

Mara Cristina Scheffer

**INFLUÊNCIA DE FATORES DE RISCO DO PACIENTE E
DE CARACTERÍSTICAS DE *Mycobacterium tuberculosis* NO
DESFECHO DOS CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE
PULMONAR TRATADOS COM ESQUEMA BÁSICO: UMA
COORTE PROSPECTIVA DE DOIS ANOS NA GRANDE
FLORIANÓPOLIS/SC**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Farmácia na Área de Concentração de
Análises Clínicas
Orientador: Prof. Dra. Maria Luiza
Bazzo

Florianópolis
2017

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

Scheffer, Mara Cristina
INFLUÊNCIA DE FATORES DE RISCO DO PACIENTE E DE
CARACTERÍSTICAS DE *Mycobacterium tuberculosis* NO
DESFECHO DOS CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE PULMONAR
TRATADOS COM ESQUEMA BÁSICO: UMA COORTE PROSPECTIVA
DE DOIS ANOS NA GRANDE FLORIANÓPOLIS/SC / Mara
Cristina Scheffer ; orientador, Maria Luiza Basso,
2017.
210 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Tuberculose, Epidemiologia
molecular, Desfecho de tratamento, Concentração
Inibitória Mínima. I. Basso, Maria Luiza. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“INFLUÊNCIA DE FATORES DE RISCOS DO
PACIENTE E DE CARACTERÍSTICAS DE
Mycobacterium tuberculosis NO DESFECHO DOS
CASOS NOVOS DE TUBERCULOSE PULMONAR
TRATADOS COM ESQUEMA BÁSICO: UMA
COORTE PROSPECTIVA DE DOIS ANOS NA
GRANDE FLORIANÓPOLIS/SC”**

POR

Mara Cristina Scheffer

Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:

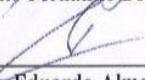
Banca Examinadora:



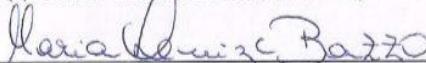
Prof(a). Dr(a). Fabíola Branco Filippin Monteiro (UFSC – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Antonio Fernando Boing (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Pedro Eduardo Almeida da Silva (FURG – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Bazzo (UFSC – Orientador)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 23 de agosto de 2017.



Dedico este trabalho aos pacientes e aos profissionais de saúde que possibilitaram a realização do mesmo.

AGRADECIMENTOS

À minha querida Professora orientadora Dra Maria Luiza Bazzo pelo incentivo, oportunidade, orientação, pelo suporte para realização do trabalho, mas principalmente pela amizade.

Aos meus amigos da Microbiologia/HU, Márcio, Ivonete, Malu, Luiz, Juliano, Mattei e mais recentemente Gustavo, pelos quatro anos segurando as pontas da minha correria e tentativa de dar conta de tudo ao mesmo tempo.

Ao amigo Sandro, sempre preocupado e disponível, me ajudando muito.

À Dra Leticia e a Albanira que não mediram esforços para me auxiliar a encontrar os pacientes de São José, proporcionando a realização do estudo.

Ao Luiz Cerne e a todas as servidoras da TB do LAMUF, pelos emails semanais comunicando os pacientes positivos da rede de Florianópolis.

À Darcita e a Kida por me auxiliarem na busca dos isolados bacterianos e resultados do LACEN/SC, parceria imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Prim e a Tai, por me auxiliarem no início do trabalho, repassando técnicas, macetes e conhecimento, tornando meu caminho um pouco mais tranquilo.

Aos amigos ICs Eduardo e Manoela, e a nossa “supervisora” Leticia pelo auxílio com as laborosas técnicas utilizadas no estudo, em especial a CIM, sem o auxílio de vocês eu terminaria o trabalho em 2020.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, em especial ao Felipe, Lica, Hana, Alisson e Marcos, sempre disponíveis para auxiliar na minha correria diária.

A minha família, especialmente minha mãe e minha irmã Natel, pelo amor, carinho, e por entender minha ausência, especialmente neste último ano.

Ao meu querido Nazareno, por me lembrar que é necessário parar para respirar depois de dias inteiros no laboratório e/ou no computador, obrigada pelo carinho e pelo suporte em casa.

Por fim, agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, e a Deus pela curiosidade, persistência, comprometimento recebidos, e por me fazer acreditar que seria possível.

Nada é suficientemente bom. Então vamos fazer o que é certo, dedicar o melhor de nossos esforços para atingir o inatingível, desenvolver ao máximo os dons que Deus nos concedeu, e nunca parar de aprender.

Ludwig van Beethoven

RESUMO

Os índices insatisfatórios de sucesso no tratamento e demora no diagnóstico têm suportado as altas taxas de incidência de TB na região da grande Florianópolis. O objetivo do presente estudo foi entender a influência de fatores de risco do paciente e de características do microrganismo no sucesso do tratamento de casos novos da doença por meio de uma coorte prospectiva de dois anos. O estudo, que acompanhou 223 casos novos de TB pulmonar tratados com esquema básico na região da grande Florianópolis, utilizou dados clínico-epidemiológicos, além de genotipagem por *spoligotyping*, pesquisa da deleção RD^{Rio} por PCR e teste de sensibilidade à rifampicina e isoniazida por microdiluição em caldo. Os dados possibilitaram o mapeamento da doença na região, verificando uma distribuição geográfica heterogênea dos casos e uma sobreposição com áreas de alta densidade populacional, baixa renda e condições precárias de higiene e saneamento. Foi possível verificar demora no diagnóstico dos sintomáticos respiratórios, contribuindo para um pior prognóstico individual e aumento na transmissão da doença na comunidade. Todas as manifestações clínicas clássicas da doença estiveram presentes em mais de 80% dos casos, que acometeram predominantemente indivíduos do sexo masculino, a faixa etária economicamente ativa e foram associados a alto nível de desemprego. A coinfeção TB/HIV representou 1/5 dos casos novos de TB, que juntamente com a baixa escolaridade e o uso de drogas ilícitas, representaram fatores preditivos independentes associados a desfechos desfavoráveis. O mapeamento das sublinhagens de *M. tuberculosis* possibilitou a visualização da disseminação de pequenos *clusters* nos bairros de maior concentração da doença, destacando o SIT216/LAM5 que emergiu nos últimos cinco anos na região, tornando-se o mais frequente entre os isolados, indicando transmissão recente do bacilo. Os SITs 20/LAM1 e 3099/LAM9 mostraram associação com maior transmissibilidade e doença mais severa, ambos apresentaram a deleção RD^{Rio} em todos os isolados. No entanto, a deleção, presente em 1/3 dos casos novos estudados, não foi associada a alta transmissibilidade, mas foi predominante na faixa etária mais elevada e em microrganismos com CIM mais baixas para rifampicina e isoniazida. Além disso, apresentou ampla variedade genética e formação de pequenos *clusters*, possibilitando inferir a associação da deleção RD^{Rio} com reativação de TB latente. Os SITs 3099/LAM9, 42/LAM9 e 73/T associados a desfechos desfavoráveis, principalmente ao abandono, estiveram presentes em maior proporção entre usuários de drogas ilícitas. O SIT50/H3 apresentou

microrganismos com CIM mais elevadas para rifampicina, incluindo um isolado monorresistente, e associação com desfechos desfavoráveis, corroborando a importância do antimicrobiano na terapia anti-TB. Em conjunto com o ST137/X2, que também apresentou CIMs elevadas para rifampicina, o SIT50/H3 foi associado a indivíduos vivendo em situação de rua. CIM para rifampicina $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$ foram observadas principalmente entre indivíduos que viviam em situação de rua, abusavam de álcool. Na família LAM o SIT216, associado a alta transmissibilidade, apresentou CIM mais altas para isoniazida e rifampicina. Os dados sugerem que, se mantido o ritmo de transmissão e abandono de tratamento atuais, envolvendo especialmente as sublinhagens H3, T1, LAM5, e X2, a grande Florianópolis enfrentará sérios problemas com TB-MDR em um futuro próximo. O estudo colaborou com a compreensão da dinâmica da TB e demonstrou a influência direta de fatores de risco, da coinfeção com HIV e da diminuição da sensibilidade à rifampicina nos desfechos desfavoráveis na região, podendo auxiliar de maneira efetiva no planejamento de estratégias para diminuição da incidência da doença.

Palavras-chave: Tuberculose, Epidemiologia, Spoligotyping, Concentração Inibitória Mínima, Rifampicina.

ABSTRACT

Unsatisfactory success rates in TB treatment corroborate the high TB incidence rate observed in the Greater Florianópolis region. The objective of this study was to understand the influence of patient risk factors and *M. tuberculosis* characteristics in the outcome of new cases through a two-year cohort study. Clinical-epidemiological data, spoligotyping genotyping, RD^{Rio} deletion search by PCR and rifampicin/isoniazid sensitivity test by broth microdilution were employed to evaluate 223 new pulmonary TB cases treated with the basic regimen in Greater Florianópolis. Data allowed for disease mapping, showing a heterogeneous case distribution and the relation with high population density, low income, and precarious hygiene and sanitary condition areas. Results showed a high diagnosis lag time for symptomatic respiratory patients, leading to worsened individual prognoses and increased transmission rates in the community. All the characteristic clinical manifestations of TB were present in more than 80% of the cases, affecting predominately male individuals, the economically active age group and showing an association with unemployment. TB/HIV coinfection was responsible for 1/5 of new TB cases and, as well as low level of schooling and use of illicit drugs, represented an independent predictive factor associated with unfavorable disease outcomes. Mapping of *M. tuberculosis* sublineages showed the spreading of small clusters, mainly in neighborhoods with a higher concentration of the disease, with emphasis to SIT216/LAM5, which emerged in the region in the last five years, having become the most frequently detected sublineage and highly associated with recent transmission. SIT20/LAM1 and SIT3099/LAM9 showed an association with higher transmissibility and more severe forms of the disease, both displaying the RD^{Rio} deletion in all analyzed isolates. This deletion, which alone was not associated with high transmissibility, occurred mostly in the higher age group and in microorganisms with lower MICs for rifampicin and isoniazid. Data suggest that the presence of the RD^{Rio} deletion in one-third of new cases, in small clusters and with a wide genetic variability, can be associated with latent-TB reactivation. SITs associated with unfavorable outcomes (SITs 3099/LAM9, 42/LAM9, and 73/T), especially default, were present in higher proportions among illicit drug users. SIT50/H3 had microorganisms with higher MICs for rifampicin, including a mono-resistant isolate, and was associated with unfavorable outcomes, corroborating the importance of this antimicrobial drug in anti-TB therapy. SIT50/H3 was associated with individuals experiencing homelessness, along with ST137/X2, which also

had a higher MIC for rifampicin. A MIC ≥ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ for rifampicin was related mainly to alcohol abuse and homelessness. In the LAM family, SIT216, associated with high transmissibility, showed higher MICs for isoniazid and rifampicin. These data suggest that, with the current rates of TB transmission and default, especially involving sublineages H3, T1, LAM5, and X2, the Great Florianópolis region may face serious problems with MDR-TB in the near future. This study expanded the comprehension of TB dynamics and demonstrated the direct influence of risk factors, HIV coinfection, and reduction in rifampicin sensitivity on the unfavorable outcome rates of the region and can effectively aid in the strategic planning for TB incidence reduction.

Keywords: Tuberculosis, Epidemiology, Spoligotyping, Minimal Inhibitory Concentration, Rifampicin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Classificação das linhagens filogenéticas baseadas na presença ou ausência de regiões de diferença (RD) e pequenas deleções.....	43
Figura 2-	Gel de eletroforese da PCR para caracterização da presença da deleção RD ^{Rio} entre os isolados de <i>M. tuberculosis</i> estudados.....	58
Figura 3-	Perfis de diferentes isolados de <i>M. tuberculosis</i> visualizados em foto de filme de RX revelado a partir de membrana de <i>Spoligotyping</i> dos pacientes incluídos no estudo na grande Florianópolis (2014-2016).....	60
Figura 4-	Representação esquemática de placa de 96 poços para realização de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (rifampicina ou isoniazida) por microdiluição.....	63
Figura 5-	Placa de microdiluição em caldo para isoniazida, revelada por oxirredução com resazurina para visualização de concentração inibitória mínima.....	65
Figura 6-	Visualização em microscópio de luz invertida, objetiva de 10 X, do crescimento em corda ou emaranhado das colônias de <i>M. tuberculosis</i> em poço contendo caldo 7H9.....	66
Figura 7-	Visualização, em microscópio de luz invertida com objetiva de 10 X, do crescimento de <i>M. tuberculosis</i> após 10 dias de incubação em caldo 7H9 e concentrações crescentes de isoniazida, para determinação da concentração inibitória mínima.....	66
Figura 8-	Distribuição geográfica dos casos novos de TB incluídos no estudo, segundo bairro de residência, nos municípios de Florianópolis e São José (2014-2016).....	70

Figura 9-	Distribuição dos casos novos de tuberculose pulmonar incluídos no estudo, segundo gênero e faixa etária.....	71
Figura 10-	Distribuição dos casos novos de tuberculose pulmonar incluídos no estudo segundo gênero e anos de escolaridade.....	72
Figura 11-	Distribuição segundo proporção do gênero, do tempo decorrido entre o início dos sintomas (tosse) e o diagnóstico de TB em semanas, para os indivíduos do estudo.....	73
Figura 12-	Distribuição em proporção de tempo decorrido entre o início dos sintomas (tosse) e o diagnóstico de TB em semanas, segundo o tempo de escolaridade dos indivíduos do estudo.....	74
Figura 13-	Proporção de coinfeção TB/HIV e de indivíduos não testados para presença do vírus, segundo a faixa etária, no estudo.....	75
Figura 14-	Distribuição dos resultados das baciloscopias de diagnóstico segundo <i>status</i> HIV dos indivíduos do estudo.....	78
Figura 15-	Distribuição da carga bacilar na bacterioscopia de diagnóstico segundo a presença ou não de cavitação no exame radiológico nos pacientes do estudo.....	79
Figura 16-	Distribuição dos resultados das baciloscopias de diagnóstico e controles do segundo e quarto meses de tratamento, incluindo baciloscopias não realizadas...	80
Figura 17-	Seguimento dos casos com alta carga bacilar no diagnóstico (BAAR +++ e BAAR ++), nos controles de 2° e 4° meses de tratamento dos pacientes do estudo.....	81
Figura 18-	Distribuição da população estudada segundo hábitos de vida considerados fatores de risco para	

	tuberculose, segundo o gênero dos indivíduos do estudo.....	82
Figura 19-	Distribuição em porcentagem dos casos de tuberculose pulmonar confirmados por cultura, segundo o desfecho do tratamento, entre os pacientes acompanhados no estudo.....	83
Figura 20-	<i>Odds ratio</i> e intervalo de confiança de 95% para o desfecho sucesso no tratamento entre os pacientes do estudo, utilizando modelo multivariável.....	86
Figura 21-	Representação de todos os <i>spoligotypes</i> encontrados nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> incluídos no estudo, classificação segundo SITVIT-WEB.....	87
Figura 22-	Distribuição das famílias e subfamílias segundo genotipagem por metodologia de <i>Spoligotyping</i> de isolados de <i>M. tuberculosis</i> do estudo.....	91
Figura 23-	Distribuição das principais linhagens de <i>M. tuberculosis</i> isoladas no estudo e nos bairros com mais de sete casos de TB durante o período estudado.	92
Figura 24-	Representação gráfica dos <i>clusters</i> definidos por <i>spoligotyping</i> entre <i>M. tuberculosis</i> isolados na região da grande Florianópolis no período de 2 anos..	93
Figura 25-	Distribuição da deleção RD ^{Rio} entre os isolados da linhagem LAM, segundo as subfamílias.....	93
Figura 26-	Distribuição das subfamílias mais frequentes segundo o gênero dos indivíduos do estudo	95
Figura 27-	Proporção dentro das principais sublinhagens dos indivíduos segundo hábito de utilização de drogas ilícitas e uso abusivo de álcool.....	95
Figura 28-	Proporção dentro dos principais SITs dos indivíduos segundo hábito de utilização de drogas ilícitas e uso abusivo de álcool.	96

Figura 29-	Proporção dentro das principais sublinhagens dos indivíduos segundo tabagismo e soropositividade para HIV.....	96
Figura 30-	Proporção dentro dos principais SITs dos indivíduos segundo tabagismo e soropositividade para HIV.....	97
Figura 31-	Proporção dentro dos principais SITs dos indivíduos segundo alta carga bacilar, presença de hemoptise, perda ponderal superior a 10% do seu peso, presença de cavitação e soropositividade para HIV.....	98
Figura 32-	Proporção dentro dos principais SITs dos indivíduos segundo alta carga bacilar no diagnóstico e permanência de baciloscopias positivas no segundo e quarto meses de tratamento, com as respectivas porcentagens de indivíduos que realizaram os controles.....	99
Figura 33-	Proporção do desfecho sucesso no tratamento associado às principais subfamílias encontradas entre os microrganismos isolados no estudo.....	102
Figura 34-	Proporção do desfecho sucesso no tratamento associado aos principais SITs encontrados entre os microrganismos isolados no estudo.....	102
Figura 35-	Distribuição dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> do estudo segundo a CIM para Isoniazida, determinada por oxirredução da resazurina.....	106
Figura 36-	Distribuição dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> do estudo segundo a CIM para Isoniazida, determinada por microscopia.....	107
Figura 37-	Distribuição dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> do estudo segundo a CIM para Rifampicina, determinada por oxirredução da resazurina.....	108
Figura 38-	Distribuição dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> do estudo segundo a CIM para Rifampicina,	

	determinada por microscopia com leituras em 10 e 14 dias de incubação.....	108
Figura 39-	Distribuição das CIMs para Isoniazida, segundo o método e tempo de leitura, considerando a concentração crítica > 0,25 µg/mL.....	110
Figura 40-	Distribuição das CIMs para Rifampicina, segundo o método e tempo de leitura, considerando a concentração crítica > 1 µg/mL.....	110
Figura 41-	Proporção de distribuição das CIMs para Rifampicina entre as seis sublinhagens mais frequentes no estudo.....	113
Figura 42-	Proporção de distribuição das CIMs para Rifampicina entre os SITs que apresentaram maior associação com CIMs mais elevadas.....	114
Figura 43-	Proporção de distribuição das CIMs para Isoniazida entre as seis sublinhagens mais frequentes no estudo..	115
Figura 44-	Mapa com distribuição dos casos de tuberculose do estudo, com fotografias registrando a associação das áreas com maior número de casos da doença e baixas condições de higiene e saneamento e aglomerados populacionais.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição dos sintomas clássicos de TB segundo o <i>status</i> HIV nos pacientes do estudo.....	76
Tabela 2-	Distribuição dos perfis de imagens observadas em radiografias ou tomografias realizadas no início do tratamento e associação com <i>status</i> HIV e quantificação de CD4 nos indivíduos do estudo.....	77
Tabela 3-	Distribuição de variáveis associadas a gravidade e transmissibilidade da tuberculose segundo o tempo decorrido entre o início dos sintomas (tosse) e o diagnóstico da doença.	79
Tabela 4-	Análise univariada, com risco relativo e intervalo de confiança de 95%, para os casos de sucesso no desfecho tratamento entre os pacientes estudados....	85
Tabela 5-	Regressão logística, com <i>odds ratio</i> e intervalo de confiança de 95% para desfecho sucesso no tratamento nos pacientes do estudo.....	86
Tabela 6-	Classificação por similaridade, utilizando a plataforma <i>Spotclust</i> , das prováveis famílias dos <i>Spoligotypes</i> não classificados ou desconhecidos segundo o SITVIT-WEB.....	89
Tabela 7-	Distribuição da sublinhagem RD ^{Rio} de segundo o perfil dos indivíduos epidemiológicos do indivíduos do estudo.....	100
Tabela 8-	Distribuição da sublinhagem RD ^{Rio} de acordo com variáveis associadas a maior transmissibilidade e/ou gravidade da TB na grande Florianópolis (2014-2016).....	101
Tabela 9-	Desfecho do tratamento para TB de acordo com a presença da deleção RD ^{Rio} entre os pacientes acompanhados na grande Florianópolis (2014 – 2016).....	103
Tabela 10-	Distribuição dos indivíduos que alcançaram sucesso no tratamento segundo variáveis de interesse e a presença ou ausência da deleção RD ^{Rio} no estudo.....	104

Tabela 11-	Diferenças de leitura da CIM para os microrganismos do estudo, segundo método utilizado e o tempo de incubação, para Rifampicina.	109
Tabela 12-	Comparação entre os resultados de suscetibilidade para isoniazida por metodologia MGIT 960 (LACEN/SC) e por microdiluição em caldo com leitura por oxirredução (resazurina) e microscopia...	111
Tabela 13-	Comparação entre os resultados de suscetibilidade para rifampicina por metodologia MGIT 960 (LACEN/SC) e por microdiluição em caldo com leitura por oxirredução (resazurina) e microscopia...	112
Tabela 14-	Sensibilidade e especificidade para o teste de sensibilidade por microdiluição em caldo, utilizando como referência a metodologia MGIT960 recomendada pela OMS.....	112
Tabela 15-	Associação entre a CIM categorizada e a presença da deleção RD ^{Rio} nos isolados de <i>M. tuberculosis</i> do estudo.....	116
Tabela 16-	Associação entre a CIM categorizada e os resultados das baciloscopias de controle do segundo e quarto meses de tratamento para os pacientes do estudo.....	117
Tabela 17-	Associação entre a CIM categorizada e o desfecho do tratamento dos pacientes do estudo.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacilo de <i>Calmette-Guerin</i>
CAS	<i>Central Asian</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation</i> ⁴
CTA	Centro de Triagem e Aconselhamento
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium Bromide</i> (brometo de cetil trimetilamônio)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Clp _R	<i>Clp protease gene Regulator</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CRISP	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas)
DIVE	Diretoria de Vigilância Epidemiológica
DM	Diabetes Mellitus
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DosR	<i>Dormancy Survival Regulon</i>
DOTS	<i>Directly Observed Treatment Short-Course</i> (Tratamento Diretamente Observado de curta duração)
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DR	<i>Direct Repeats</i> (Repetição Direta)
ECOFF	<i>Cut-off</i> epidemiológico (ponto de corte epidemiológico)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetra-acético)
EIA	<i>East African Indian</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IDHM	Índice de Desenvolvimento Humano Municipal
IL	Interleucina
INF	Interferon
InhA	Proteína carreadora enoil-acil redutase
IS	<i>Insertion Sequence</i> (Sequência de inserção)
ITR	Índice de Transmissão Recente
IUATLD	<i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i>
H	<i>Haarlem</i>

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
KasA	Beta-cetoacil enoil-sintetase
KatG	Catalase-peroxidase
LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina
LAM	<i>Latin American and Mediterranean</i>
MDR	Multidroga resistente
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MNT	Micobactéria Não-Tuberculosa
NF-κB	<i>Factor Nuclear kappa B</i>
NAT	<i>Arylamine N-acetyltransferase</i> (arilamina N-acetiltransferase)
OADC	<i>Oleic acid, Albumin, Dextrose, Catalase</i> (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	<i>Para-Aminosalicylic Acid</i> (ácido paraminossalicílico)
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
Phe	Fenilalanina
PIB	Produto Interno Bruto
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
Pro	Prolina
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores de reconhecimento Padrão)
RD	<i>Region-of-difference</i> (Região de Diferença)
RH	Rifampicina e Isoniazida
RNA	<i>Acid Ribonucleic</i>
RNA _m	<i>messenger Acid Ribonucleic</i>
RPF	Fator Promotor de Ressuscitação - <i>resuscitation-promoting factor</i>
RR	Risco Relativo
RZHE	Rifampicina, Pirazinamida, Isoniazida e Etambutol
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SI	Sequência de Inserção
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SIT	<i>Spoligotyping International Type</i>
SSPE	<i>Sodium Chloride-Sodium Phosphate-EDTA</i>

TB	Tuberculose
TbD1	<i>Mycobacterium tuberculosis specific deletion region1</i>
TB-MDR	Tuberculose Multidroga Resistente
TB-XDR	Tuberculose Extensivamente Droga Resistente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDO	Tratamento Diretamente Observado
TE	Tampão Tris EDTA
Th	<i>T helper cells</i>
THP-1	<i>Human Leukemic Monocytic Cells</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
Tyr	Tirosina
UBS	Unidade Básica de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPA	Unidade de Pronto Atendimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DA LITERATURA	33
2.1	Tuberculose	33
2.1.1	Transmissão e Patogênese	33
2.1.2	Classificação, Manifestações Clínicas e Radiográficas da Tuberculose Pulmonar	37
2.2	Epidemiologia	38
2.3	Controle da Tuberculose	40
2.4	Agente etiológico	44
2.4.1	Epidemiologia Molecular	46
2.5	Tratamento	49
2.5.1	Resistência aos Antimicrobianos	50
2.5.2	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos	52
3	OBJETIVOS	55
3.1	Objetivo Geral.....	55
3.2	Objetivos Específicos.....	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1	Tipo e local do estudo	56
4.2	Critérios de Inclusão	57
4.3	Critérios de Exclusão	57
4.4	Fluxo de Coleta de Casos/Isolados Bacterianos.....	58
4.5	Dados Demográficos e Clínicos.....	58
4.6	Dados Laboratoriais	59
4.7	Dados Radiográficos	60
4.8	Isolados Bacterianos.....	60
4.9	Extração de DNA	60

4.10	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção da deleção RD ^{Rio}	61
4.11	Detecção dos Fragmentos Amplificados pela PCR	62
4.12	Spoligotyping	63
4.12.1	Reação de amplificação	63
4.12.2	Hibridização e detecção dos produtos amplificados	63
4.12.3	Análise dos <i>spoligotypes</i>	65
4.13	Determinação da Concentração Inibitória Mínima	65
4.13.1	Solução estoque dos fármacos	65
4.13.2	Meio de cultura e solução de resazurina	66
4.13.3	Preparo das placas de microdiluição	66
4.13.4	Preparo do inóculo bacteriano	67
4.13.5	Controles	68
4.13.6	Leitura e interpretação	68
4.14	Cálculo Amostral	71
4.15	Análise Estatística	72
4.16	Considerações Éticas	72
5	RESULTADOS	73
5.1	Perfil Epidemiológico da População Estudada	73
5.2	Perfil Clínico da População Estudada	78
5.3	Perfil Comportamental da População Estudada	85
5.4	Desfecho dos Casos de Tuberculose do Estudo	86
5.5	Associação entre Desfecho e Variáveis Epidemiológicas	88
5.6	Genotipagem dos Isolados do Estudo	91
5.7	Associação entre Genotipagem, Deleção RD ^{Rio} , População Estudada e Desfecho	98
5.8	Concentração Inibitória Mínima	107

5.9	Associação entre a Concentração inibitória mínima, as Características Genéticas dos Isolados e o Desfecho dos Casos	117
6	DISCUSSÃO	123
6.1	Perfil Epidemiológico da Tuberculose na Região Estudada.....	123
6.2	Perfil Clínico da Tuberculose na População Estudada	131
6.3	Perfil Comportamental da População Estudada	139
6.4	Desfecho dos Casos e Associação com Variáveis Epidemiológicas	142
6.5	Caracterização Genética	145
6.6	Associação entre Características Genéticas dos Isolados, População Estudada e Desfecho.....	149
6.7	Concentração Inibitória Mínima.....	154
6.8	Associação entre a Concentração Inibitória Mínima, as Características Genéticas dos Isolados e o Desfecho dos Casos.	160
7	SUMÁRIO DE RESULTADOS POR OBJETIVO	
	ESPECÍFICO	165
8	CONCLUSÕES.....	171
9	PERSPECTIVAS.....	173
	REFERÊNCIAS	175
	APÊNDICE A	205
	APÊNDICE B	209

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), uma das mais antigas doenças infecciosas conhecidas, permanece como um dos maiores problemas de saúde pública e uma importante causa de mortalidade no mundo, apesar da disponibilidade de tratamento eficaz e barato. O problema afeta também a economia, devido a incapacidade laborativa temporária ou permanente do doente, que na maioria dos casos, se encontra em idade produtiva.

A integração de ferramentas de genotipagem com investigação epidemiológica clássica promove uma abordagem diferenciada, possibilitando o entendimento da distribuição da TB e o modo de transmissão do bacilo na população. Atualmente, a determinação do genótipo de *M. tuberculosis* representa uma importante colaboração na projeção de esforços para controlar a TB, especialmente em razão do conhecido impacto de variações genóticas sobre o desfecho da doença e resistência aos fármacos. A genotipagem sugere que os casos de recorrência são devidos a reativação ou reinfeção exógena, até o entendimento da distribuição global de linhagens de *M. tuberculosis*, com monitoramento da disseminação de isolados de alto-risco, bem como exploração de características evolucionárias da espécie.

