondicional; aos meus pais, em especial à minha mãe, e irmão, que me permitiram chegar até aqui; e a minha grande incentivadora Glaura Regina.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha saúde, oportunidades e perseverança para concluir este projeto.

Ao meu marido Rafael Lapa, por todo carinho e apoio e, principalmente, por cultivar nosso amor durante todos esses anos.

Aos meus pais, Carla Patrícia e Agnaldo Pereira (*in memoriam*), ao meu irmão, Guilherme, por me darem a base para me tornar quem sou.

Em especial, à minha mãe, por estar sempre disposta a ajudar, incentivar, compreender e a me estimular a ser minha melhor versão em todos os momentos da vida.

À Maria Célia, que me mostrou que sempre há um novo caminho a seguir e que me apresentou pessoas incríveis, fundamentais para este trabalho.

À minha orientadora, Dra. Pérola de Oliveira Magalhães, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade e confiança depositada durante todo este projeto.

À minha coorientadora, Dra. Glaura Regina de Castro e Lima, agradeço a oportunidade incrível que me foi dada no projeto de pesquisa da tuberculose que foi marco inicial para esse trabalho. Agradeço pelos ensinamentos nos ensaios e análise, pela paciência, amizade e oportunidade de continuarmos essa parceria.

À equipe de tuberculose do LACEN-DF, Agnaldo, Agenor, Alberto, Brenno, Carlos, Fernanda, Maria, Nina e Rosa por terem me acolhido no setor e me ensinado várias técnicas com paciência e empatia, bem como pela disposição de ajudar a qualquer momento.

Ao Dr. Natan Monsores de Sá, imensamente, por dedicar um tempo para me dar um feedback.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo apoio financeiro no projeto de pesquisa da tuberculose, que foi marco inicial para esse trabalho através da Seleção Pública de Propostas de Pesquisa Científica, Tecnológica e Inovação.

À FEPECS, pela aprovação no comitê de ética.

À Universidade de Brasília (UnB), por me proporcionar esse sonho e conquistar mais um novo ciclo de vida.

À Jeannie Yokoyama e a Natália Costa, minhas amigas, incentivadoras e sempre dispostas a me ajudar em qualquer circunstância.

À Cláudia Cardoso e família por todo carinho e apoio nos momentos mais difíceis.

À enfermeira Juliana, do Hospital Dia, por me acolher e me ajudar na busca dos prontuários dos pacientes.

*“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”
Marie Curie*

RESUMO

ARAÚJO, Karina Fernandes de. **Perfil fenotípico e genotípico do complexo *Mycobacterium Tuberculosis* isolado no Distrito Federal de 2014 a 2021**. Brasília, 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília. 2023.

A tuberculose (TB) continua sendo um importante problema de saúde pública. A má detecção e condução do tratamento da doença resistente aos medicamentos ameaça reverter o progresso atual do controle global da TB. Nesse sentido, é necessário estudar a resistência aos fármacos, uma vez que ela representa uma ameaça aos programas de TB. A compreensão desses mecanismos requer conhecimento do padrão de sensibilidade das linhagens para, assim, fornecer o tratamento adequado ao doente de TB. O estudo objetiva analisar os perfis fenotípicos e genotípicos das cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e a resistência aos principais fármacos utilizados para o tratamento da TB isoladas em amostras clínicas do Distrito Federal (DF) no período de 2014 a 2021. Trata-se de um estudo transversal retrospectivo com 30 cepas de pacientes com TB pulmonar e extrapulmonar positivas encaminhadas ao Laboratório de Micobactérias do Núcleo de Bacteriologia do LACEN-DF. Fizeram parte do estudo dados do SINAN/ SITE-TB e prontuários dos pacientes. Todas as amostras clínicas foram analisadas utilizando as metodologias: GeneXpert® (TRM-TB), baciloscopia, cultura sólida e líquida, SIRE BACTEC/MGIT 960®, GenoType® MTBDR*plus* e GenoType® MTBDR*sl*. De acordo com os resultados do teste GenoType® MTBDR*plus*, 30% das cepas apresentaram mutações no gene *rpoB*, nenhuma cepa apresentou mutação em *katG* e *inhA* simultaneamente, 10% das cepas apresentaram mutações apenas nos genes *inhA*, 53,3% das cepas apresentaram mutações no gene *katG*. A precisão do GenoType® MTBDR*plus*, no DF, para a detecção de resistência à R e H foi de 100% quando comparável ao método MGIT 960®. A maioria das amostras analisadas se tratava de novos casos de TB sendo diagnosticado com resistência primária. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética da FEPECS (SES-DF) sob o Número do Parecer: 1.960.986/CAAE: 62925816.9.0000.5553.

Palavras-Chave: Tuberculose; tuberculose resistente a múltiplos medicamentos, *rpoB*, *KatG*, *inhA*.

ABSTRACT

ARAÚJO, Karina Fernandes de. **Phenotypic and genotypic profile of the *Mycobacterium Tuberculosis* complex isolated in the Federal District from 2014 to 2021.** Brasília, 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília. 2023.

Tuberculosis (TB) remains an important public health problem. Poor detection and management of drug-resistant disease threatens to reverse current progress in global TB control. In this sense, it is necessary to study drug resistance, since it represents a threat to TB programs, and understanding these controls requires knowledge of the sensitivity pattern of the strains and, thus, providing adequate treatment to the TB patient. The study objectively analyzes the phenotypic and genotypic profiles of the *Mycobacterium tuberculosis* complex strains and the resistance to the main drugs for the treatment of TB in clinical clinics in the Federal District (DF) from 2014 to 2021. This is a retrospective cross-sectional study with 30 strains from patients with positive pulmonary and extrapulmonary TB sent to the Mycobacteria Laboratory of the Bacteriology Nucleus of LACEN-DF. Data from SINAN/SITE-TB and patient records were part of the study. All clinical analyzes were followed using the methodologies: GeneXpert® (TRM-TB), bacilloscopy, solid and liquid culture, SIRE BACTEC/MGIT 960®, GenoType® MTBDRplus and GenoType® MTBDRsl. According to the results of the GenoType® MTBDRplus test, 30% of the strains evolved the *rpoB* gene, no strains mutated both *katG* and *inhA* simultaneously, 10% of the strains evolved only the *inhA* genes, 53.3% of the strains evolved no *katG* gene. The accuracy of GenoType® MTBDRplus, in the DF, for detecting resistance to rifampicin and isoniazid was 100% when found using the MGIT 960® method. Most of the patients seen were new TB cases being overwhelmed with primary resistance. The project was approved by the FEPECS Ethics Committee (SES-DF) under Opinion Number: 1.960.986/CAAE: 62925816.9.0000.5553.

Key words: Tuberculosis; multi-drug resistant tuberculosis, *rpoB*, *KatG*, *inhA*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sanatório de Beelitz próximo a Berlim utilizado para o tratamento de trabalhadores da capital alemã com TB.	23
Figura 2 - Transmissão da tuberculose através da exalação/inalação de aerossóis de pessoa contaminada.....	26
Figura 3 - Fluxo de amostras suspeitas de tuberculose (TB) e TB droga resistente	42
Figura 4 - Colônias do complexo <i>M. tuberculosis</i> em meio de cultura Ogawa-Kudoh. Colônias de cor creme, não produtoras de pigmento, secas e rugosas	57
Figura 5 - Programação para a amplificação (HAIN)	58
Figura 6 - Exemplo das bandas presente em cada fita HAIN de 1° e 2° linha.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Culturas realizadas nos anos de 2014 a 2021 no LACEN-DF	46
Tabela 2 - Taxa de contaminação x positividade das culturas realizadas nos anos de 2014 a 2021 no LACEN-DF.	47
Tabela 3 - Variáveis relativas aos pacientes e resultados dos testes fenotípicos (MGIT 960 ®, GeneXpert®) e genotípico (GenoType ®).	50
Tabela 4 - Variáveis relativas ao tipo de entrada e hábitos.	54
Tabela 5 - Relação dos resultados de baciloscopia, TRM-TB (GeneXpert®) e cultura dos pacientes.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG/CP – Aminoglicosídeos/peptídeos cíclicos

AMK – Amicacina

ANTI-TB – Antituberculose

BAAR – Bacilo álcool-ácido-resistente

BCG – Bacilo de Calmette - Guérin

BK – Bacilo de Koch

CAP – Capreomicina

CMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019*

DF – Distrito Federal

DFC – Dose fixa combinada

DNA – Ácido desoxirribonucléico

E – Etambutol

Eis – Gene usado para detecção da resistência de nível baixo à kanamicina

FLQ – Fluoroquinolonas

GYRA/GYRB – Genes que conferem resistência fluoroquinolonas

H – Isoniazida

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC – Índice de crescimento

KAN – Canamicina

*KATG/INH*A – Genes que conferem resistência ao antibiótico isoniazida

LACEN-DF – Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal

TB-MDR – Tuberculose multidrogas-resistente

MNT – Micobactéria não tuberculosa

MS – Ministério da Saúde

SNPs e DIPs / INDELS – Marcadores genéticos

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polimerase chain reaction*

PE/PPE – “*Proline-glutamic acid e proline-proline-glutamic acid*”

PNCT – Programa Nacional de Controle da Tuberculose

R – Rifampicina

RpoB – Gene que conferem resistência ao antibiótico rifampicina

Rrs – Genes que conferem resistência à canamicina

RT- PCR – *Reverse transcription – polymerase chain reaction*

S – Estreptomicina

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SITE-TB – Sistema de Informação de tratamentos especiais para tuberculose

TARV – Terapia Antirretroviral

TB – Tuberculose

TB-HIV – Coinfecção tuberculose- HIV

TB-RR – Tuberculose resistente à rifampicina

TBUG – Tuberculose urogenital

TRM-TB – Teste Rápido Molecular para Tuberculose

VIO – Viomicina

WHO – *World Health Organization*

WT – Banda do tipo selvagem

TB-XDR – Tuberculose extremamente resistente

Z – Pirazinamida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	História	22
2.2	Micobactérias.....	24
2.3	Transmissão	25
2.4	Tuberculose pulmonar	27
2.5	Tuberculose extrapulmonar	27
2.5.1	Tuberculose Miliar.....	27
2.5.2	Tuberculose Urogenital	28
2.5.3	Meningite tuberculosa.....	28
2.5.4	Tuberculose Abdominal	29
2.5.5	Pericardite por Tuberculose.....	29
2.5.6	Tuberculose dos ossos e das articulações.....	29
2.5.7	Outros locais	30
2.6	Vacina BCG.....	30
2.7	Genoma do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
2.8	População de maior vulnerabilidade.....	33
2.9	Diagnóstico clínico	33
2.9.1	Tuberculose pulmonar.....	33
2.10	Diagnóstico laboratorial	33
2.10.1	GeneXpert®	34
2.10.2	Baciloscopia.....	34
2.10.3	Cultura	35
2.10.4	Imunocromatografia	36
2.10.5	BD BACTEC MGIT 960® e BD BACTEC MGIT SIRE®	36
2.10.6	Genotype ®	37

2.10.7 Sequenciamento genético	38
2.11 Tratamento da tuberculose.....	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivos específicos.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Critérios para inclusão e exclusão das amostras.....	41
4.1.1 Considerações éticas.....	41
4.2 Cepas selecionadas para o estudo.....	41
4.3 Busca de dados referentes aos pacientes	41
4.4 Fluxo das amostras encaminhadas ao LACEN-DF	42
4.5 Teste rápido molecular GeneXpert®.....	42
4.6 Baciloscopia das amostras selecionadas.....	43
4.7 Cultura	43
4.8 Método MGIT 960®	44
4.9 GenoType ®	44
4.10 Controle de qualidade.....	45
4.11 Amostras estocadas para análise.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Busca de dados referentes aos pacientes	45
5.2 Amostras selecionadas para o estudo	46
5.3 Baciloscopia, GeneXpert® e cultura das amostras selecionadas	55
5.4 GenoType ®	57
5.5 Método MGIT 960®	59
6 CONCLUSÃO.....	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
8 ANEXO.....	67

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) continua sendo um importante problema de saúde pública a nível mundial. O fato é que apesar da TB mostrar variável incidência e mortalidade no mundo e tendência de queda, a má detecção e condução do tratamento da doença resistente aos medicamentos ameaça reverter o progresso atual do controle global da TB (KUAN et al., 2015).

No Brasil, ainda há dificuldades no controle da doença. O Brasil continua entre os 30 países de alta carga para a TB e para coinfeção TB-HIV, sendo, portanto, considerado prioritário para o controle da doença no mundo pela Organização Mundial de Saúde. A cada ano no Brasil são notificados em média cerca de 70 mil casos novos e 4,6 mil óbitos em decorrência da doença (WHO, 2018).

Entre 2015 e 2021, foram diagnosticados 6.698 casos de TB droga resistente no Brasil. Por isso, em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou uma nova estratégia voltada ao fim da tuberculose até 2035. Essas estratégias visam a redução em 90 % da incidência da TB e em 95 % o número de mortes causadas pela doença no país até o ano de 2035. Isso significa que, até 2035, será necessário que o Brasil reduza a taxa de incidência para menos de 10 casos por 100 mil habitantes e limite o número de óbitos pela doença em 230. Com essa nova meta, tornou-se fundamental o diagnóstico precoce e o tratamento imediato de pessoas de todas as idades com qualquer forma de TB suscetível ou resistente a medicamentos. (BRASIL, 2021; BRASIL, 2019).

Em 2020, ano que teve início a pandemia pela *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19), observou-se uma queda de 16% na notificação de casos novos de TB no Brasil em comparação com 2019. Essa redução foi mais pronunciada a partir do mês de abril, sendo que em maio verificou-se a maior variação do período (34%) em relação aos casos notificados (BRASIL, 2022).

No mesmo ano, a demanda de diagnóstico e tratamento da TB na população foi baixa em comparação com o ano de 2019. Um dos grandes desafios enfrentados durante a pandemia pela COVID-19 foi a redução dos recursos humanos, financeiros e outros realocados para o combate à COVID-19, limitando a disponibilidade de serviços essenciais (BRASIL, 2022).

Atualmente, o Distrito Federal (DF) tem uma população de 3.094.325 habitantes e apresentou em 2021 segundo dados do Boletim Epidemiológico a incidência de 9,2 casos de TB por 100 mil habitantes (IBGE, 2021; BRASIL 2021). Está localizado na Região Centro-Oeste do Brasil, sendo Brasília a cidade mais importante e sede da capital federal, possui 31 Regiões Administrativas e o serviço público é responsável por 79,9% das ações de saúde

(COHN, 2010), com a ressalva de que somente a rede pública realiza o tratamento da TB. Sendo o Hospital Dia a referência no tratamento de agravos como HIV, hepatites virais crônicas e as formas graves de TB e hanseníase (BRASIL, 2020).

Alguns pesquisadores vêm observando que nos últimos anos, os casos de infecções por TB têm apresentado resistências aos fármacos antituberculose (anti-TB) já utilizados no esquema de tratamento da TB. Hoje, ainda não há na literatura uma estratégia quimioterápica eficiente de combate a TB resistente, fazendo-se necessários estudos com atualizações mais aprofundadas sobre o tema (CORDILLOT *et al.*, 2013).

A resistência no complexo *M. tuberculosis* (CMTB) pode ser classificada em primária, a qual é observada em pacientes sem histórico de tratamento de TB e que, portanto, foram infectados por uma fonte com TB resistente. Já a forma adquirida ou secundária é verificada em pacientes com TB que tiveram inicialmente o seu resultado como TB sensível e que se tornaram resistente após exposição aos medicamentos (DALCOLMO, 2012).