No Brasil, o monitoramento genético ainda é restrito a informações isoladas de grupos de pesquisa. Embora insuficiente, este monitoramento em pequenos blocos, permitiu caracterizar as principais linhagens circulantes em algumas regiões do país que, até o momento, não detectou a circulação do principal genótipo mundial associado com resistência aos antimicrobianos, a linhagem *Beijing*. Possibilitou também a caracterização de uma variante genética RD^{Rio}, em 2007 no Rio de Janeiro, que foi inicialmente associada à doença cavitária na população brasileira, ao aumento na eficiência da transmissibilidade e à resistência aos fármacos.

O crescente número de casos de TB causados por isolados resistentes aos principais antimicrobianos, tem representado um obstáculo ao tratamento, aumentando a mortalidade e a dificuldade de conter a disseminação da infecção. A realização de testes de sensibilidade para *M. tuberculosis* além de guiar o manejo dos casos individualmente, tem papel fundamental na vigilância epidemiológica e influencia o desenvolvimento de novos guidelines para tratamento da TB. A utilização de testes quantitativos com determinação de concentração inibitória mínima (CIM) para os principais antimicrobianos, pode ser uma importante ferramenta na batalha contra o aumento da resistência,

especialmente pela otimização da utilização dos fármacos de primeira linha.

A região da grande Florianópolis apresenta a segunda maior incidência de TB do Estado de Santa Catarina. Dados divulgados pelo município de Florianópolis, mostram uma incidência crescente, que alcançou 53,3 casos/100.000 habitantes em 2015, associada a baixas taxas de sucesso no tratamento, próximas a 60%.

Neste contexto, o objetivo do estudo foi analisar influência de fatores de risco associados ao paciente, de características genéticas de *M. tuberculosis* e da concentração inibitória mínima à Rifampicina e à Isoniazida, no desfecho dos casos novos de tuberculose pulmonar que iniciaram tratamento com esquema básico na grande Florianópolis/SC. Foi realizada uma coorte prospectiva por um período de 2 anos, na qual foram incluídos casos de tuberculose pulmonar ativa, com cultura positiva, diagnosticados entre maio de 2014 e maio de 2016, que foram acompanhados até o desfecho. Os desfechos dos casos incluíram sucesso no tratamento, abandono, falência ao tratamento ou morte. A caracterização molecular das linhagens de *M. tuberculosis* foi realizada por *spoligotyping*; a pesquisa da deleção RD^{Rio} por reação em cadeia da polimerase; e a determinação da CIM por microdiluição em caldo. Os resultados laboratoriais foram relacionados com dados clínico-epidemiológicos e desfecho, coletados por entrevista e acompanhamento em prontuário.

Com o monitoramento genético pretende-se contribuir para o entendimento do curso da tuberculose na região, auxiliando no planejamento e racionalização dos recursos dos programas de controle da infecção. Com a determinação das CIMs, pretende-se relacionar níveis de resistência com o desfecho clínico, provendo informações importantes para o tratamento da TB resistente, especialmente em relação à real necessidade de utilização de fármacos de segunda linha e tempo de tratamento. Além de otimizar a utilização dos fármacos disponíveis, estas informações têm importância econômica, visto que o tratamento com fármacos de segunda linha é substancialmente mais oneroso ao sistema de saúde, além de causar mais efeitos adversos nos pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tuberculose

Mycobacterium tuberculosis, é um patógeno humano extraordinário que infecta cerca de um terço da população mundial (WHO 2015a), e causa umas das mais recalcitrantes infecções bacterianas da era moderna, a tuberculose (TB) (KIESER; RUBIN, 2015). Através de milhares de anos de coevolução, *M. tuberculosis* tornou-se um dos patógenos humanos de maior sucesso, adquirindo a habilidade de estabelecer infecção progressiva ou latente e persistir mesmo na presença de um sistema imune completamente funcionante (GOLDBERG et al., 2014). As primeiras evidências da doença, que afeta principalmente o pulmão (TB pulmonar) podendo ocorrer em outros sítios corpóreos (TB extrapulmonar) ou se disseminar (TB miliar), datam de pelo menos 4.000 anos (ZINK et al., 2007). O grupo do paleontologista britânico Don Brothwell revelou uma frequência de TB entre 28% e 22% em múmias egípcias de diferentes períodos, sugerindo taxas de infecções comparáveis durante aproximadamente 2.500 anos (ZINK et al., 2007). Segundo Roberts (2015), evidências de estudos de paleopatologia sugerem que o advento da agricultura levou a um aumento nos casos de TB, com novo aumento no ambiente urbano na era medieval tardia, afetada principalmente pela pobreza da população. Em 1865, Jean Antonie Villemin comprovou que a TB era uma doença contagiosa e não hereditária como se acreditava, e em 1882 Robert Koch descobriu o agente causal, esclarecendo assim a patogenia da TB na segunda metade do século XIX. Inicialmente, o agente foi denominado *Bacterium tuberculosis*, e em 1886, Lehmann e Neumann alteraram o nome para *Mycobacterium tuberculosis*, presume-se que foi devido à sua semelhança com um fungo, considerando a aparência e o crescimento lento em cultura (GOODFELLOW; MAGEE, 1998).

2.1.1 Transmissão e Patogênese

Indivíduos com TB pulmonar aerolizam *M. tuberculosis*, transmitindo o bacilo (YATES et al., 2016). Esta aerolização acontece de maneira mais rápida durante a tosse, que pode produzir gotículas suficientemente pequenas, que permanecem suspensas no ar (TURNER; BOTHAMLEY, 2015). No entanto, gotículas respiratórias maiores podem cair no chão, ressecar e evaporar, a evaporação rápida permite que muitas gotículas com massa suficientemente baixa permaneçam

suspensas em correntes de ar até que sejam inaladas ou ventiladas para fora do ambiente (ZAYAS et al., 2005). A infecção é causada pela inalação dessas partículas aerolizadas contendo *M. tuberculosis*. Vários fatores como o status do sistema imune do hospedeiro, a carga bacilar inalada, a proximidade dos contatos e a infecciosidade do caso fonte, desempenham um papel fundamental na transmissão da TB. No início da infecção, as gotículas inaladas contendo a bactéria, são depositadas nos alvéolos pulmonares. *M. tuberculosis* nos alvéolos é fagocitado por macrófagos (ERNST, 2012, NUNES-ALVES et al., 2014), no entanto, estudos em pulmões de camundongos infectados por aerossóis, proporcionaram evidências de extensiva replicação bacteriana nas primeiras semanas após a infecção em um compartimento “não migratório” (WOLF et al., 2008). Evidências indicam que o microrganismo provavelmente invade e se replica em células epiteliais alveolares, que estão em número muito superior aos macrófagos, um ambiente permissivo para rápida replicação, protegido de células fagocíticas. Além disso, esta replicação em células epiteliais alveolares possibilita a aquisição de um fenótipo invasivo, que facilita a disseminação bacteriana, antes de desencadear a resposta imune adaptativa (RYNDAK et al., 2015).

Os estágios iniciais da infecção são caracterizados por resposta imune inata, resultando no recrutamento de monócitos e linfócitos. A resposta imune adaptativa ocorre mais tarde, após a disseminação do microrganismo pelos linfonodos (NUNES-ALVES et al., 2014). Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), como receptores *Toll Like*, *Nod Like* e *C-type Lecitin*, desempenham um papel central no reconhecimento de *M. tuberculosis*, resultando na ativação da resposta imune inata e adaptativa (MISHRA et al., 2017). PRRs estão envolvidos na ativação do inflamossoma, biogênese do fagossoma, tráfego endossomal, e padrões de processamento de antígenos, críticos para uma resposta imune efetiva. O polimorfismo nesses receptores tem sido associado com aumento na suscetibilidade à TB em humanos (LIU et al., 2014; DITTRICH et al., 2015; GUO, XIA, 2015). Evidências mostram ainda, que para aumentar sua sobrevivência intracelular, *M. tuberculosis* evoluiu com múltiplas estratégias para subverter e reprogramar a resposta imune mediada por PRRs (KHAN et al., 2016; PEDDIREDDY et al., 2017).

M. Tuberculosis é uma bactéria intracelular, e embora possa ser fagocitada por diferentes tipos de células, encontra o seu nicho preferencial nos macrófagos alveolares (ERNST et al., 2012; NUNES-ALVES et al., 2014). A função do macrófago é de restringir o crescimento

micobacteriano através de mecanismos bactericidas como autofagia, apoptose, liberação de óxido nítrico, formação do inflamossoma, liberação de espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos induzidos por vitamina D (GUTIERREZ et al., 2004; LIU et al., 2006; BEHAR et al., 2011). No entanto, uma diversidade de bactérias intracelulares, incluindo *M. tuberculosis*, podem causar desregulação epigenética nas células do hospedeiro, contribuindo para o início e progressão da doença (NILLER et al., 2017). Estudos recentes demonstraram, que diferentes efetores liberados por *M. tuberculosis*, conhecidos como nucleomodulinas, podem alterar o padrão de expressão de genes do hospedeiro, por indução de metilação do DNA, estabelecendo um ambiente favorável para persistência da bactéria intracelular. Isto ocorre via alterações na liberação de citocinas, com inibição da fusão do fago-lisossomo, permitindo a persistência e replicação de *M. tuberculosis* fagocitado (YASSEN et al., 2015; SHARMA et al., 2016; JOSE et al., 2016; ZHENG et al., 2017). A indução da apoptose no hospedeiro durante a infecção do macrófago pelo *M. tuberculosis* é outro exemplo clássico de como este microrganismo causa imunossupressão no indivíduo infectado ganhando vantagens de sobrevivência (SHARMA et al., 2009).

A expansão da resposta imune leva à migração de células T efectoras (Th1) para o pulmão infectado, que secretam fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon (IFN- γ), recrutando outras células como neutrófilos, células dendríticas e células B, que podem eliminar a infecção, ou o bacilo pode multiplicar-se levando à infecção primária (PEDDIREDDY et al., 2017). Entretanto, alguns bacilos podem ainda escapar da resposta imune, manipular a resposta do hospedeiro e entrar em dormência, com formação do granuloma, que vai restringir a replicação e dispersão de *M. tuberculosis* (ERNST et al., 2012; PHILIPS et al., 2012; NUNES-ALVES et al., 2014; KHAN et al., 2015; PEDDIREDDY et al., 2017). Granulomas são agregados compactos de células imunes, principalmente macrófagos maduros, formados em resposta a estímulos persistentes, infecciosos ou não, e são associados a várias doenças (RAMAKRISHNAN, 2012). Na TB ativa e latente, o granuloma caseoso clássico, apresenta baixa disponibilidade de oxigênio, é circundado por fibroblastos, com macrófagos e neutrófilos na periferia, apresentando macrófagos mortos na parte central (BARRY et al., 2009).

Desta forma, o sistema imune consegue controlar a infecção, mas em geral, não consegue levar à esterilização, assim a maioria das pessoas infectadas pelo microrganismo se torna assintomática, permanecendo em um estado conhecido como TB latente, e representando um enorme reservatório potencial da doença (KONDRATIEVA et al., 2014). Embora

a formação do granuloma seja uma resposta imune básica produzida contra um agente infeccioso, ela também é promovida pelo microrganismo como parte de sua virulência. O estado de dormência é definido como uma incapacidade de replicação em cultura, combinada com atividade metabólica extremamente baixa (GANGADHARAM, 1995). Para *M. tuberculosis* é atribuída sofisticada capacidade de evadir do sistema imune, permitindo sua persistência indefinidamente. Estratégias adotadas para manutenção desta fase de dormência incluem mecanismos imunes (manipulação de receptor *Toll-Like*, de citocinas e de função celular), bioquímicos (desenvolvimento de resistência a intermediários reativos e a antimicrobianos), e genéticos (ativação de genes associados com dormência) (PEDDIREDDY et al., 2017). A habilidade de permanecer no estado de dormência ou reativar, depende de fatores genéticos do microrganismo e do hospedeiro (KONDRATIEVA et al., 2014). Em *M. tuberculosis* essa habilidade é regulada por aproximadamente 50 genes, destacando as proteínas reguladoras DosR, que auxiliam o microrganismo a adaptar-se ao ambiente anaeróbico, induzindo a expressão de 48 genes e garantindo a sobrevivência no granuloma (SELVARAJ et al., 2012). A expressão dos genes é induzida na hipóxia e parece ter papel na manutenção do baixo crescimento bacteriano em condições desfavoráveis.

A reativação de *M. tuberculosis* dormente ocorre quando prevalecem condições favoráveis como disponibilidade de nutrientes, re-aeração e comprometimento imune do hospedeiro, que levam a ativação de diferentes genes, necessários para o crescimento do bacilo. É gerenciada por proteínas pertencentes à família de fator promotor de ressuscitação (RPF – *resuscitation-promoting factor*), essenciais à lise da parede celular granulomatosa (KONDRATIEVA et al., 2014). E também, por reguladores de proteases (ClpG – *Clp protease gene Regulator*) que desempenham um papel vital na manutenção do *turnover* de proteínas e na degradação de proteínas acumuladas, auxiliando a bactéria a entrar novamente na fase metabólica (MCGILLIVRAY et al., 2015). Esses genes encontram-se superexpressos quando o estresse é removido (PEDDIREDDY, 2017).

Assim, múltiplas possibilidades são decorrentes da inalação de *M. tuberculosis*: a depuração bacteriana pela ativação imune do hospedeiro; a multiplicação de bactérias levando à infecção primária; a sobrevivência adormecida de bactérias no granuloma, tornando o hospedeiro assintomático e não contagioso; e a reativação de bactérias por violação do estado de dormência causando o ressurgimento da infecção. No entanto, uma proporção relativamente pequena (5-15 %) dos 2 a 3 bilhões

de pessoas infectadas com *M. tuberculosis* desenvolverão a doença durante suas vidas, probabilidade aumentada entre pessoas infectadas com HIV (WHO 2015a).

2.1.2 Classificação, Manifestações Clínicas e Radiográficas da Tuberculose Pulmonar

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), TB pulmonar refere-se a casos confirmados bacteriologicamente ou diagnosticados clinicamente, que envolvam o parênquima pulmonar ou a árvore brônquica. Na TB miliar, a despeito da disseminação do bacilo via corrente sanguínea, ocorrem lesões nos pulmões, sendo classificada como TB pulmonar. O derrame pleural, sem alterações radiográficas nos pulmões, é classificado como TB extrapulmonar. Um paciente que apresente ambas as formas, pulmonar e extrapulmonar, deve ser classificado para notificação como um caso de TB pulmonar (WHO, 2013).

A tosse é o sintoma mais comum de TB pulmonar, no início pode ser não produtiva, mas subsequentemente, com a inflamação e necrose tecidual, o escarro é normalmente produzido. Hemoptise é infrequente, usualmente é resultado de doença prévia, não necessariamente associada com doença ativa, pode resultar de bronquiectasia tuberculosa residual, ruptura de vaso na parede de uma cavidade, infecção por outras bactérias e fungos em cavidade residual, ou brocolitíase em lesões calcificadas. A TB frequentemente produz sinais e sintomas de natureza sistêmica, como febre, perda de apetite, perda de peso, fraqueza, suores noturnos e mal-estar. Em muitos pacientes a doença pode estar associada a outras desordens como infecção pelo HIV, diabetes mellitus, neoplasias, insuficiência renal crônica, alcoolismo ou abuso de drogas, que podem mascarar ou modificar os sinais e sintomas clássicos da TB, levando inclusive a erro e/ou atraso no diagnóstico, especialmente em pacientes com infecção pelo HIV (ATS, CDC, 2000).

Na TB primária, a imagem radiográfica geralmente é vista como um infiltrado no lobo inferior ou médio. Se o processo persiste, com o desenvolvimento de imunidade mediada por células, pode ocorrer cavitação. Quando ocorre reativação de TB latente, é comum a presença de anormalidades no lobo superior em um ou ambos os pulmões. Cavitação é frequentemente observada nesta forma de TB. A ocorrência de erosão de um foco parenquimal de TB, dentro de um vaso sanguíneo ou linfático, pode levar a disseminação do microrganismo com o aparecimento de um padrão “miliar” na imagem radiográfica (distribuição

de pequenos nódulos). O termo miliar é derivado da semelhança visual entre as lesões disseminadas com sementes de painço tais nódulos, histologicamente, são granulomas. A ocorrência de ruptura de uma cavidade ou foco parenquimal adjacente via fístula broncopleural, leva a efusão, resultando no microrganismo derramado no espaço pleural, formando o empiema tuberculoso (ATS, CDC, 2000).

2.2 Epidemiologia

TB é considerada uma doença social com implicações médicas. Sempre ocorreu desproporcionalmente entre populações desfavorecidas, como pessoas vivendo em situação de rua, desnutridas e vivendo em áreas de grande densidade demográfica. A propagação da infecção pelo HIV e de imigração de pessoas de áreas com alta incidência de TB, colaboraram com o aumento no número de casos da doença no mundo (ATS, CDC, 2000)

Segundo o Relatório Global da OMS de 2016, o Brasil está entre os “top 20” em número absoluto estimado de casos de TB no mundo, estes países detêm 84% dos casos mundiais da doença. No relatório, a OMS apresentou os resultados em três diferentes categorias, além dos países com alta carga de TB, foram definidos aqueles com alta coinfeção TB/HIV, lista na qual o Brasil também figura entre os “top 20”, e com alta taxa de infecção multirresistente (WHO 2016). Globalmente, em 2015, a OMS estimou uma incidência de 10,4 milhões de casos de TB (variação entre 8,7 e 12,2 milhões), equivalente a 142 casos/100.000 habitantes.

A maioria dos casos estimados em 2015 ocorreu na Ásia (61 %) e na África (26 %); o continente americano apresentou uma pequena porcentagem (3%). A Índia, é o país com maior número de casos de TB, juntamente com a China e a Indonésia, contabilizaram 45% dos casos globais em 2015. Quando relacionado ao tamanho da população (taxa de incidência), alguns países incluindo África do Sul, Lesoto, Coreia do Norte e Moçambique, apresentaram taxas superiores a 500 casos/100.000 habitantes (834, 788, 561 e 551/100.000 habitantes, respectivamente) (WHO 2016).

Em 2015, foram notificados aos Programas Nacionais de Controle de TB (PNCT) 6,4 milhões de casos de TB no mundo, dos quais 57% foram confirmados bacteriologicamente. No continente Americano foram 184.081 casos, dos quais 77% confirmados bacteriologicamente (WHO, 2016).

No Brasil, a notificação de TB é compulsória e de investigação obrigatória conforme Portarias Ministeriais nº 204 e 205, de 17 de fevereiro de 2016. Em 2015, foram notificados 73.221 novos casos/recidivas no país, aproximadamente 40% das notificações do continente Americano (WHO, 2016), com 4.374 óbitos registrados em que a TB aparece como causa básica (BRASIL, 2016a), e mortalidade estimada de 7.700 casos conforme relatório da OMS (WHO, 2016). Segundo boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, o país ocupa a 18ª posição em carga de TB, representando 0,9% dos casos estimados no mundo (BRASIL, 2016a). A taxa de incidência foi de 30,9/100.000 habitantes, com uma distribuição bastante heterogênea dos casos, variando entre 10,5/100.000 habitantes no Tocantins e 70,1/100.000 habitantes no Amazonas (BRASIL, 2016a). Quatro Estados e o Distrito Federal apresentaram incidências abaixo de 20 casos/100.000 habitantes. Santa Catarina ficou em 6º lugar no ranking de menor incidência apresentando 23,1 casos/100.000 habitantes em 2015 (BRASIL, 2016a).

De acordo com o informativo da Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Estado de Santa Catarina (DIVE/SC), a taxa de incidência de TB vem se mantendo estável nos últimos 10 anos, em 2014 foi de 16,1/100.000 habitantes na forma pulmonar, e 28,3/100.000 habitantes incluindo TB extrapulmonar (DIVE, 2016). Apesar de encontrar-se entre os Estados com as mais baixas taxas de incidência de TB no país, algumas regiões de Santa Catarina apresentam taxas superiores à média nacional (30,9/100.000 habitantes), confirmando a distribuição heterogênea da doença também em nosso Estado. Considerando o ano de 2014, a região da Foz do Rio Itajaí e a Grande Florianópolis apresentaram incidências próximas a 60/100.000 habitantes e 50/100.000 habitantes, respectivamente (DIVE, 2016). Desde 2004, o PNCT elencou municípios brasileiros prioritários, com o objetivo de intensificar as estratégias de controle da TB, especialmente nos locais de maior incidência da doença. Santa Catarina possui sete municípios enquadrados nessa categoria: Balneário Camboriú, Blumenau, Camboriú, Criciúma, Florianópolis, Itajaí e São José (BRASIL, 2004).

Na região da Grande Florianópolis, o município de Florianópolis apresenta a maior incidência de TB, 53,3/100.000 habitantes. Em 2006, o município apresentava incidência de 40/100.000 habitantes, caracterizando uma tendência a elevação do número de casos nos últimos 10 anos (FLORIANÓPOLIS, 2015). O município de São José apresentou uma incidência de 26,7/100.000 habitantes em 2015, caracterizando uma queda nos casos de TB quando comparado aos 38,8/100.000 habitantes registrados em 2006 (TABNET/DIVE). Em 2015, a densidade

demográfica de Florianópolis era 623,68 habitantes/km², com IDHM (Índice de Desenvolvimento Humano Municipal) 0,847 e PIB (Produto Interno Bruto) per capita 32.385,04 reais; São José/SC apresentava uma densidade demográfica de 1.376,78 habitantes/km², IDHM 0,809, PIB per capita 34.181,78 reais. O IDH brasileiro é de 0,754 e o país situa-se em 15º lugar nas Américas. O IDH desses dois municípios é semelhante ao IDH do Chile (0,847), situado em 3º lugar nas Américas (UNDP 2016). Por outro lado, os dois municípios estão entre as maiores incidências de HIV/AIDS do Brasil (BRASIL, 2016b)

2.3 Controle da Tuberculose

Apesar da promulgação de estratégias múltiplas, pela OMS e governos dos países, para prevenir e controlar a TB, não há queda significativa no número de novos casos. A tarefa de controlar a TB parece ainda mais utópica, considerando-se o risco de recidiva da doença, a falência terapêutica, com surgimento e disseminação de isolados resistentes aos antimicrobianos, além da capacidade de latência de *M. tuberculosis* (PEDDIREDDY et al., 2017).

Atualmente, os programas de controle da TB têm por objetivo reduzir a mortalidade, prevalência e incidência da doença, com ações baseadas em encontrar e tratar os casos, especialmente aqueles bacilíferos, responsáveis pela manutenção do ciclo da transmissão de *M. tuberculosis* (WHO, 2015a). Com as estratégias “*Stop TB/2006*” e “*End TB/2016*”, a OMS busca frear a trajetória da epidemia por meio da intensificação da pesquisa e inovação, e do fortalecimento das políticas e sistemas de apoio. Busca incluir o governo, a comunidade e a iniciativa privada, promovendo prevenção, ampliação do diagnóstico e do tratamento, com foco especial na população pobre e vulnerável, coinfeção TB-HIV e TB-MDR (WHO, 2006; WHO, 2015b).

O pilar fundamental dos programas de controle continua sendo a estratégia DOTS (*Directly Observed Treatment Short-Course*), promovida pela OMS a partir de 1993. O pacote técnico e de gestão DOTS foi baseado em um modelo de sistema de controle de TB desenvolvido por Karel Styblo da União Internacional Contra Tuberculose e Doenças Pulmonares (IUATLD: *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*) em 1970, com uma abordagem gerencial para detecção e tratamento dos casos. Nesse modelo, as unidades básicas de saúde já existentes, receberiam recursos e pessoal necessários para realizar o diagnóstico, tratamento, registro e relato do

progresso dos pacientes em áreas delimitadas entre 100.000 e 150.000 habitantes (WHO, 1999).

A recomendação da estratégia DOTS foi fundamentada na constatação de que o maior problema em relação ao controle da TB não era a falta de meios para detectar e curar os pacientes, mas a falta de organização dos serviços para garantir o diagnóstico e a cura (WHO, 1999; WHO, 2001). As maiores deficiências eram a garantia do fornecimento do tratamento, as altas taxas de abandono e a ausência de sistemas adequados de vigilância e monitoramento (SBARBARO et al., 2001).

A partir da metade do século XX, com o advento da quimioterapia, o tratamento da TB passou a ser ambulatorial, os doentes poderiam conviver na sociedade ou com suas famílias, ainda que com estigmas, mas não segregados em sanatórios e hospitais destinados a tratar a doença (GONÇALVES, 2000). A medicina descobriu a cura para TB, operaram-se mudanças na forma de lidar com a doença e com o doente, o indivíduo assumiu seu grau de participação no processo (BETHLEM, 1995). No entanto, a autonomia do paciente, ainda que relativa, possibilitou o descontrole em vez do controle previsto pela política de saúde. Em decorrência, novos elementos surgiram e se tornaram agravantes: o abandono, a recidiva, a falência terapêutica e a resistência aos antimicrobianos (GONÇALVES, 2000).

Com a estratégia DOTS, o tratamento padronizado deveria ser diretamente observado pelo menos durante a fase intensiva (dois primeiros meses) e o progresso do paciente registrado e relatado até a cura por sistemas de monitoramento. Bons exemplos da eficácia do sistema chegaram a taxas de cura de 95% dos casos, com sucesso também no aumento dos casos diagnosticados (TSOGT et al., 1999).

O objetivo da OMS para os países em desenvolvimento, em 2001, era alcançar taxa de cura de 85%, por meio da adoção da estratégia DOTS, com a realização de coortes de acompanhamento do desfecho do tratamento para todos os pacientes com baciloscopia positiva, em todos os centros (WHO, 1999). Em 2016, com o “*End TB*”, a meta foi ampliada para 95% de cura (WHO, 2015b). Desde 2001, a meta foi pactuada pelo governo brasileiro, que verificou a necessidade de consolidar a atuação de Estados e Municípios, por meio da descentralização das estratégias de controle da TB nos municípios considerados prioritários. Segundo a OMS, a descentralização refere-se a uma mudança na responsabilidade das funções de planejar, administrar e executar, de níveis centrais (estaduais) para níveis mais periféricos (municipais) no sistema de saúde nacional (WHO, 2003). No processo de descentralização proposto pelo

Ministério da Saúde, a atenção aos pacientes deveria ser expandida para a rede de atenção básica que substituiria os ambulatórios municipais especializados. O tratamento supervisionado sugerido, foi a observação direta da tomada do medicamento, pelo menos uma vez por semana, durante o primeiro mês do tratamento (BRASIL, 2004). Para as recomendações vigentes, são considerados em tratamento diretamente supervisionado (TDO) os doentes com 24 doses supervisionadas na primeira fase do tratamento, e 48 doses supervisionadas na segunda fase (BRASIL, 2011).

No entanto, de 2004 a 2014, a taxa de sucesso no tratamento dos pacientes notificados no Brasil (74.117 casos em 2014), permaneceu estacionada nos 70%. O país ocupava o segundo pior desempenho entre os 20 países com alta carga de TB no mundo em 2013 (WHO, 2015), e com a nova abordagem da OMS, ocupou o sétimo pior desempenho entre os “Top 30” em 2014 (WHO, 2016a).

A baixa adesão ao tratamento para TB pode levar à morte, resistência aos fármacos, continuidade da transmissão na comunidade, e conseqüentemente, aumento nos custos para o sistema de saúde (MAARTENS, WILKINSON, 2007; FRANKE et al., 2008; TOCZEK et al., 2013; WOIMO et al., 2017). Alguns estudos sul-americanos apontaram como fatores de risco para o abandono, o uso excessivo de álcool, uso de drogas ilícitas, baixa escolaridade, tratamento para TB-MDR, histórico de encarceramento, histórico de residência em centros de reabilitação, pobreza ou pobreza extrema, sexo masculino, tabagismo, indivíduos com coinfeção TB/HIV, e dificuldades com custo do transporte à unidade de saúde (HERRERO et al., 2015; LACKEY et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2016). No continente Africano, estudos relacionam a não aderência ao tratamento à baixa escolaridade, falta de informação sobre a doença nas visitas a unidades de saúde, quantidade de comprimidos, a distância entre a unidade de saúde do DOTS e a residência do paciente superior a 10 km, efeitos colaterais, custo de medicamentos outros além dos antimicrobianos anti-TB, e falta de alimentação adequada (IBRAHIM et al., 2014; FAGUNDEZ et al., 2016; BORU et al., 2017; WOIMO et al., 2017). Além disso, revisão sistemática sobre fatores relacionados a não adesão ao tratamento entre populações de imigrantes, acrescenta à lista, fatores como status de imigração não documentado, idade avançada e fatores sociais (LIN, MELENDEZ-TORRES, 2016). O grande número de fatores associados ao abandono é um indicativo de que uma complexa combinação de causas independentes pode afetar a adesão ao tratamento (LACKEY et al., 2015).

Um dos mais preocupantes tópicos relacionados a não adesão ao tratamento é a emergência de resistência e consequentemente de TB-MDR. Em 2005, o Brasil estimava entre os casos novos 0,9% (0,5-1,4) de TB-MDR e entre os casos previamente tratados 5,4% (4,0 – 7,2); em 2015, TB-MDR foi estimada em 1,5% (1,1-1,9) entre os casos novos e 8% (5,9-10) entre os previamente tratados (WHO, 2007; WHO, 2016). Embora o país não faça parte dos “Top 30” da TB-MDR mundial, em dez anos foram observados aumentos de aproximadamente 70% dos casos de TB-MDR, entre os casos novos, e 50% entre aqueles previamente tratados. A taxa de sucesso no tratamento para os casos de TB-MDR que iniciaram tratamento em 2013 no país, foi de 52%, e de apenas 12% para os casos de TB-XDR (tuberculose extensivamente resistente) (WHO, 2016). Diante da dificuldade de tratar a TB resistente, é fundamental reunir esforços para frear sua disseminação, sendo recomendado inclusive, a necessidade de considerar a internação para garantir um tratamento efetivo e pelo tempo recomendado (ARBEX et al., 2015).

O governo brasileiro fez investimentos expressivos em melhorias no diagnóstico dos casos novos, com a implementação de metodologia molecular na rede pública, oferecendo um diagnóstico rápido, mais sensível, e com a possibilidade de detectar e iniciar imediatamente o tratamento dos casos de TB-MDR. O objetivo da implementação do teste diagnóstico Xpert MTB/RIF® (Cepheid, EUA) foi reduzir a transmissão e a morbidade da doença e avançar na redução das taxas de incidência (BRASIL, 2013). Entretanto, entre as metas de detectar, tratar e curar do Ministério da Saúde, a adesão ao tratamento continua como o grande desafio, sendo necessários investimentos em pessoal, gestão, planejamento estratégico e supervisão para melhorar a adesão às políticas públicas (SCHEFFER et.al, 2017 – artigo submetido).

A interação de muitos fatores afeta a transmissão da TB na população, incluindo fatores demográficos e outros riscos, padrões de contato dentro e entre diferentes grupos, tendo diferentes locais de trabalho, de socialização e vivendo em diferentes sítios (incluindo abrigos para pessoas vivendo em situação de rua), com diferentes acessos aos serviços de saúde para diagnósticos, e tendo diferentes necessidades para aderência ao tratamento (WHITE; ABUBAKAR, 2016). Estes fatores distintos precisam ser conhecidos, quantificados e compreendidos, para melhorar o controle da TB. São necessárias melhorias na quantificação de fatores de risco e taxas de transmissão, utilizando métodos de epidemiologia molecular, associados a dados epidemiológicos de alta qualidade, incluindo rastreamento de contatos, documentação detalhada de fatores de risco e histórico de exposição (WHITE; ABUBAKAR,

2016). A combinação de tais abordagens deve ser utilizada para dirigir questões de fundamental importância, como a não adesão ao tratamento, tratamento de infecção latente e TB-MDR. O hipotético fim da epidemia de TB, passa pelo desenvolvimento de novos sistemas que possibilitem intervenções adaptadas a epidemias heterogêneas (THERON et al., 2015).

Para atingir as metas da estratégia *End TB*, com seu ambicioso objetivo de eliminar a TB epidêmica, é necessária intensificação e continuidade de pesquisas nas áreas de clínica, epidemiologia, sistemas de saúde e ciências sociais. Alcançar tal objetivo será possível somente com desenvolvimento e rápida aceitação de novas ferramentas, incluindo diagnóstico rápido, tratamento seguro e de curta duração para infecção ativa e TB latente, e uma vacina eficaz, combinadas com sistemas de saúde eficientes, e provisão de cuidados e ações sobre determinantes sociais da TB (LIENHARDT et al., 2016).

2.4 Agente etiológico

Membro da ordem *Actinomycetales*, composta principalmente por bactérias ambientais, a família *Mycobacteriaceae* provavelmente evoluiu do solo, e *M. tuberculosis* tornou-se um dos mais bem-sucedidos patógenos humanos da história (GALAGAN et al., 2014). O gênero *Mycobacterium* acomoda 169 espécies distintas, entre elas destacam-se os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), agentes causais da tuberculose (TB). São patógenos intracelulares em humanos e animais (JAGIELSKI et al., 2016). O complexo compreende espécies tipicamente associadas a infecções humanas, como *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canettii*, bem como outras espécies adaptadas especificamente a animais domésticos e selvagens, como *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. pinnipedii*, *M. surucattae*, e bacilo de dassie (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>). *M. tuberculosis* é o principal membro do CMTB, a causa mais comum de TB e um dos patógenos mais devastadores da história da humanidade (DANIEL, 2006; JAGIELSKI et al., 2016).

O microrganismo apresenta forma bacilar, levemente curvada ou reta, e quando sofre algum estresse, pode tornar-se fragmentado (MAGEE et al., 2015). Resiste à descoloração com álcool ácido, sendo essa uma propriedade característica do gênero. A maioria das espécies não cora bem pelo método de Gram, mas usualmente são consideradas Gram-positivas, devido a algumas semelhanças na parede celular (MAGEE et al., 2015). No entanto, a parede celular micobacteriana tem características únicas, contém camada polipeptídica, camada de peptidoglicano e

lipídios livres, sendo o alto teor de lipídios responsável pela característica de álcool ácido resistência e impermeabilidade a inúmeros compostos. Sua parede celular complexa é responsável, em parte, pela resistência intrínseca a vários antimicrobianos e pelo crescimento lento, requerendo mecanismos especializados para que ocorra a divisão celular (HETT, RUBIN 2008). A composição principal da parede se dá por três tipos de macromoléculas: peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos, que são intercalados com moléculas de proteínas da parede celular, de manose de fosfatidilinositol, lipídios de tiocerol, lipomanano e lipoarabinomanano (BRENNAN, 2003). Ácidos graxos complexos, como os ácidos micólicos podem estar ligados à membrana celular ou acoplados a um carboidrato, como o dimetilcolato de trealose, que é responsável pela formação típica de *M. tuberculosis*, o fator corda (FORRELAND et al., 2013).

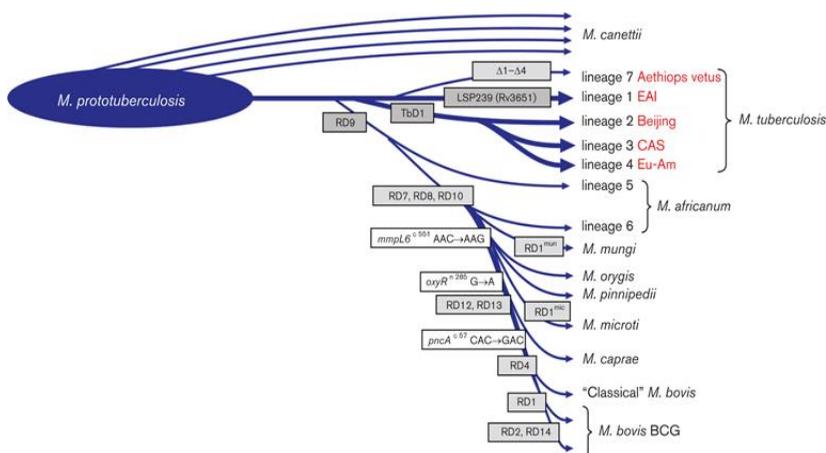
O genoma da linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* é composto por 4.411.529 pb (pares de base), que codificam aproximadamente 4.000 genes, apresenta um alto conteúdo de guanina e citosina, 65,6%, distribuído uniformemente ao longo do genoma (COLE et al., 1998). A comparação entre o genoma do microrganismo referência H37Rv com o de isolados clínicos, encontrou polimorfismo de grandes sequências e de nucleotídeos únicos, em numerosos genes, incluindo codificadores de fatores de virulência e resposta imune ao hospedeiro. Tais resultados indicam que o polimorfismo entre isolados de *M. tuberculosis* é maior do que previamente antecipado, e que variações genéticas podem ter um importante papel na patogênese e imunidade da tuberculose (FLEISCHMANN et al, 2002). Mais recentemente, foi sugerido que variantes clonais podem emergir como resultado de um fenômeno de microevolução, um isolado pode sofrer rearranjos genéticos em um único episódio de infecção, levando à emergência de variantes clonais que abrigam diferenças sutis em relação ao isolado parental, podendo apresentar diferença na infectividade. O que representaria, por um lado, uma variante clonal com maiores taxas de crescimento, com capacidade aumentada de formar cavidades, com conseqüente aumento na sua transmissão, por outro, uma variante clonal com infectividade diminuída, poderia representar uma vantagem evolutiva em termos de garantia da manutenção do hospedeiro, com conseqüente sobrevivência bacteriana (NAVARRO et al., 2013).

2.4.1 Epidemiologia Molecular

Genotipagem clássica, e mais recentemente, sequenciamento do genoma total de isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis*, tem se tornado uma ferramenta padrão para rastreamento epidemiológico e investigação de estrutura populacional de isolados locais e globais (NIEMANN; SUPPLY, 2014). A somatória de técnicas moleculares e abordagens epidemiológicas convencionais tem permitido a identificação de determinantes da distribuição, transmissão e manifestação da doença na população, contribuindo muito para o conhecimento da genética populacional da TB. Estudos de epidemiologia molecular demonstraram que *M. tuberculosis* sofreu evolução clonal em linhagens divergentes, associadas a regiões geográficas específicas e, possivelmente, com distintas populações étnicas (WEISENBERG et al., 2012). O cenário evolucionário do CMTB sugere que isolados ancestrais sejam caracterizados pela presença de uma região de deleção específica (TbD1) e isolados modernos pela deleção de TbD1 (BROSCH et al., 2002) (Figura 1). A biologia evolutiva postula que a diversidade genética e biológica em espécies do CMTB e suas sublinhagens, decorrem principalmente de alterações genômicas brutas, tais como deleções, inserções, inversões, e duplicações, que são conhecidas coletivamente como região-de-diferença (RD) (COLE, 2002). Atualmente, a presença ou ausência de regiões RD, permitiu classificar o CMTB em 7 diferentes linhagens (NEBENZAHL-GUIMARÃES et al., 2016) (Figura 1).

Em 1997, Kamerbeek e colaboradores, utilizando como marcadores a estrutura do locus DR (*Direct Repeats*), que representa uma grande família de repetições de DNA, denominadas CRISPR (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas), subdividiram *M. tuberculosis* em famílias. A técnica de *Spacer oligonucleotide typing* (*Spoligotyping*) descrita pelo grupo, baseada em reação em cadeia da polimerase (PCR), é muito versátil para genotipagem do CMTB, possibilitando o agrupamento de padrões de acordo com a similaridade, explorando o polimorfismo existente no *locus* DR entre os diferentes isolados. Mudanças neste *locus* são quase neutras e ocorrem via consecutivas deleções irreversíveis de uma única unidade ou em blocos contíguos.

Figura 1: Classificação das linhagens filogenéticas baseadas na presença ou ausência de regiões de diferença (RD) e pequenas deleções



Fonte: NEBENZAHL-GUIMARÃES et al., 2016

Globalmente, várias famílias ou linhagens filogenéticas, podem ser distinguidas pelo perfil de *Spoligotyping*, cuja distribuição geográfica é marcadamente variável. Estudo com 39.295 isolados, de 122 países, distribuiu as principais linhagens entre os cinco continentes, a *Beijing* foi predominante na Ásia e Oceania; a *East African Indian* (EAI) foi altamente prevalente na Ásia e Oceania, particularmente nas Filipinas; a linhagem *Central Asian* (CAS) foi prevalente no sul da Ásia, especialmente na Índia; a X foi altamente prevalente na América do Norte e poderia ser relacionada a ancestrais Angloxações, pois foi frequentemente encontrada em áreas de colonização inglesa; a linhagem *Haarlem* (H) foi prevalente na Europa; a *Latin American and Mediterranean* (LAM) foi prevalente na América do Sul; a superfamília T foi a única encontrada em proporção semelhante em todos os continentes (aproximadamente 30%) (BRUDEY et al, 2006). Em estudo posterior, utilizando o sequenciamento de 89 genes, Comas e colaboradores (2009) agruparam estas famílias segundo linhagens, altamente congruentes com as definidas com base em deleções genômicas ou polimorfismos de grandes sequencias. Nesta classificação a linhagem 1 corresponde à família EAI, a linhagem 3 à família CAS, a 5 e 6 correspondem a *M. africanum* 2 e 1, respectivamente. No entanto, o estudo sugere que outros grupos definidos por *spoligotyping* deveriam ser classificados como sublinhagens, isolados da família Beijing seriam parte

da linhagem 2, e cinco grupos de *spoligotyping* LAM, H, X, Uganda e Cameroon, seriam sublinhagens dentro da linhagem 4 (COMAS et al., 2009) (Figura 1). Outros estudos do mesmo grupo classificaram ainda T e S como pertencentes a sublinhagem Euro-Americana ou 4 (KATO-MAEDA et al., 2011).

Três linhagens genótípicas principais, LAM, H e T são as mais frequentes na África, América Central, Europa e América do Sul (BRUDEY et al., 2006). Estudo com 1991 isolados, de 11 Estados brasileiros, mostrou que quase metade dos isolados pertencia à linhagem LAM (46%), seguido pela T (18,6%) e H (12,2%) (GOMES et al., 2012).

Em 2007, Lazzarinni e colaboradores identificaram uma nova sublinhagem como sendo a maior causa de TB no Rio de Janeiro (LAZZARINI et al., 2007). A sublinhagem RD^{Rio} é membro da linhagem LAM e apresenta uma deleção de 26.314 pb na sequência do DNA. Esta deleção envolve 10 genes, incluindo dois que codificam proteínas micobacterianas denominadas PPE (prolina-prolina ácido glutâmico) que são associadas ao reconhecimento da micobactéria pelo sistema imune (LAZZARINI et al., 2007). De acordo com os primeiros estudos, a sublinhagem RD^{Rio} disseminou-se no Brasil e internacionalmente, emergindo como importante causa de TB (WEISENBERG et al., 2012; VON GROLL et al., 2010b; BARBOSA et al., 2012), com um aumento na possibilidade de causar doença cavitária, aumento na eficiência de transmissibilidade (LAZZARINI et al., 2007; 2008) e associação à maior resistência aos antimicrobianos (DALLA-COSTA et al., 2013). Lazzarini e colaboradores (2008), em uma coorte de casos de TB na cidade de Belo Horizonte, mostraram associação significativa entre a linhagem RD^{Rio} e cavitação pulmonar. Como TB cavitária é associada com maior carga bacilar no escarro, o estudo sugeriu que a linhagem estaria associada com maior transmissibilidade da doença, alimentando a cadeia de transmissão (LAZZARINI et al., 2008). No entanto, esta associação foi posteriormente questionada por resultados do mesmo grupo, em estudo prospectivo realizado no Rio de Janeiro, que não encontrou distinção clínica entre doença causada pela sublinhagem RD^{Rio} (BARBOSA et al., 2012). Dalla Costa e colaboradores (2013) relataram associação significativa entre casos de TB-MDR e pacientes infectados com a sublinhagem RD^{Rio}, mas não observaram diferenças clínicas, radiológicas ou laboratoriais.

Evidências sugerem que a diversidade genética tem impacto significativo sobre a patogenicidade e imunogenicidade dos isolados individuais. Este conhecimento, está mudando o paradigma clássico da TB, no qual fatores relacionados ao hospedeiro, como imunidade, e

fatores ambientais, como duração e intensidade da exposição, são vistos como os principais ou únicos responsáveis pelo desfecho da infecção, não considerando a importância da diversidade genética do patógeno (GAGNEUX; SMALL, 2007).

2.5 Tratamento

Sem tratamento a mortalidade por TB é alta. Estudos da era pré-quimioterapia mostraram que cerca de 70% das pessoas com TB pulmonar e baciloscopia de escarro positiva morriam em 10 anos, e entre os casos de TB pulmonar com baciloscopia negativa e cultura positiva a mortalidade era de 20% (TIEMERSMA et al., 2011). Com diagnóstico precoce e tratamento adequado, quase todas as pessoas com TB podem ser curadas (WHO 2015a).

O primeiro fármaco efetivo contra a TB foi a estreptomicina, descoberta em 1943. Recebida com grande entusiasmo pela comunidade científica e pelos doentes, trouxe consigo a resistência do bacilo, e somente a partir de 1949 com a descoberta de outro fármaco antituberculose, o ácido paraminossalicílico (PAS), utilizado em associação com a estreptomicina, foi possível reduzir a frequência de casos com isolados resistentes (GONÇALVES, 2000; GILLESPIE, 2002). O uso da combinação de terapias levou à diminuição na emergência de resistências aos fármacos, tornando-se o padrão para terapias antituberculose (GILLESPIE, 2002; HALL et al., 2009). Os antimicrobianos utilizados, atualmente, como primeira linha no tratamento da TB, isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) e etambutol (E), foram descobertos na metade do século XX, em 1952, 1963, 1954 e 1961, respectivamente (GILLESPIE 2002; WONG et al., 2013). O tratamento atual utiliza a combinação de quatro fármacos, por dois meses (2RZHE), seguida pela combinação de dois fármacos, por quatro meses (4RH) (WHO 2016). Inicialmente, o tratamento padrão era realizado em 18 meses, com internação nos primeiros três meses. Em 1965, após pesquisa da IUATLD, o tratamento foi reduzido para 12 meses. O regime padronizado, atualmente, foi reduzido para seis meses (“curta duração”) e pode atingir taxas de cura superiores a 95% em condições experimentais, e mais de 90% em tratamento sob a supervisão de programas de controle da tuberculose (ZUMLA et al., 2013).

Acredita-se que na tuberculose cavitária estão presentes três populações de *M. tuberculosis*: bacilos na fase log de crescimento, bacilos se replicando lentamente em condições ácidas, e bacilos sob condições de hipóxia que não estão em replicação (MITCHISON, 1979). Fármacos

como a rifampicina, isoniazida e pirazinamida têm ação seletiva sobre cada uma destas populações, tornando essencial o uso de terapias combinadas para erradicar todos os bacilos. Isoniazida é ativa nos bacilos na fase log de crescimento, enquanto a pirazinamida é ativa nos bacilos em replicação lenta ou semi-dormentes, que residem no ambiente ácido das lesões da TB (MITCHISON, 1985). A rifampicina é ativa em bacilos em crescimento e não replicantes (metabolismo lento) durante os seis meses de tratamento, com a isoniazida associada para prevenir a resistência durante a fase de manutenção (HALL et al., 2009; PALOMINO; MARTIN, 2014). A introdução do etambutol, como quarto fármaco na fase intensiva do tratamento para o esquema básico, tem como justificativa a constatação do aumento de resistência primária à isoniazida e da resistência primária à isoniazida associada à rifampicina, observado no II Inquérito Nacional de resistência aos fármacos antituberculose conduzido em 2007-2008, em comparação com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado no período de 1995 a 1997 (BRASIL 2009).

2.5.1 Resistência aos Antimicrobianos

Em casos de resistência à rifampicina e isoniazida, falência ao esquema básico ou na impossibilidade do uso do esquema básico por intolerância a dois ou mais fármacos, o Ministério da Saúde recomenda a utilização do esquema para multirresistência. Neste esquema, utiliza-se estreptomicina, etambutol, levofloxacina, pirazinamida e terizidona (BRASIL 2009). Segundo o Ministério da Saúde, falência terapêutica é caracterizada pela persistência da baciloscopia positiva ao final do tratamento; ou por pacientes positivos (++) ou (+++) no início do tratamento, mantendo essa situação até o quarto mês de tratamento; ou por positividade inicial seguida de negatificação e nova positividade a partir do quarto mês de tratamento (BRASIL 2011). Os fatores de risco para falência terapêutica incluem cavitação, doença extensa e imunossupressão, culturas de escarro que permanecem positiva após oito semanas de tratamento são indicativas de falência. Se algum dos fatores de risco estiver presente, a terapia pode ser estendida por até nove meses (ZUMLA et al., 2013).

A resistência aos fármacos utilizados emerge por multiplicação seletiva de mutantes resistentes dentro das lesões, apesar da presença do antimicrobiano na concentração que inibe o crescimento, como resultado de um tratamento inapropriado e/ou inadequado. A frequência de mutantes resistentes e os níveis de resistência variam dependendo do fármaco, do gene que sofreu mutação e posição/local da mutação, cujas

expressões fenotípicas incluem: alterações de sítio de ligação, perda de enzimas ativadoras da molécula do fármaco, mudanças na permeabilidade, efluxo e produção de enzimas inativadoras da molécula do antimicrobiano (KIM, 2005). A resistência simultânea à isoniazida e rifampicina define um isolado de *M. tuberculosis* como TB-MDR. Sem estes dois potentes antimicrobianos, o tratamento de TB-MDR torna-se difícil, uma vez que os fármacos de segunda linha utilizados são menos eficientes e não tão bem tolerados quanto os de primeira linha (MUKHERJEE et al., 2004).

O mecanismo de ação da isoniazida é complexo, afeta a síntese de macromoléculas, especialmente o ácido micólico. A pró-droga é ativada pela enzima catalase-peroxidase (KatG), e os produtos ativos tem como alvo a proteína carreadora enoil-acil (ACP) redutase (InhA) e a beta-cetoacil enoil-ACP-sintetase (KasA), da via da síntese de ácido micólico (BANERJEE et al., 1994; MDLULI et al., 1998; PALOMINO; MARTIN, 2014; UNISSA et al., 2016). Além disso, a isoniazida é inativada pela enzima arilamina N-acetiltransferase (NAT), que também tem importante papel na via de síntese de ácido micólico (BHAKTA et al., 2004). Desta forma, o mecanismo de resistência à isoniazida pode envolver múltiplos genes. Os dois principais mecanismos moleculares de resistência são associados com mutações em *katG* e *inhA* e sua região promotora (PALOMINO; MARTIN 2014; UNISSA et al., 2016). O mecanismo de ação da rifampicina é por ligação à subunidade β da RNA polimerase, inibindo a elongação do RNAm (BLANCHARD, 1996). A maioria dos isolados clínicos resistentes à rifampicina apresentam mutações no gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase (TELENTI et al., 1993; PALOMINO; MARTIN 2014). Aproximadamente 96% dos isolados resistentes à rifampicina apresentam mutações em uma região de 81 pb que abrange os códons 507-533 do gene *rpoB*. Além disso, a atividade aumentada de bombas de efluxo, levando à extrusão do antimicrobiano, foi proposta como mecanismo de resistência, especialmente em isolados clínicos que não apresentavam mutações nos genes descritos (DA SILVA et al., 2011). O sinergismo, entre a permeabilidade reduzida da parede celular e a atividade de efluxo, pode constituir o primeiro estágio para o desenvolvimento e efetivação de fenótipos resistentes (MACHADO et al., 2012; VIVEIROS et al., 2012). Recentemente, Machado e colaboradores (2017), evidenciaram atividade de efluxo e superexpressão de genes de bombas na presença do antimicrobiano, contribuindo para o aumento dos níveis de resistência em *M. tuberculosis*, independentemente do genótipo. O estudo demonstrou que os diferentes níveis de resistência entre isolados clínicos, incluindo

isolados MDR e XDR, se devem a combinação entre a atividade das bombas de efluxo e mutações nos genes alvo (MACHADO et al., 2017).

2.5.2 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

O teste convencional de susceptibilidade aos antimicrobianos para micobactérias utiliza uma única concentração do fármaco, chamada de concentração crítica, categorizando um isolado clínico como sensível ou resistente. Esta concentração crítica é considerada mais um parâmetro epidemiológico, que distingue o tipo selvagem do tipo não selvagem capaz de crescer na presença de altas concentrações do fármaco, do que um valor de ponto de corte estabelecido para guiar as decisões terapêuticas (KIM, 2005).

Na década de 60, Canetti e colaboradores demonstraram preocupação com a atividade dos “novos fármacos antituberculose”, devido ao aparecimento de isolados bacterianos capazes de crescer na presença de altas concentrações dos antimicrobianos, e com a busca por testes de susceptibilidade acurados, reproduzíveis, econômicos e rápidos. Os autores sugeriram a utilização de isolado sensível como controle, possivelmente H37Rv, para assegurar o desempenho do método, evitando a classificação de isolados selvagens como resistentes ou resistentes como selvagens. Outras recomendações, em relação aos métodos de concentração absoluta, foram a padronização do inóculo e a determinação da concentração crítica para aquele método, naquele laboratório, com amostras de isolados selvagens. Por fim, os autores consideraram que o melhor tipo de teste de susceptibilidade para *M. tuberculosis* seria a determinação totalmente quantitativa, na qual o microrganismo é capaz de crescer em meio contendo uma ampla gama de concentrações conhecidas do fármaco, proporcionando informações sobre o nível de resistência (CANETTI et al., 1963).

A demanda por um teste de susceptibilidade confiável tem aumentado com a expansão da resistência aos antimicrobianos antituberculose, e com a necessidade de um tratamento apropriado para TB-MDR. Este teste deve ser baseado em medidas quantitativas confiáveis para prevenir futuras ampliações da resistência (MUKHERJEE et al., 2004).

Estudos com protocolos quantitativos padronizados são necessários para prover dados dos níveis de resistência fenotípica *in vitro*. Estes níveis devem ser cuidadosamente correlacionados com amostras clínicas representativas de isolados de *M. tuberculosis* de pacientes virgens de tratamento, e de pacientes que tenham falha no tratamento com

o regime contendo o fármaco testado (SPRINGER et al., 2009). A correlação entre os níveis de resistência e os desfechos dos tratamentos, poderia ser utilizada como referência para otimizar o uso dos fármacos de primeira linha, reduzindo a utilização dos fármacos de segunda linha, que são mais caros, mais tóxicos e menos eficazes.

Os primeiros ensaios quantitativos para determinação da concentração inibitória mínima aos antimicrobianos, em isolados de *M. tuberculosis*, foram realizados em meio Löwenstein-Jensen com diferentes concentrações dos fármacos, e a leitura era realizada entre 4 a 6 semanas (CANETTI et al., 1963). Ensaios colorimétricos utilizando meio líquido (7H9 suplementado), baseados na oxirredução do Alamar Blue, Resazurina ou sais tetrazólicos como MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), com leituras realizadas entre 7 e 14 dias, mostraram boa concordância com os resultados do método das proporções (YAJKO et al., 1995; MSHANA et al., 1998; PALOMINO et al., 2002; RAUT et al., 2008). Outra metodologia para determinação de CIM descrita foi o Etest, que segundo os autores, apresentou fácil leitura dos resultados e boa concordância com a CIM feitas em ágar Middlebrook 7H11 e com metodologia automatizada radiométrica (BACTEC 460, BD). Para a metodologia por Etest, utilizando-se um inóculo equivalente a escala 3,0 de McFarland, a leitura foi realizada entre 5 a 10 dias (WANGER; MILLS, 1996; JOLOBA et al., 2000; AKCALI et al., 2005).

Teste automatizado, baseado no MGIT 960® e software TB sXiST® (BD, USA), foi avaliado em estudo multicêntrico para isolados de TB-MDR. Utilizando fármacos de primeira e segunda linhas, com validação pelo perfil genético de resistência, apresentou concordância superior a 80%, exceto para o etambutol. O estudo mostrou que níveis de resistência baixos, moderados ou altos, foram associados a mutações genéticas específicas, reforçando a imagem da heterogenicidade do termo resistência para *M. tuberculosis* e a importância da padronização e realização de testes quantitativos (CAMBAU et al., 2015).

Outro sistema comercial disponível é o Sensititre™ (Thermo Fischer Scientific, USA), um teste para determinação de CIM para 12 antimicrobianos de primeira e segunda linhas, com leitura dos resultados entre 7 e 21 dias, que possibilita automação da inoculação das placas e da leitura final. Estudos comparando o desempenho do sistema Sensititre™ com o método das proporções têm demonstrado boa acurácia do teste, exceção para os testes com etambutol (LEE et al, 2014, YU et al., 2016).