A resistência do complexo *M. tuberculosis* aos fármacos ocorre quase que exclusivamente por alterações pontuais em seu genoma. Essas mutações pontuais conferem monorresistência (resistência a somente um fármaco) e o acúmulo gradual dessas alterações pode levar ao desenvolvimento de multirresistência, sendo que a seleção de isolados resistentes é favorecida pelo tratamento realizado de forma inadequada (CORDILLOT *et al.*, 2013).

A resistência aos fármacos anti-TB também pode ocorrer, mas em número bem menor, por resistência inata ou intrínseca, ou por mecanismos que inativam o fármaco ou modificam a molécula-alvo do fármaco. Os mecanismos mais conhecidos de resistência inata do CMTB são: bombas de efluxo (algumas proteínas presente no CMTB são capazes de expulsar os fármacos do meio intracelular para o meio extracelular dos microrganismos), modificação de alvos (há a modificação na molécula-alvo do fármaco esta pode levar à alteração da ligação do fármaco na molécula e conseqüentemente a diminuição da sua atividade), modificação de antibióticos (a bactéria é capaz de produzir algumas enzimas que transferem os grupamentos e alteram a estrutura química dos fármacos causando um impedimento na ligação às moléculas-alvo, como a enzima aminoglicosídeo N-acetiltransferase, que causa a resistência aos aminoglicosídeos) e degradação enzimática de antibióticos (a bactéria é capaz de produzir algumas enzimas que degradam os fármacos, como a β -lactamase, codificada pelo gene *blaC* de *M. tuberculosis*, que possui atividade de degradar anéis β -lactâmicos, incluindo os membros da família dos antibióticos carbapenêmicos, que são degradados lentamente (BRASIL, 2019).

Para reduzir o fardo da tuberculose multirresistente (TB-MDR) e a emergência de cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniazida (H) e rifampicina (R), além

da resistência a qualquer fluorquinolona (FLQ) e a pelo menos uma das drogas específicas injetáveis: capreomicina (CAP), Canamicina (KAN), e amicacina (AMK), devem ser superadas as lacunas de detecção, diagnóstico e tratamento com novas ferramentas (KUAN *et al.*, 2015).

Nesse sentido, é necessário estudar a resistência aos fármacos uma vez que ela representa uma ameaça aos programas de TB, e a compreensão desses mecanismos requer conhecimento do padrão de sensibilidade das linhagens e assim, fornecer o tratamento adequado ao doente de TB (SINGH *et al.*, 2020).

A tuberculose multidrogas-resistente (TB-MDR) é um problema crescente e o padrão ouro atual dos testes de sensibilidade às drogas é lento e difícil. Além disso, os testes de susceptibilidade fenotípica automatizados às drogas são ensaios caros e lentos, ou seja, diagnosticar a resistência às drogas permanece um obstáculo para a eliminação da TB. Daí, o combate à resistência aos medicamentos, deve passar por métodos laboratoriais mais rápidos, dentre eles os testes moleculares em uma gestão eficaz do caso e para um tratamento correto. (ACHARYA *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de diagnósticos moleculares baseados em reações de *polimerase chain reaction* (PCR) e sequenciamento genético são importantes porque detectam tanto a presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, quanto as mutações que conferem a resistência às drogas, sendo que estas ferramentas podem subsidiar a identificação de determinantes genéticos de resistência aos principais fármacos anti-TB (DICKS; STOUT, 2018).

As mutações associadas à resistência à R, uma das principais drogas de primeira linha, são bem compreendidas e ocorrerem em uma única região genômica em mais de 95% dos isolados resistentes fenotipicamente. As mutações associadas com H que é o segundo fármaco mais utilizado de primeira linha, são mais complexas e ocorrem em múltiplos genes do complexo *M. tuberculosis*. Mas, em cada contexto epidemiológico, torna-se necessário a compreensão dessas mutações a fim de conduzir adequadamente o tratamento de TB-MDR (BESPIATYKH *et al.*, 2021).

A emergência de cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* XDR agrava o problema. Isso porque a TB-XDR é causada por cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à H e R (TB-MDR), além da resistência a qualquer FLQ e a pelo menos uma das seguintes drogas injetáveis: CAP, KAN e AMK (CAMINERO *et al.*, 2010).

Vários outros estudos de diagnósticos moleculares vêm sendo realizados, dentre eles a de variabilidade genética do CMTB e sua relação com a virulência e gravidade da doença (VINHAS, 2013); o da modelação estrutural de proteína que pode prever o impacto dos

polimorfismos na eficácia do fármaco, na ausência de dados fenotípicos (PHELAN *et al.*, 2016); a identificação de variações de nsSNPs e Indels nos genes PE_PGRS de cepas TB-XDRTB (KANJI *et al.*, 2015) no sentido também de superar as limitações dos testes de sensibilidade às drogas fenotípicas clássicas (VAN DEUN *et al.*, 2015).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História

A TB é uma das doenças mais antigas do mundo. Acredita-se que a TB é tão antiga quanto a própria humanidade. Alguns achados arqueológicos nos permitem levar em consideração que os primeiros casos do acometimento humano pela TB, a chamada até então de “peste branca”, tenham ocorrido em múmias egípcias, há mais de 5.000 anos A. C., as quais apresentavam anormalidades típicas do comprometimento vertebral pela TB (o Mal de Pott), além de tecidos contendo o DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (DUTT; STEAD, 2006).

A TB passou a ser mais compreendida nos séculos XVII e XVIII. Foi quando a doença recebeu seu nome atual. A partir do final do século XVIII a enfermidade foi vinculada a duas representações: a primeira a associava a uma doença romântica, que acometia principalmente poetas e intelectuais; a outra, criada em fins do século XIX, a vinculava a um mal social, visão que permaneceu durante o século XX (DUTT; STEAD, 2006).

Desde o século XIX, a doença era tratada com a terapêutica higienodietética, que consistia em uma boa alimentação, repouso e incorporava o clima das montanhas. Para isso, os pacientes eram isolados em sanatórios e preventórios (Figura 1).

Figura 1 - Sanatório de Beelitz próximo a Berlim utilizado para o tratamento de trabalhadores da capital alemã com TB.



Fonte: Neher, 2016.

Há estudos que relatam que a TB chegou no Brasil durante a colonização portuguesa quando ela aqui se estabeleceu, onde jesuítas e colonos eram infectados pelo que chamavam de “peste branca”. O contato dos doentes com os povos nativos (índios) proporcionou o adoecimento e a morte de muitos. Alguns estudos nos mostram que o Padre Manuel da Nóbrega, quando chegou ao Brasil em 1549, tenha sido o primeiro indivíduo conhecido portador de TB no país (CAMPOS R; PIANTA C., 2001).

Em cartas destinadas ao reino de Portugal foram encontradas referências a quadros clínicos compatíveis com a doença, como nas cartas de Inácio Loyola (1555) e de José de Anchieta (1583). Nelas havia um trecho que relatava o seguinte: “*os índios, ao serem catequizados, adoecem, na maior parte, com escarro, tosse e febre, muitos cuspiendo sangue, a maioria morrendo com deserção das aldeias*”. Neste trecho cientistas supõem que as descrições destes achados se encaixariam como TB e acreditavam que foi assim que ocorreu o início da transmissão de pessoas a pessoa (ROSERMBERG, 1999).

Em 1882, o bacteriologista alemão Robert Koch descreveu o microrganismo causador da TB, o chamado *bacilo de Koch*. Em 1920 no Brasil, com a Reforma Carlos Chagas, que deu origem ao Departamento Nacional de Saúde Pública, o Estado passou a estar mais presente na luta contra a doença, criando a Inspeção de Profilaxia da Tuberculose. Na década de 1930 surgiram avanços no combate à doença com a invenção da vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin), a baciloscopia, a abreugrafia, o pneumotórax e outras cirurgias torácicas. Em função do conhecimento mais amplo da doença, o fator clima na sua cura passou a ser questionado. Com a descoberta da quimioterapia antibiótica específica na década de 1940 e a comprovação

de sua eficácia ao longo das décadas de 1950 e 1960, o tratamento passou a ser ambulatorial sem a necessidade de internação, o que culminou na desativação dos sanatórios. O advento do tratamento com antibióticos, unido a medidas de profilaxia e simplificação do diagnóstico, ocasionou uma redução significativa no índice de mortalidade pela doença (ROSERMBERG, 1999).

A partir dos anos 1990, apesar da crença de que a doença estava controlada, observou-se em várias regiões do mundo um crescimento de casos principalmente associados à infecção pelo HIV (Vírus da imunodeficiência humana). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), são registrados anualmente 5 milhões de novos casos de coinfeção no mundo. Estudos de autópsia apontam a TB como responsável por 33% das mortes de soropositivos, mesmo entre os que foram tratados com antirretroviral de elevada eficácia. Outro dos grandes desafios enfrentados pelos Programas Nacionais de Controle da Tuberculose (PNCTs) é o aumento da forma resistente da doença em diversos países nos últimos anos.

2.2 Micobactérias

A TB pode ser causada por qualquer uma das espécies que integram o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB): *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG; *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*. Ambas as espécies possuem elevada similaridade genética entre as espécies do CMTB. O que os diferencia está relacionado a fatores do hospedeiro, à variação geográfica e à patogenicidade. O foco do nosso trabalho e na saúde pública, é o complexo *M. tuberculosis*, conhecida também como *bacilo de Koch* (BK) (BRASIL, 2022).

O complexo *M. tuberculosis* são microrganismos que possuem dimensões que variam de 0,5 µm a 0,3µm. As espécies deste grupo são organismos bacilares fino, retos ou ligeiramente curvos, pleomórficos, aeróbios fracamente Gram positivos e fortemente ácido resistentes. Em certo estágio do seu ciclo de crescimento, apresentam uma distintiva propriedade tintorial, denominada ácido resistência. Essa propriedade deve-se à presença de lipídeos singulares na superfície da célula, denominados *ácidos micólicos*, encontrados somente no gênero *Mycobacterium*, na superfície da célula micobacteriana (DHEDA *et al.*, 2014).

Embora o complexo *M. tuberculosis* sejam classificadas como Gram-positivas, elas não são coradas pela coloração de Gram comumente utilizadas em laboratórios, mas pelos métodos de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun. Em ambas, se utiliza a carbolfucsina que confere coloração vermelha às micobactérias. Por resistirem ao descoloramento subsequente com solução álcool-

ácido, receberam a designação de “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) (DHEDA *et al.*, 2014).

Em sua estrutura, há os ácidos micólicos, que são um grupo complexo de lipídeos hidroxilados de cadeia ramificada ligados covalentemente ao peptidoglicano da parede celular. Este complexo dá à superfície celular uma consistência cerosa e hidrofóbica (MADIGAN, 2016). Assim, torna o microrganismo resistente à descoloração por álcool-ácido, como a resistência à ação de diversos agentes químicos, antibióticos, resposta imune do hospedeiro e a capacidade de formar biofilmes (DHEDA *et al.*, 2014).

Essa característica tintorial refere-se ao alto teor de lipídios em sua parede celular. Em torno de 60%, que é composta basicamente por uma membrana citoplasmática recoberta por espessa camada de peptidoglicano (ácido N-glicolilmurâmico), o qual se encontra covalentemente ligado às cadeias de arabinogalactano (polissacarídeo) que, por sua vez, estão esterificadas na sua extremidade com ácidos graxos de cadeia longa, os ácidos micólicos. (GUMBER *et al.*, 2007).

2.3 Transmissão

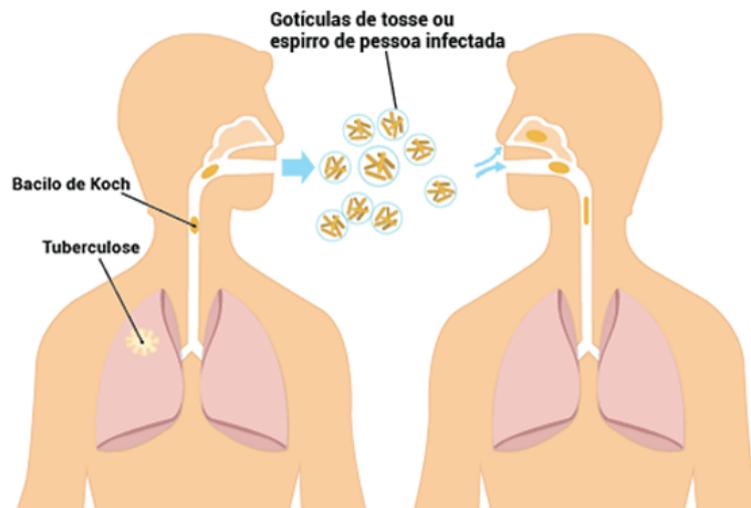
O agente etiológico da TB é o complexo *Mycobacterium tuberculosis* que foi descrito por Robert Koch, o fundador do campo da microbiologia médica, em 1882. A TB é uma doença que é transmitida pela via respiratória que pode assumir diversas formas geralmente, de uma pessoa com TB pulmonar ou laríngea, a outra pessoa, por exalação de aerossóis oriundos da tosse da pessoa contaminada que eliminam os bacilos no ambiente (Figura 2). Após a inalação dos bacilos oriundos de pessoas contaminadas, os bacilos que conseguirem chegar aos alvéolos pulmonares, irão provocar a infecção tuberculosa, dando início a uma rápida resposta inflamatória, envolvendo macrófagos e neutrófilos, na tentativa de eliminar o agente agressor (MADIGAN, 2016).

A resposta inflamatória pode não ser tão eficaz, abrindo lacunas no mecanismo de defesa, resultando na progressão da inflamação. Quando a resposta inflamatória não é eficaz, há a multiplicação no foco de inoculação, podendo chegar a um total de 100 mil bacilos em apenas três semanas. A partir do foco pulmonar, pode ocorrer a propagação do bacilo para outros órgãos por via linfo-hematogênica ou via endo-brônquica, essa fase marca também o início da reação inflamatória específica mediada pelos linfócitos TCD4 e TCD8, impedindo o estabelecimento da doença em 95% dos casos, definida como infecção primária. A lesão inicial evolui para fibrose e/ou calcificação. Vale ressaltar que em 5% dos casos, a infecção primária

não é contida, seja pela deficiência no desenvolvimento da imunidade celular, ou pela alta carga bacilar (BRASIL, 2019).

A Pessoa com TB pulmonar ou laríngea que tem baciloscopia positiva no escarro é chamada de “bacilífero” que se refere a casos que tem maior capacidade de transmissão, entretanto pessoas com outros exames bacteriológicos como cultura e/ou teste rápido molecular da tuberculose (TRM-TB) positivos também podem transmitir (BRASIL, 2019).

Figura 2 - Transmissão da tuberculose através da exalação/inalação de aerossóis de pessoa contaminada



Fonte: PMM/SMS, 2019.

Há outras vias de transmissão de TB como pela pele e placenta. Esse tipo de transmissão é raro e desprovida de importância epidemiológica. Os bacilos que se depositam em roupas, lençóis, copos e outros objetos dificilmente se dispersam em aerossóis e, por isso, não têm papel significativo na transmissão da doença (BRASIL, 2019).