Atualmente, nenhum método de referência para determinar a CIM para *M. tuberculosis* é universalmente aceito. Devido a utilização de diferentes técnicas para determinação da CIM, não existe um *cut-off*

epidemiológico (ECOFF), pois este, deveria ser delineado pela distribuição Gaussiana das CIMs compiladas, de vários laboratórios, utilizando a mesma metodologia. Além disso, os resultados dos métodos genotípicos apresentam o desafio da falsa resistência, pela presença de mutação que não conferem resistência, ou da falsa sensibilidade, por mutações diferentes dos mecanismos de resistência conhecidos, o que torna importante sua complementação por metodologias fenotípicas. Sendo assim, é urgente o estabelecimento de uma metodologia de referência, com definição de pontos de corte, que permitam a avaliação da atividade dos antimicrobianos antituberculose *in vitro*, possibilitando precisão no auxílio da decisão terapêutica e na vigilância da resistência (SCHON et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os fatores de risco associados ao hospedeiro, variações genóticas como presença da deleção RD^{Rio} e *spoligotype*, além do nível de resistência à rifampicina e isoniazida da bactéria, como interferentes no desfecho de casos novos de tuberculose pulmonar tratados com esquema básico na grande Florianópolis.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar dados clínico-epidemiológicos de casos novos de tuberculose pulmonar obtidos por entrevista e pesquisa em prontuário;
- Avaliar a influência de fatores de risco associados a tuberculose no sucesso do tratamento;
- Mapear (a distribuição) os casos novos de tuberculose pulmonar na região estudada;
- Caracterizar e mapear as linhagens de *M. tuberculosis* circulantes na região estudada por metodologia molecular de Spoligotyping;
- Analisar a influência da variação genotípica caracterizada pela presença da deleção RDRio no fenótipo da doença clínica;
- Avaliar a associação entre dados clínico-epidemiológicos e as características genóticas dos isolados de *M. tuberculosis* estudados;
- Avaliar a influência das variações genóticas caracterizadas pelas diferentes linhagens no sucesso do tratamento;
- Avaliar o método da microdiluição em caldo com leitura por oxirredução e por microscopia para determinação da CIM para *M. tuberculosis* isolados de casos novos de TB pulmonar;
- Determinar a CIM à Isoniazida e à Rifampicina nos isolados de *M. tuberculosis* de casos novos de tuberculose pulmonar tratados com esquema básico;
- Avaliar a relação entre os valores de CIM apresentados pelo microrganismo no início do tratamento e o desfecho clínico;
- Associar as linhagens circulantes à presença da deleção RDRio, à CIM e ao desfecho do tratamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo e local do estudo

Coorte prospectiva que acompanhou o desfecho de casos novos de tuberculose pulmonar, tratados com esquema básico, no período de maio de 2014 a maio de 2016 diagnosticados nos municípios de Florianópolis e São José, considerados prioritários para o PNCT.

Florianópolis possuía uma população estimada em 2015 de 469.690 habitantes, área territorial 675,409km², densidade demográfica de 623,68 habitantes/km², IDHM 2010 0,847 e PIB per capita 32.385,04 reais (IBGE, 2016). Nesse município, o programa de tuberculose é descentralizado, sendo as 70 Unidades Básicas de Saúde responsáveis pelo atendimento aos pacientes em tratamento para TB. São José possuía uma população estimada em 2015 de 232.309 habitantes, área territorial 150,453 Km², densidade demográfica de 1.376,78 habitantes/km², IDHM 2010 0,809, PIB per capita 34.181,78 reais (IBGE, 2016). Nesse município, o programa de tuberculose é centralizado em um ambulatório especializado, localizado no Centro de Triagem e Aconselhamento.

Os desfechos, sucesso no tratamento, falência, abandono ou óbito, foram avaliados conforme as seguintes definições, de acordo com OMS (WHO, 2013 revision 2014) e PNCT (BRASIL, 2015):

Sucesso no tratamento: soma dos pacientes que completaram o tratamento e aqueles declarados curados (WHO, 2013 revision 2014).

Tratamento completo: Conforme recomendado pela política nacional, sem evidência de falha, mas sem registro de que três ou mais culturas negativas realizadas com pelo 30 dias de intervalo após a fase intensiva (WHO, 2013/2014).

Cura¹: ausência da doença ao final do tratamento comprovada por: baciloscopia e cultura negativas (cura bacteriológica comprovada, uma na fase de acompanhamento e outra no final do tratamento); e/ou radiografia e avaliação clínica (cura não comprovada bacteriologicamente para pacientes que não tiverem realizado o exame de escarro por ausência de expectoração) (BRASIL, 2015) .

¹ Os critérios de cura estabelecidos não são totalmente seguidos nos municípios avaliados por falta da comprovação bacteriológica e ou radiológica da cura.

Falência ao tratamento: persistência da baciloscopia e/ou cultura positivas ao final do tratamento; ou pacientes positivos (baciloscopia: ++ ou ++++) no início do tratamento, mantendo esse perfil baciloscópico até o quarto mês de tratamento; ou positividade inicial seguida de negatificação e nova positividade a partir do quarto mês de tratamento (BRASIL, 2015).

Abandono: paciente que deixou de utilizar a medicação por mais de 30 dias ou mais e interrompeu o tratamento por mais de 30 dias consecutivos (BRASIL, 2015).

Morte: morte do paciente, durante o período de tratamento independente da sua causa (WHO 2013/2014).

4.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado por cultura positiva para *M. tuberculosis*, que realizaram diagnóstico nos municípios de Florianópolis e São José e iniciaram tratamento com esquema básico para TB pulmonar, entre maio de 2014 e maio de 2016, que concordaram em participar do estudo mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

O tratamento dos pacientes foi conduzido de acordo com o protocolo padronizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). O esquema básico para adultos e adolescentes consiste em comprimidos com dose fixa combinada de Rifampicina (R) 150 mg, Isoniazida (H) 75 mg, Pirazinamida (Z) 400 mg e Etambutol (E) 275 mg, seguido por comprimidos com R 150 mg e H 75mg. O tratamento é dividido em fase intensiva, dois meses de RHZE e fase de manutenção, quatro meses de RH. Pacientes com forma cavitária da doença, que permaneçam com baciloscopia positiva ao final do segundo mês de tratamento, ou com aparecimento de poucos bacilos no exame de escarro do quinto ou sexto meses, ou mesmo com os escarro negativo que apresentem evolução clínico-radiológica insatisfatória, ou ainda aqueles com monorresistência à R ou H, poderão ter a segunda fase prolongada para nove meses. O estudo não interferiu com a rotina e tratamento do paciente.

4.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com baciloscopia positiva que posteriormente resultaram em culturas negativas; ou culturas positivas identificadas como Micobactéria Não-Tuberculosa (MNT) a partir de testes fenotípicos realizados pelo LACEN/SC; ou culturas

positivas para *M. tuberculosis* que apresentaram resistência aos antimicrobianos do esquema básico (monorresistência ou multirresistência) com posterior mudança de esquema de tratamento, ou que devido a hepatopatias prévias ou efeitos adversos graves ao tratamento básico foram submetidos à mudança de esquema de tratamento.

4.4 Fluxo de Coleta de Casos/Isolados Bacterianos

Os pacientes com baciloscopias positivas, diagnosticados no Hospital Universitário/UFSC, foram entrevistados no momento do diagnóstico, na emergência ou leitos de internação do hospital, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Para os demais casos, diagnóstico realizado em outras unidades de saúde, o contato com o paciente ocorreu após a entrada da sua respectiva cultura positiva no setor de tuberculose do LACEN/SC. Foram realizadas visitas semanais ao setor de tuberculose do LACEN/SC para verificar a entrada de culturas positivas provenientes dos municípios de Florianópolis e São José. Os casos residentes em São José, por realizarem consultas médica mensais, previamente agendadas, foram entrevistados no momento consulta subsequente. Os pacientes residentes em Florianópolis foram contatados por meio dos postos de saúde de sua região ou por telefone. Após assinatura dos TCLEs, os isolados bacterianos dos pacientes provenientes de outras unidades de saúde, foram cedidos pelo LACEN/SC para realização da pesquisa. Os casos foram acompanhados por prontuários até o desfecho.

4.5 Dados Demográficos e Clínicos

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes foram coletados nos prontuários nas unidades de saúde e por meio de questionário aplicado ao paciente (Apêndice B). Todas as entrevistas e pesquisas em prontuários foram realizadas pela pesquisadora. Na pesquisa, os pacientes foram identificados com um número sequencial. As variáveis coletadas foram: idade, sexo, escolaridade, endereço residencial (para mapeamento das famílias circulantes de *M. tuberculosis*); dados clínicos (tosse, produção de escarro, hemoptise, febre, sudorese noturna, peso, perda ponderal, *status* HIV) e comorbidades; além de hábitos como tabagismo; utilização de drogas ilícitas; e uso abusivo de álcool (ingestão alcoólica foi classificada como não abusiva para aqueles que reportaram beber raramente ou em pequenas quantidades; e como abusiva para aqueles que

reportaram beber frequentemente, chegando ou não a embreaguês e apresentando ou não dependência psíquica cultural ou física pelo álcool). Foram avaliados ainda, o local onde foi realizado o diagnóstico (hospital, unidade básica de saúde (UBS), unidades municipais de pronto atendimento (UPA) ou consultórios particulares) e o tempo decorrido entre o início dos sintomas, especialmente a tosse, e o diagnóstico da tuberculose.

4.6 Dados Laboratoriais

Os dados laboratoriais avaliados foram baciloscopia e cultura para *M. tuberculosis* realizados nos laboratórios municipais e hospitalares da grande Florianópolis no momento do diagnóstico, identificação bacteriana e teste de sensibilidade aos antimicrobianos realizados no LACEN/SC.

As baciloscopias foram realizadas por coloração de Ziehl-Neelsen seguindo as recomendações do Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobacterioses (BRASIL, 2008). Foram avaliados de 20 a 100 campos microscópicos/lâmina em objetiva de imersão, sendo no mínimo 100 campos para as amostras negativas. Interpretação: não observação de BAAR nos 100 campos, a amostra foi considerada negativa; observação de 1 a 9 BAAR nos 100 campos, foi relatado o número exato de BAAR encontrados; observação de 10 a 99 BAAR nos 100 campos, amostra positiva (+); observação de 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos, amostra positiva (++); observação de mais de 10 BAAR por campo em 20 campos, amostra positiva (+++). A baciloscopia para controle de tratamento da tuberculose seguiram os mesmos critérios de interpretação, e segundo o MS deveria ser realizada mensalmente. (BRASIL, 2011)

As amostras biológicas dos pacientes (escarro, lavado brônquico/broncoalveolar e/ou líquido pleural) foram cultivadas em meio sólido Ogawa-Kudoh ou Löwestein-Jensen, após descontaminação, quando necessário, e incubadas a 36 °C (+/- 1 °C), nos laboratórios de origem. Após semeadura, foram realizadas leituras semanais das culturas até a visualização de crescimento bacteriano característico. Foram realizadas as colorações de Ziehl-Neelsen para confirmação de álcool ácido resistência, e os isolados foram encaminhados ao LACEN/SC para identificação e antibiograma.

A identificação bacteriana foi realizada pela presença do fator corda e por teste imunocromatográfico para detecção do antígeno MPT 64 (Bioeasy, Coreia). Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos

foram realizados por metodologia fenotípica qualitativa e automatizada no BACTEC-960[®] - MGIT[™] (BD, EUA). Os fármacos testados foram rifampicina, isoniazida, etambutol e estreptomicina.

4.7 Dados Radiográficos

Foram avaliadas radiografias ou tomografias realizadas no início do tratamento, preferencialmente antes do início e até 30 dias após. Nos exames de imagens, analisou-se a presença de cavitação, consolidação, infiltrado homogêneo, nódulos e/ou derrame pleural. A avaliação foi realizada por laudos, quando presentes, ou por imagens fotografadas ou diretamente dos sistemas informatizados de radiologia do Hospital Universitário/UFSC e do Estado de Santa Catarina. As imagens foram analisadas por pneumologista que recebeu somente a imagem com o número de identificação do paciente.

4.8 Isolados Bacterianos

Os isolados primários de *M. tuberculosis* identificados no LACEN/SC foram subcultivados em Ogawa-Kudoh a 36 °C (+/- 1 °C) durante 20 a 30 dias no laboratório de microbiologia do Hospital Universitário, sendo então submetidos à extração de DNA no LBMMS e ao congelamento de alíquotas da bactéria a -20 °C e -80 °C para posterior realização de antibiograma pela metodologia de concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo.

4.9 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por metodologia previamente descrita por van Soolingen e colaboradores (1994), método enzimático que utiliza CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). As colônias de *M. tuberculosis* foram semeadas em meio de Ogawa-Kudoh (Laborclin, Brasil) incubadas a 36 °C (+/-1 °C) por 20 a 30 dias. Após esse período, um inóculo bacteriano equivalente a uma alça de 10 µL foi transferido para uma solução de 400 µL de TE 1X (10mM Tris/1,0 mM EDTA, pH 8,0) em criotubos com tampa rosca. A suspensão foi inativada em bloco térmico a 90 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL de lisozima (10 mg/mL) e os tubos foram incubados *overnight* a 37 °C. No dia seguinte, foram adicionados 75 µL da solução SDS (10 %)/proteínase K (10 mg/mL) e os tubos foram incubados a 65 °C por 10 minutos. Na sequência, adicionaram-se 100 µL de NaCl 5 M e 100 µL da

solução CTAB/NaCl (10 g/4,1 g/100 mL). A mistura foi incubada a 65 °C por 10 minutos. Foram adicionados 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), que após homogeneização por inversão e por vortex, seguida de centrifugação (7250 x g por 5 minutos), possibilitou a separação das fases. A fase aquosa foi transferida para um tubo tipo eppendorf, o DNA foi então precipitado por adição de 600 µL de isopropanol (proporção 1:1) seguido de resfriamento *overnight* a -20 °C. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados (7250 x g) por 15 minutos. O isopropanol foi removido e ao DNA precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70 % (peso/peso), que após homogeneização delicada foi novamente centrifugado e o sobrenadante desprezado. Após essa etapa de lavagem o *pellet* de DNA foi seco em temperatura ambiente e posteriormente ressuspensão em 50 µL de TE 1 X e armazenado em alíquotas a 4 °C para uso imediato e a -80 °C para estoque.

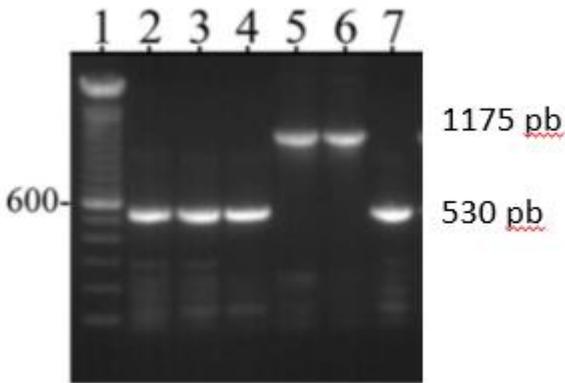
4.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção da deleção RD^{Rio}

A PCR para amplificação do gene *IS1561* foi realizada utilizando-se os iniciadores F-*IS1561* (5'-GACCTGACGCCGCTGACAC-3') e R-*IS1561* (5'-CACCTACACCGCTTCCTGCC-3'), que amplificam um fragmento de 530 pb, do interior da região deletada, caracterizando a ausência de deleção. A amplificação da ponte RD^{Rio} utilizou os iniciadores F-Brg (5'-CACTCCGGCTGCCAATCTCGTC-3') e R-Brg (5'-CACCGCCACGCTGAATGAGACCA-3'), que amplificam um fragmento de 1175 pb, formado pela união das extremidades da região deletada, e caracterizam a presença da deleção. A PCR multiplex foi realizada em termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific-USA) seguindo as condições padronizadas por Gibson e colaboradores (2008) e adaptadas por Von Groll e colaboradores (2012): 95 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto, 72 °C por 4 minutos, e um ciclo final de extensão de 72 °C por 4 minutos. Em todas as reações foram utilizados controles RD^{Rio} e *IS1561*, além do controle negativo (ausência de DNA). A reação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 0,2 µM dos iniciadores RD^{Rio} BrgF/R e 0,2 µM dos iniciadores *IS1561*F/R, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (Invitrogen™ Life Technologies), 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e KCl 50 mM, Glicerol 50 % (Amresco, EUA), 1,0 µL de DNA e 1 U da enzima Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies).

4.11 Detecção dos Fragmentos Amplificados pela PCR

Os produtos foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1 %, corados por brometo de etídio (1 $\mu\text{g/mL}$), visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV- 20), utilizando-se o sistema de fotodocumentação de géis ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com marcadores de tamanho molecular de 100 pb. A identificação da linhagem RD^{Rio} foi estabelecida pelo tamanho do fragmento amplificado, um fragmento de 1175 pb corresponde a linhagem RD^{Rio} e de 530 pb corresponde à ausência de deleção (Figura 2).

Figura 2: Gel de eletroforese da PCR para caracterização da presença da deleção RD^{Rio} entre os isolados de *M. tuberculosis* estudados.



Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 100 pb (Life Thechnologies- USA);
Canaletas 2, 3, 4 e 7 representam isolados sem a presença da deleção (amplicon 530pb);

Canaletas 5 e 6 representam isolados com a presença da deleção RD^{Rio} (amplicon 1175pb).

Fonte: a autora

4.12 Spoligotyping

A realização da genotipagem dos isolados de *M. tuberculosis* pela técnica de *Spoligotyping* (*Spacer oligonucleotide typing*), utilizou o kit *Spoligotyping* IM9701 (Ocimum Biosolutions, Índia), a metodologia foi realizada seguindo o protocolo do fabricante:

4.12.1 Reação de amplificação

Os oligonucleotídeos DRa (5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3') e DRb (3' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 5') pareiam nas extremidades das sequências de Repetição Direta (DR) do *locus* DR e foram utilizados para amplificar as sequências espaçadoras entre duas DRs. Para cada reação foram utilizados entre 50 a 100 ng de DNA molde, 20 pmoles de cada oligonucleotídeo, 200 μ M de desoxiribonucleosídeos trifosfato (Invitrogen™ Thermo Fisher, USA), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen™ Thermo Fisher, USA). As amplificações pela PCR foram realizadas em termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific, USA) conforme as condições descritas por Kamerbeek e colaboradores (1997) e referenciadas no protocolo do fabricante: um ciclo inicial de 96 °C por 3 minutos, 20 ciclos de 96 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

4.12.2 Hibridização e detecção dos produtos amplificados

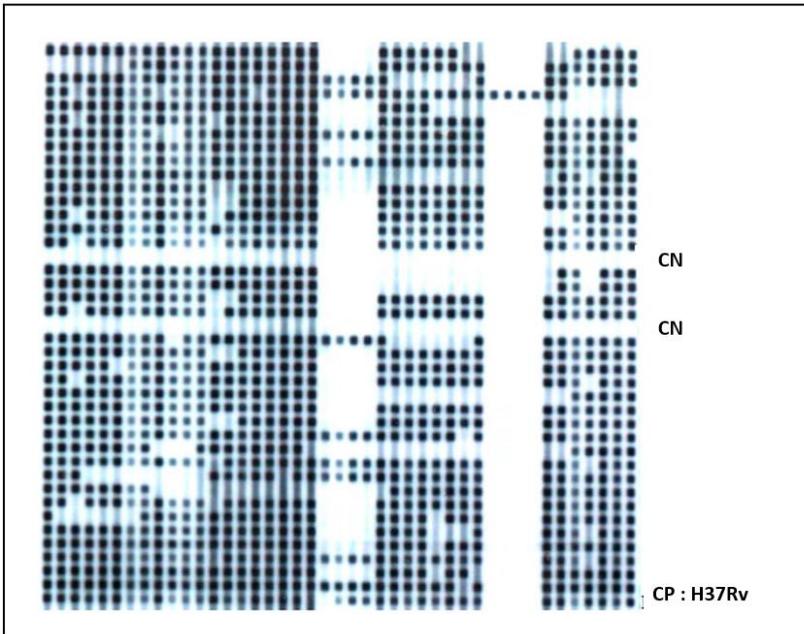
Os produtos amplificados foram hibridizados em uma membrana contendo o conjunto de 43 oligonucleotídeos imobilizados, cada um correspondendo a uma das sequências únicas dos espaçadores no *locus* DR.

Para hibridização, 45 μ L do produto amplificado desnaturado (99 °C por 10 minutos) foram diluídos em 140 μ L de SSPE 2X (0,02 M Na₂HPO₄.2H₂O, 0,36 M NaCl, 2 mM EDTA – pH 7,4)/SDS 0,1 %. Cada amostra diluída foi aplicada sobre a membrana em um canal paralelo no *miniblotter* (Ocimum Biosolutions, Índia), ficando perpendicular às linhas dos oligonucleotídeos previamente imobilizados. O *miniblotter* foi incubado a 60 °C por 60 minutos para hibridização. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes em 100 mL de SSPE 2X/SDS 0,5 % por 10 minutos a 60 °C em forno giratório (Marconi, Brasil). Após as lavagens, a membrana foi incubada a 30 °C com 5 μ L de um conjugado

de estreptavidina-peroxidase (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, USA) diluído em 20 mL de SSPE 2X/SDS 0,5 % por 60 minutos. A membrana foi lavada duas vezes em 100 mL de SSPE 2X-SDS 0,5 % por 10 minutos a 30 °C e duas vezes com 250 mL de SSPE 2X por 5 minutos em temperatura ambiente.

A revelação foi realizada pela sensibilização de um filme autorradiográfico (Fuji 100NIF 18 X 24) através da detecção da quimiluminescência do DNA hibridizado utilizando o kit ECL™ (Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, USA), com exposição de 10 minutos (Figura 3).

Figura 3: Perfis de diferentes isolados de *M. tuberculosis* visualizados em foto de filme de RX revelado a partir de membrana de *Spoligotyping* dos pacientes incluídos no estudo na grande Florianópolis (2014-2016).



CN – Controle Negativo / CP H37Rv – cepa padrão *M. tuberculosis*

Fonte: a autora

4.12.3 Análise dos *spoligotypes*

Os *spoligotypes* encontrados foram classificados em SITs (*Spoligotyping International Type*) com base no banco de dados internacional SITVIT Database – Institute Pasteur de La Guadeloupe, França (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/), versão disponível SpoIDB4 2017. Os *spoligotypes* com perfil desconhecidos foram analisados também pelo Spotclust (http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_spotclust.html) possibilitando determinar a porcentagem de similaridade com as subfamílias já descritas.

4.13 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM), considerada padrão ouro para determinar a suscetibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos, é definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir mais que 99 % do crescimento bacteriano, ou neste estudo, capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo em ensaio de microplaca. A escolha do sistema de microdiluição em caldo foi realizada devido ao baixo custo e por não necessitar de equipamentos para sua realização.

4.13.1 Solução estoque dos fármacos

A CIM foi determinada para os dois principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose Isoniazida (H) e Rifampicina (R) nas concentrações de 0,03 – 0,06 – 0,125 – 0,25 – 0,5 – 1,0 – 2,0 – 4,0 e 8,0 µg/mL. As soluções estoque dos antimicrobianos foram preparadas seguindo as recomendações do CLSI (M07-A10:2015) com a fórmula:

$$\text{peso (mg)} = \frac{\text{volume (mL)} \times \text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potência (}\mu\text{g/mg)}}$$

Estoque H (Sigma-Aldrich, Belgica):

$$\text{Peso} = \frac{10 \text{ mL} \times 1600 \mu\text{g/mL}}{990 \mu\text{g/mg}} = 16,161 \text{ mg}$$

Estoque R (Sigma-Aldrich, Belgica):

$$\text{Peso} = \frac{10 \text{ mL} \times 1600 \mu\text{g/mL}}{970 \mu\text{g/mg}} = 16,495 \text{ mg}$$

Após pesagem, isoniazida foi diluída com 10 ml de água tipo I (MiliQ®) e rifampicina com um ml de metanol e nove ml de água tipo I. As soluções foram esterilizadas por filtração, utilizando filtro com poros de 22 µm, em cabine de fluxo laminar. Alíquotas de 500 µL de cada antimicrobiano foram distribuídas em criotubos estéreis e armazenadas em freezer -80 °C. O Tempo de armazenamento máximo é de 6 meses, todas as alíquotas foram utilizadas em até 4 meses.

4.13.2 Meio de cultura e solução de resazurina

- Caldo Middlebrook 7H9 (Difco, USA): (4,7 g em 900 mL de água tipo I, suplementado com 0,5 % (v/v) de glicerol e 0,1 % de casitona (Difco, USA) seguido de autoclavação. O caldo foi posteriormente suplementado com OADC 10 % (v/v).
- OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase): 8,5 g/L de cloreto de sódio, 50,0 g/L albumina bovina (fração V), 0,04 g/L de catalase, 0,5 g/L de ácido oleico, e 20,0 g/L de dextrose (Sigma, USA) em água tipo I quantidade suficiente para um litro. A solução foi esterilizada por filtração e armazenada sob refrigeração, protegida da luz, até o momento do uso (2-8 °C).
- Resazurina (Sigma, USA): O sal de resazurina sódica foi preparado na concentração de 0,01 % (peso/vol) em água tipo I, esterilizado por filtração (0,22 µm), a solução foi estocada sob refrigeração (2-8 °C), protegida da luz, por até sete dias.

4.13.3 Preparo das placas de microdiluição

Alíquotas das soluções estoque dos fármacos foram descongeladas imediatamente antes do uso e diluídas em meio de cultura 7H9 suplementado. Tubos de 10 ml previamente esterilizados foram identificados para realização das diluições seriadas (1:2) de cada antimicrobiano. No 1° tubo foram adicionados 9,9 mL de caldo 7H9 suplementado e 100 µL da solução estoque (1600 µg/mL), concentração final de 16 µg/mL; do 2° ao 9° tubos foram adicionados 5 mL de caldo 7H9 e realizada a diluição seriada transferindo 5 mL da solução de antimicrobiano do tubo anterior. As placas de 96 poços foram preenchidas conforme representado na Figura 4, sendo os poços externos “O” preenchidos com 200 µL de água tipo I estéril, para assegurar a umidade; os poços “CP” (linhas 1 e 11) preenchidos com 100 µL de caldo 7H9 e 100 µL do inóculo bacteriano diluído 1:20, para verificar a viabilidade

bacteriana; o poço “CN” (A12) preenchido com 200 μL de caldo 7H9, para confirmar a esterilidade do meio de cultura; e os poços B10-B2 até G10-G2 preenchidos com 100 μL de concentrações crescentes do antimicrobiano e 100 μL do inoculo bacteriano diluído 1:20.

Figura 4. Representação esquemática de placa de 96 poços para realização de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (rifampicina ou isoziazida) por microdiluição.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	CN
B	CP	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	CP	O
C	CP	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	CP	O
D	CP	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	CP	O
E	CP	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	CP	O
F	CP	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	CP	O
G	CP	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	CP	O
H	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Concentrações em $\mu\text{g/mL}$

O: 200 μL de água tipo I estéril;

CP (controle positivo): 100 μL de caldo 7H9 e 100 μL do inóculo bacteriano;

CN (controle negativo): 200 μL do caldo 7H9 utilizado para preparar as placas.

Fonte: a autora

4.13.4 Preparo do inóculo bacteriano

Os isolados de *M. tuberculosis* armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram descongelados, semeados em Ogawa-Kudoh e incubados em $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 20 a 30 dias, sendo então submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

Colônias de *M. tuberculosis*, massa equivalente a uma alça de 10 μL , foram transferidas para um tubo de vidro com tampa de baquelite, contendo pérolas de vidro, previamente esterilizados. O tubo foi submetido a forte agitação mecânica, em vórtex, por aproximadamente um minuto. Após repouso de 15 minutos, foi adicionado 1 mL de caldo

7H9 e submetido a nova agitação para completa dissolução dos grumos bacterianos. Após novo repouso de 15 minutos, o sobrenadante foi aspirado com pipeta tipo *pasteur* estéril, e transferido para tubo tipo *falcon* de 15 mL contendo 2 mL de caldo 7H9, em volume suficiente, ajustando a turbidez à escala 1 de McFarland, verificada em densitômetro (DensiCheck – BioMérieux, França). O inóculo foi diluído 1:20 em caldo 7H9 (4.750 µL de caldo 7H9 e 250 µL do inóculo ajustado). Na sequência, 100 µL do inóculo diluído 1:20 foi adicionado à placa de microdiluição previamente preparada. Os testes foram realizados em duplicatas para cada isolado, assim, em cada placa foram testados três isolados, linhas B1/11-C1/11 representando o isolado 1; linhas D1/11-E1/11 o isolado 2; e linhas F1/11-G1/11 o isolado 3 (Figura 4).

Após completo preenchimento, as placas foram seladas com parafilme, armazenadas em caixas plásticas fechadas e transferidas para estufa onde foram incubadas a 36 °C (+/- 1 °C).

4.13.5 Controles

Além dos controles de esterilidade do caldo 7H9 (controle negativo) e do controle de viabilidade do isolado bacteriano (controle positivo), para cada experimento, independente do número de isolados testados, foi realizado o controle da diluição dos antimicrobianos utilizando a cepa referência H37Rv (ATCC 25618) sensível à isoniazida e à rifampicina, bem como isolados monorresistentes à isoniazida e à rifampicina, gentilmente cedidos pelo LACEN/SC.

4.13.6 Leitura e interpretação

4.13.6.1 Resazurina

Após sete dias de incubação, 30µl da solução 0,01% de resazurina foi adicionada aos poços da microplaca para verificar o crescimento bacteriano. A resazurina é um corante redox solúvel, estável nos meios de cultura e não tóxico aos microrganismos, capaz de medir a proliferação e viabilidade celular por monitorização do estado de oxirredução do ambiente de crescimento celular.

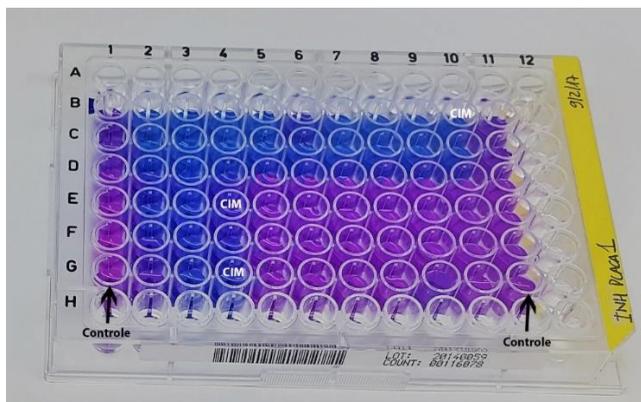
As placas foram novamente seladas com parafilme e incubadas a 36 °C (+/- 1 °C). Foram realizadas leituras após 24 e 48 horas de incubação, avaliando-se a mudança de coloração. A coloração inicialmente azul da resazurina muda para rosa ou roxa devido a sua redução em presença do crescimento bacteriano por liberação de NADH

proveniente do metabolismo celular. A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano na qual não houve mudança na coloração (Figura 5).

4.13.6.2 Microscopia

As placas de microdiluição também foram lidas utilizando-se microscópio de luz invertida (CK2 – Olympus, Japão) para observação do crescimento micobacteriano em objetiva de 10 X. Em meio líquido *M. tuberculosis* apresenta crescimento típico em forma de corda ou emaranhados (Figura 6), sendo facilmente diferenciado da turvação devido contaminação por crescimento de fundo com outras bactérias, bem como, por crescimento de fungos.

Figura 5: Placa de microdiluição em caldo para isoniazida, revelada por oxirredução com resazurina para visualização de concentração inibitória mínima.

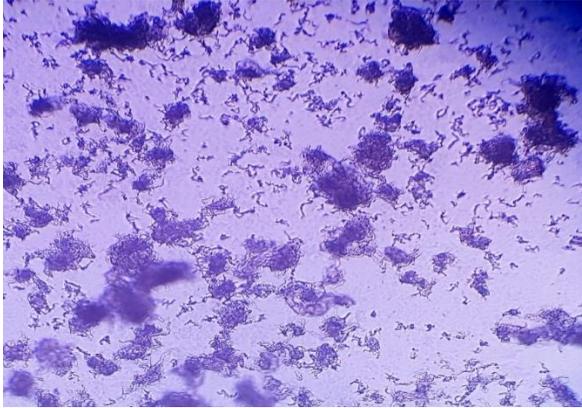


Controle: CP (controle positivo); CIM: concentração inibitória mínima. Linhas A e H: água tipo I; Linhas B e C: isolado 1; colunas 1 e 11 controle positivo; colunas 10 a 2: microrganismo exposto a concentrações crescentes de isoniazida; Linhas D e E: isolado 2; colunas 1 e 11 controle positivo; colunas 10 a 2: microrganismo exposto a concentrações crescentes de isoniazida. Linhas F e G: isolado 3; colunas 1 e 11 controle positivo; colunas 10 a 2 microrganismo exposto a concentrações crescentes de isoniazida.

Fonte: a autora

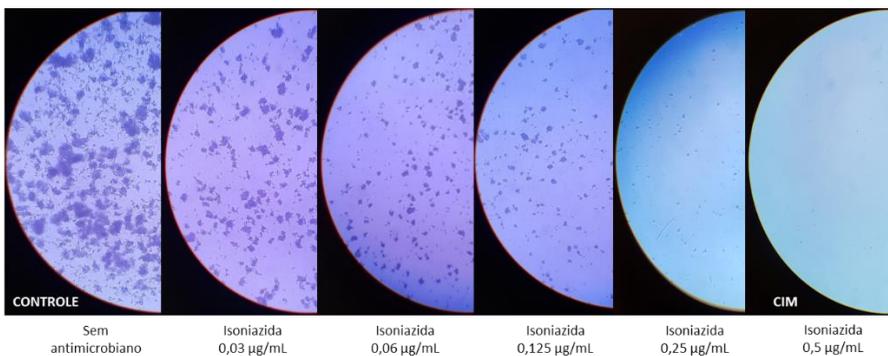
Após 10 e 14 dias de incubação, as placas foram observadas por microscopia de luz invertida. A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano na qual não foi verificado crescimento bacteriano por microscopia (Figura 7).

Figura 6. Visualização em microscópio de luz invertida, objetiva de 10 X, do crescimento em corda ou emaranhado das colônias de *M. tuberculosis* em poço contendo caldo 7H9.



Fonte: a autora

Figura 7. Visualização, em microscópio de luz invertida com objetiva de 10 X, do crescimento de *M. tuberculosis* após 10 dias de incubação em caldo 7H9 e concentrações crescentes de isoniazida, para determinação da concentração inibitória mínima.



CIM: concentração inibitória mínima

Fonte: a autora

4.13.6.3 Interpretação

Os resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos para micobactérias foram avaliados conforme as definições do documento M24-A2 / CLSI (2011):

Concentração Crítica: são adotadas por convenções internacionais, para cada antimicrobiano, a concentração crítica é a menor concentração que inibe 95 % de isolados “selvagens”/ *wild-type* de *M. tuberculosis* que não foram expostos ao fármaco, mas que simultaneamente não inibem amostras consideradas resistentes que são isoladas de pacientes que não respondem a terapia.

Concentração Inibitória Mínima (CIM): menor concentração de um agente antimicrobiano que impede/evita crescimento visível de um microrganismo em teste de suscetibilidade por diluição em caldo.

As comparações dos resultados das leituras obtidas por metodologia de oxirredução (colorimétrica) e por microscopia foram realizadas conforme as definições do documento M23-A3 / CLSI (2008):

Suscetível: Isolados que são inibidos por um agente antimicrobiano em concentrações que são usualmente alcançadas quando as dosagens recomendadas são utilizadas para aquele sítio de infecção, com provável resposta clínica.

Resistente: Isolados que não são inibidos pelas concentrações de um agente antimicrobiano que são usualmente alcançadas com dosagens normais, ou a eficácia clínica do agente sobre o isolado não foi demonstrada em estudos.

Erro grave: mudança da categoria sensível para resistente (falsa resistência)

Erro muito grave: mudança da categoria resistente para sensível (falsa sensibilidade)

4.14 Cálculo Amostral

Para o cálculo amostral do estudo foi considerada a população estimada e o número de casos novos de TB pulmonar confirmados por cultura nos dois municípios para o período do estudo, um nível de significância de 95 % e poder do teste de 80 %, com sucesso em aproximadamente 70% dos casos tratados. Esperava-se 126 casos com desfecho favorável (sucesso no tratamento) e 67 casos de desfecho desfavorável (abandono, falha ou óbito).

No período do estudo, foram diagnosticados 476 casos novos de tuberculose pulmonar nos dois municípios, sendo 284 casos confirmados por cultura, em 63,8% dos casos o registro de encerramento foi de sucesso

no tratamento (TABNET/DIVE/SC). Destes 284 casos, 242 pacientes foram entrevistados e aceitaram participar do estudo, mas 223 atenderam os critérios de inclusão.

4.15 Análise Estatística

Os dados foram analisados com o auxílio do *software* SPSS 22.0® (SPSS Inc., Chicago, USA), sumarizados como números absolutos e percentuais. As associações foram analisadas por meio de teste de Qui-quadrado de Pearson ou exato de Fischer, conforme apropriado, em nível de significância de 5%. Adicionalmente, foram calculados os riscos relativos, e intervalo de confiança de 95%. Modelo de regressão logística foi utilizado para determinar o efeito independente das potenciais variáveis preditoras associadas ao desfecho do tratamento.

4.16 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) no dia 10 de março de 2014 Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 25716113.7.0000.0121 (Anexo 1).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil Epidemiológico da População Estudada

No período do estudo, foram arrolados 242 pacientes com diagnóstico de TB pulmonar confirmado por cultura, que iniciaram tratamento nos municípios de Florianópolis e São José. Foram excluídos da análise 19 pacientes que não utilizaram o esquema básico para tratamento, em seis deles foi utilizado esquema alternativo devido a hepatopatias graves, em 13 casos houve mudança de esquema após liberação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, dos quais nove eram multirresistentes, e quatro eram monorresistentes que não estavam evoluindo bem com o esquema básico.

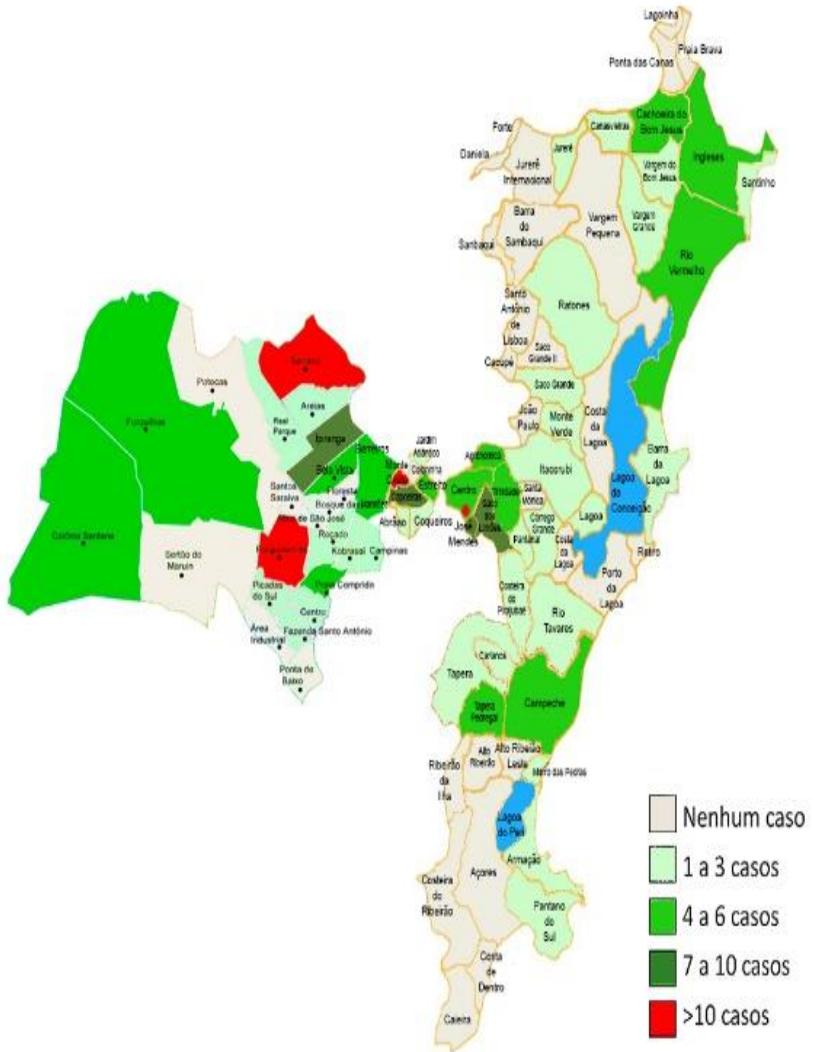
Entre os 223 casos de TB pulmonar incluídos no estudo, 60,5% (135/223) dos pacientes residiam no município de Florianópolis, 35,9% (80/223) residiam em São José, 1,3% (3/223) residiam em Biguaçu 0,9% (2/223) residiam na Palhoça. Foi incluído também um paciente que residia em Rancho Queimado, um em Tijucas e um em Porto Belo.

A Figura 8 apresenta a distribuição geográfica dos casos novos de TB pulmonar do estudo que residiam em Florianópolis e em São José. No mapa, a região central de Florianópolis, corresponde à região de maior localização de moradores de rua, que representaram 16 pacientes no período estudado (11,9%), o bairro Monte Cristo concentrou o maior número de casos residentes (14/135: 10,4%), seguido dos bairros Saco dos Limões (8/135: 5,9%) e José Mendes (7/135: 5,2%). No mapa do município de São José, o bairro Serraria concentrou o maior número de casos (15/80: 18,8%), seguido de Forquilha (12/80: 15%) e Bairro Ipiranga (9/80: 11,2%), os três bairros abrigaram 45% dos casos de TB do município.

Nos casos estudados, o diagnóstico de TB foi realizado principalmente em unidades hospitalares 46,8% (102/218), sendo 32,6% (71/218) realizados nas UBSs, 9,6% (21/218) nas UPAs, 9,2% (20/218) em consultórios particulares e 1,8% (4/218) nos Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA), e 2,2% (5/223) dos pacientes não informaram. Quando questionados sobre contato prévio com pessoas com TB, somente 64% (143/223) dos indivíduos respondeu, sendo que 79% (113/143) dos casos informou que conheciam pessoas que trataram ou estavam em tratamento para TB, incluindo 14 pacientes que haviam tratado TB a mais de 5 anos (12,4%: 14/113). Parentes de primeiro grau como mãe, irmão ou cônjuge representaram 44% (50/113), amigos 23,9% (27/113), parentes de segundo grau como tios e primos 7,1% (8/113), além disso,

8,8% relatam passagem por presídios (10/113) e 3,5% (4/113) por clínica de recuperação para usuários de drogas.

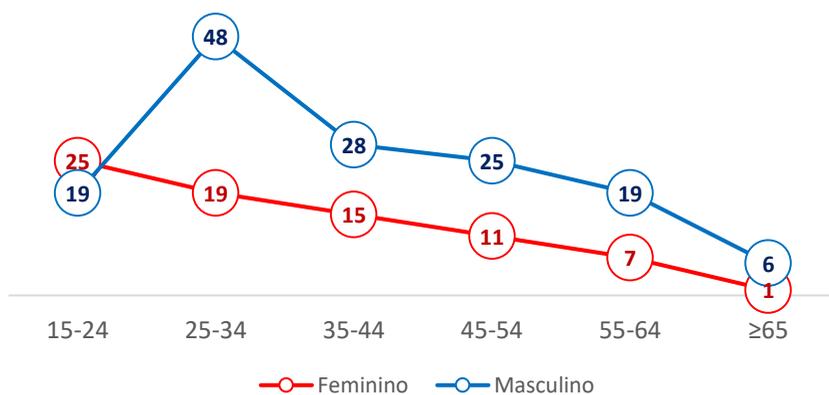
Figura 8: Distribuição geográfica dos casos novos de TB incluídos no estudo, segundo bairro de residência, nos municípios de Florianópolis e São José (2014-2016).



Fonte: a autora

A população estudada compreendeu predominantemente indivíduos do sexo masculino, 65% (145/223), e 35% (78/223) do sexo feminino. A média de idade foi de $37,6 \pm 14,2$ anos (mínima de 15 e máxima de 83 anos), sendo 19,7 % (44/223) na faixa etária entre 15-24 anos, 30,0% (67/223) entre 25-34 anos, 19,3% (43/223) entre 35-44 anos, 16,1% (36/223) entre 45-54 anos, 11,7% (26/223) entre 55-64 anos e 3,2% (7/223) maiores que 65 anos. A faixa etária mais jovem apresentou uma inversão no gênero predominante, 56,8% (25/44) dos indivíduos foram do sexo feminino (Figura 8). Aproximadamente metade dos casos ocorreu na faixa etária entre 25-44 anos (49,3 %), quase um terço entre 25-34 anos (30%). Observou-se diminuição da doença com o aumento da faixa etária (Figura 9).

Figura 9 – Distribuição dos casos novos de tuberculose pulmonar incluídos no estudo, segundo gênero e faixa etária.

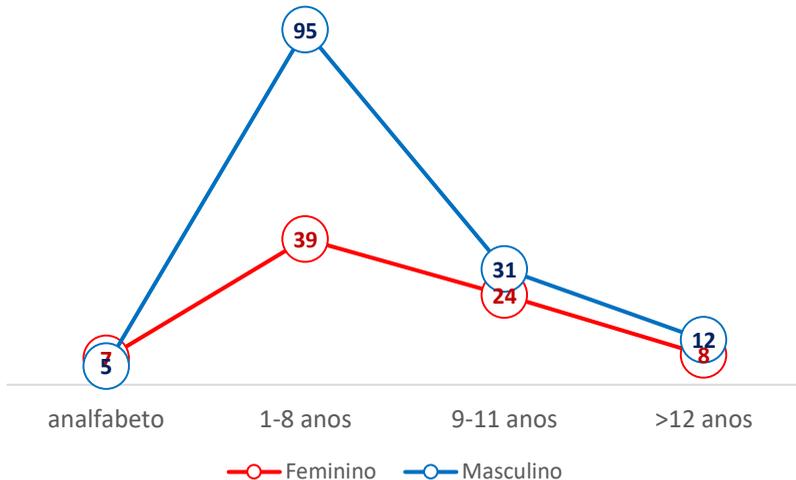


$p = 0,02$

Fonte: a autora

A escolaridade dos casos novos de TB pulmonar foi ≤ 8 anos para 65,5% (146/223) dos pacientes do estudo, dos quais 5,4% (12/223) não eram alfabetizados, 24,7% (55/223) estudaram por 9 a 11 anos, e somente 9,0% (20/223) dos casos iniciaram a educação superior (> 12 anos). Relacionando-se com sexo, a baixa escolaridade foi mais expressiva no sexo masculino, 69,0% (100/145) desses indivíduos estudaram ≤ 8 anos, sendo que no sexo feminino foram 59,0% (46/78) ($p = 0,27$) (Figura 10).

Figura 10. Distribuição dos casos novos de tuberculose pulmonar incluídos no estudo segundo gênero e anos de escolaridade.



$p = 0,27$

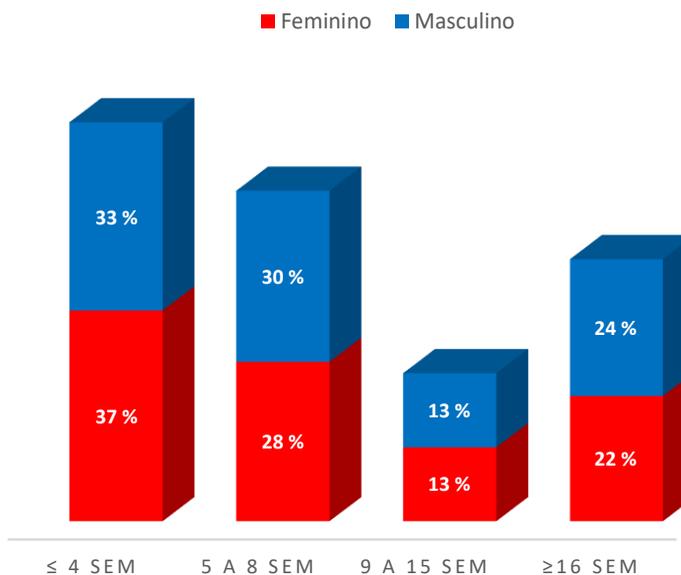
Fonte: a autora

Dos pacientes entrevistados, 16,1% (36/223) não informaram a atividade exercida. Entre as respostas obtidas, aproximadamente 28% (53/187) estavam desempregados, 15% (28/187) trabalhavam na construção civil, 7% (13/187) em restaurantes/lanchonetes, 6,4% (12/187) no comércio (lojas e supermercados), 4,8% eram aposentados, 4,8% do lar (9/187), 4,3% (8/187) em serviços gerais e os demais tinham ocupações diversas (serralheiro, marceneiro, professor, reciclador, taxista, zelador, frentista, mecânico, entre outras). A profissão de quatro indivíduos poderia estar diretamente relacionada à transmissão da doença: dentista, agente de saúde, funcionário de laboratório de saúde pública e agente penitenciário. Além disso, 4,0% (9/223) relataram passagens prévias por presídios e 2,2% (2/223) por clínica de recuperação para usuários de drogas.

O tempo médio entre o início dos sintomas, mais especificamente a tosse, e a realização do diagnóstico foi de $9,6 \pm 8,0$ semanas (0 a 48), com mediana de oito semanas. Entre os 172 pacientes que responderam, 34,3% iniciou o tratamento em até quatro semanas (59/172), 29,1% (50/172) entre 5 e 8 semanas, 13,4% (23/172) entre 9 a 15 semanas e 23,3% (40/172) após 16 semanas do início dos sintomas. Cinco pacientes relataram não ter tido tosse como sintoma (tempo zero) e dois pacientes

relataram mais do que 40 semanas de tosse até o diagnóstico. Ambos os casos que relataram tempo superior a 40 semanas, realizaram diagnóstico em unidades hospitalares, após episódios de hemoptise. Ambos haviam convivido com casos de TB previamente, um era ex-presidiário cujo parceiro de cela adoeceu com TB e o outro relatou que a mãe tratou TB no anterior. Neste último caso, devido ao tempo prolongado de tosse com exposição dos familiares, durante o período do estudo, a mãe adoeceu novamente, além da irmã e do cunhado que residiam no mesmo terreno. Relacionando-se o tempo decorrido entre o início da tosse e o diagnóstico da TB com gênero (Figura 11) e com escolaridade do paciente (Figura 12), não foram observadas diferenças significativas.

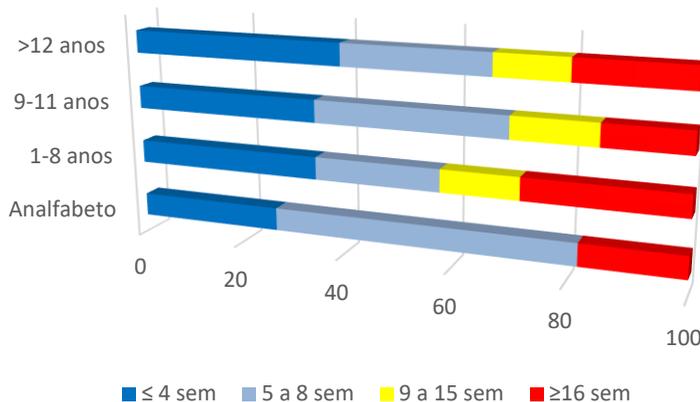
Figura 11: Distribuição segundo proporção do gênero, do tempo decorrido entre o início dos sintomas (tosse) e o diagnóstico de TB em semanas, para os indivíduos do estudo.



$p = 0,93$

Fonte: a autora

Figura 12: Distribuição em proporção de tempo decorrido entre o início dos sintomas (tosse) e o diagnóstico de TB em semanas, segundo o tempo de escolaridade dos indivíduos do estudo.



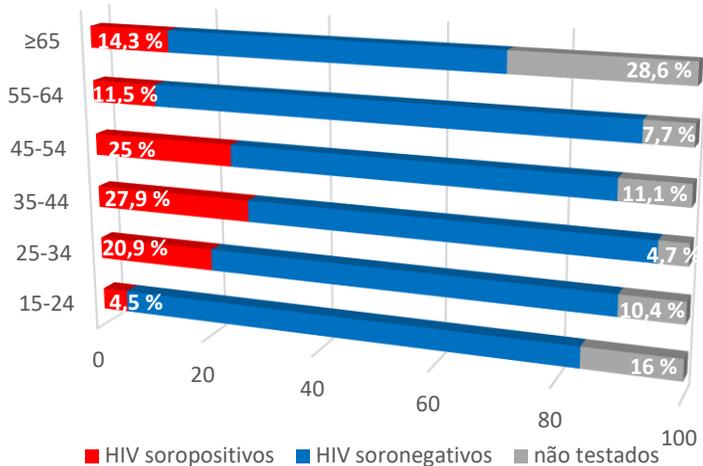
$p = 0,78$

Fonte: a autora

5.2 Perfil Clínico da População Estudada

A testagem para HIV entre os casos novos de TB foi realizada em 199 pacientes (89,2%), dos quais 20,6% (41/199) foram soropositivos para o vírus. Entre os indivíduos do sexo masculino a coinfeção TB/HIV foi observada em 22,3% (29/130) e no sexo feminino em 17,4% (12/69) ($p=0,41$), sendo a porcentagem de indivíduos não testados semelhante entre os gêneros, 10,3% e 11,5% respectivamente. A faixa etária entre 35-44 anos apresentou maior porcentagem de indivíduos HIV soropositivos 29,3% (12/41) dos testados, sendo também a faixa etária com maior porcentagem de testagens realizadas 95,3% (41/43) (Figura 13). Avaliando-se individualmente cada faixa etária, entre os mais jovens (15-24 anos), a coinfeção TB/HIV foi significativamente menor 5,4% (2/37) ($p=0,01$), no entanto, a porcentagem de indivíduos testados foi baixa 84,0% (37/44). Entre 25-34 anos, a coinfeção foi 23,3% (14/60) e a testagem 89,6% (60/67); 45-54 anos foi 28,1% (9/32) e 88,9% (32/36), 55-64 foi 12,5% (3/24) e 92,3% (24/26), e entre os indivíduos com 65 anos ou mais foi de 20,0% (1/5) e testagem em 71,4% (5/7). Entre os pacientes HIV soropositivos 61% (25/41) realizou contagem/quantificação de CD4 no momento do diagnóstico de TB, 72% (18/25) apresentou contagem < 200 células/ mm³ (19-192) e 28% (7/25) > 200 células/ mm³ (207-833).

Figura 13: Proporção de coinfeção TB/HIV e de indivíduos não testados para presença do vírus, segundo a faixa etária, no estudo.



$p = 0,09$

Fonte: a autora

Outras comorbidades associadas à TB foram registradas em 21,5% (48/223) dos indivíduos do estudo. A principal delas foi diabetes em 6,7% (15/223), seguida por doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em 2,2% (5/223), hepatite C em 1,8% (4/223), asma e bronquite crônica em 1,3% (3/223). Sete pacientes diagnosticaram TB durante a gestação (3,1%).

Os sintomas típicos da TB pulmonar relatados pelos pacientes foram tosse crônica, com expectoração e em alguns casos hemoptise; perda de peso involuntária, febre vespertina e sudorese noturna. Entre as respostas obtidas no estudo, 96,3% (209/217) dos pacientes relataram a presença de tosse, que em 94,5% (205/217) dos casos evoluiu para expectoração e 31,7% (66/208) apresentaram episódios de hemoptise. Em 83,9% (172/205) dos casos, houve relato de febre e em 82% (169/206) de sudorese noturna. Os episódios de hemoptise foram significativamente mais frequentes entre os pacientes HIV soronegativos ($p=0,03$), no entanto, para febre, sudorese noturna, tosse e expectoração não houve diferença em relação ao *status* HIV (Tabela 1). No momento do diagnóstico, para 83% (197/223) dos indivíduos o peso foi registrado em prontuário, sendo o peso médio dos pacientes de $57,95 \pm 10,9$ kg, variando entre 35-96 kg. Entre os indivíduos de sexo feminino o peso médio foi de $54,3 \pm 10,4$ kg (37-83 kg) e entre os indivíduos do sexo masculino foi de

60,2 ±10,8 kg (35-96 kg). Dos entrevistados que relataram perda ponderal, em 60,6% (103/170) a perda de peso foi superior a 10 % da massa corporal caracterizando perda de peso severa. Relacionando-se a perda de peso severa com o *status* HIV, não houve diferença significativa entre pacientes HIV soropositivos (70%) e soronegativos (57%) (p=0,19).

Tabela 1: Distribuição dos sintomas clássicos de TB segundo o *status* HIV nos pacientes do estudo.

Sintomas	Total N (%)	HIV soropositivo N (%)	HIV soronegativo N (%)	HIV não testado N (%)	p ^a
Febre	172 (83,9)	30 (81,1)	123 (83,1)	19 (90,5)	0,82
Sudorese noturna	169 (82,0)	27 (73,0)	124 (83,8)	18 (85,7)	0,15
Tosse	209 (96,3)	37 (94,9)	150 (96,1)	22 (100)	0,66
Expectoração	205 (94,5)	37 (94,9)	146 (93,6)	22 (100)	1,00
Hemoptise	66 (31,7)	6 (16,7)	54 (35,6)	6 (28,6)	0,03 ^b
Perda peso severa ^c	103 (60,6)	21 (70,0)	73 (57,0)	9 (75,0)	0,19

^a Para cálculo do p foram considerados somente os pacientes com *status* HIV conhecidos

^b p ≤ 0,05

^c Perda de peso >10% da massa corporal

Exames de imagens como radiografias e/ou tomografias de tórax foram realizados no início do tratamento por 86,1% dos pacientes (192/223), a presença de consolidações foi evidenciada em 59,9% (115/192) dos casos, cavitações em 46,4% (89/192), nódulos em 18,2% (35/192), infiltrados homogêneos em 16,7% (32/192) e derrame pleural em 6,8% (13/192). Entre os 178 casos que realizaram exames de imagens e com *status* HIV conhecido, a presença de cavitações foi significativamente associada aos pacientes soronegativos (p=0,03). Os demais perfis radiográficos foram predominantes nos HIV soropositivos, sendo estatisticamente significativos predomínio de derrame pleural e infiltrado homogêneo nos pacientes HIV soropositivos (p= 0,01) (Tabela 2). O risco de derrame pleural foi 3,7 vezes maior (IC 95%: 1,26 – 10,78)

e de apresentar infiltrado homogêneo foi 2,2 vezes maior (IC 95%: 1,19 – 4,11) nestes pacientes. A despeito do número pequeno de pacientes que realizou a quantificação de CD4, a presença de cavitação, infiltrado homogêneo e em menor proporção, nódulos, foi superior nos indivíduos com $CD4 \geq 200$ células/mm³, da mesma forma, derrame pleural e consolidações naqueles com $CD4 < 200$ células/mm³.