Os pacientes com exame bacteriológico de escarro positivo sustentam a cadeia de transmissão da doença. Desta maneira estima-se que uma pessoa com baciloscopia positiva infecte ao menos 10 a 15 pessoas em média, em uma comunidade, durante um ano. Há também a forma de transmissão através de pessoas que têm contatos duradouros com pacientes com TB pulmonar, aqueles identificados com BAAR positivo no escarro são os que mais transmitem a doença. Em geral, eles têm a forma TB pulmonar cativária ou, mais raramente, a TB laríngea. E aqueles pacientes que possuem baciloscopia de escarro negativa, mesmo com TRM-TB ou cultura positivos no escarro, têm infectividade menor. Ou seja, pessoas com cultura de escarro negativa e as com TB extrapulmonar exclusivamente, até então, são desprovidas de infectividade. Já os pacientes com TB pulmonar e infecção pelo HIV, na dependência de maior

comprometimento da imunidade, podem ter menos acometimento pulmonar e apresentação cavitária da doença e, assim, menor infectividade (BRASIL, 2019).

O risco de transmissão da TB perdura enquanto o paciente eliminar bacilos no escarro. Após o início do tratamento, a transmissão tende a diminuir gradativamente e, em geral, após 15 dias, ela encontra-se muito reduzida. Por isso a importância de realizar baciloscopia de escarro que além do controle e confirmação da eficácia do esquema terapêutico, é importante para a avaliação de risco para os contatos (BRASIL, 2021).

Todas as medidas de controle da infecção pelo complexo *M. tuberculosis* devem ser mantidas até que seja confirmada a negativação ou bacilos não viáveis à baciloscopia do caso. Alguns estudos nos mostram que as crianças com TB pulmonar, em geral, têm baciloscopia negativa e, por isso, pouca importância na cadeia de transmissão da doença (MADIGAN, 2016).

É importante que quem conviva com pessoas com o diagnóstico positivo de TB deixe os ambientes ventilados e com luz natural direta, pois, o bacilo é sensível à luz solar, e a circulação de ar possibilita a dispersão de partículas infectantes (BRASIL, 2019).

2.4 Tuberculose pulmonar

A TB pulmonar frequentemente se desenvolve lentamente, é possível que o paciente não apresente sintomas, com exceção de "não se sentir bem" quando combinado com anorexia, fadiga e perda ponderal de peso, que se desenvolvem ao longo de várias semanas. Geralmente, a tosse é o sintoma mais comum. Inicialmente, ela pode produzir apenas uma pequena quantidade de escarro âmbar ou verde ao acordar pela manhã, mas à medida que a doença progride pode se tornar mais produtiva. É bastante comum ter febre baixa e suores noturnos que é um sintoma clássico, porém não são tão comuns ou específicos para TB. Já na coinfeção pelo HIV, muitas vezes é mais provável que os pacientes apresentem sintomas extrapulmonares (variedades de sintomas e localizações, dependendo dos órgãos afetados) ou que a doença se espalhe (LYON, 2017).

2.5 Tuberculose extrapulmonar

2.5.1 Tuberculose Miliar

Também conhecida como TB hematogênica generalizada, resulta na disseminação linfo-hematogênica maciça do complexo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de um foco

pulmonar ou extrapulmonar que dissemina pelo corpo podendo formar pequenos nódulos esbranquiçados no aspecto radiográfico. Os pequenos nódulos deram origem ao termo “miliar”, em analogia às sementes de milho (SHARMA; MOHAN, 2017).

A TB miliar é causada por uma falha do sistema imunológico em controlar a disseminação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Como resultado, a grande maioria dos pacientes com TB são adultos com imunossupressão significativa e, em particular, crianças imunocomprometidas (SHARMA; MOHAN, 2017).

Febre, calafrios, fraqueza, mal-estar e, mais comumente, dispneia progressiva são alguns dos sintomas. A transmissão intermitente de bacilos da TB pode resultar em uma doença febril de longo prazo. Anemia, trombocitopenia ou reação leucêmica podem resultar do envolvimento da medula óssea (TIERNEY; NARDELL, 2018).

2.5.2 Tuberculose Urogenital

Acomete os sistemas urinário e/ou genitais, cujo diagnóstico é difícil e, muitas vezes, tardio, pois o tempo entre a primo-infecção e as manifestações clínicas da doença podem variar de 5 a 30 anos. Como resultado, podem causar sérios efeitos colaterais, como insuficiência renal e infertilidade (WILKINSON *et al.*, 2017).

A infecção geralmente se dissemina para a bexiga e, em homens, para a próstata, as vesículas seminais, ou o epidídimo, provocando um aumento na massa escrotal. A TBUG é mais comum no sexo masculino, na proporção aproximada de 2 homens para cada mulher. A TB renal, por outro lado, é uma forma grave da doença que se manifesta quase sempre tardiamente devido à lentidão com que progride. Durante o período de latência da TB, podem ocorrer diversos problemas miccionais crônicos que são comuns, mas não específicos da TB renal. Quadros de hematúrias inexplicadas, disúrias, nictúrias e polaciúrias prolongadas, piurias assépticas e, especialmente, repetição injustificada de infecções urinárias, devem ser acuradamente investigados (WILKINSON *et al.*, 2017).

2.5.3 Meningite tuberculosa

A meningite ocorre, frequentemente, na ausência de infecção em outras localizações extrapulmonares. Geralmente, é mais comum entre idosos e pessoas imunocomprometidas, mas em áreas onde a TB é comum entre crianças, a meningite por TB geralmente ocorre entre o nascimento e os cinco anos (TIERNEY; NARDELL, 2018).

A meningite é o tipo mais grave de TB, com alta morbidade e mortalidade em qualquer idade. É uma forma que se pensa ser prevenida na infância com a vacinação BCG. Febre baixa, cefaleia persistente, náuseas e sonolência são alguns dos sintomas, que podem evoluir para torpor e coma. Os sinais de Kernig e Brudzinski podem ser positivos (TIERNEY; NARDELL, 2018).

2.5.4 Tuberculose Abdominal

A TB abdominal pode envolver o trato gastrointestinal, peritônio ou linfonodos mesentéricos. A infecção peritoneal representa disseminação de linfonodos abdominais ou de salpingooforite (Inflamação simultânea da trompa de Falópio e do ovário correspondente). A peritonite é particularmente comum em alcoólatras com cirrose (SANAI, 2005).

Os sintomas podem ser leves, com fadiga, dor e sensibilidade abdominal que pode ser intensa o suficiente para se assemelhar a abdome agudo, febre baixa e sudorese noturna em alguns casos. Outras características sistêmicas da doença incluem perda de peso, anorexia e mal-estar. A sobreposição desta doença a outras condições crônicas como uremia, cirrose e AIDS tornam esses sintomas mais difíceis de identificar (SANAI, 2005).

2.5.5 Pericardite por Tuberculose

A infecção do pericárdio pode se desenvolver a partir de focos nos linfonodos mediastinais ou de TB pleural. Em algumas partes do mundo com incidência alta, a pericardite por TB é uma causa comum de parada cardíaca (TIERNEY; NARDELL, 2018).

Os sintomas podem começar com atrito pericárdico e dor torácica pleurítica e postural ou febre. O tamponamento pericárdico pode ocorrer, produzindo dispneia, distensão de veia do pescoço, pulso paradoxal, bulhas abafadas e possivelmente hipotensão (TIERNEY; NARDELL, 2018).

2.5.6 Tuberculose dos ossos e das articulações

É um tipo de TB em que a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* se espalha pela corrente sanguínea e se instala nos ossos e articulações, principalmente na coluna, quadril e joelho, resultando no aparecimento de sintomas como dor na região, rigidez nas articulações e dificuldade de movimento (TIERNEY; NARDELL, 2018).

A doença de Pott é um tipo de TB extrapulmonar que afeta a coluna vertebral. Ela começa em uma vértebra e, em muitos casos, se espalha para vértebras vizinhas, resultando em um estreitamento do espaço discal entre elas. Sem tratamento, as vértebras podem desmoronar, afetando potencialmente a medula espinhal. A compressão da coluna causa déficits neurológicos, como paraplegia e edema paravertebral, que podem levar a um abscesso (SANAI, 2005).

2.5.7 Outros locais

A doença pode comprometer os linfonodos nas cadeias cervicais e supra claviculares posteriores, a pele que resulta da extensão direta de um foco de TB subjacente (linfonodo regional, osso ou articulação infectados), formando úlceras e tratos sinusais, a boca causando úlceras de boca e orofaringe que se desenvolvem com a ingestão de laticínios contaminados por *M. bovis*, podendo causar lesões primárias no intestino delgado (TIERNEY; NARDELL, 2018).

Pode atingir o fígado, sendo comum com TB pulmonar avançada e amplamente disseminada ou TB miliar. Porém, o fígado geralmente cicatriza sem seqüela quando a infecção principal é tratada. A TB no fígado ocasionalmente se dissemina para a vesícula biliar, levando à icterícia obstrutiva (TIERNEY; NARDELL, 2018).

A TB é capaz de infectar a parede de um vaso sanguíneo e romper até mesmo a aorta. O envolvimento adrenal, levando à doença de Addison, era comum antigamente, mas é raro nos dias de hoje. Os bacilos da TB podem se disseminar para uma bainha tendínea (tenossinovite tuberculosa) por extensões diretas de lesões adjacentes no osso ou disseminação hematogênica de qualquer órgão infectado (SANAI, 2005).

2.6 Vacina BCG

A vacina Calmette-Guérin (BCG) foi desenvolvida em 1921 por Léon Calmette e Alphonse Guérin. Foi descoberta através de uma série de testes em cepas virulentas do complexo *Mycobacterium bovis*, e é utilizada desde 1924. Desde então, a vacina tem sido distribuída por vários fabricantes que implementaram métodos próprios de fabricação, resultando em várias cepas BCG sendo usado em todo o mundo com vários graus de atenuação e eficácia (LUCA; MIHAESCU, 2013).

A BCG Moreau é a cepa utilizada na vacinação de recém-nascidos contra a TB no Brasil. Infelizmente, a vacina BCG ainda não oferece 100% de proteção contra a TB pulmonar, mas seu uso generalizado permite a prevenção de formas mais graves da doença, como meningite tuberculosa e TB miliar (WHO, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em países onde a TB é comum e a vacina está incluída nos programas de vacinação infantil, a vacina tem potencial para prevenir mais de 40 milhões de casos de meningite tuberculosa a cada ano. Para alcançar tais efeitos, é necessário um alto nível de cobertura vacinal, razão pela qual é fundamental que todas as crianças recebam a vacina BCG (WHO, 2004).

A vacina BCG é administrada por meio de injeção intradérmica de aproximadamente 0,1 ml de vacina contendo pelo menos 200 milhões de bactérias vivas. As bactérias injetadas são encontradas principalmente no local da injeção, mas em poucos minutos ou horas, espalham-se para os linfonodos regionais, podendo ocorrer a formação de granulomas nas semanas e meses seguintes. A disseminação lateral por via linfática ou hematogênica para todo o organismo é possível, e granulomas podem ser vistos em todo o sistema reticuloendotelial (LUCA; MIHAESCU, 2013).

As bactérias são, então, fagocitadas por macrófagos e proliferam intracelularmente e extracelularmente, favorecendo o desenvolvimento da imunidade por meio de células mediadas por linfócitos T de tipos específicos e inespecíficos. Infelizmente, o mecanismo exato pelo qual a bactéria causa esse desenvolvimento ainda é desconhecido. Essa imunidade reduzirá gradualmente a proliferação bacteriana, resultando em uma redução no número de bactérias (CAMPOS; PIANTA, 2001).

Em alguns casos, é possível que as bactérias possam sobreviver por décadas após a vacinação, e isto pode ser mais um fenômeno geral, mas as condições quantitativas nesta questão são desconhecidas. O fenômeno de micobactérias permanecerem vivas por décadas sem manifestações da doença é conhecido a partir de bactéria tuberculosa virulenta, a qual pode sobreviver no organismo em uma forma não-proliferativa, provavelmente em granulomas, por muitas décadas após o início da infecção (LUCA; MIHAESCU, 2013).

Em um pequeno número de pessoas que foram vacinadas, principalmente recém-nascidos com imunodeficiência congênita, infecções generalizadas podem ser observadas até 5 anos após a vacinação. Poucos estudos em animais e humanos foram conduzidos com o objetivo de documentar a absorção, distribuição, biotransformação e excreção do BCG. Além de seu efeito específico contra a TB, a vacina BCG tem efeitos imunológicos não específicos (fora do

alvo) que protegem contra uma ampla gama de infecções e é usada regularmente para tratar o câncer de bexiga (LUCA; MIHAESCU, 2013).

2.7 Genoma do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O genoma do complexo *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv foi completamente sequenciado em 1998. A cepa do CMTB H37Rv é a cepa de TB mais estudada e utilizada em laboratórios. A sequência completa do genoma H37Rv foi isolada de um paciente com TB pulmonar atendido em Nova York pelo médico Dr. Edward R. Baldwin (COLE *et al.*, 1998).

Há estudos que relatam que seu tamanho é de 4 milhões de pares de bases, com aproximadamente 3.906 genes codificadores. Grande parte desses genes são responsáveis pelo metabolismo de ácidos graxos devido à complexa parede celular micobacteriana. Cerca de 10% da capacidade de codificação é feita pelas famílias de genes “*proline-glutamic acid e proline-proline-glutamic acid*” (PE/PPE), que codificam proteínas ricas em glicina ácidas. Estas proteínas ricas em prolina e glutamato são consideradas antígenos de superfície que são responsáveis pela interação com o sistema imunológico do hospedeiro (NIMMO *et al.*, 2022).

A maior parte da resistência a antibióticos para o CMTB é conferida por mutações genômicas. Geralmente SNPs ou pequenas inserções ou deleções e, ocasionalmente, deleções ou inversões maiores. A resistência à R está diretamente relacionada ao gene *rpoB*. Este gene é capaz de codificar a subunidade beta da RNA polimerase dependente de DNA, que é o alvo molecular das R. A grande parte das mutações *rpoB* ocorrem em uma região central de 81 pares de base do gene, chamado de RMP-resistance-determining region (RRDR), responsável por codificar 27 aminoácidos que correspondem aos códons 426 a 452 em *M. tuberculosis* ou 507-533 (JAGIELSKI *et al.*, 2018).

Alguns estudos mostram que o mecanismo de resistência à H pode ocorrer em vários genes, sendo os mais conhecidos o *katG* e a região promotora do gene *inhA*. A H é ativada pela enzima catalase-peroxidase codificada por *katG*. O gene *inhA* codifica a proteína redutase transportadora de enoil-acil dependente de NADH, responsável pela síntese de ácido micólico, sendo este, outro ponto de mutação que confere resistência ao antimicrobiano (NIMMO *et al.*, 2022).

Os genes mais comuns para detecção da resistência às FLQ são os genes *gyrA* e *gyrB*. As mutações impedem a ligação à DNA girase necessária para a replicação do DNA. O gene *rrs* é analisado para detecção de resistência cruzada aos aminoglicosídeos/peptídeos cíclicos (AG/CP), tais como kanamicina (KAN) e amikacina (AMK), ambos AG, ou capreomicina

(CAP) e viomicina (VIO), ambos CP. A resistência surge por mutações no gene *rrs*, que codifica o 16S RNA ribossomal, e no gene *rpsL*, que codifica o gene da proteína ribossomal S12. O gene *eis* é examinado para a detecção da resistência de nível baixo à KAN (NIMMO *et al.*, 2022).