Tabela 2: Distribuição dos perfis de imagens observadas em radiografias ou tomografias realizadas no início do tratamento e associação com *status* HIV e quantificação de CD4 nos indivíduos do estudo.

Imagens	Total N (%)	HIV soropositivo N (%)			HIV soronegativo N (%)	HIV não testado N (%)	p ^a
		Total	CD4 <200	CD4 ≥200			
	192 (86,1)	38 (92,7)	17 (41,5)	6 (14,6)	140 (88,6)	14 (58,3)	-
Cavitação	89 (46,4)	11 (28,9)	2 (11,8)	1 (16,7)	69 (49,3)	9 (64,3)	0,03 b
Consolidação	115 (59,9)	23 (60,5)	10 (58,8)	2 (33,3)	80 (57,1)	12 (85,7)	0,67
Infiltrado Homogêneo	32 (16,7)	12 (31,6)	4 (23,5)	2 (33,3)	20 (14,3)	-	0,01 b
Nódulos	35 (18,2)	11 (28,9)	5 (29,4)	2 (33,3)	23 (16,4)	1 (7,1)	0,08
Derrame pleural	13 (6,8)	6 (15,8)	4 (23,5)	1 (16,7)	6 (4,2)	1 (7,1)	0,01 b

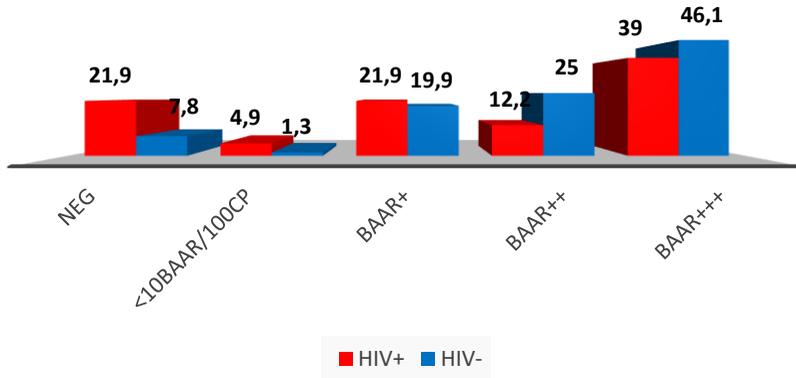
^a Para cálculo do p foram considerados somente os pacientes com *status* HIV conhecidos

^b $p \leq 0,05$

Todos os pacientes do estudo apresentaram cultura com crescimento de *M. tuberculosis* em amostras de trato respiratório inferior. Os resultados das baciloscopias realizadas no diagnóstico foram registrados em prontuário para 99,1% dos casos (221/223). Observou-se alta carga de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR): +++ em 45,2% (100/221) dos pacientes; 22,6% (50/221) apresentou BAAR: ++; 19,5% (43/221) apresentou BAAR: +; e 1,8% (4/221) <10 BAAR/100campos; totalizando 89,1% (197/221) de baciloscopias positivas. A baciloscopia foi negativa em 10,9% (24/221) dos pacientes. Associando-se ao *status* HIV, observou-se diferenças significativas ($p=0,02$) nos resultados das

baciloscopia, no momento do diagnóstico, aproximadamente metade dos indivíduos HIV soropositivos (48,7%) apresentaram baixa carga bacilar (negativo 21,9%, <10 BAAR/100 campos 4,9% e BAAR+ 21,9%). O inverso foi observado entre os indivíduos HIV soronegativos, 71,1% apresentaram alta carga bacilar (BAAR+++ foi observado em 46,1% e BAAR ++ em 25,0%) (Figura 14). Além disso, a baciloscopia negativa isoladamente, foi significativamente associada a pacientes HIV soropositivos ($p < 0,01$). Associando com a contagem de células CD4, 61,1% (11/18) dos indivíduos com $CD4 < 200$ células/mm³ apresentaram baixa carga bacilar, e 71% (5/7) dos indivíduos com $CD4 \geq 200$ células/mm³ apresentaram BAAR +++.

Figura 14: Distribuição dos resultados das baciloscopias de diagnóstico segundo *status* HIV dos indivíduos do estudo.

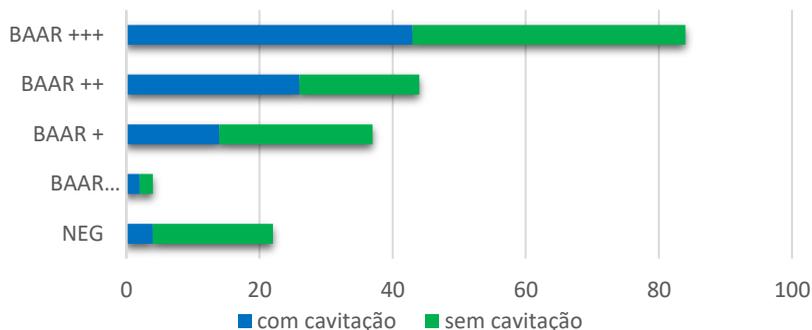


$p = 0,02$

Fonte: a autora

Relacionando-se a presença de cavitação no exame radiológico com carga bacilar no diagnóstico, observou-se que em 70% dos casos com cavitação a baciloscopia apresentou alta carga bacilar (BAAR +++: 41,7% e BAAR ++ 25,3%) ($p = 0,02$) (Figura 15). Por outro lado, baciloscopias negativas foram significativamente associadas à ausência de cavitação ($p < 0,01$) e a presença de derrame pleural ($p < 0,01$).

Figura 15: Distribuição da carga bacilar na baciloscopia de diagnóstico segundo a presença ou não de cavitação no exame radiológico nos pacientes do estudo.



P= 0,02

Fonte: a autora

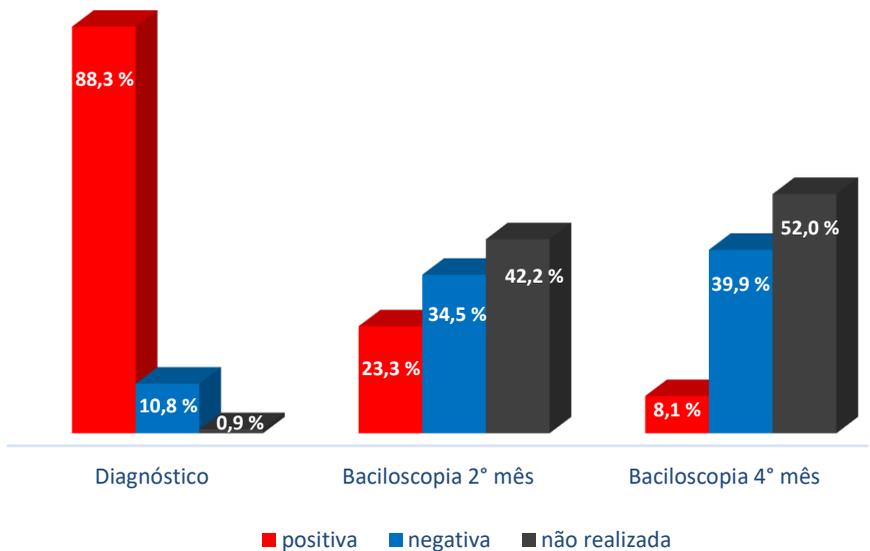
Tabela 3: Distribuição de variáveis associadas a gravidade e transmissibilidade da tuberculose segundo o tempo decorrido entre o início dos sintomas (tosse) e o diagnóstico da doença.

	Tempo de Tosse				p
	≤ 4 semanas N (%)	5-8 semanas N (%)	9-15 semanas N (%)	≥ 16 semanas N (%)	
Baciloscopia					
Negativa	11 (18,6)	7 (14,0)	0	0	
BAAR+	8 (13,6)	8 (16,0)	5 (22,7)	7 (17,5)	
BAAR ++	16 (27,1)	10 (20,0)	6 (27,3)	10 (25,0)	
BAAR +++	24 (40,7)	25 (50,0)	11 (50,0)	23 (57,7)	0,13
Cavitação	24 (43,6)	17 (39,5)	150 (50)	19 (50)	0,77
Hemoptise	13 (22)	19 (38,8)	7 (30,4)	19 (47,5)	0,05

Baciloscopias de controle foram realizadas em apenas 57,8% dos pacientes no segundo mês de tratamento (129/223) e em 48,0% no quarto mês de tratamento (107/223) (Figura 16). Dos pacientes com alta carga bacilar, BAAR +++ e BAAR ++, no momento do diagnóstico, 32,2% (32/99) e 26% (13/50) respectivamente, mantiveram baciloscopias positivas em no segundo mês de tratamento ($p = 0,02$ e $p = 0,66$, respectivamente) (Figura 17). Destes, 13,1% (13/99) e 6% (3/50) respectivamente, mantiveram baciloscopias positivas no quarto mês de tratamento ($p = 0,05$ e $p = 0,42$, respectivamente). No entanto, a despeito

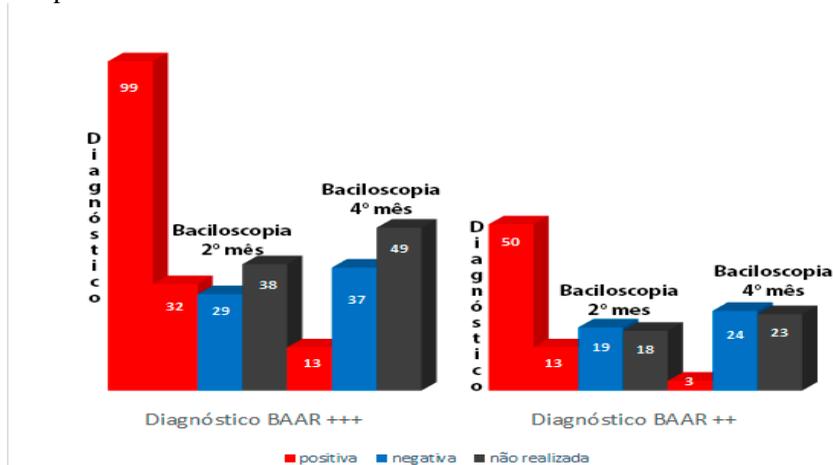
da associação significativa entre indivíduos com BAAR +++ no diagnóstico e a permanência de bacilos no escarro durante o tratamento, somente 61,6 % (61/99) destes pacientes realizou o controle no 2º mês e 50,5% (50/99) no 4º mês de tratamento, sendo que 32,3% (32/99) deles, ou seja, aproximadamente um a cada três pacientes com BAAR +++, não realizou nenhuma das duas baciloscopias de controle. A presença de cavitação nas imagens radiográficas de diagnóstico foi associada com a permanência de baciloscopia positiva no segundo mês de tratamento em 68,6% (35/51) dos pacientes ($p < 0,01$) e no quarto mês de tratamento em 66,7% (12/18) deles ($p = 0,11$).

Figura 16: Distribuição dos resultados das baciloscopias de diagnóstico e controles do segundo e quarto meses de tratamento, incluindo baciloscopias não realizadas.



Fonte: a autora

Figura 17: Seguimento dos casos com alta carga bacilar no diagnóstico (BAAR +++ e BAAR ++), nos controles de 2º e 4º meses de tratamento dos pacientes do estudo.



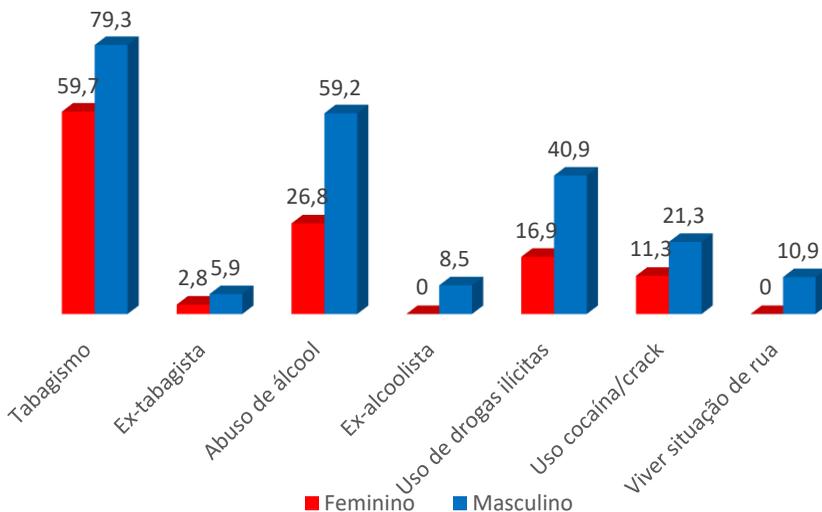
Fonte: a autora

5.3 Perfil Comportamental da População Estudada

Em relação aos hábitos de vida considerados fatores de risco para TB, os indivíduos foram questionados sobre tabagismo, abuso de álcool e uso de drogas ilícitas, bem como viver em situação de rua. Entre os indivíduos que responderam as questões, o tabagismo foi relatado por 64,7% (134/207) deles, sendo que 59,9% (124/207) fumavam no momento do diagnóstico e 4,8% (10/207) informaram ser ex-tabagistas. Separando-se os indivíduos do sexo masculino, o percentual de tabagistas aumenta para 79,3%, (107/135), sendo significativamente superior ao observado no sexo feminino 59,7% (43/72) ($p < 0,01$). O uso abusivo de álcool foi relatado por 36,8% (74/201), incluindo 5,5% (11/201) dos indivíduos que informaram ser ex-alcoolistas, da mesma forma, considerando-se somente o sexo masculino, 59,2% (77/130) relatou problemas com álcool, proporção significativamente superior ao sexo feminino 26,8% (19/71) ($p < 0,01$). O uso de drogas ilícitas foi relatado por 34,3% (68/198) dos indivíduos, o crack foi a droga mais utilizada (35,1%: 27/70), seguida por maconha (21,4%: 15/70) e cocaína (11,4%: 8/70), sendo que 24,3% (17/70) relataram fazer uso de várias drogas. Entre os indivíduos do sexo masculino 44,1% (56/127) informaram fazer uso de

drogas ilícitas, proporção significativamente superior ao sexo feminino 16,9% (12/71) ($p < 0,01$) (Figura 18). Dezenove indivíduos incluídos no estudo viviam em situação de rua (8,5%), dos quais 16 no município de Florianópolis, sendo todos do sexo masculino. Considerando a população de Florianópolis (469.690) e o número de casos de TB do município incluídos no estudo no período de dois anos (135), observou-se um risco 131,23 vezes maior de adoecer por TB entre as pessoas que vivem em situação de rua (IC 95% = 79,45-220,05).

Figura 18: Distribuição da população estudada segundo hábitos de vida considerados fatores de risco para tuberculose, segundo o gênero dos indivíduos do estudo

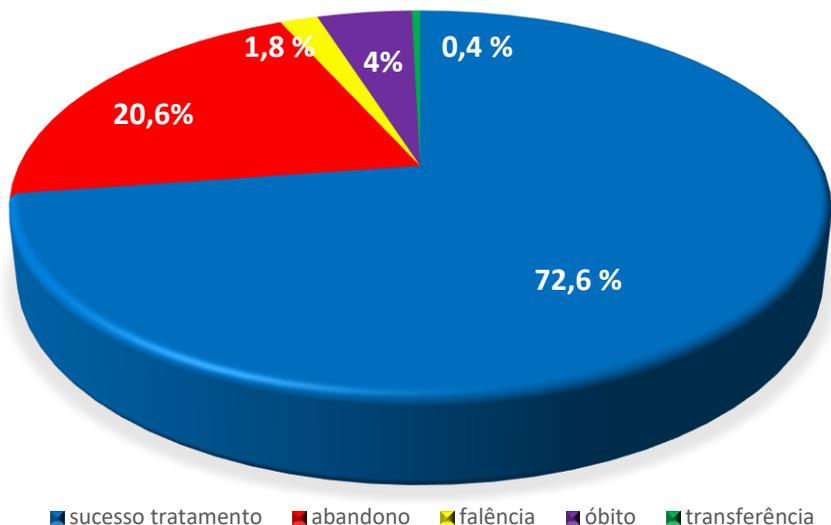


Fonte: a autora

5.4 Desfecho dos Casos de Tuberculose do Estudo

Dos 223 pacientes acompanhados, 162 (72,6%) evoluíram para desfechos favoráveis com sucesso no tratamento, 46 (20,6%) abandonaram o tratamento, quatro (1,8%) tiveram cultura positiva a partir do quarto mês sendo caracterizada falência terapêutica, 10 (4,5%) foram a óbito durante o tratamento e um (0,4%) foi transferido para outro Estado com perda de seguimento (Figura 19).

Figura 19: Distribuição em porcentagem dos casos de tuberculose pulmonar confirmados por cultura, segundo o desfecho do tratamento, entre os pacientes acompanhados no estudo.



Fonte: a autora

Os 223 casos realizaram tratamento com o esquema básico (RHZE). O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado para 204 isolados de *M. tuberculosis*, em 19 isolados, o teste não foi realizado no LACEN/SC devido ao pequeno número de colônias na cultura primária. Entre os isolados testados, 95,6% (195/204) apresentaram sensibilidade aos quatro antimicrobianos testados (rifampicina, isoniazida, etambutol e estreptomicina). Foram identificadas monorresistência aos quatro fármacos, sendo uma à rifampicina (0,5%), uma ao etambutol (0,5%), uma à estreptomicina (0,5%) e 5 à isoniazida (2,5%), além de um caso de polirresistência (isoniazida+estreptomicina). Associando-se as resistências identificadas nos microrganismos ao desfecho clínico, o caso resistente à rifampicina foi a óbito; o resistente ao etambutol e dois casos resistentes à isoniazida abandonaram o tratamento; e quatro resistentes à isoniazida evoluíram para cura, incluindo o polirresistente. Em 18 casos, o esquema primário foi prorrogado por nove meses (2RHZE/7RH), entre eles, os quatro

resistentes à isoniazida que evoluíram para cura, três com comorbidades associadas à TB e 11 entre os casos que apresentaram baciloscopia de controle positiva no quarto mês de tratamento com cultura negativa, todos alcançaram sucesso terapêutico. Além dos 11 casos que prorrogaram o tratamento, outros sete apresentaram baciloscopia positiva no quarto mês de tratamento, três abandonaram o tratamento e quatro foram considerados falha terapêutica, pois a cultura também permaneceu positiva no período.

5.5 Associação entre Desfecho e Variáveis Epidemiológicas

Buscando-se compreender as baixas taxas de sucesso no tratamento da TB pulmonar na região estudada, a primeira análise realizada foi a associação do desfecho com as variáveis epidemiológicas de interesse. Análise univariada evidenciou maior sucesso no tratamento entre o sexo feminino ($p=0,02$), em indivíduos do sexo masculino a probabilidade de desfecho favorável diminuiu 18% (IC 95% = 0,71-0,96). Apesar da faixa etária não apresentar diferenças significativas relacionadas ao sucesso no tratamento, os indivíduos com idade entre 55-64 anos, apresentaram maior probabilidade de sucesso no tratamento, sendo 1,36 vezes maior (IC 95%: 1,11-1,68) quando comparado à faixa etária mais jovem (Tabela 4).

Avaliando-se fatores de risco clássicos associados à TB, como o tabagismo, o estudo mostrou que a exposição diminuiu a probabilidade de sucesso no tratamento em 25% (IC 95 % = 0,64-0,88). O abuso de álcool diminuiu a probabilidade de sucesso no tratamento em 26% (IC 95 % = 0,64-0,91). No entanto, as piores associações foram relacionadas ao uso de drogas ilícitas, que diminuiu a probabilidade de sucesso no tratamento em 44% (IC 95 % = 0,43-0,72), e a viver em situação de rua, que diminuiu a em 51% (IC 95 % = 0,27-0,88). A probabilidade de resultados favoráveis no tratamento também foi significativamente menor nos pacientes HIV soropositivos ($p<0,01$) (Tabela 4). Dos 41 pacientes soropositivos do estudo 51,2% (21/41) obtiveram sucesso no tratamento, sendo que 31,7% (13/41) abandonaram e 14,6% (6/41) foram a óbito. A soropositividade para HIV diminuiu 34% (IC 95% = 0,48-0,90) a probabilidade de sucesso no tratamento, e aumentou em 7,85 (IC 95% = 2,05-30,08) vezes o risco de morte. Entre os 25 pacientes soropositivos que realizaram contagem de CD4, não houve diferença significativa para as contagens acima ou abaixo de 200 células/mm³ ($p=0,26$), possivelmente devido ao pequeno número de casos, no entanto, observou-se que em 80% (4/5) dos coinfectados que foram a óbito a quantificação

de CD4 foi <200 células/mm³. Além disso, a soropositividade para HIV foi significativamente associada ao tabagismo, uso de drogas ilícitas, abuso de álcool ($p < 0,01$).

Tabela 4: Análise univariada, com risco relativo e intervalo de confiança de 95%, para os casos de sucesso no desfecho tratamento entre os pacientes estudados.

Variáveis (N)	SUCESSO NO TRATAMENTO			
	N(%)	RR	IC 95%	p
Sexo				
Masculino (145)	98 (67,6)			
Feminino (78)	64 (82,1)	0,82	0,71-0,96	0,02 ^a
Faixa etária (anos)				
15-24 (44) ^b	31 (70,5)			
25-34 (67)	49 (73,1)	1,04	0,82-1,32	
35-44 (43)	29 (67,4)	0,96	0,72-1,27	
45-54 (36)	24 (66,7)	0,91	0,66-1,24	
55-64 (26)	25 (96,1)	1,36	1,11-1,68	
≥ 65 (7)	4 (57,1)	0,81	0,42-1,58	0,07
Escolaridade				
Ensino fundamental (146) ^b	98 (67,1)			
Ensino médio (55)	45 (81,8)	-	-	
Ensino Superior (22)	19(86,4)			0,04 ^a
Tabagismo				
Não (73)	63 (86,3)			
Sim (134)	87 (64,9)	0,75	0,64-0,88	<0,01 ^a
Abuso de álcool				
Não (127)	100 (78,7)			
Sim (74)	43 (58,1)	0,74	0,60-0,91	<0,01 ^a
Uso de drogas ilícitas				
Não (130)	110 (84,6)			
Sim (68)	32 (47,1)	0,56	0,43-0,72	<0,01 ^a
Vivendo em situação de rua				
Não (204)	154 (75,5)			
Sim (19)	7 (36,8)	0,49	0,27-0,88	<0,01 ^a
HIV				
Negativo (158)	123 (77,8)			
Positivo (41)	21 (51,2)	0,66	0,48-0,90	<0,01 ^a

^a $p < 0,05$

^b variável utilizada como referência para cálculo do RR

RR: Risco Relativo;

IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%;

Ao utilizar o modelo de regressão logística para as variáveis associadas ao sucesso no tratamento entre os dados do presente estudo, com o objetivo de estimar o papel das variáveis independentes que atuam multiplicativamente sobre a chance de sucesso, observou-se que a baixa escolaridade, soropositividade para HIV e o uso de drogas ilícitas foram fatores preditivos independentes associados a desfechos desfavoráveis no tratamento (Tabela 5 e Figura 20).

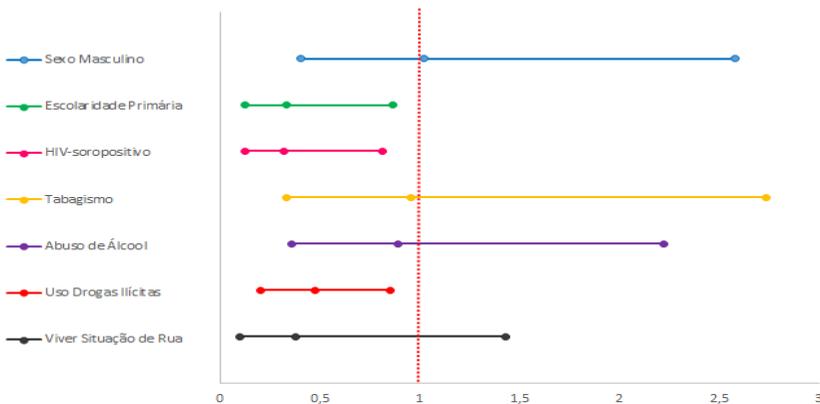
Tabela 5: Regressão logística, com *odds ratio* e intervalo de confiança de 95% para desfecho sucesso no tratamento nos pacientes do estudo.

Variáveis	p ^a	OR ^b	Intervalo de Confiança de 95%	
			Inferior	Superior
Sexo Masculino	0,96	1,023	0,406	2,578
Escolaridade Primária	0,02 ^a	0,329	0,125	0,866
HIV-soropositivo	0,02 ^a	0,320	0,126	0,811
Tabagismo	0,93	0,952	0,331	2,737
Abuso de Álcool	0,81	0,893	0,359	2,224
Drogas Ilícitas	<0,01 ^a	0,200	0,85	0,473
Viver em Situação de Rua	0,15	0,377	0,100	1,430

^a $p \leq 0,05$

^b OR = *odds ratio*

Figura 20: *Odds ratio* e intervalo de confiança de 95% para o desfecho sucesso no tratamento entre os pacientes do estudo, utilizando modelo multivariável.



Fonte: a autora

5.6 Genotipagem dos Isolados do Estudo

Foram incluídos no estudo 223 isolados de *M. tuberculosis*, um por paciente. A análise dos isolados por metodologia de *Spoligotyping* foi realizada para 219 isolados, sendo que 4 não amplificaram/hibridizaram. A metodologia possibilitou a identificação de 65 diferentes *spoligotypes* (Figura 21), 89,5% (196/219) dos isolados pertenciam a 48 *Spoligotypes* International Type (SIT), 3,7% (8/219) a cinco diferentes perfis *Orphan* e 6,8% (15/219) a 12 diferentes perfis ainda não registrados no SpolDB4 (perfis desconhecidos). Os perfis que não foram classificados em família/subfamília na plataforma SITVIT-WEB (SpolDB4), foram analisados posteriormente na plataforma Spotclust, que possibilitou determinar a similaridade dos perfis não classificados com famílias já descritas (Tabela 6).

Figura 21: Representação de todos os *spoligotypes* encontrados nos isolados de *M. tuberculosis* incluídos no estudo, classificação segundo SITVIT-WEB.

SIT	Perfil	Família e Subfamília	Isolados N (%)
2		H2	1 (0,5)
4		NC	2 (0,9)
17		LAM2	17 (7,8)
20		LAM1	9 (4,1)
33		LAM3	2 (0,9)
34		S	1 (0,5)
39		T4-CEU1	1 (0,5)
42		LAM9	21 (9,6)
44		T5	1 (0,5)
47		H1	3 (1,4)
50		H3	9 (4,1)
51		T1	2 (0,9)
52		T2	1 (0,5)
53		T1	6 (2,7)
59		LAM11-ZW	2 (0,9)
60		LAM4	2 (0,9)
64		LAM6	11 (5,0)
65		T1	10 (4,6)
73		T	12 (5,5)
86		T1	1 (0,5)
91		X3	1 (0,5)
93		LAM5	2 (0,9)

119		X1	4 (1,8)
137		X2	5 (2,3)
176		LAM6	1 (0,5)
177		LAM9	4 (1,8)
179		LAM2	2 (0,9)
194		LAM2	1 (0,5)
211		LAM3	1 (0,5)
216		LAM5	24 (11,0)
237		NC	1 (0,5)
241		T1	3 (1,4)
388		LAM9	1 (0,5)
433		H3	1 (0,5)
729		LAM1	3 (1,4)
823		T1	5 (2,3)
866		LAM9	3 (1,4)
908		LAM2	1 (0,5)
1241		NC	1 (0,5)
1321		Ambigou	1 (0,5)
1537		LAM3	1 (0,5)
1580		T1	1 (0,5)
1694		LAM2	1 (0,5)
2512		LAM1	1 (0,5)
2514		LAM4	4 (1,8)
2571		NC	1 (0,5)
3099		NC	6 (2,7)
4004		NC	2 (0,9)
Orph1		LAM4	3 (1,4)
Orph2		LAM9	1 (0,5)
Orph3		LAM2	2 (0,9)
Orph4		S	1 (0,5)
Orph5		Orphan	1 (0,5)
Unk1		NC	2 (0,9)
Unk2		NC	2 (0,9)
Unk3		NC	2 (0,9)
Unk4		NC	1 (0,5)
Unk5		NC	1 (0,5)
Unk6		NC	1 (0,5)
Unk7		NC	1 (0,5)
Unk8		NC	1 (0,5)
Unk9		NC	1 (0,5)
Unk10		NC	1 (0,5)
Unk11		NC	1 (0,5)
Unk12		NC	1 (0,5)

NC: não classificado no programa SITVIT-WEB/ Fonte: a autora

Tabela 6: Classificação por similaridade, utilizando a plataforma *Spotclust*, das prováveis famílias dos *Spoligotypes* não classificados ou desconhecidos segundo o SITVIT-WEB.

SIT	Linhagem Maior	Família e Subfamília	Isolados N
4	Euro-American	T1-RUS2	2
237	Euro-American	X2	1
1231	Euro-American	LAM1	1
1241	Euro-American	LAM	1
2571	Indo-Oceanic/ EuroAmerican	ZERO ^a	1
3099	Euro-American	LAM9	6
4004	Indo-Oceanic/EuroAmerica	H1	2
Orphan5	Indo-Oceanic/EuroAmerica	H1	1
Unknown1	Euro-American	LAM2	2
Unknown2	Euro-American	LAM4	2
Unknown3	Euro-American	LAM	2
Unknown4	Euro-American	LAM	1
Unknown5	Euro-American	LAM	1
Unknown6	Euro-American	H3	1
Unknown7	Euro-American	H3	1
Unknown8	Euro-American	H1	1
Unknown9	Euro-American	H3	1
Unknown10	Indo-Oceanic/EuroAmerica	ZERO ^b	1
Unknown11	Indo-Oceanic/EuroAmerica	ZERO ^a	1
Unknown12	<i>M. bovis</i>	PINI2	1

Fonte: a autora

Utilizando os resultados obtidos com a análise das duas plataformas de classificação, foram identificadas 6 famílias e 19 subfamílias: LAM (LAM1, LAM2, LAM3, LAM4, LAM5, LAM6, LAM9 e LAM11), T (T1, T1-RUS, T2, T4 e T5), H (H1, H2 e H3), X (X1, X2 e X3), S e BOVIS.

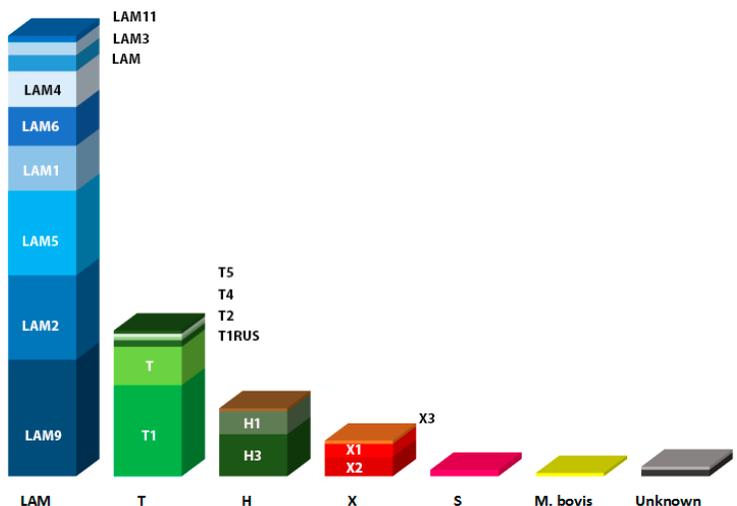
A linhagem *Latin-American-Mediterranean* (LAM) foi a mais frequente, representando 62,1% dos isolados (136/219), seguida da família T com 20,5% (45/219), da *Harleem* (H) com 9,6% (21/219), da X com 5,0% (11/219) e S com 0,9% (2/219) (Figura 21 e 22). Além dos isolados de *M. tuberculosis*, foi identificado no *Spotclust* um isolado de *M. bovis*. A figura 23 mostra a distribuição geográfica das subfamílias nos bairros com maior concentração de casos de TB durante o período estudado.

Entre as 19 subfamílias identificadas, LAM9 foi a mais frequente, representando 16,4% (36/219) dos isolados, seguida da T1 com 12,8% (28/219), LAM5 e LAM2, ambas com 11,9% (26/219), LAM1 com 6,4% (14/219), H3 com 5,9% (13/219), LAM6 e T com 5,5% (12/219) e LAM4 com 5,0% (11/219). As demais subfamílias representaram, isoladamente, menos de 3% dos isolados identificados (Figura 21 e 22).

Avaliando-se os 48 SITs identificados, o SIT216/LAM5 foi o mais frequente, representando 11,0% (24/219) dos isolados. Outros SITs identificados com maior frequência foram SIT42/LAM com 9,6% (21/219), SIT17/LAM2 com 7,8% (17/219), SIT73/T com 5,5% (12/219), SIT64/LAM6 com 5,0% (11/219), SIT 65/T1 com 4,6% (10/219), SIT50/H3 e SIT20/LAM1 ambos com 4,1% (9/219) (Figura 21).

Considerando a genotipagem por *Spoligotyping*, que encontrou 65 perfis entre os 219 (n) isolados do estudo, sendo 33 representados por apenas um isolado e 186 (nc) isolados agrupados em 32 (c) clusters (2 a 24 isolados) (Figura 24), podemos aplicar a equação para calcular de maneira simplificada o índice de transmissão recente (ITR_{n-1}) [$ITR_{n-1}=(nc-c)/n$], sendo n o número total de isolados, nc o número de isolados em *clusters*, c o número de *clusters* (WADA, et al., 2009). O índice calculado utilizando-se somente o *spoligotyping*, que isoladamente não representa um alto poder discriminatório, mostra uma taxa de transmissão recente de 0,70, ou seja, 70% dos isolados circulantes na região estariam associados a transmissão recente da TB e não a reativação, baseado nos dados de *Spoligotyping*, um número provavelmente superestimado. O cluster representado pelo SIT216/LAM5 teria um ITR_{n-1} de 0,85, o SIT50/H3 teria um ITR_{n-1} de 0,69, o SIT17/LAM2 teria um ITR_{n-1} de 0,5, o SIT42/LAM9 que representa o segundo mais frequente teria um ITR_{n-1} de 0,47, e os SIT73/T e SIT64/LAM6 teriam um ITR_{n-1} de 1,0.

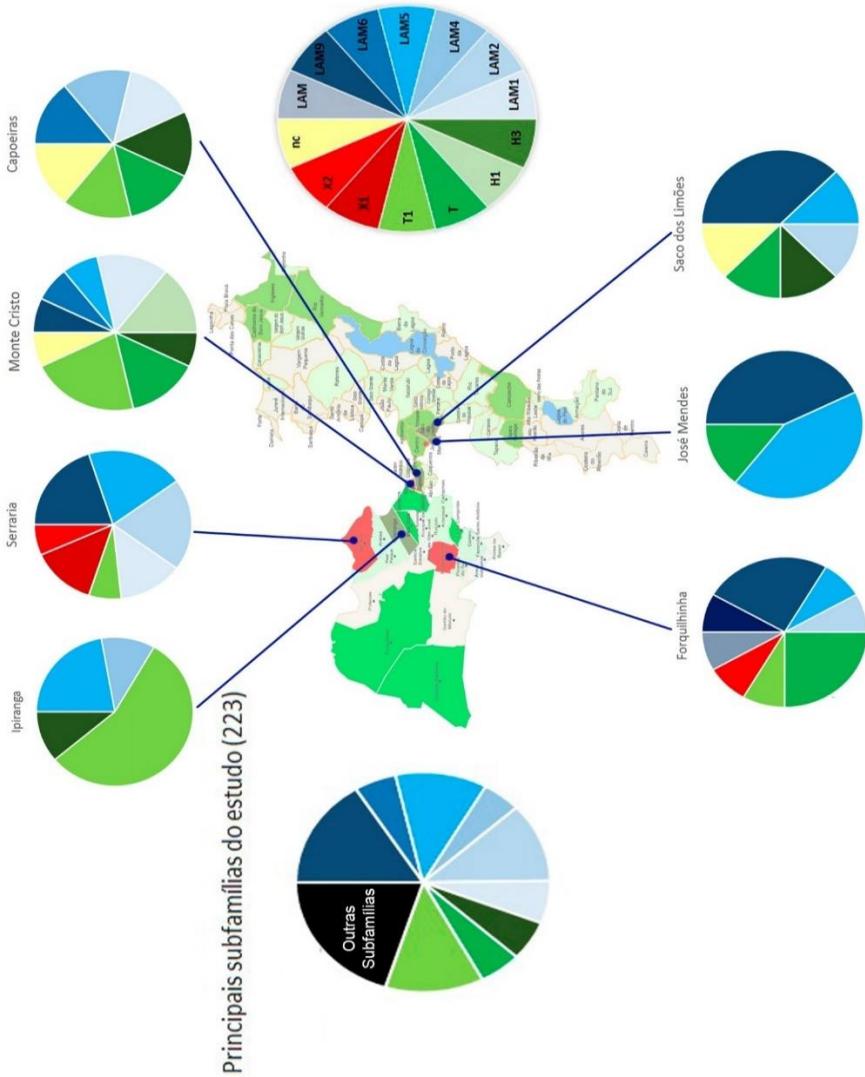
Figura 22: Distribuição das famílias e subfamílias segundo genotipagem por metodologia de *Spoligotyping* de isolados de *M. tuberculosis* do estudo



T descrito dentro da linhagem T é representado por isolados do SIT73/T
 Fonte: a autora

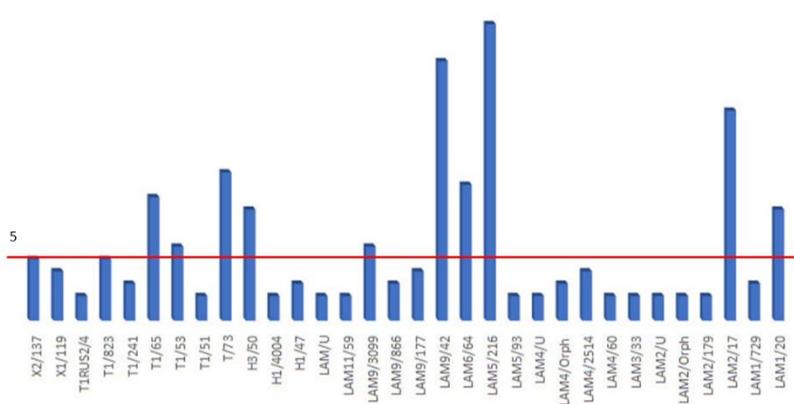
A variação genotípica caracterizada pela presença da deleção RD^{Rio} foi detectada em 33,6% (75/223) dos isolados estudados. Todas as deleções foram identificadas na linhagem LAM, compreendendo 16 perfis diferentes, compostos por seis perfis únicos e 10 clusters (2 a 17 isolados). A sublinhagem LAM2 representou 38,2% (26/68) dos isolados, e também o maior cluster SIT17/LAM2 (17 isolados), LAM9 representou 27,9% (19/68) dos isolados e o terceiro maior cluster SIT42/LAM9 (oito isolados), LAM1 representou 20,6% (14/68) e o segundo maior cluster (nove isolados), LAM4 com 13,2% (9/68), LAM5 e LAM11 com 2,9% (2/68), e 4,4% (3/68) foram classificados apenas como linhagem LAM. Portanto, 100% dos isolados da sublinhagem LAM2, LAM1 e LAM11 apresentaram a deleção RD^{Rio}, nas demais sublinhagens a deleção foi encontrada em 81,8% (9/11) dos isolados LAM4, 52,8% (19/36) dos LAM9, e 7,7% (2/26) dos LAM5 (Figura 25). Nas sublinhagens LAM3 e LAM6 não foram observados isolados com a presença da deleção RD^{Rio} (Figura 25).

Figura 23: Distribuição das principais linhagens de *M. tuberculosis* isoladas no estudo e nos bairros com mais de sete casos de TB durante o período estudado.



Gráficos em pizza representam a distribuição das linhagens nos bairros
 Fonte: a autora

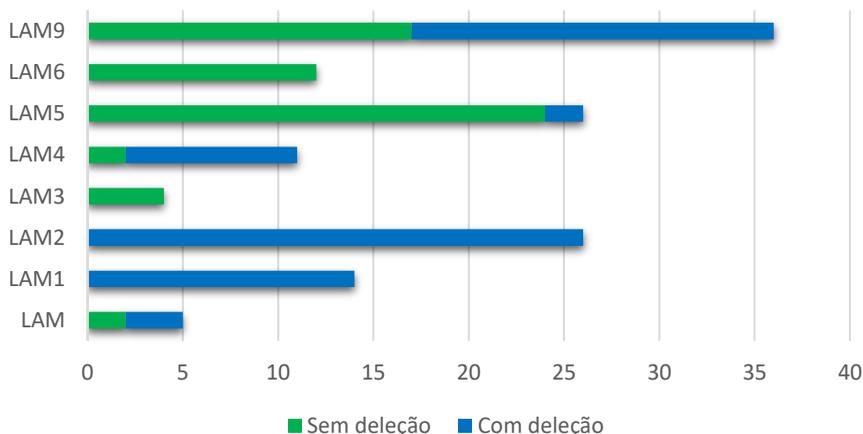
Figura 24: Representação gráfica dos *clusters* definidos por *spoligotyping* entre *M. tuberculosis* isolados na região da grande Florianópolis no período de 2 anos.



Linha vermelha representa o ponto definido pelo estudo para separar os principais SITs circulantes na região (>5 isolados/SIT).

Fonte: a autora

Figura 25: Distribuição da deleção RD^{Rio} entre os isolados da linhagem LAM, segundo as subfamílias.



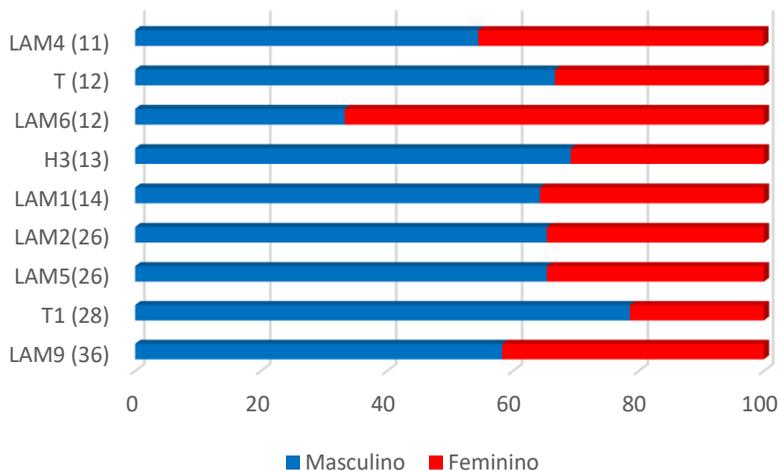
Fonte: a autora

5.7 Associação entre Genotipagem, Deleção RD^{Rio}, População Estudada e Desfecho

Avaliando-se as linhagens genéticas (famílias e subfamílias), não houve diferença significativa associada à distribuição dos indivíduos em relação ao gênero ($p=0,70$). No entanto, observando-se as principais subfamílias do estudo, verifica-se que 78,6% (22/28) dos indivíduos com subfamília T1, 69,2% (9/13) da H3 e 66,7% (8/12) da T, eram do sexo masculino (Figura 26). Na família LAM a proporção de indivíduos do sexo feminino foi um pouco maior, sendo que a sublinhagem LAM6 foi a única que apresentou predominância de indivíduos do sexo feminino, 66,7% (8/12) (Figura 26).

Agrupando-se as principais subfamílias encontradas no estudo segundo hábitos que poderiam estar associados com a via de transmissão da TB, foi observada associação entre as linhagens de *M. tuberculosis* e pessoas vivendo em situação de rua ($p<0,01$). A avaliação dos *spoligo*types entre os 19 isolados de pacientes vivendo em situação de rua, mostrou que dois isolados pertenciam à subfamília H3, dois à T1, dois à T1-RUS, dois a X2, e os demais eram perfis únicos. Não foi observada diferença significativa em relação à distribuição das linhagens em pacientes que utilizavam drogas ilícitas, abusavam de álcool, ou eram tabagistas ($p=0,39$, $p=0,13$, $p=0,88$ respectivamente). No entanto, ao avaliar a proporção de isolados dentro de cada sublinhagem associada aos mesmos hábitos, observou-se que a sublinhagem LAM9 foi isolada predominantemente entre usuários de drogas ilícitas (51,5%) e H3 entre aqueles que abusavam de álcool (50,0%), sendo que T1 foi isolada em grande proporção em ambos (Figura 27). Ao avaliar os principais SITs dentro de cada sublinhagem, o SIT3099 classificado pelo *Spotclust* como LAM9 e representado no estudo por apenas 6 isolados, destacou-se entre os demais pela alta proporção de usuários de drogas ilícitas (83,3%) e alcoolistas (66,7%). Da mesma forma, o SIT65/T1 apresentou alta proporção de ambos, e os SITs 42/LAM9 e 73/T alta proporção de usuários de drogas ilícitas (Figura 28).

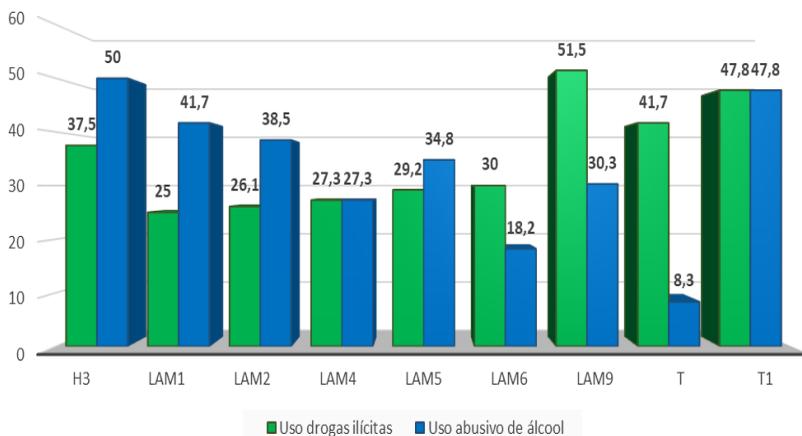
Figura 26: Distribuição das subfamílias mais frequentes segundo o gênero dos indivíduos do estudo



Principais subfamílias (número de isolados)

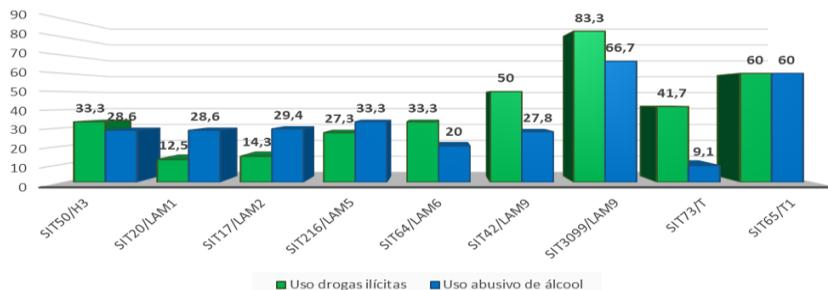
Fonte: a autora

Figura 27: Proporção dentro das principais sublinhagens dos indivíduos segundo hábito de utilização de drogas ilícitas e uso abusivo de álcool.



Fonte: a autora

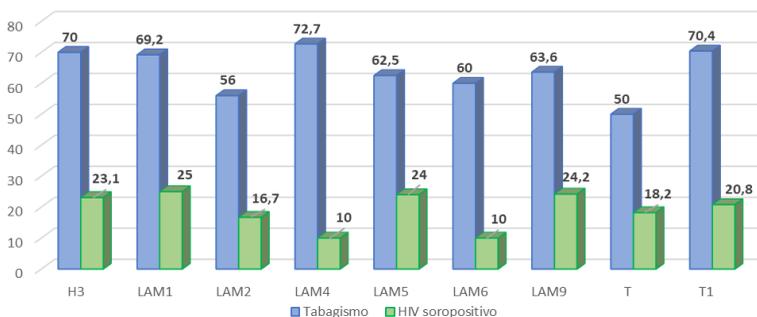
Figura 28: Proporção dentro dos principais SITs dos indivíduos segundo hábito de utilização de drogas ilícitas e uso abusivo de álcool.



Fonte: a autora

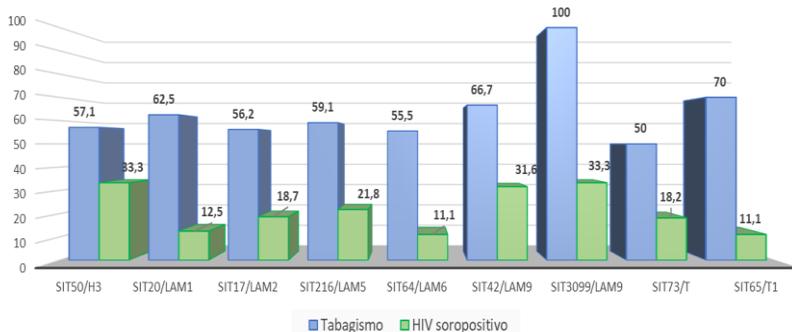
Entre os tabagistas, a proporção de indivíduos em cada sublinhagem foi semelhante, sendo a menor porcentagem observada na subfamília T (50%) e a maior em LAM4 (72,7%) ($p=0,91$). Entre os pacientes HIV soropositivos, não houve diferença significativa na distribuição das sublinhagens ($p=0,91$). No entanto, foi observada baixa proporção de indivíduos soropositivos nas sublinhagens LAM4 e LAM6 (10%), sendo as maiores porcentagens observadas em LAM1 (25%), LAM9 (24,2%) e LAM5 (24%) (Figura 29). Ao avaliar os principais SITs dentro de cada sublinhagem, novamente o SIT3099/LAM9 destacou-se entre os demais, todos os indivíduos eram tabagistas além da alta proporção de soropositivos para HIV (33,3%). Da mesma forma, para os SITs 50/H3 e 42/LAM aproximadamente um terço dos indivíduos eram soropositivos para HIV (33,3 e 31,6%, respectivamente) (Figura 30).

Figura 29: Proporção dentro das principais sublinhagens dos indivíduos segundo tabagismo e soropositividade para HIV.



Fonte: a autora

Figura 30: Proporção dentro dos principais SITs dos indivíduos segundo tabagismo e soropositividade para HIV.



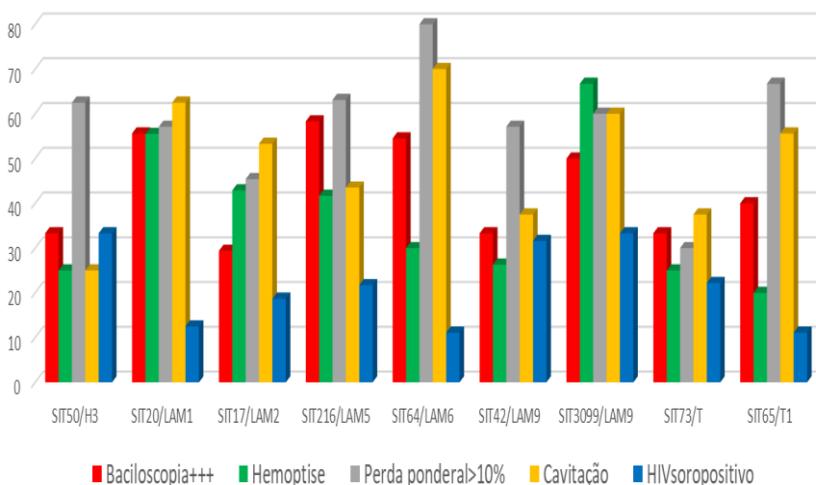
Fonte: a autora

Associando características clínicas relacionadas a maior transmissibilidade e maior gravidade da doença com os principais SITs encontrados no estudo, observou-se que mais da metade dos indivíduos infectados por *M. tuberculosis* classificado como SIT20/LAM1 apresentaram alta carga bacilar, hemoptise, perda ponderal severa e cavitação, SIT com predominância de indivíduos soronegativos para HIV. Aproximadamente 60% dos indivíduos com microrganismos pertencentes ao SIT216/LAM5 apresentaram alta carga bacilar. A maior proporção de hemoptise foi observada nos indivíduos infectados por microrganismos do SIT3099/LAM9, sendo que os seis indivíduos realizaram diagnóstico em menos de oito semanas, SIT que também apresentou perda ponderal severa e presença de cavitação em aproximadamente 60% dos indivíduos, sendo que um terço deles eram HIV soropositivos. O SIT64/LAM6 apresentou maior proporção de perda ponderal severa (80%) e presença de cavitação (70%), sendo a menor proporção de indivíduos HIV soropositivos (11,1%) (Figura 31).

Para o SIT 216/LAM5 que apresentou a maior proporção de indivíduos com alta carga bacilar no diagnóstico (58,3%), aproximadamente 62% realizou baciloscopia de controle no segundo mês de tratamento, dos quais 33,3% permaneceram positivas, e entre os 41,7% que realizaram controle no quarto mês, todas negativaram. Por outro lado, para o SIT20/LAM1, que apresentou 55,6% de indivíduos com alta carga bacilar no diagnóstico, 75% dentre os 44,4% que realizaram a baciloscopia de controle no segundo mês permaneceram positivas, e dos 55,5% que realizaram controle no quarto mês 20% mantiveram positividade. No SIT50/H3, aproximadamente um terço dos indivíduos

apresentou alta carga bacilar no diagnóstico, sendo que entre os 55,5% que realizaram controle no segundo mês, 66,7% das baciloscopias permaneceram positivas e 20% permaneceram positivas no quarto mês de tratamento. No entanto, o SIT relacionado a maior proporção de baciloscopias positivas no quarto mês de tratamento foi o 73/T, para o qual, entre os 41,7% dos indivíduos que realizaram a baciloscopia de controle no quarto mês, 60% foram positivas (Figura 32).

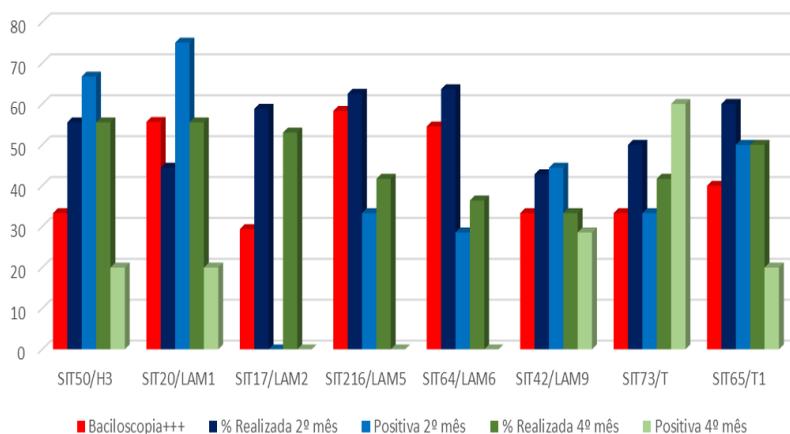
Figura 31: Proporção dentro dos principais SITs dos indivíduos segundo alta carga bacilar, presença de hemoptise, perda ponderal superior a 10% do seu peso, presença de cavitação e soropositividade para HIV.



Fonte: a autora

A deleção RD^{Rio}, presente em 33,6% dos isolados de *M. tuberculosis* do estudo, foi mais frequente em microrganismos isolados de indivíduos do sexo feminino 41% do que entre os do sexo masculino (29,7%), mas a diferença não foi significativa ($p=0,09$) (Tabela 7). Quanto a faixa etária, foi observada maior proporção da deleção nos microrganismos isolados de indivíduos mais velhos, entre 55 a 60 anos (46,2%) e >65 anos (71,4%), nas faixas etárias mais jovens, a deleção esteve presente em aproximadamente 30% dos microrganismos isolados (Tabela 7). A deleção foi pouco frequente entre microrganismos isolados de indivíduos com maior escolaridade (18,2%).

Figura 32: Proporção dentro dos principais SITs dos indivíduos segundo alta carga bacilar no diagnóstico e permanência de baciloscopias positivas no segundo e quarto meses de tratamento, com as respectivas porcentagens de indivíduos que realizaram os controles.



Fonte: a autora

Associando-se à presença ou não de hábitos como tabagismo, uso de drogas ilícitas e abuso de álcool nos indivíduos do estudo, a distribuição de microrganismos com a deleção foi muito semelhante, próximo aos 30% para todas as variáveis. Da mesma forma em relação ao *status* HIV, a deleção foi observada em 34% dos microrganismos isolados tanto de pacientes soropositivos quanto de soronegativos. Entre os indivíduos vivendo em situação de rua foi observado o menor percentual de microrganismos apresentando a deleção RD^{Rio} 15,8% ($p=0,04$) (Tabela 7).

No presente estudo, não foi observada associação entre a presença da deleção RD^{Rio} e alta carga bacilar (BAAR +++), a proporção de indivíduos com as duas variáveis foi de 24,7%, conseqüentemente, a presença da deleção não foi associada à maior transmissibilidade. Quando associada com variáveis relacionadas a maior gravidade da doença, como hemoptise, cavitação e nódulos, a presença de microrganismos com deleção foi relacionada significativamente ao aparecimento de nódulos nos exames radiológicos de imagens ($p=0,04$) (Tabela 8).