2.8 População de maior vulnerabilidade

A TB pode afetar pessoas de todas as idades, raças e classes sociais. Entretanto, há certos grupos de pessoas que são mais propensas ao desenvolvimento da doença. Infelizmente, no Brasil, assim como em outros países que possuem condições de vida semelhantes, alguns grupos populacionais têm maior vulnerabilidade para o risco de contaminação por TB. Pessoas que possuem alguma imunodeficiência, quando o organismo do paciente está com sistema imunológico fragilizado como pessoas com HIV, pessoas que passaram por transplantes de órgãos ou que usam algum medicamento que suprime o sistema imunológico, são mais propensas ao desenvolvimento da TB. Pessoas que vivem em condições precárias, imigrantes, pessoas em situação de rua, população encarcerada, profissionais da saúde, crianças, idosos e indígenas são mais suscetíveis à TB. É importante lembrar que a TB é uma doença tratável e curável. O tratamento adequado e o diagnóstico precoce são essenciais para prevenir a evolução da doença e evitar complicações mais graves (BRASIL,2022).

2.9 Diagnóstico clínico

2.9.1 Tuberculose pulmonar

Os sintomas típicos da TB pulmonar incluem febre, suores noturnos, fadiga anormal, tosse produtiva e hemoptise. Em adultos não imunocomprometidos, a doença avança lentamente, em contraste com crianças e pessoas imunocomprometidas, que podem apresentar TB fulminante com início abrupto. A persistência da tosse por mais de 3 semanas deve sempre levar em consideração a TB (BRASIL, 2021).

2.10 Diagnóstico laboratorial

2.10.1 GeneXpert®

O teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB) é indicado para o diagnóstico de TB pulmonar e laríngea em adultos e adolescentes. A sensibilidade do TRM-TB em amostras de escarro de adultos tem mostrado resultados superiores à baciloscopia. Com cerca de 90% de sensibilidade na detecção do complexo *M. tuberculosis* e de 95% de sensibilidade na detecção da resistência à R. Quando comparada a sensibilidade para o diagnóstico em crianças (<10 anos de idade) esse valor cai para 66% mostrando que a sua utilização na infância ainda é limitada (BRASIL, 2019).

O Xpert® MTB/RIF Assay, é realizado nos equipamentos GeneXpert®, é um teste qualitativo de diagnóstico in vitro que utiliza uma reação de PCR "nested" em tempo real para detectar o complexo *Mycobacterium tuberculosis* em expectoração natural ou sedimentos concentrados resultantes de expectoração induzida ou espontânea. O Xpert® MTB/RIF Assay detecta mutações no gene *rpoB* ligadas à resistência à R na amostra quando o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* é detectado (CEPHEID, 2020).

O sistema GeneXpert® é modular, permitindo que qualquer laboratório realize testes de diagnóstico molecular em tempo real usando PCR, independentemente do tamanho, estrutura ou volume das amostras. O procedimento de preparação da amostra é fácil e rápido e o equipamento faz todo o resto automaticamente, com tempo de resposta mais rápido que as tecnologias tradicionais (PATEL, 2013).

Os sistemas são compostos por um instrumento, um computador e um software pré-instalado para realização de testes e visualização dos resultados. Os sistemas necessitam do uso de cartuchos descartáveis GeneXpert®, que contêm reagentes para RT-PCR e PCR e onde são concluídos os processos de RT-PCR e PCR. Os resultados são interpretados pelo sistema GeneXpert® a partir dos sinais de fluorescência medidos e dos algoritmos de cálculo incorporados (CEPHEID, 2020).

2.10.2 Baciloscopia

Visa a pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), em amostras coradas pelo método de Ziehl-Neelsen. A baciloscopia do escarro, desde que executada corretamente em todas as suas fases, permite detectar em média 60% a 80% dos casos de TB pulmonar, o que é importante do ponto de vista epidemiológico, já que os casos bacilíferos são os responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão (BRASIL, 2022).

A baciloscopia direta é solicitada aos pacientes sintomáticos respiratórios, com suspeita clínica e/ou radiológica de TB pulmonar, independentemente do tempo de tosse e suspeita clínica de TB extrapulmonar (exame em materiais biológicos diversos). De acordo com o Manual de Recomendação para Controle da Tuberculose, a baciloscopia de escarro deve ser realizada em, no mínimo, duas amostras: uma por ocasião da primeira consulta e outra, independentemente do resultado da primeira, na manhã do dia seguinte, preferencialmente ao despertar. Nos casos em que há indícios clínicos e radiológicos de suspeita de TB e as duas amostras de diagnóstico apresentem resultado negativo, devem ser solicitadas amostras adicionais (BRASIL, 2022).

A baciloscopia é feita a partir do esfregaço da amostra de escarro. É feito o esfregaço da amostra na lâmina deixando-o secar em temperatura ambiente, em seguida é feita a coloração da lâmina pela técnica de Ziehl-Neelsen, onde se utiliza a fucsina, lavagem da lâmina, álcool ácido, lavagem, azul de metileno e lavagem deixando-a secar em temperatura ambiente (COSTA *et al.*, 2018).

Após a confecção das lâminas elas são utilizadas para leitura em microscópio (100x), os bacilos de Koch permanecerão corados com fucsina, devido as propriedades da parede celular das micobactérias terem alta concentração lipídica, o que lhe dão resistências à descoloração pelo álcool-ácido, os bacilos permanecerão com uma coloração eosinofílica (vermelho rosado) (PEDRO *et al.*, 2010).

A leitura e a interpretação da lâmina consistem na verificação microscópica de 100 campos na lâmina, caso não seja encontrado nenhum BAAR essa amostra é negativa, se for encontrado de 1 a 9 BAAR em 100 campos, relata-se a quantidade encontrada de BAAR por campo, caso seja encontrado 10 a 99 BAAR em 100 campos define como positivo (+), de 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos observados POSITIVO ++, e em média mais de 10 BAAR por campo em 20 campos observados POSITIVO +++ (MOTA *et al.*, 2012).

2.10.3 Cultura

A cultura é considerada o padrão ouro para o diagnóstico do CMTB. É um método de elevada especificidade e sensibilidade. O resultado obtido através da cultura confirma o diagnóstico de micobacteriose, posteriormente, sendo necessária a identificação de espécie para caracterizar se é um caso de TB ou outra micobactéria (BRASIL, 2019).

A semeadura de amostra em meios de cultura sólidos é usada no cultivo de micobactérias. Os métodos de cultura mais usados são sólidos baseados em ovo, Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh. Têm a vantagem de serem menos dispendiosos e terem um índice de contaminação mais baixo. A desvantagem de usar um meio sólido é o tempo que leva para detectar o crescimento bacteriano, que pode variar de 14 a 30 dias podendo durar até oito semanas (BRASIL, 2022).

2.10.4 Imunocromatografia

Utilizado para identificação do CMTB. Trata-se de um teste por imunoenensaio cromatográfico rápido, para identificação qualitativa do complexo *M. tuberculosis* que utiliza o anticorpo monoclonal anti-MPT64. É um teste de execução simples com baixo custo e alta sensibilidade e especificidade. É bem conhecido que as micobactérias secretam mais de 33 proteases diferentes. A MPT64, uma das proteínas mais comuns, foi descoberta apenas em culturas do CMTB, levando ao desenvolvimento de um teste para identificar especificamente essa proteína (ABE *et al.*, 1999).

2.10.5 BD BACTEC MGIT 960® e BD BACTEC MGIT SIRE®

Consistem em um método automatizado para isolamento primário de micobactérias a partir de amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares e teste de sensibilidade a antibióticos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*. São considerados como padrão ouro para determinação de resistência aos tuberculostáticos. Trata-se de um diagnóstico *in vitro* utilizando o equipamento BD BACTEC 960® desenvolvido e otimizado para detecção rápida de micobactérias de amostras clínicas. As amostras são processadas e inoculadas em tubos BD BBL MGIT (do inglês, *Mycobacteria* Growth Indicator Tube). Os microrganismos presentes vão metabolizar os nutrientes e oxigênio no tubo de cultura. Cada tubo de cultura contém um sensor fluorescente que responde à concentração de oxigênio no meio de cultura. Os fotodetectores do equipamento medem o nível de fluorescência, o qual corresponde à quantidade de oxigênio consumida pelo organismo, evidenciado por emissão de fluorescência (LOPES, 2016).

O Kit BD BACTEC MGIT 960® SIRE® é um teste qualitativo com 4 a 13 dias de duração, este permite a realização do teste de sensibilidade, cujos resultados são determinados

pelo instrumento BACTEC MGIT 960[®] que faz a análise da fluorescência no tubo contendo droga comparada à fluorescência no tubo controle de crescimento, realizada automaticamente pelo equipamento. Após essa análise, o equipamento BACTEC MGIT 960[®] interpreta os resultados utilizando algoritmo específico e libera o teste de sensibilidade como S (sensível) ou R (resistente). Realizado a partir de culturas do complexo *M. tuberculosis* para as drogas: estreptomicina (S), isoniazida (H), rifampicina (R) e etambutol (E) (LOPES, 2016).

2.10.6 Genotype[®]

O GenoType[®] 2.0 é um teste qualitativo in vitro para a identificação genética molecular do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e suas resistências. O teste GenoType[®] MTBDR^{plus} detecta mutações associadas à resistência R e/ou H a partir de amostras clínicas com baciloscopia positiva ou negativa e amostras cultivadas. Já o GenoType[®] MTBDR^{sl} detecta mutações associadas à resistências às fluoroquinolonas (FLQ; ex. ofloxacina e moxifloxacina) e aminoglicosídeos/peptídeos cíclicos (AG/CP); antibióticos injetáveis como a canamicina, amicacina, capreomicina e viomicina) de amostras de expectoração com microscopia positiva ou negativa ou de amostras cultivadas (LIFESCIENCE, 2017).

Trata-se de um diagnóstico molecular que tem sido amplamente utilizado para identificar resistência aos medicamentos de primeira linha R e H e segunda linha fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e peptídeos cíclicos entre os casos de TB. O teste utiliza a PCR para amplificar regiões específicas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, áreas dos genes associados às resistências (CRUDU *et al.*, 2012).

Todo o procedimento é dividido em três etapas: 1^o extração de DNA com o kit GenoLyse[®], (pode ser de amostras clínicas pulmonares, descontaminadas ou material de cultura sólida/líquida), 2^o amplificação com polimerase e primers que já estão incluídos nas misturas de Amplificação A e B (AM-A e AM-B) e são otimizados especificamente para este teste e 3^o hibridização reversa com a utilização de um instrumento de hibridização da Hain Lifescience[®]. O teste nos fornece o resultado em tiras. Uma folha de registro de resultados está incluída no kit para avaliação dos resultados. Ao utilizar esta folha de registro de resultados, as tiras são coladas na folha alinhando as faixas CC e AC com as respectivas linhas da folha, posteriormente é feito a análise de cada banda (LIFESCIENCE, 2017).

2.10.7 Sequenciamento genético

O sequenciamento é universalmente reconhecido como o padrão ouro de identificação de micobactérias. São capazes de detectar tanto a presença do microrganismo quanto às mutações que conferem a resistência às drogas, sendo estas ferramentas que subsidiam a identificação de determinantes genéticos de resistência a todos os fármacos anti-TB. O sequenciamento genético promete revolucionar o cuidado do paciente, no sentido de interromper a transmissão, assegurando o diagnóstico precoce e de suas resistências. Daí a importância do sequenciamento de genomas, uma vez que permite várias informações biológicas dos organismos, com muita utilidade para a prática clínica (FARHAT, *et al.*, 2016).

Sobretudo, o sequenciamento total do genoma é um método acessível e disponível para a genotipagem do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e, por sua vez, revolucionou a interpretação/identificação dos genomas das micobactérias. O sequenciamento de todo o genoma em alguns locais é utilizado rotineiramente para investigar a resistência à TB, a dinâmica de transmissão e a estrutura populacional do CMTB tornando possível correlacionar dados genômicos e testes laboratoriais. Neste caso, uma vez que todo o genoma é sequenciado, não só ajuda em apontar as diferenças mínimas entre as várias sequências, mas poupa tempo e o custo do diagnóstico e operacional do tratamento de TB-MDR. O sequenciamento da última geração também é útil na identificação de polimorfismos de nucleotídeo único, na genômica comparativa e em vários aspectos da dinâmica de transmissão, bem como, também facilitam o estudo de suas características filogenéticas e evolutivas (BESPIATYKH *et al.*, 2021).

2.11 Tratamento da tuberculose

O tratamento da TB no Brasil dura no mínimo seis meses, é gratuito e está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS). O tratamento é padronizado e constituídos por uma associação de fármacos para diminuir a probabilidade de seleção de bacilos resistentes (BRASIL, 2022).

As drogas utilizadas nos tratamentos são divididas em dois grupos: primeira e segunda linha. Os medicamentos básicos da primeira linha de tratamento da TB são usados para o tratamento sem suspeita de resistência, sendo dividido em duas fases: intensiva (dois meses): rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) e o etambutol (E), todas combinadas em um só comprimido, recebendo a denominação de dose fixa combinada (DFC); e manutenção (quatro meses): R e H, comprimidos em DFC (BRASIL, 2022).

Esses medicamentos são administrados por via oral, têm melhor eficácia contra o complexo *M. tuberculosis* e apresentam reações adversas toleráveis em geral, tornando quase sempre desnecessária a interrupção do esquema terapêutico e não permite a seleção pelo usuário de um dos fármacos (BRASIL, 2019).

Os medicamentos de segunda linha são ministrados por vias orais ou injetáveis, são utilizados em casos de resistências ou intolerância aos fármacos de primeira linha. Possuem uma atividade moderada contra o complexo *M. tuberculosis* e, em geral, apresentam mais efeitos colaterais, além de possuírem um tempo de tratamento maior, variando de 9 a 24 meses (BRASIL, 2019).

Para o esquema terapêutico anti-TB ser mais efetivo, deve atender a três grandes objetivos: atividade bactericida, prevenção da seleção de bacilos resistentes e poder esterilizante. A atividade bactericida precoce é a capacidade de matar a maior quantidade de bacilos, o mais rapidamente possível, sendo medida pela velocidade com que são mortos. Essa velocidade é identificada pela conversão da cultura de escarro no final da fase intensiva do tratamento (segundo mês) (COURA, 2015).

Para a prevenção da seleção de bacilos resistentes e a efetiva cura da doença, é necessário empregar conjuntos terapêuticos que combinem uma variedade de drogas que atuam em bactérias sensíveis e em populações de bactérias naturalmente resistentes, pois bacilos resistentes a uma droga podem ser sensíveis a outra. (BRASIL, 2019).

A atividade esterilizante é a capacidade de eliminar todos os bacilos presentes no indivíduo, seja nas cavidades pulmonares, no interior das lesões ou no interior dos macrófagos, é definida pela proporção de recidivas que ocorrem após o término do tratamento (COURA, 2015).

As drogas utilizadas no esquema terapêutico anti-TB que atendem aos três principais objetivos são H, S e R com atividade bactericida precoce, à R e a Z com maior potencial esterilizante e o E, um bacteriostático tipicamente ligado a medicamentos que são mais eficazes na prevenção do surgimento de bactérias resistentes (BRASIL, 2022).

A resistência às drogas podem ser classificadas como: monorresistência (resistência a somente um fármaco anti-TB), polirresistência (resistência a dois ou mais fármacos anti-TB, exceto à associação R e H), TB-RR (resistência à R identificada por meio do TRM-TB exclusivamente ainda sem teste de sensibilidade, sem outras resistências conhecidas), TB-MDR (resistência a pelo menos R e H, os dois mais importantes fármacos para o tratamento da TB e a resistência extensiva (TB-XDR resistência à R e à H acrescida de resistência à fluoroquinolona (qualquer delas) e à linezolida ou à bedaquilina) (BRASIL, 2022).

Hoje, enfrentam-se alguns desafios referentes ao controle da TB e um dos principais que impedem os pacientes de um bom prognóstico é a resistência aos medicamentos comumente utilizados. Os pacientes que apresentam resistência aos medicamentos desafiam o controle da TB, pois na maioria das vezes possuem histórico de recidiva e reingresso ao tratamento aliados a fatores que contribuem para a resistência à TB, como histórico de tratamento prévio e reingresso após abandono fazendo com que seja necessário um tratamento de maior complexidade. Em decorrência disso, torna-se necessário retomar o tratamento ou adequá-lo e a necessidade do estudo de identificação da resistência microbiana existente para evolução de cura desta doença (BESERRA, 2021).

3 OBJETIVOS

Analisar os perfis fenotípicos e genotípicos através de metodologias convencionais entre 2014 a 2021 das cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e sua resistência aos principais fármacos para o tratamento da tuberculose isoladas em amostras clínicas encaminhadas ao LACEN-DF.

3.1 Objetivos específicos

Foram comparados os perfis de sensibilidade detectados com a metodologia fenotípica e genotípica em cepas do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* isoladas a partir de amostras clínicas encaminhadas ao LACEN-DF.

Para atingir os objetivos propostos foram realizadas as seguintes etapas:

- Analisar as cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando seis metodologias: GeneXpert®, baciloscopia, cultura sólida e líquida, imunocromatografia, SIRE BACTEC/MGIT 960®, GenoType® MTBDR*plus* e GenoType® MTBDR*sl*.
- Detectar por metodologia molecular GeneXpert® a presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e sua resistência a rifampicina em amostras clínicas.
- Determinar fenotipicamente o perfil de sensibilidade de cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* através do SIRE BACTEC/MGIT 960®.
- Determinar genotipicamente os perfis de sensibilidade de cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* através do GenoType® MTBDR*plus* e GenoType® MTBDR*sl* e GeneXpert®.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Critérios para inclusão e exclusão das amostras

O presente trabalho trata de um estudo transversal retrospectivo, com amostras clínicas de pacientes com suspeita de TB encaminhadas ao Laboratório de Micobactérias do Núcleo de Bacteriologia do LACEN-DF. Compôs o estudo cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de amostras clínicas entre o período de 2014 a 2021 que apresentaram resistência a pelo menos um fármaco.

Foram excluídas aquelas amostras que apresentaram contaminação por micobactéria não tuberculosa (MNT) ou outras bactérias contaminantes. As amostras provenientes de outros estados da federação e as culturas positivas de paciente em duplicidade ou repetidas ao longo do ano que possuíam um mesmo perfil de sensibilidade.

4.1.1 Considerações éticas

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS) por estar vinculada ao LACEN-DF, órgão da Secretaria de Saúde do DF (SES-DF) sob o número do parecer: 1.960.986/CAAE: 62925816.9.0000.5553 (ANEXO 1).

4.2 Cepas selecionadas para o estudo

Ao total foram selecionadas cepas resistentes a pelo menos um fármaco totalizando 30 culturas resistentes a pelo menos um fármaco de 20.274 culturas realizadas no LACEN entre os anos de 2014 e 2021. Todas as amostras foram obtidas através do encaminhamento de amostras ao Laboratório de Micobactérias do Núcleo de Bacteriologia do LACEN-DF.

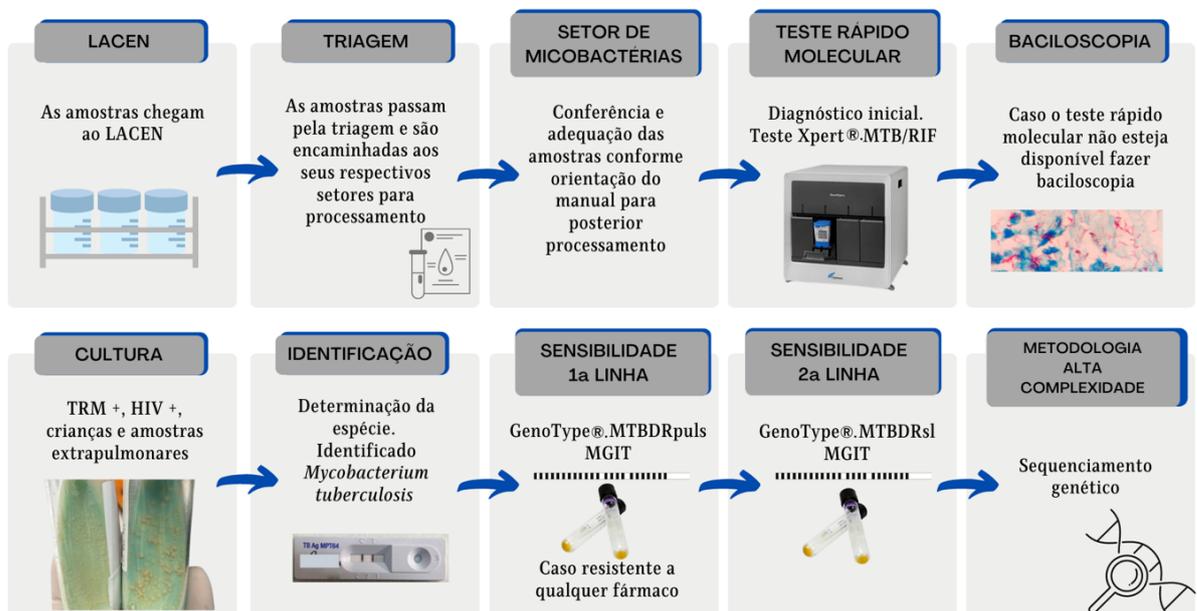
4.3 Busca de dados referentes aos pacientes

Foi realizada uma busca pelas informações dos pacientes através dos prontuários existentes e dos sistemas SINAN e SITE-TB. Desta maneira, todos os dados obtidos a respeito das variáveis relativas aos pacientes são provenientes de pesquisas nos prontuários já existentes e nos sistemas.

4.4 Fluxo das amostras encaminhadas ao LACEN-DF

De acordo com a Organização e Gerenciamento da Rede de Laboratórios de Diagnóstico de Tuberculose e do Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. As amostras encaminhadas ao LACEN-DF devem seguir o fluxo estabelecido pelo MS, esquematizado na Figura 3.

Figura 3 - Fluxo de amostras suspeitas de tuberculose (TB) e TB droga resistente



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2019.

4.5 Teste rápido molecular GeneXpert®

Para fazer o teste foram necessários a utilização de cartuchos específicos Xpert MTB/RIF ULTRA descartáveis, que devem ser de utilização única. Nesse cartucho contém todos os reagentes necessários para a realização da PCR, incluindo reagentes liofilizados, tampões líquidos e soluções de lavagem. Todo o processamento acontece dentro do mesmo, são cartuchos autônomos, um para cada amostra e para cada paciente evitando a contaminação cruzada entre as amostras (MARLOWE *et al.*, 2011).

Na detecção, é possível identificar simultaneamente o complexo *M. tuberculosis* e a resistência à R pela amplificação, por meio de PCR, de cinco sondas sobrepostas que são

complementares à região determinante da resistência à R, composta por 81 pares de bases do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. Em seguida, esta região é examinada com o objetivo de identificar mutações associadas à resistência à R. (PATEL, 2013).

Na primeira PCR, um par de *primers* é usado para gerar produtos de DNA, que podem conter produtos amplificados a partir de áreas não alvo. Os produtos da primeira PCR são, então, usados como molde em uma segunda PCR, usando um *primer* diferente, cujo sítio de ligação esteja localizado dentro do primeiro produto amplificado, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade da reação (MARLOWE *et al.*, 2011).

Os resultados do teste são interpretados pelo sistema GeneXpert® (Cepheid) denominado teste rápido molecular para TB a partir dos sinais de fluorescência medidos e dos algoritmos de cálculos incorporados. Este teste detecta a presença ou ausência do complexo *M. Tuberculosis* através de parâmetros como *high*, *medium*, *low* ou *very low* dependendo do valor do ciclo *threshold* do alvo presente na amostra e detecta a mutação no gene *RpoB* que confere resistência a R (RIE *et al.*, 2010).

4.6 Baciloscopia das amostras selecionadas

As amostras selecionadas foram submetidas a baciloscopia. As baciloscopias foram realizadas a partir de esfregaço da amostra de escarro de cada paciente em duplicata. Foi utilizada a metodologia de Ziehl Neelsen para coloração de cada lâmina, conforme preconizado pelo manual de recomendações para o controle da TB no Brasil (BRASIL, 2019).

4.7 Cultura

As cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* foram cultivadas seguindo o preconizado pelo LACEN-DF, ou seja, de acordo com os métodos estabelecidos no Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. As amostras clínicas foram cultivadas em meio sólido Ogawa-Kudoh e meios líquidos MGIT/BACTEC 960 por até 42 dias (BRASIL, 2022).

Todas as amostras clínicas cultivadas em meio de cultura sólido Ogawa-Kudoh, foram identificadas como complexo *Mycobacterium tuberculosis* com base na velocidade de crescimento (lento, de 4 a 8 semanas), morfologia das colônias (colônias de cor creme, não produtoras de pigmento, secas e rugosas), e um resultado positivo para o teste imunocromatográfico de detecção do antígeno MPT64.

4.8 Método MGIT 960®

Trata-se de um método qualitativo automatizado que utiliza o sistema BD BACTEC *Mycobacterium* Growth Indicator Tube 960® (MGIT 960®) para detecção de micobactérias e o kit BD BACTEC MGIT 960® SIRE® para teste de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento da TB.

Para realizar o teste foi necessário semear as amostras em meio de cultura Ogawa-Kudoh para obtenção de colônias puras do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. As colônias em fase logarítmica de crescimento foram cultivadas em meio de cultura líquido no sistema automatizado MGIT 960®. Após as colônias serem cultivadas em meio de cultura líquido nos tubos BBL MGIT elas foram incubadas no BACTEC MGIT 960® a 36-37 °C. A análise dos tubos se deu através da fluorescência no tubo contendo a droga comparada com à fluorescência no tubo controle de crescimento realizada automaticamente pelo aparelho.

No índice de crescimento (IC) 400 (quatro a 13 dias após a incubação), o aparelho encerrará o teste emitindo o relatório com o IC de cada tubo contendo o fármaco, demonstrando a sensibilidade do isolado quando $IC \leq 100$ ou resistência quando $IC > 100$.

4.9 GenoType®

O GenoType® MTBDR*puls* (1° linha) é um teste com a finalidade de identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à R e ou H a partir de espécimes pulmonares clínicos. A identificação a R se deu através da detecção de mutações associadas ao gene *rpoB* (que codifica a subunidade β da RNA polimerase). Para a resistência à H foi verificada a existência do gene *katG* (que codifica a catalase peroxidase) e a região promotora do gene *inhA* (que codifica o NADH – enoil-ACP-redutase) (LIFESCIENCE, 2017).

O GenoType® MTBDR*sl* (2° linha) é um teste com a finalidade de identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e das suas resistências às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos/peptídeos cíclicos. A detecção da resistência à FLQ foi facultada pela detecção das mutações mais significativas associadas a resistências dos genes *gyrA* e *gyrB* (que codificam respectivamente a subunidade A e subunidade B da DNA girase). Foram examinados para a detecção da resistência AG/CP, o gene 16S rRNA (*rrs*), para detecção de resistência de baixo nível à canamicina, é examinada a região promotora do gene *Eis* (que codifica a acetiltransferase *Eis*) (LIFESCIENCE, 2015).

Os testes tanto de primeira e segunda linha possuem como princípio a tecnologia de PCR hibridização reversa em fita. O DNA do *Mycobacterium* foi extraído a partir de amostras de pacientes ou material de cultura, especificamente amplificado por PCR e detectado em uma fita utilizando hibridização reversa e uma reação de coloração enzimática (CRUDU *et al.*, 2012).

Na pesquisa, foi realizado o teste tanto com colônias previamente identificadas, estas foram utilizadas como amostras e semeadas no meio de cultura Ogawa-kudoh para obtenção das colônias, tanto quanto colônias crescidas de amostras devidamente congeladas.

4.10 Controle de qualidade

Para o controle de qualidade de todas as análises de suscetibilidade, foi utilizada a cepa padrão H_{37RA} do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, uma cepa sensível a todos os fármacos utilizados no esquema de terapia padrão para a TB.

4.11 Amostras estocadas para análise

Todos os isolados foram repicados no meio de cultura Ogawa-Kudoh. Após crescimento as culturas foram triadas e selecionadas para posterior congelamento. As cepas selecionadas foram transferidas para criotubos contendo caldo Middlebrook 7H9 + 10% de glicerol e armazenadas a -80°C, sob condições estéreis, até o momento de seu uso para análises e confirmações de resultados posteriores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Busca de dados referentes aos pacientes

Foi feita uma busca de dados referentes aos pacientes diagnosticados com TB nos sistemas SINAN e SITE-TB para informações complementares aos testes laboratoriais e entendimento do histórico de saúde de cada paciente envolvido. Obteve-se como resultado 13,30% dos pacientes não foram notificados junto ao SINAN. O que contradiz o Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil que firma que todos os casos confirmados de TB devem obrigatoriamente ser notificados no Sinan, que é o sistema oficial para o registro das doenças de notificação compulsória.

Desta forma, pode-se ter um grave prejuízo nos dados gerados no SINAN que podem permitir cálculos equivocados de indicadores operacionais e epidemiológicos importantes para a análise do perfil epidemiológico da TB no País e para o monitoramento e avaliação das ações de controle.

Um banco de dados atualizado e de qualidade é útil para avaliação dos serviços prestados ao paciente e pode servir de base para tomada de decisão para o desenvolvimento de ações de controle da TB.

5.2 Amostras selecionadas para o estudo

Ao total, foram selecionadas 30 cepas que tiveram o crescimento do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e que apresentaram resistência a pelo menos um fármaco em amostras clínicas encaminhadas ao Laboratório de Micobactérias do Núcleo de Bacteriologia do LACEN-DF entre os anos de 2014 e 2021. Dentre as culturas realizadas nesse período, obteve-se um total de 20.274 culturas, 1.789 culturas positivas para TB e 614 culturas contaminadas (Tabela 1). Considera-se contaminação a presença de microrganismos que produzem enzimas proteolíticas capazes de liquefazer o meio que contém ovos, alterando a cor e a consistência do meio.

Tabela 1 - Culturas realizadas nos anos de 2014 a 2021 no LACEN-DF

Ano	Culturas realizadas	Culturas positivas	Culturas contaminadas
2014	2.903	181	27
2015	2.491	268	54
2016	2.348	243	116
2017	2.102	105	102
2018	2.203	183	78
2019	3.304	247	122
2020	2.262	269	45
2021	2.661	302	70
TOTAL	20.274	1.798	614

Fonte: LACEN-DF, 2022.

Como é possível observar, houve uma queda constante nas culturas realizadas no LACEN-DF entre os anos de 2016 e 2017, conseqüentemente uma queda nas culturas positivas. O coeficiente de incidência de culturas encaminhadas para análise e culturas positivas no Distrito Federal aumentou entre os anos de 2018 e 2019, confirmando o que o Boletim

Epidemiológico da Tuberculose do Ministério da Saúde edição especial março de 2022 nos diz a respeito do coeficiente de incidência de TB no Brasil.

Em 2020 e 2021, ao longo da pandemia de COVID-19, apesar de observar uma redução na incidência de culturas realizadas em comparação com o período anterior à pandemia houve um aumento de culturas positivas diagnosticadas. O que nos faz pensar em inúmeras hipóteses para este acontecimento. Se apenas os pacientes com a doença já instalada e mais grave que estavam procurando os serviços de saúde, enquanto aqueles com sintomas mais leves ficavam represados em casa ou devido ao aumento nas solicitações de radiografias de tórax. A interrupção do acesso aos serviços de TB, redução dos recursos humanos, financeiros e outros realocados para o combate à COVID-19 limitou a disponibilidade de serviços essenciais.

No entanto, na perspectiva da TB como um grave problema de saúde pública mundial, a consequência imediata da pandemia de COVID-19 no mundo foi a redução do número de novos casos notificados (BRASIL, 2022). Segundo a OMS, estima que cerca de 10 milhões de pessoas no mundo desenvolveram TB em 2020. No entanto, apenas 5,8 milhões de casos foram diagnosticados e notificados, o que reflete uma queda de 18% em relação a 2019. Com a pandemia as pessoas deixaram de procurar os serviços de saúde, diminuindo o número de casos, notificações e uma redução de 15% no número de pessoas tratadas para TB resistente a medicamentos.

De 2020 a 2021, observa-se um aumento na proporção de positividade das culturas de TB e uma queda na taxa de contaminação das culturas com relação aos anos anteriores. Entre os anos de 2014 e 2021 o percentual de culturas positivas variou entre 6,23% e 11,34%.

Tabela 2 - Taxa de contaminação x positividade das culturas realizadas nos anos de 2014 a 2021 no LACEN-DF.

Ano	Contaminação	Positividade
2014	0,93%	6,23%
2015	2,16%	10,75%
2016	4,94%	10,34%
2017	4,85%	4,99%
2018	3,54%	8,30%
2019	3,69%	7,47%
2020	1,98%	11,89%
2021	2,63%	11,34%

Fonte: LACEN-DF, 2022.

A queda da taxa de contaminação das culturas de TB de 2016 a 2019 reflete a qualidade das amostras recebidas, a qualidade dos reagentes, a integridade dos meios de cultivo e a qualidade na execução dos testes. Os valores de referência segundo Brasil (2022) são entre 3% e 5% para meios sólidos e de <10% para meios líquidos. Valores baixos de contaminação poderiam estar relacionados a descontaminação excessiva, exposição muito longa da amostra à descontaminação ou concentração muito alta de verde malaquita no meio de cultura. Já valores mais altos podem indicar concentração muito baixa do reagente descontaminante, tempo curto de contato entre a amostra e a solução descontaminante, amostras mal-conservadas durante o transporte ou o armazenamento, tempo muito longo entre a coleta da amostra e seu processamento, problemas na preparação do meio de cultura ou presença de contaminantes no ambiente do laboratório e/ou na estufa de cultura (BRASIL, 2022). No entanto, como no presente trabalho, tanto as técnicas fenotípicas quanto genotípicas apresentaram concordância de resultados podemos inferir que essa variável não teve impacto nos resultados de positividade das amostras.

Os pacientes envolvidos no estudo são provenientes dos serviços ambulatoriais e hospitalares do Distrito Federal. São eles: UBS 10 de Ceilândia, Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF), Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), Hospital Regional da Asa Sul (HRAS), Hospital Regional de Ceilândia (HRC), Hospital Regional do Gama (HRG), Hospital Regional do Paranoá (HRPA), Hospital Regional de Planaltina (HRP), Hospital Regional de Santa Maria (HRSM), Hospital Regional de Taguatinga (HRT) e UBS 01 da Asa Sul. Apesar da baixa incidência da TB no Distrito Federal, quando comparada com a média nacional o diagnóstico dos casos de TB mostra que a maioria dos casos foram diagnosticados em serviços de atenção especializada e de alta complexidade embora a atenção primária seja a principal porta de entrada do sistema de saúde.

Desta forma, a atenção primária à saúde é mais conhecida como postos de saúde, realizam ações e atendimentos voltados à prevenção e promoção à saúde. Nas UBS é possível fazer exames e consultas de rotina com equipes multiprofissionais e profissionais especializados em saúde da família, a atenção especializada é dividida em dois elementos (atenção secundária e terciária), que são, respectivamente, média e alta complexidade (ambulatorial e especializada hospitalar) e a alta complexidade que são os Hospitais Gerais de grande porte, Hospitais Universitários, Santa Casas e unidades de ensino e pesquisa fazem parte do nível de alta complexidade da atenção especializada (BRASIL, 2019).

Em suas variáveis relativas aos pacientes, foi considerado para análise o sexo, feminino e masculino, idade entre 22 a 73 anos, raça (branca, amarela, parda, negra e indígena),

escolaridade (analfabeto, ensino fundamental incompleto, ensino fundamental completo, ensino médio incompleto, ensino médio completo, ensino superior incompleto e ensino superior completo), forma (pulmonar, extrapulmonar, pulmonar + extrapulmonar), coinfeção TB-HIV (Tabela 3), tipo de entrada (caso novo, recidiva, reingresso após abandono, transferência, pós óbito e não se sabe) e hábitos (alcoolismo, tabagismo e drogas ilícitas) (Tabela 4).

Dos 30 casos de TB de 2014 a 2021, 83,3% ocorreram em pessoas do sexo masculino e 16,7% no sexo feminino. Observa-se predomínio do sexo masculino em quase todas as faixas etárias. De acordo com alguns estudos publicados na Revista Portuguesa de Pneumologia (2012), a prevalência da TB no sexo masculino ocorre porque eles são mais propensos a sofrer de silicose, uso de drogas, abuso de álcool, doença pulmonar obstrutiva crônica, infecção pelo HIV e câncer de pulmão. Todos esses fatores que podem comprometer o sistema imunológico e conseqüentemente afetar a saúde.

O Distrito Federal é cercado por cinturões de pobreza, apesar do elevado Índice de Desenvolvimento Humano do DF que ocupa a nona posição entre 5.565 municípios. Existe uma grande desigualdade social. O DF e os municípios do Entorno tornaram-se a terceira área metropolitana do país, atrás somente das de São Paulo e Rio de Janeiro. A explosão populacional em somente seis décadas, resultado de fluxos migratórios intensos, especialmente do Nordeste, aumentou os problemas da mais jovem capital do país. Sua periferia inchou com aqueles que não conseguiram residir em Brasília, formando um aglomerado de municípios pobres e dependentes. Com isso, os determinantes da doença continuam os mesmos (GONÇALVES *et al.*, 2015).

De acordo com a Tabela 3 (raça), observa-se que a maior parte dos casos de TB concentrou-se em pessoas autodeclaradas pardas seguida pelas de raça preta. Ao mesmo tempo, o percentual de casos de TB em raça amarelas ou indígenas não se fez presente nesse estudo. A taxa de TB em pessoas brancas e ignoradas foram as mais baixas. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2022) a população negra ou parda, que vive no Brasil na maioria das vezes vive em uma situação social vulnerável, conseqüentemente eles têm duas vezes mais chance de pegar TB do que uma pessoa de raça branca.

Tabela 3 - Variáveis relativas aos pacientes e resultados dos testes fenotípicos (MGIT 960[®], GeneXpert[®]) e genotípico (GenoType[®]).

Paciente	Ano	Reside	Sexo	Idade	Raça	Escolaridade	HIV	Tipo	Fenotípico		Genotípico GenoType [®]	
									GeneXpert [®]	MGIT 960 [®]	Banda de mutação	Mutação
1	2014	Águas Claras	M	36	Parda	EFC	Positivo	Pulmonar	CMTB (RIF/Resistente)	Resistente (R)	<i>rpoB</i> MUT3	S531L
2	2019	Sobradinho	M	37	Parda	EMC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H/S)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
3	2019	Planaltina	M	55	Parda	Analfabeto	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
4	2017	I	F	55	I	I	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (S)	°	°
5	2018	Santa Maria	M	36	Parda	EFI	Positivo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H/S)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
6	2018	Ceilândia	M	46	Parda	EFC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Resistente)	Resistente (R)	<i>rpoB</i> MUT2A	H526Y
7	2014	Santa Maria	F	47	Preta	EMC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>inhA</i> WT1 desaparece	-
8	2019	I	M	37	I	I	Negativo	Extrapulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
9	2016	Planaltina	M	48	Branca	EMC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
10	2020	Ceilândia	M	45	Parda	EMC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Resistente)	Resistente (R/H)	<i>rpoB</i> MUT2B <i>katG</i> MUT1	H526D S315T1
11	2018	Samambaia	M	54	Preta	EFI	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (S)	°	°
12	2017	Morador de rua	M	33	Parda	I	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Resistente)	Resistente (R/H)	<i>rpoB</i> WT8 desaparece <i>katG</i> MUT1	- S315T1
13	2018	Recanto das Emas	M	32	Parda	EFC	Não realizado	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H/S)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
14	2019	Riacho Fundo	M	26	Parda	EFC	Positivo	Extrapulmonar	Não detectado	Resistente (H)	<i>katG</i> MUT1	S315T1

15	2017	Ceilândia	M	31	Parda	EMC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Sensível	Sensível	Sensível
16	2021	I	M	56	I	I	Não realizado	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
17	2015	I	M	29	Parda	EFI	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Resistente)	Resistente (R/H/E/FLQ)	<i>rpoB</i> MUT3 <i>katG</i> MUT1 <i>gyrA</i> MUT1 <i>gyrA</i> MUT3C	S531L S315T1 A90V D94G
18	2020	I	M	54	I	I	Positivo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
19	2017	Cruzeiro novo	M	73	Preta	EMC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H/S)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
20	2018	Morador de rua	M	44	Parda	EFI	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Sensível	Sensível	Sensível
21	2018	Asa sul	M	73	Branca	ESC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>katG</i> MUT2	S315T2
22	2019	Samambaia	F	55	Parda	EMC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Resistente)	Resistente (R)	<i>rpoB</i> MUT2A	H526Y
23	2018	Ceilândia	F	22	Branca	ESC	Não realizado	Pulmonar	CMTB (RIF/Resistente)	Resistente (R)	<i>rpoB</i> MUT2A	H526Y
24	2018	Santa Maria	M	52	Branca	EMI	Não realizado	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
25	2020	Morador de rua	M	53	Preta	Analfabeto	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Resistente)	Resistente (R)	<i>rpoB</i> MUT2A	H526Y
26	2018	Ceilândia	M	28	Parda	I	Não realizado	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
27	2018	Asa sul	F	30	Parda	ESC	Não realizado	Pulmonar	CMTB (RIF/Resistente)	Resistente (R)	<i>rpoB</i> MUT1	D516V
28	2020	Riacho Fundo	M	39	Preta	EFI	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>katG</i> MUT1	S315T1
29	2017	Morador de rua	M	30	Parda	EMI	Positivo	Pulmonar + Extrapulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (S)	°	°
30	2019	Santa Maria	M	24	Parda	EMC	Negativo	Pulmonar	CMTB (RIF/Sensível)	Resistente (H)	<i>katG</i> MUT1	S315T1

I = Ignorado.

Sexo: M: masculino e F: feminino.

Escolaridade: EFI: ensino fundamental incompleto, EFC: ensino fundamental completo, EMI: ensino médio incompleto, EMC: ensino médio completo e ESC: ensino superior completo

° = cepas com resistência à estreptomicina.

MGIT 960 ®: **S:** estreptomicina. **H:** isoniazida. **R:** rifampicina. **E:** etambutol.

GeneXpert®: CMTB (RIF/Sensível): complexo *Mycobacterium tuberculosis* rifampicina sensível; CMTB (RIF/Resistente): complexo *Mycobacterium tuberculosis* rifampicina resistente.

GenoType ®: **RPOB:** gene que conferem resistência ao antibiótico rifampicina. **KATG/INHA:** genes que conferem resistência ao antibiótico isoniazida, **GYRA/GYRB:** genes que conferem resistência fluoroquinolonas (**FLQ**). **Rrs:** genes que conferem resistência à canamicina (**KAN**) e amicacina (**AMK**), ou capreomicina (**CAP**) e viomicina (**VIO**). **Eis:** gene usado para detecção da resistência de nível baixo à canamicina.

Fonte: LACEN-DF, 2022; PRONTUÁRIOS; SINAN e SITE-TB.

Alguns dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua demonstram que no Distrito Federal há 37,5% (branca), 10,5 % (preta), 50,4% (parda) e 1,5 % (amarela ou indígena), o que também justifica a maior prevalência de TB na população de raça parda no DF devido a maior concentração de pessoas dessa raça (IBGE, 2018).

Com relação a escolaridade (Tabela 3), pode-se observar que entre os pacientes no estudo houve uma prevalência maior entre aqueles que possuíam o ensino fundamental incompleto e ensino médio completo. Segundo alguns estudos eles atribuem esse fato diretamente correlacionado com a renda, uma vez que a doença está atrelada às condições sociais de vida dos que a desenvolvem. Em decorrência da baixa renda, a maioria dos doentes com TB tem empregos compatíveis com seu nível de escolaridade (trabalhadores domésticos, motoristas e pessoas que trabalham na construção civil), conseqüentemente, vivem em áreas de alto risco, comem inadequadamente e na maioria das vezes não possuem acesso a serviços básicos de saúde (OLIVEIRA *et al.* 2017).

Observa-se que o número de pacientes que não foram testados para HIV no nosso estudo foi de 20% (Tabela 3), o que é considerado um valor muito alto e que gera uma certa preocupação em relação às testagens e no acompanhamento dos pacientes. Isso porque uma vez na ficha de notificação/investigação da TB é necessário registrar o resultado do teste para HIV (sorologia ou teste rápido) e se atentar a quadros de coinfeção, pois possuem um maior risco de progressão de TB infecção para doença ativa e maior possibilidade de ter formas atípicas e graves. A TB é a doença oportunista que mais leva o paciente que vive com HIV a óbito e a associação de TB-MDR com infecção pela HIV tem sido relatada em várias regiões do mundo. Uma vez confirmado o diagnóstico, o caso de TB deve ser acompanhado até o seu encerramento (BRASIL, 2019).

A coinfeção TB-HIV é a principal causa de morte em pacientes com aids. Em 2015, 22% das pessoas diagnosticadas com a coinfeção foram a óbito. Com isso, o Ministério da Saúde recomenda que o teste de TB seja realizado em todos os momentos da assistência a pessoas vivendo com HIV. Da mesma forma, todas as pessoas diagnosticadas com TB devem fazer o teste de HIV (BRASIL, 2022).

A maioria dos pacientes avaliados nestes estudos apresentavam TB pulmonar com uma taxa de 90%, 6,70% TB extrapulmonar e 3,30% apresentavam as duas formas. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) entre os anos de 2018 e 2021 no Brasil 73,9% dos casos foram confirmados como TB pulmonar, 23% dos casos como TB extrapulmonar e 3% dos casos como TB pulmonar e extrapulmonar concomitantemente.

A forma pulmonar, além de ser a mais comum, é também a mais importante para a saúde pública, principalmente quando se trata da baciloscopia positiva, pois é responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da doença. Já a forma extrapulmonar é mais comum em pessoas que vivem com HIV ou aquelas que possuem algum comprometimento do sistema imunológico (BRASIL, 2022).

Segundo o Boletim Epidemiológico da Tuberculose do Ministério da Saúde edição especial março de 2022, houve uma queda nos casos de coinfeção TB-HIV variando de 9,9% em 2012 a 8,3% em 2021 dado que reflete a despeito da diminuição de testagens para o HIV em casos novos de TB durante a pandemia da COVID-19, nos anos de 2020 e 2021. Na Tabela 3, das 30 amostras selecionadas para o estudo 16,6% dos pacientes apresentaram coinfeção TB-HIV e 63,4% dos pacientes apresentaram resultados negativos para HIV.

Tabela 4 - Variáveis relativas ao tipo de entrada e hábitos.

TIPO DE ENTRADA	
Tipo de entrada	Porcentagem
Caso novo	63%
Recidiva	13,30%
Reingresso após abandono	7%
Não se sabe	16,7%
HÁBITOS	
Hábitos	Porcentagem
Alcoolismo	20%
Drogas ilícitas	16,70%
Tabagismo	16,70%
Ignorado	26,60%
Nenhum	20%

Fonte: SINAN/ LACEN-DF.

Das amostras selecionadas para o estudo, 63% correspondem a casos novos de TB (Tabela 4). Caso novo é o caso de TB ativa que nunca utilizou medicamento antituberculose ou que utilizou por menos de 30 dias. O que nos mostra que constantemente há novos casos de TB sendo diagnosticado com resistência primária, ou seja, são pacientes que estão dando entrada com resistência primária aos fármacos utilizados no tratamento da TB, conseqüente, eles estão sendo infectados por bacilos resistentes. 13,30% de casos são de recidiva, caso de TB ativa que foi tratado anteriormente e recebeu alta por cura comprovada ou por ter completado o

tratamento e retornou com TB resistente, 7% dos casos resistentes são de reingresso após abandono, é o caso de TB ativa, tratado anteriormente por mais de 30 dias, mas que deixou de tomar o medicamento por 30 dias consecutivos ou mais e 16,70% referem-se aos casos de TB ativa com história prévia desconhecida (BRASIL, 2019).

De todos os pacientes com amostras encaminhadas para análise, 20% possuem dependência relacionada com o uso indiscriminado de álcool (alcoolismo). Existem diversos estudos ao redor do mundo entre a associação do uso de álcool e o risco de desenvolver TB, fato que pode estar correlacionado a alta taxa de pessoas com TB e que fazem o uso indiscriminado do álcool. Uma das principais hipóteses relacionadas ao fator de risco em desenvolver a TB em concomitância com o uso de álcool pode ser devido à queda da imunidade, desnutrição, fragilidade social, exposições a situações de risco, entre outros. Dados que nos geram preocupação tendo em vista que a TB apresenta pior prognóstico em pacientes alcoolistas quando comparados a pacientes não-alcoolistas (PAULA *et al.*, 2005).

Ademais, 16,70% faziam o uso de substâncias psicoativas ou psicotrópicas cuja produção e comercialização são proibidas por lei no Brasil. A presença de usuários de drogas ilícitas infectados pela TB nas famílias e comunidades é um fator crítico na manutenção da cadeia de transmissão da TB. Diversos fatores estão associados a infecção pelo complexo *M. tuberculosis* e a progressão para a doença ativa em usuários de drogas ilícitas, como: o estilo de vida desses usuários, as condições de moradia, o isolamento de pessoas em ambientes fechados para o consumo de drogas ilícitas e a partilha de materiais de uso pessoal e descartáveis (SILVA *et al.*, 2018).

Além disso, 16,70% possuem dependência física e psicológica do consumo de nicotina, substância presente no tabaco (tabagismo). De acordo com dados da OMS, mais de 20% da incidência global de TB pode ser atribuída ao uso do tabaco, o que aumenta o risco de doença em duas vezes. A exposição passiva e ativa à fumaça do cigarro também está associada a um risco aumentado de TB que está relacionado à disfunção ciliar, redução da resposta imune e defeitos na resposta imune aos macrófagos, com ou sem diminuição da contagem de TCD4, aumentando a suscetibilidade à infecção pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (WHO, 2018), 20% dos pacientes afirmaram não utilizar álcool, nicotina ou drogas ilícitas e 26,60% não quiseram responder se faziam uso.

5.3 Baciloscopia, GeneXpert® e cultura das amostras selecionadas

Tabela 5 - Relação dos resultados de baciloscopia, TRM-TB (GeneXpert®) e cultura dos pacientes.

Teste	Positivo	Negativo
Baciloscopia	76,70%	23,30%
TRM-TB	96,70%	3,30%
Cultura	100,00%	0,00%

Fonte: LACEN-DF.

A baciloscopia de cada amostra foi analisada conforme o que é adotado pelo LACEN-DF que segue como critérios para interpretação dos resultados da baciloscopia, a padronização com o método de Ziehl-Neelsen pela Organização Mundial da Saúde. Do total de 30 amostras de baciloscopia 76,70% das análises apresentaram resultados positivos (foi observado a presença de BAAR nas lâminas analisadas) e 23,30% como resultados negativos (não foi observado a presença de BAAR nas lâminas analisadas).

No Brasil, em torno de 70% dos portadores de TB pulmonar possuem amostras de escarro com grande quantidade de bacilos (BRASIL, 2022). Teste importante na identificação da maioria dos casos bacilíferos, que são as fontes mais importantes de transmissão da doença e para controle da TB (permite avaliar o sucesso ou a falência do tratamento), além de ser um método simples, rápido e de baixo custo.

Os resultados do teste pelo sistema GeneXpert® foram interpretados a partir dos sinais de fluorescência medidos e dos algoritmos de cálculos incorporados (RIE *et al.*, 2010). Como observamos no gráfico o TRM-TB apresentou 96,70% das amostras analisadas positivas (houve a detecção do complexo *Mycobacterium Tuberculosis*) e apenas 3,30% foram negativas (não houve a detecção do complexo *Mycobacterium Tuberculosis*). Da análise com o sistema GeneXpert® 30% das amostras foram detectadas a resistência à R e 70% não foram detectadas a resistência à R. Segundo o Manual de Recomendações para Controle da Tuberculose no Brasil a sensibilidade do TRM-TB em amostras de escarro de adultos é de cerca de 90% e 95% de sensibilidade a resistência à R. Desta maneira, o TRM-TB possui uma sensibilidade superior à da baciloscopia. Ao analisar a resistência à R no geneXpert® verificou-se que todas as amostras resistentes à R foram concordantes com os testes MGIT® e o GenoType®.

Como se pode analisar na Tabela 5. todas as amostras que foram cultivadas apresentaram uma taxa de 100% de crescimento, ou seja, todas as amostras semeadas foram

capazes de crescer no meio de cultura (Figura 4). Segundo o Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial da TB a cultura é um dos métodos de referência (padrão ouro) para TB (BRASIL, 2019).

Figura 4 - Colônias do complexo *M. tuberculosis* em meio de cultura Ogawa-Kudoh. Colônias de cor creme, não produtoras de pigmento, secas e rugosas



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.4 GenoType®

De acordo com os resultados do teste GenoType® MTBDR_{plus}, 30% das cepas apresentaram mutações no gene *rpoB*, nenhuma cepa apresentou mutação em *katG* e *inhA* simultaneamente, 10% das cepas apresentaram mutações apenas nos genes *inhA*, 53,3% das cepas apresentaram mutações no gene *katG* e 6,7% das cepas não foi encontrado resistências no teste em análise.

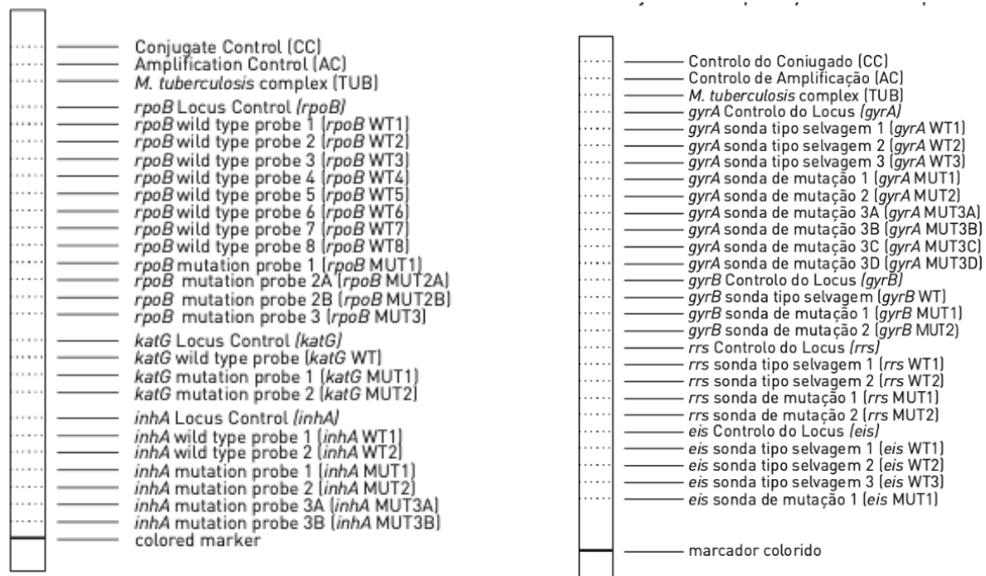
No gene *rpoB* 3,3% das cepas apresentaram mutação na banda MUT1 do gene *rpoB* o que estavam associadas ao códon 513-519, o que sugere mutação D516V, 13,4% das cepas apresentaram mutação na banda MUT2A no gene *rpoB* o que sugere a mutação H526Y, 3,3% das cepas apresentaram mutação na banda MUT2B conferindo mutação H526D, 6,7% das cepas apresentaram o mesmo perfil genotípico de resistência, ou seja, perda da banda selvagem WT8 e aparecimento da banda MUT3 do gene *rpoB*, o que sugere a mutação S531L. O paciente 12 teve a perda da banda selvagem WT8 e não houve aparecimento da banda de mutação para *rpoB*. No entanto, a interpretação é que houve mutação no gene *rpoB*, no entanto a mutação não estava presente na fita. Sendo desta forma uma amostra elegível para sequenciamento genético.

Figura 5 - Programação para a amplificação (HAIN)

15 min 95°C	1 ciclo
30 sec 95°C } 2 min 65°C }	10 ciclos
25 sec 95°C } 40 sec 50°C } 40 sec 70°C }	20 ciclos
8 min 70°C	1 ciclo
Taxa de aquecimento	≤2,2°C/sec

Os produtos de amplificação poderão ser armazenados de +8 a -20°C.

Fonte: LIFESCIENCE, 2012.

Figura 6 - Exemplo das bandas presente em cada fita HAIN de 1° e 2° linha

Fonte: LIFESCIENCE, 2012.

Na pesquisa do *katGMUT1* houve o mesmo perfil genotípico em 50% das amostras analisadas com mutação S315T1, 3,3% com mutação S315T2 e 46,7% não apresentaram mutações nesse teste para *katG*.

Nos resultados da pesquisa do gene de mutação *inhA* 6,7% das cepas apresentaram mutação na banda MUT1 que representa uma mutação C15T, 3,3% das cepas ocorreram a ausência de banda WT que foi um indicativo de resistência ao fármaco avaliado, também sendo uma amostra elegível para o sequenciamento genético pois a mutação não estava contemplada

no teste utilizado 90% das cepas analisadas não possuíram resistências relacionada ao gene *inhA*.

Dentre as cepas selecionadas para o estudo foram selecionadas três cepas para fazer o teste de sensibilidade aos fármacos de segunda linha. Duas amostras com padrão de multirresistência (TB-MDR) e uma monorresistente. Os resultados do GenoType® MTBDRsl (segunda linha de tratamento para TB) nas amostras 10 e 12 foi a não detecção de nenhuma mutação que conferem resistência aos fármacos de segunda linha. Na amostra 17 foi detectada a banda de mutação MUT1 e MUT3c que correspondem a mutação A90V e D94G conferindo resistência à Fluoroquinolonas.

5.5 Método MGIT 960®

Através do teste MGIT 960®, obteve-se os seguintes resultados (Tabela 3): sete das cepas apresentavam resistência à S, dezenove resistência à H, nove resistentes à R, uma resistente à E e duas amostras apresentaram-se sensíveis às drogas testadas. Quatro apresentaram resistência à S e H, duas resistentes à H e R e uma resistente à H, R e E. O perfil fenotípico da resistência à R e H puderam ser comparadas com o teste GenoType® MTBDRplus, genotípico, permitindo verificar a mutação responsável pela resistência in vitro verificada pelo SIRE MGIT 960®. Resultado que já foi verificado antes por Lima (2015) onde foi verificada a acurácia do ensaio GenoType® MTBDRplus para a detecção da resistência à R e à H quando comparada aos testes de sensibilidade convencionais com um tempo de resposta na detecção da resistência à R e à H reduzido.

Quando tentamos associar o local de residência dos pacientes com a presença das mutações e resistências obtemos os seguintes resultados: os pacientes que residiam em mesma localidade apresentaram algumas similaridades. Dois pacientes alegaram que residiam em Planaltina. Ambos os pacientes apresentaram resistência a H um relacionado ao gene *inhA* e outro relacionado a *katG*. Os quatro pacientes que residiam em Santa Maria apresentaram resistência à H, três apresentaram resistência na banda de mutação *katG* MUT1 conferindo a mesma mutação em S315T1 e um paciente houve o desaparecimento da banda de mutação no gene *inhA* para conhecimento da mutação nesse caso é necessário um sequenciamento genético para melhor investigação.

Os pacientes que residiam em Ceilândia dois possuíam resistência à R na mesma banda de mutação *rpoB* MUT2A, dois apresentaram resistência à H na banda de mutação *katG* MUT1 um deles também possuía resistência à R e um paciente apresentou se sensível nos testes de

suscetibilidade aos fármacos. Dois dos pacientes que residiam no Riacho Fundo apresentaram resistência à H com a mesma mutação. Os pacientes que residiam em Samambaia um teve resistência à S e o outro resistência a R. Os que residiam na Asa Sul um apresentou resistência à R e outro à H.

Nos pacientes em situação de rua apresentaram perfil de resistência diferentes. Um deles não possuía resistência aos fármacos analisados, um possuía resistência tanto à R quanto à H e outro apresentou resistência à S. Os pacientes que apresentaram coinfeção TB-HIV em sua maioria possuíam resistência à H.

Segundo o estudo realizado as mutações associadas à resistência à R no Distrito federal parecem ocorrer com mais frequência no gene *rpoB* H526Y (MUT2A). Já as mutações associadas com H ocorrem em sua maioria no gene *katG* S315T1 (MUT1) e um número reduzido de mutações em *inhA* C-15T (MUT1) utilizando como base os testes realizados nas amostras selecionadas para o estudo.

6 CONCLUSÃO

A maioria das amostras analisadas no estudo foram predominantemente de origem pulmonar e foram encaminhadas por unidades hospitalares ao LACEN-DF. As amostras de origem pulmonar são as mais importantes, pois são responsáveis por manter a cadeia de transmissão da doença. A maioria dos casos foram diagnosticados em serviços de atenção especializada e de alta complexidade embora a atenção primária seja a principal porta de entrada do sistema de saúde.

Analisando todas as variáveis relativas aos pacientes dos casos de TB no DF pode-se observar que não houve nenhuma divergência de dados de acordo com dados da literatura. O elevado Índice de Desenvolvimento Humano do DF e a baixa incidência de casos não fez diferença nos determinantes da doença.

A TB foi mais prevalente no sexo masculino, a idade média de acometimento pela doença foi de 45,5 anos (IQR 22-73) com maior frequência na população de raça parda com o ensino fundamental incompleto e ensino médio completo. Os resultados de HIV estavam disponíveis para apenas 24 pacientes, dos quais 16,6% (5/24) eram HIV positivos e a maioria possuía resistência à H. A testagem para o HIV estava abaixo do recomendado pelo MS. Isso gera um sinal de alerta, pois é necessário iniciar o tratamento do HIV em pessoas com coinfeção TB-HIV de forma oportuna e manter a vinculação das pessoas à rede de atenção e a adesão à TARV são recomendações fundamentais para diminuir a morbidade e a mortalidade

nessa população. Além de promover ações que viabilizem o cuidado das pessoas com coinfeção TB-HIV em um mesmo serviço assistencial e fortalecer a articulação entre equipes, serviços e coordenação de TB e HIV no desenvolvimento de ações colaborativas com foco no paciente. Mesmo o DF tendo esse serviço ofertado de forma conjunta no Hospital Dia, ainda encontramos grandes falhas nas articulações entre os dois agravos.

A maior parte dos casos de TB, segundo o estudo, foi categorizada como casos de resistência primária. Um fato muito preocupante, pois o doente já está se contaminando com bacilos resistentes, o que nos gera um alerta. Fica um questionamento se esses pacientes não foram adequadamente assistidos, acolhidos, se tiveram um diagnóstico ineficaz inicialmente e os subsequentes tratamentos tardios. Das 30 amostras selecionadas, quatro amostras de pacientes diagnosticados com TB resistentes não estavam no banco de dados do SINAN. Diante de tal informação, há prejuízo para a realização de cálculos a partir dos dados gerados no sistema. Isso permite a produção equivocada de indicadores operacionais e epidemiológicos importantes, prejudicando a análise do perfil epidemiológico da TB no DF e o monitoramento e avaliação das ações de controle. Recomenda-se, assim, desenvolver estratégias de qualificação da informação entre bases de dados da TB.

Ao analisar os perfis fenotípicos e genotípicos das cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e sua resistência aos principais fármacos para o tratamento da TB isoladas em amostras do DF, obteve-se o perfil das cepas de resistência no Distrito Federal de maior prevalência que foi as cepas resistentes à H seguidamente à R. Os genes mais envolvidos na resistência à isoniazida foi o *KatG* que conferem mutação S315T1 no códon 315 seguido pela resistência a R no gene *RpoB* na mutação H526Y no códon 526-529. Em duas das amostras ocorreu a perda de uma banda selvagem no teste GenoType® MTBDR*plus* e ela não apareceu em nenhuma banda de mutação abrangida pela fita, o que nos leva a considerar um futuro sequenciamento genético para identificarmos as mutações que levaram a esta resistência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, C.; HIRANO, K.; TOMIYAMA, T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3693-3697, 1999.
- ACHARYA, B. *et al.* Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5, p. 4065-4075, 2020.
- BESERRA, Karine Alves, *et al.* Itinerário terapêutico de pessoas com tuberculose resistente e em retratamento. **Avances en Enfermería**, v. 39, n. 1, p. 21-29, 2021.
- BESPIATYKH, D. *et al.* A comprehensive map of mycobacterium tuberculosis complex regions of difference. **Msphere**, v. 6, n. 4, p. e00535-21, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da TB e outras Micobactérias**. Brasília, 2019. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf. Acesso em: 08 jun. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico Especial – 2021**. Brasília, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/sau/pt-br/centrais-de-contenido/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim-tuberculose-2021_24.03#:~:text=Entre%202015%20e%202020%2C%20foram,entre%2030%20e%2049%20anos. Acesso em: 08 jun. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas E Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose – 2022**. Brasília, 2022. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2022/boletim-epidemiologico-de-tuberculose-2022>. Acesso em: 08 JUN. 2022.
- CAMINERO, J. A. *et al.* Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 9, p. 621-629, 2010.
- CAMPOS, R.; PIANTA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul–Brasil. **Bol Saúde**, v. 15, n. 1, p. 61-71, 2001.
- CASTRO, Kássia Batista de; LIMA, Larissa Ane de Sousa. **Atlas do Distrito Federal**. Brasília: CODEPLAN, 2020. Disponível em: <https://www.codeplan.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/05/Atlas-do-Distrito-Federal-2020-Cap%C3%ADtulo-5.pdf>. Acesso em: 8 dez. 2022

CEPHEID. **Xpert® MTB/RIF**. Rev. G, jul.2020. Disponível em: <https://www.cepheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpert-MTB-RIF-PORTUGUESE-Package-Insert-301-1404-PT-Rev-G.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2022.

COLE, S. T. *et al.* Decifrando a biologia do *Mycobacterium tuberculosis* a partir da sequência completa do genoma. **Natureza**, v. 396, n. 6707, pág. 190-190, 1998.

COSTA, R. R. da *et al.* Diagnóstico laboratorial da tuberculose: Revisão de literatura. **Rev Med Minas Gerais**, v. 28, n. Supl 5, p. S280525, 2018.

CORDILLOT, M. *et al.* In vitro cross-linking of *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan by L, D-transpeptidases and inactivation of these enzymes by carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 5940– 5945, 2013.

COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 1175-2045.

CRUDU, V. *et al.* First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1264-1269, 2012.

DALCOLMO, M. P. Tratamento da tuberculose sensível e resistente. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 55-9, 2012.

DHEDA, K. *et al.* Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis. **The lancet Respiratory medicine**, v. 2, n. 4, p. 321-338, 2014.

DICKS, K. V.; STOUT, J. E. Molecular diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Annu Rev Med**, v. 70, p. 77-90, 2018.

DIRIBA, G. *et al.* Performance of *Mycobacterium* Growth Indicator Tube BACTEC 960 with Lowenstein–Jensen method for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* at Ethiopian National Tuberculosis Reference Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2017.

DUTT, A. K.; STEAD, W. W. Epidemiology and host factors. **Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections**, v. 4, p. 3-16, 2006.

FARHAT, M. R. *et al.* Genetic Determinants of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and Their Diagnostic Value. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 194, n.5, p. 621-30, 2016.

GONÇALVES, F. O. *et al.* **Índice multidimensional de pobreza (imp)**: as dimensões da pobreza no distrito federal e suas políticas de enfrentamento. Disponível em: https://www.codeplan.df.gov.br/wpcontent/uploads/2018/02/TD_6_As_Dimens%C3%B5es_d

a_Pobreza_no_DF_e_suas_Pol%C3%ADticas_de_Enfrentamento.pdf. Acesso em: 08 jun. 2022.

GUMBER, S.; TAYLOR, D. L.; WHITTINGTON, R. J. Protein extraction from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Comparison of methods for analysis by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, native PAGE and surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. **Journal of microbiological methods**, v. 68, n. 1, p. 115-127, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico 2018**. Disponível em: www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao.html. Acesso em: 08 jun. 2022.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico 2021**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/df.html>. Acesso em: 08 jun. 2022.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico 2022**. Disponível em: [https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=Negros\[acesso&start=80](https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=Negros[acesso&start=80). Acesso em: 29 nov. 2022.

JAGIELSKI, T. *et al.* Characterization of Mutations Conferring Resistance to Rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n.10, p. e01093-18, 2018.

KANJI, A. *et al.* Characterization of genomic variations in SNPs of PE_PGRS genes reveals deletions and insertions in extensively drug resistant (XDR) *M. tuberculosis* strains from Pakistan. **International journal of mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 73-79, 2015.

KUAN, C. S. *et al.* Genome Analysis of the First Extensively Drug-Resistant (XDR) *Mycobacterium tuberculosis* in Malaysia Provides Insights into the Genetic Basis of Its Biology and Drug Resistance. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0131694, 2015.

LIFESCIENCE, H. **Genotype MTBDRplus ver 2.0**: Instructions for use. 2017.

LIMA, G. R. C. C. **Avaliação da resistência aos tuberculostáticos de primeira linha em cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* isolados no Distrito Federal**. 2015. 110 f., il. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

LOPES, M. A. Manual do Usuário BD BACTEC MGIT 960 e BD BACTEC MGIT 320. **Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas**, v. 18, p. 1-7, 2016.

LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG vaccine. **Maedica**, v. 8, n. 1, p. 53-58, 2013.

LYON, S. M.; ROSSMAN, Milton D. Pulmonary tuberculosis. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 1, p. 5.1. 24, 2017.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

MARLOWE, E. M. *et al.* Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1621-1623, 2011.

MOTA, P. C. *et al.* Predictors of delayed sputum smear and culture conversion among a Portuguese population with pulmonary tuberculosis. **Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)**, v. 18, n. 2, p. 72-79, 2012.

NEHER, S. Ar puro. **Made for minds**. Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.dw.com/pt-br/as-ru%C3%ADnas-do-sanat%C3%B3rio-de-beelitz/g-19503746>. Acesso em: 08 jun. 2022.

NIMMO, C. *et al.* Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in the genomic era. **Frontiers in cellular and infection microbiology** v. 12, n. 954074, 2022.

OLIVEIRA, J. F; *et al.* **Educação escolar: políticas, estrutura e organização**. Cortez editora, 2017.

PATEL, V. B. *et al.* Diagnostic accuracy of quantitative PCR (Xpert MTB/RIF) for tuberculous meningitis in a high burden setting: a prospective study. **PLoS medicine**, v. 10, n. 10, p. e1001536, 2013.

PAULA, A. de *et al.*, A influência do alcoolismo no prognóstico e tratamento da tuberculose. **SMAD Revista Eletrônica Saúde Mental Álcool e Drogas (Edição em Português)**, v. 1, n. 1, p. 01-09, 2005.

PEDRO, H. S. P. *et al.* Baciloscopia para Tuberculose pulmonar. Estudo multicêntrico do esfregaço para baciloscopia de escarro no diagnóstico da tuberculose pulmonar segundo a Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 39, n. 4, p. 273-282, 2010.

PHELAN, J. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* whole genome sequencing and protein structure modelling provides insights into anti-tuberculosis drug resistance. **BMC medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2016.

PMM/SMS. **Tuberculose**: é uma doença infecciosa e transmissível, causada pelo bacilo de Koch. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.mafra.sc.gov.br/noticias/ver/2019/05/saude-de-mafra-alerta-sobre-tuberculose-uma-doenca-infecciosa-e-transmissivel>. Acesso em: 08 JUN. 2022.

RIE, A. V. *et al.* Xpert® MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope?. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 10, n. 7, p. 937-946, 2010.

ROSEMBERG, J. Tuberculose-Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de pneumologia sanitária**, v. 7, n. 2, p. 5-29, 1999.

SANAI, F. M.; BZEIZI, K. I. Systematic review: tuberculous peritonitis—presenting features, diagnostic strategies and treatment. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 22, n. 8, p. 685-700, 2005.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Miliary tuberculosis. **Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections**, p. 491-513, 2017.

SILVA, D. R. *et al.* Fatores de risco para tuberculose: diabetes, tabagismo, álcool e uso de outras drogas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, p. 145-152, 2018.

SINGH, R. *et al.* Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1547-1567, 2020.

TIERNEY, D; NARDELL, E. A. Tuberculose (TB). 2018. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7as->. Acesso em: 08 jun. 2022.

VAN DEUN, A. *et al.* Mutações *rpoB* contestadas podem freqüentemente causar resistência importante à rifampicina entre novos pacientes com tuberculose. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 2, pág. 185-190, 2015.

VINHAS, S. A. **Estudo sobre características genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes com e sem lesões cavitárias**. 2013.140 f. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) - Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

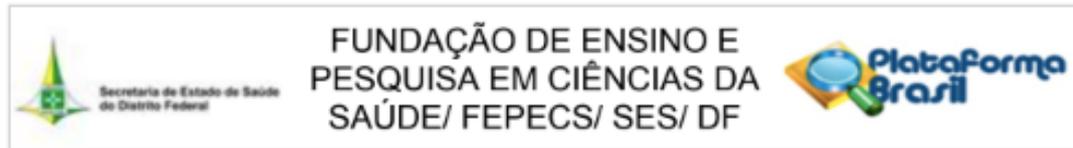
WILKINSON, R. J. *et al.* Tuberculous meningitis. **Nature reviews neurology**, v. 13, n. 10, p. 581-598, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report**. Geneva, 2018. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 08 jun. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vacina BCG**. Genebra, 2004. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/BCG-vaccines-report-december-2004>. Acesso em: 08 jun. 2022.

8 ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética



FUNDAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE/ FEPECS/ SES/ DF

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfis genéticos e de resistência das cepas de Mycobacterium tuberculosis isoladas em amostras clínicas, utilizando métodos convencionais, PCR e sequenciamento no Distrito Federal.

Pesquisador: GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62925816.9.0000.5553

Instituição Proponente: DISTRITO FEDERAL SECRETARIA DE SAUDE

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.960.986

Apresentação do Projeto:

Parecer 1932370 já descrito anteriormente

Objetivo da Pesquisa:

Parecer 1932370 já descrito anteriormente

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Parecer 1932370 já descrito anteriormente

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Parecer 1932370 já descrito anteriormente

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Parecer 1932370 já descrito anteriormente

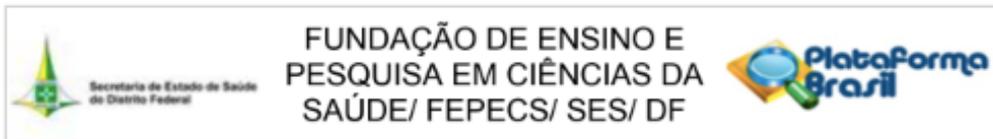
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram sanadas satisfatoriamente.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.960.986

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_838271.pdf	09/02/2017 21:36:01		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PPSUS2016ENCAMINHADOFEPECSrev.docx	09/02/2017 20:17:42	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
Outros	CARTARESPPOSTAPENDENCIAS2017.pdf	09/02/2017 20:16:13	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
Outros	APROVACAOFAPDODF.pdf	09/02/2017 20:15:47	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMOCONSENTIMENTOADOLFOLUTZ.pdf	09/02/2017 20:14:52	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
Orçamento	ORCAMENTOAUTORIZADOFAP.pdf	09/02/2017 20:14:25	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termoconcordancia.pdf	06/12/2016 14:57:37	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termoTCLE.pdf	06/12/2016 14:55:23	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	06/12/2016 14:53:50	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
Outros	CVMariadoSocorroNantuaEvangelista.pdf	05/12/2016 22:07:12	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
Outros	CVFABIANO.pdf	05/12/2016 22:06:12	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito
Outros	CVGLAURA.pdf	05/12/2016 22:04:37	GLAURA REGINA DE CASTRO E CALDO LIMA	Aceito

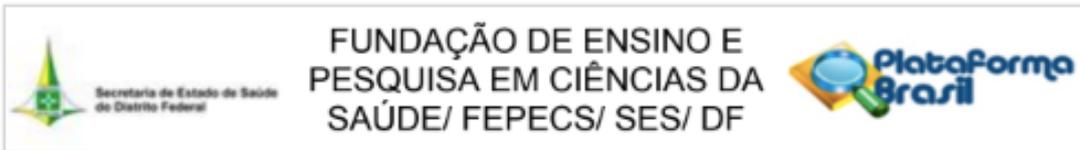
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
 Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeefica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.950.986

BRASILIA, 13 de Março de 2017

Assinado por:
Helio Bergo
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeefica.secretaria@gmail.com