Tabela 7: Distribuição da sublinhagem RD^{Rio} de segundo o perfil dos indivíduos epidemiológicos do indivíduos do estudo.

Variável	Sem deleção RD ^{Rio} N(%)	Com deleção RD ^{Rio} N(%)	p	Total
Sexo				
Masculino	102 (70,3)	43 (29,7)	0,09	145 (65,0)
Feminino	46 (59,0)	32 (41,0)		78 (35,0)
Faixa etária				
15-24	30 (68,2)	14 (31,8)	0,18	44 (19,7)
25-34	45 (67,2)	22 (32,8)		67 (30,0)
35-44	31 (72,1)	12 (27,9)		43 (19,3)
45-54	26 (72,2)	10 (27,8)		36 (16,1)
55-64	14 (53,8)	12 (46,2)		26 (11,7)
>65	2 (28,6)	5 (71,4)		7 (3,1)
Escolaridade				
Fundamental	97 (66,4)	49 (33,6)	0,19	146 (65,5)
Nível médio	33 (60,0)	22 (40,0)		55 (24,6)
Nível superior	18 (81,8)	4 (18,2)		22 (9,9)
Tabagismo				
Sim	87 (64,9)	47 (34,6)	0,94	134 (60,1)
Não	47 (64,4)	26 (32,2)		73 (32,7)
Não informou				16 (7,2)
Uso abusivo de álcool				
Sim	49 (66,2)	25 (33,8)	0,65	74 (33,2)
Não	80 (63,0)	47 (37,0)		127 (56,9)
Não informou				22 (9,9)
Uso de drogas ilícitas				
Sim	45 (66,2)	23 (33,8)	0,83	68 (30,5)
Não	84 (64,6)	46 (35,4)		130 (58,3)
Não informou				25 (11,2)
Vivendo em situação de rua				
Sim	17 (84,2)	2 (15,8)	0,04 ^a	19 (8,5)
Não	131 (66,0)	73 (34,0)		204 (91,5)
HIV				
Negativo	104 (65,8)	54 (34,2)	0,99	158 (70,8)
Positivo	27 (65,9)	14 (34,1)		41 (18,4)
Não testado				24 (10,8)

^a p ≤ 0,05

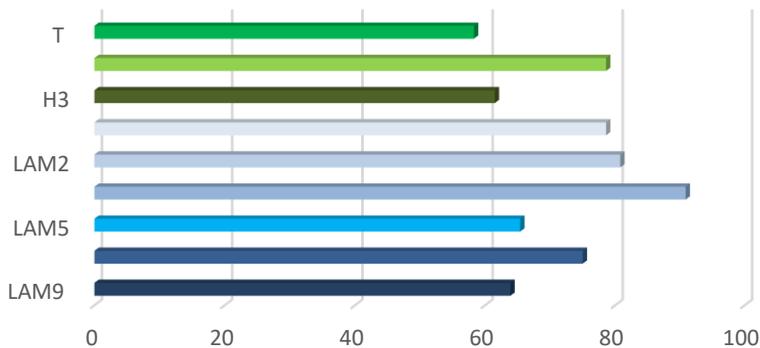
Tabela 8: Distribuição da sublinhagem RD^{Rio} de acordo com variáveis associadas a maior transmissibilidade e/ou gravidade da TB na grande Florianópolis (2014-2016).

	Sem deleção RD^{Rio} N(%)	Com deleção RD^{Rio} N(%)	p^a	Total
Hemoptise				
Sim	40 (60,6)	26 (39,4)		66 (31,7)
Não	100 (70,4)	42 (29,6)	0,16	142 (68,3)
Cavitação				
Sim	58 (65,2)	31 (34,8)		89 (46,4)
Não	69 (67,0)	34 (33,0)	0,79	103 (53,6)
Nódulos				
Sim	18 (51,4)	17 (48,6)		35 (18,2)
Não	109 (69,4)	48 (30,6)	0,04	157 (81,8)
Carga bacilar				
3+	74 (75,3)	26 (24,7)		93 (44)
3+	30 (58,8)	20 (41,2)		51 (24)
2+	42 (61,8)	29 (38,2)	0,23	68 (32)
≤1+				

^a p ≤ 0,05

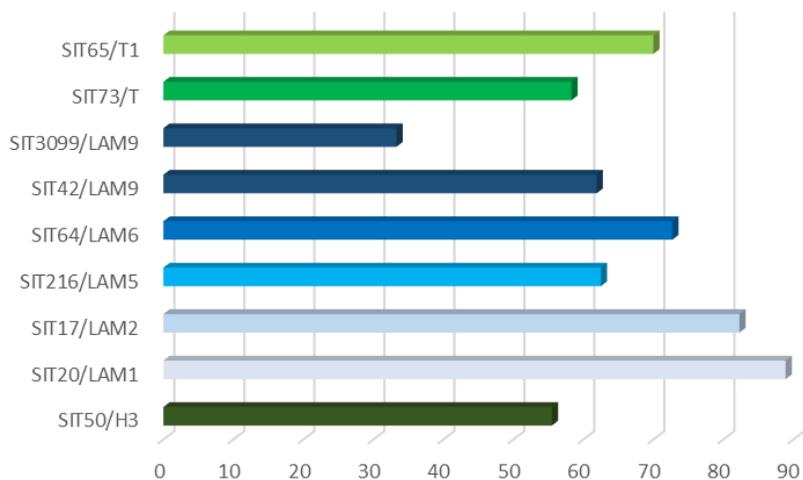
Não houve diferença significativa entre o desfecho do tratamento e as diferentes subfamílias (p=0,21) ou entre os diferentes SITs (p=0,34). A associação entre as principais subfamílias do estudo ao desfecho, mostrou maior proporção de sucesso no tratamento em indivíduos com infecção por microrganismos da linhagem LAM4 (90,9%), sendo as menores proporções de cura associadas à T (58,3%), H3 (61,5%) e LAM9 (63,9%) (Figura 33). Quando avaliamos os principais SITs associados ao desfecho do tratamento, SIT3099/LAM9 teve desfecho favorável em somente 33% dos indivíduos, SIT50/H3 em 55,5%, SIT73/T em 58,3%, SIT42/LAM9 em 61,9%, e SIT216/LAM5 em 62,5% (Figura 34).

Figura 33: Proporção do desfecho sucesso no tratamento associado às principais subfamílias encontradas entre os microrganismos isolados no estudo.



Fonte: a autora

Figura 34: Proporção do desfecho sucesso no tratamento associado aos principais SITs encontrados entre os microrganismos isolados no estudo.



Fonte: a autora

A tabela 9 mostra a distribuição de microrganismos com a deleção RD^{Rio} segundo o desfecho de sucesso ou insucesso do tratamento. A proporção de deleção permaneceu em torno dos 30%, não havendo correlação significativa com nenhum desfecho específico.

Tabela 9. Desfecho do tratamento para TB de acordo com a presença da deleção RD^{Rio} entre os pacientes acompanhados na grande Florianópolis (2014 – 2016).

Desfecho	Total N (%)	Sem deleção RD^{Rio}	Com deleção RD^{Rio}	p^a
Sucesso no tratamento	161 (72,2)	103 (64,0)	58 (36,0)	
Insucesso no tratamento	62 (20,4)	45 (72,3)	17 (27,4)	0,22
Abandono	46 (20,6)	33 (71,7)	13 (28,3)	
Falência	4 (1,8)	4 (100)	-	
Óbito	10 (4,5)	7 (70,0)	3 (30)	

^ap ≤ 0,05

Considerando o desfecho favorável: sucesso no tratamento, associado a diferentes variáveis, a presença de microrganismos que apresentaram a deleção RD^{Rio} foi significativamente maior em indivíduos do sexo feminino (p=0,02) (Tabela 10). Entre os indivíduos do sexo feminino, a frequência de microrganismos com deleção foi superior ao sexo masculino (41% e 29,7%, respectivamente), do mesmo modo que o sucesso no tratamento (82,1%) (p=0,02).

5.8 Concentração Inibitória Mínima

Dos 223 isolados de *M. tuberculosis*, cinco microrganismos não cresceram em duas tentativas de repique e foram considerados inviáveis para realização do teste de sensibilidade. Em outros quatro isolados não foi possível a leitura por ambas as metodologias, resazurina e microscopia, um contaminou com leveduras e um por *Staphylococcus* spp, e dois deles não tiveram crescimento no poço controle. A CIM para isoniazida e rifampicina foi determinada para 214 isolados do estudo.

Tabela 10: Distribuição dos indivíduos que alcançaram sucesso no tratamento segundo variáveis de interesse e a presença ou ausência da deleção RD^{Rio} no estudo.

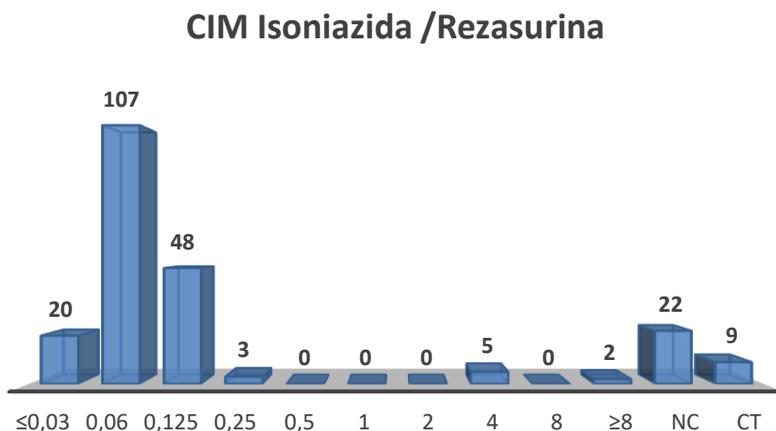
Variável	Sucesso no tratamento Sem deleção N(%)	Sucesso no tratamento Com deleção N(%)	p^a	Total
Sexo				
Masculino	69 (71,1)	28 (28,9)	0,02 ^a	97
Feminino	34 (53,1)	30 (46,9)		64
Faixa etária				
15-24	22 (71,0)	9 (29,0)	0,39	31
25-34	32 (65,3)	17 (34,7)		49
35-44	19 (65,5)	10 (34,5)		29
45-54	16 (69,6)	7 (30,4)		23
55-64	13 (52,0)	12 (48,0)		25
≥ 65	1(25,0)	3 (75,0)		4
Escolaridade				
≤ Ensino fundamental	61 (62,9)	36 (37,1)	0,12	97
Ensino médio	26 (57,8)	19 (42,2)		45
Ensino superior	16 (84,2)	3 (15,8)		19
Tabagismo				
Sim	54 (62,8)	32 (37,2)	0,91	86
Não	39 (61,9)	24 (38,1)		63
Abuso de álcool				
Sim	27 (64,3)	15 (35,7)	0,63	42
Não	60 (60,0)	40 (40,0)		100
Uso de drogas ilícitas				
Sim	21 (67,7)	10 (32,2)	0,49	31
Não	67	43		110
Vivendo em situação de rua				
Sim	6 (85,7)	1 (14,3)	0,22	7
Não	97 (63,0)	57 (37,0)		154
HIV				
Negativo	79 (64,2)	44 (35,8)	0,71	123
Positivo	12 (60)	8 (40)		20

^a p ≤ 0,05

Considerando-se determinação da CIM para isoniazida, na leitura utilizando-se oxirredução da Resazurina, em 9,3% (20/214) dos isolados não houve alteração na coloração dos controles, inviabilizando o resultado do teste devido a falta de crescimento do microrganismo (NC). Em 4,2% (9/214) houve alteração da coloração para tons rosa/roxo claros em vários poços, impossibilitando a determinação exata da CIM, na leitura posterior por microscopia os mesmos poços não apresentaram crescimento típico de micobactéria, somente um pequeno crescimento de fundo, e foram, por esse motivo, considerados como contaminação (CT). A Figura 35 apresenta a distribuição das CIMs por leitura colorimétrica. Por microscopia foi possível determinar a CIM de todos os 214 isolados após visualização do crescimento em corda ou emanharado típico de *M. tuberculosis*. Para os testes com Isoniazida, as leituras por microscopia realizadas após 10 e 14 dias de incubação apresentaram CIM idênticas, sua distribuição está representada na Figura 36. Comparando-se os resultados de leituras colorimétricas (oxirredução) e microscopia para Isoniazida, foram observadas diferenças de 1-log_2 em 6,5% (14/214) dos isolados, sendo que a microscopia foi 1-log_2 maior que a resazurina em 5,1% (11/214) e a resazurina foi 1-log_2 maior em 1,4% (3/214). Diferenças de 1-log_2 ou uma concentração, são consideradas concordantes e, portanto, aceitáveis para métodos de teste de sensibilidade por diluição segundo o documento M7A10/CLSI (2015), o estudo considerou discordantes diferenças $\geq 2\text{-log}_2$ entre as CIMs.

Na leitura da CIM para rifampicina por oxirredução da resazurina, 8,4% (18/214) dos isolados não apresentaram alteração na coloração dos controles, inviabilizando o resultado do teste devido a falta de crescimento do microrganismo (NC). Um isolado (0,5%) apresentou alteração da coloração para tons rosa/roxo claros em vários poços, impossibilitando a determinação exata da CIM, na leitura posterior por microscopia os mesmos poços não apresentaram crescimento típico de micobactéria, somente um pequeno crescimento de fundo, sendo considerado como contaminação (CT). A Figura 37 apresenta a distribuição das CIMs para rifampicina por leitura colorimétrica. Para os testes com rifampicina, houve diferenças entre as leituras realizadas após 10 dias de incubação e as leituras após 14 dias de incubação, a distribuição das CIMs segundo as leituras nos respectivos períodos são apresentadas na Figura 38.

Figura 35. Distribuição dos isolados de *M. tuberculosis* do estudo segundo a CIM para Isoniazida, determinada por oxirredução da resazurina.



Concentrações em µg/mL

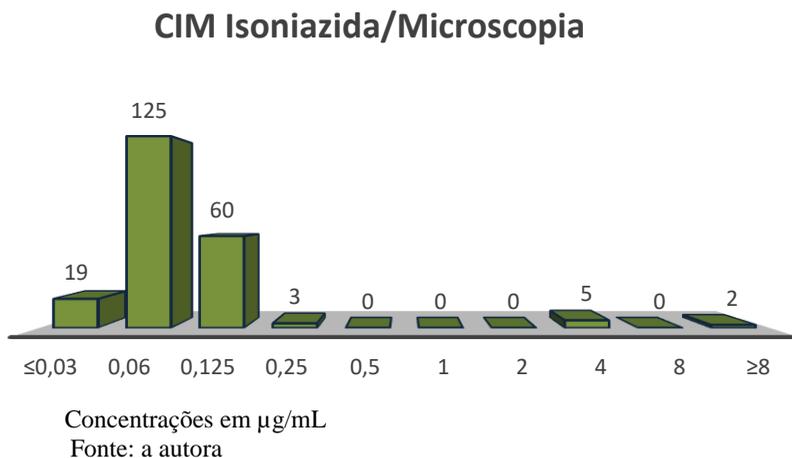
NC: não houve crescimento no poço controle

CT: contaminação, alteração de coloração não devida a crescimento de micobactéria

Fonte: a autora

Na leitura da CIM para rifampicina por oxirredução da resazurina, 8,4% (18/214) dos isolados não apresentaram alteração na coloração dos controles, inviabilizando o resultado do teste devido a falta de crescimento do microrganismo (NC). Um isolado (0,5%) apresentou alteração da coloração para tons rosa/roxo claros em vários poços, impossibilitando a determinação exata da CIM, na leitura posterior por microscopia os mesmos poços não apresentaram crescimento típico de micobactéria, somente um pequeno crescimento de fundo, sendo considerado como contaminação (CT). A Figura 37 apresenta a distribuição das CIMs para rifampicina por leitura colorimétrica. Para os testes com rifampicina, houve diferenças entre as leituras realizadas após 10 dias de incubação e as leituras após 14 dias de incubação, a distribuição das CIMs segundo as leituras nos respectivos períodos são apresentadas na Figura 38.

Figura 36. Distribuição dos isolados de *M. tuberculosis* do estudo segundo a CIM para Isoniazida, determinada por microscopia.

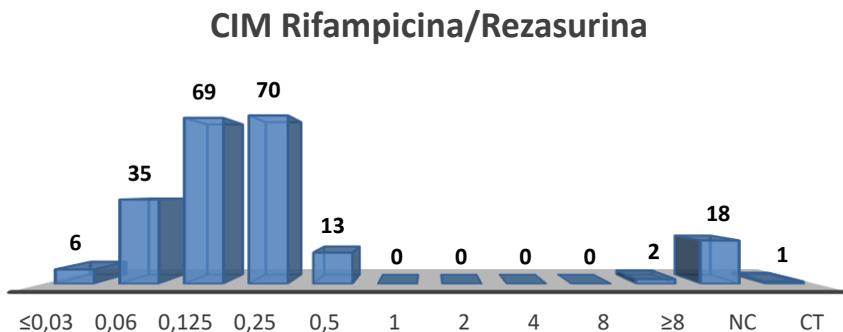


Na leitura da CIM para rifampicina por oxirredução da resazurina, 8,4% (18/214) dos isolados não apresentaram alteração na coloração dos controles, inviabilizando o resultado do teste devido a falta de crescimento do microrganismo (NC). Um isolado (0,5%) apresentou alteração da coloração para tons rosa/roxo claros em vários poços, impossibilitando a determinação exata da CIM, na leitura posterior por microscopia os mesmos poços não apresentaram crescimento típico de micobactéria, somente um pequeno crescimento de fundo, sendo considerado como contaminação (CT). A Figura 37 apresenta a distribuição das CIMs para rifampicina por leitura colorimétrica. Para os testes com rifampicina, houve diferenças entre as leituras realizadas após 10 dias de incubação e as leituras após 14 dias de incubação, a distribuição das CIMs segundo as leituras nos respectivos períodos são apresentadas na Figura 38.

As CIMs para rifampicina obtidas por leitura colorimétrica foram inferiores às leituras microscópicas após 10 dias de incubação em 57,0% (112/195) dos isolados, com resultados válidos para resazurina, em 3,6% (7/195) foram observadas diferenças $\geq 2\text{-log}_2$ entre as leituras, sendo considerados discordantes. Considerando-se as leituras por microscopia após 14 dias de incubação e por resazurina, as CIMs foram inferiores em 78% (152/195), em 26,1% (51/195) foram observadas diferenças de 2-log_2 , sendo consideradas discordantes (Tabela 10). As CIMs obtidas por

leitura microscópica após 14 dias de incubação foram superiores às realizadas após 10 dias de incubação em 1- \log_2 para 40,7% (87/214), os resultados foram considerados concordantes (Tabela 11)

Figura 37: Distribuição dos isolados de *M. tuberculosis* do estudo segundo a CIM para Rifampicina, determinada por oxirredução da resazurina.



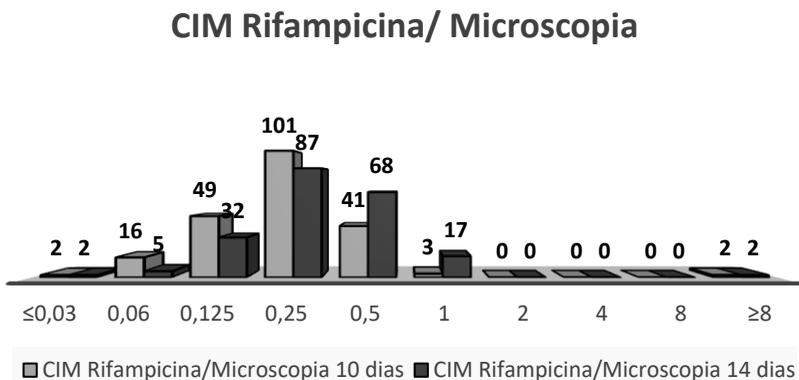
Concentrações em µg/mL

NC: não houve crescimento no poço controle

CT: contaminação, alteração de coloração não devida a crescimento de micobactéria

Fonte: a autora

Figura 38: Distribuição dos isolados de *M. tuberculosis* do estudo segundo a CIM para Rifampicina, determinada por microscopia com leituras em 10 e 14 dias de incubação.



Concentrações em µg/mL

Fonte: a autora

Tabela 11: Diferenças de leitura da CIM para os microrganismos do estudo, segundo método utilizado e o tempo de incubação, para Rifampicina.

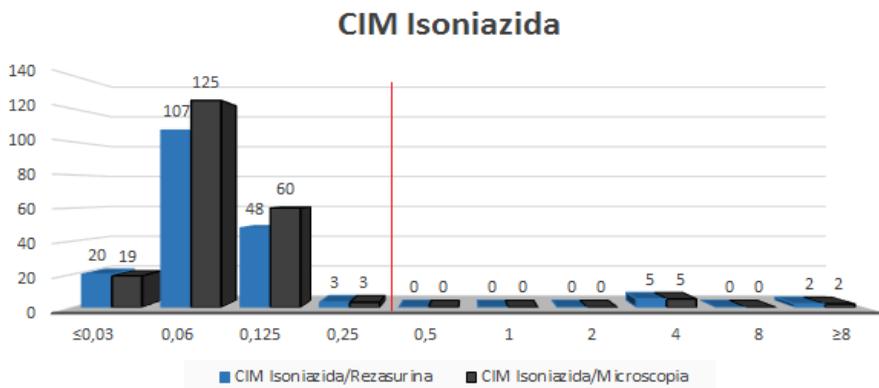
Resazurina	Microscopia 10 dias	Microscopia 14 dias	Nº de isolados	Total de isolados
+1 Log				
≤ 0,03	0,06	0,06	1	
0,06	0,12	0,12	8	
0,12	0,25	0,25	30	
0,25	0,5	0,5	19	
0,5	1	1	3	61
		+1 Log		
0,06	0,06	0,12	6	
0,12	0,12	0,25	11	
0,25	0,25	0,5	19	
0,5	0,5	1	4	40
	+1 Log			
NC	0,06	0,12	4	
NC	0,12	0,25	2	
NC	0,25	0,5	1	7
+1 Log	+1 Log	+1 Log		
<0,03	0,06	0,12	1	
0,06	0,12	0,25	16	
0,12	0,25	0,5	17	
0,25	0,5	1	10	44
	+2 Log	+1 Log		
<0,03	0,12	0,25	1	
0,06	0,25	0,5	2	3
	+2 Log			
0,06	0,25	0,25	2	
0,12	0,5	0,5	2	4

Concentrações em µg/mL

Considerando-se as concentrações críticas de 0,2 µg/mL/isoniazida e 1 µg/mL/ rifampicina para crescimento em meio sólido 7H10 segundo documento M7A10/CLSI (2015) e para crescimento em meio líquido no sistema automatizado (MGIT – BD, USA), os resultados obtidos pelos diferentes métodos de leitura foram considerados concordantes pois encontraram-se em uma mesma categoria

de sensibilidade, não sendo observados erros graves ou muito graves (Figuras 39 e 40).

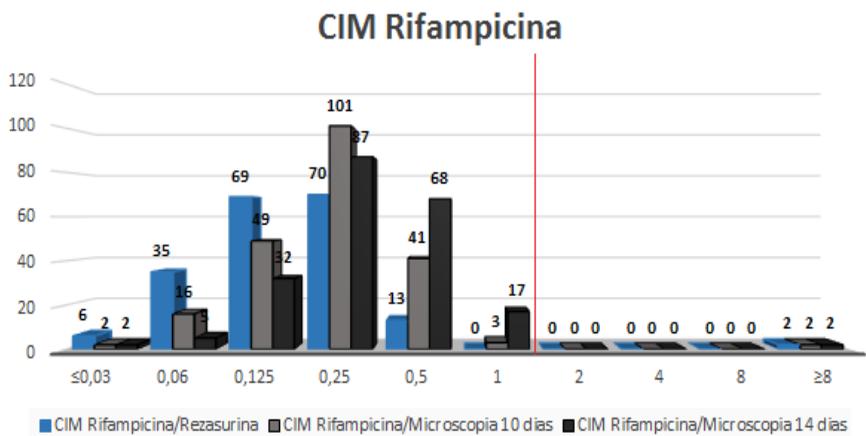
Figura 39: Distribuição das CIMs para Isoniazida, segundo o método e tempo de leitura, considerando a concentração crítica > 0,25 µg/mL.



Concentrações em µg/mL

Fonte a autora

Figura 40: Distribuição das CIMs para Rifampicina, segundo o método e tempo de leitura, considerando a concentração crítica > 1 µg/mL.



Concentrações em µg/mL

Fonte: a autora

No entanto, quando comparados aos resultados do MGIT 960 realizados no LACEN/SC, foram observadas discordâncias entre categorias. Para isoniazida foram descritos um erro grave, isolado classificado como sensível pelo MGIT apresentou CIM de 4 µg/mL na microdiluição em caldo, e três erros muito graves, isolados considerados resistentes pelo MGIT apresentaram CIM ≤0,03 e 0,06 µg/mL por microscopia e ≤0,03 e 0,12 µg/mL por oxirredução (Tabela 12). Para rifampicina foi observado um erro grave, isolado classificado como sensível pelo MGIT apresentou CIM 8 µg/mL na microdiluição em caldo (Tabela 13). Com base nestes resultados, o teste de microdiluição em caldo utilizado no presente estudo, apresentou sensibilidade de 50% e especificidade de 98,4% para isoniazida, e sensibilidade de 100% e especificidade de 95% para rifampicina (Tabela 14).

Tabela 12: Comparação entre os resultados de suscetibilidade para isoniazida por metodologia MGIT 960 (LACEN/SC) e por microdiluição em caldo com leitura por oxirredução (resazurina) e microscopia.

MGIT		N° isolados – CIM INH (µg/mL)							CT	NC	T
		≤0,03	0,06	0,12	0,25	4	8	≥8			
INH	Re	18	99	43	3	1		2	7	20	193
S	Mi	17	118	52	3	1	2	-	-	-	
INH	Re	1	-	1	-	3	-	-	1	-	6
R	Mi	1	2		-	3	-	-	-	-	
NR	Re	1	7	5	-	1	-	-	1	-	15
	Mi	1	5	8	-	1	-	-	-	-	

S: Sensível, R: Resistente; Re: leitura por oxiredução com resazurina; Mi: leitura por microscopia; CT: contaminação; NC: ausência de crescimento nos poços controles.

Destaque em cinza para resultados discordantes

Fonte: a autor

Tabela 13: Comparação entre os resultados de suscetibilidade para rifampicina por metodologia MGIT 960 (LACEN/SC) e por microdiluição em caldo com leitura por oxirredução (resazurina) e microscopia.

MGIT		N° isolados – CIM RIF (µg/mL)								CT	NC	Total
		≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	8	≥8			
RIF S	Re	6	34	62	66	11	-	1	-	-	18	198
	Mi10	2	16	45	95	38	-	1	-	-	-	
	Mi14	2	5	30	81	65	14	1	-	-	-	
RIF R	Re	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
	Mi10	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	
	Mi14	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	
NR	Re	-	1	7	4	2	2	-	-	1	-	15
	Mi10	-	-	4	6	3	-	-	-	-	-	
	Mi14	-	-	2	7	3	3	-	-	-	-	

S: Sensível, R: Resistente; Re: leitura por oxirredução com resazurina; Mi10: leitura por microscopia após 10 dias; Mi14: leitura por microscopia após 14 dias CT: contaminação; NC: ausência de crescimento nos poços controles.

Destaque em cinza para resultados discordantes

Fonte: a autor

Tabela 14: Sensibilidade e especificidade para o teste de sensibilidade por microdiluição em caldo, utilizando como referência a metodologia MGIT960 recomendada pela OMS.

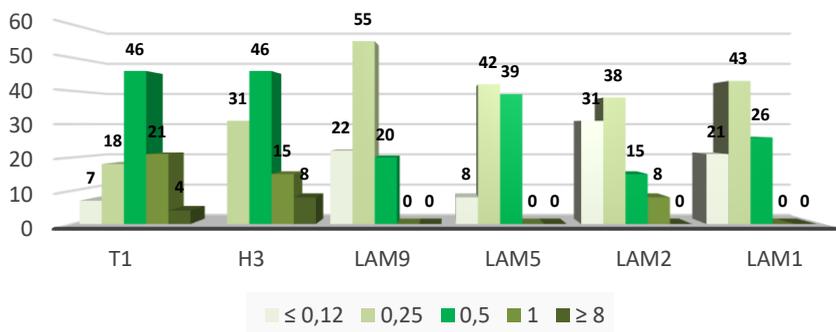
CIM (n=214)	N MGIT960		Sensibilidade %	Especificidade %
	Resistente	Sensível		
Isoniazida (0,25 µg/mL)				
Resistente	3	3	50	98,4
Sensível	3	190		
Rifampicina (1,0 µg/mL)				
Resistente	1	1	100	99,5
Sensível	0	197		

5.9 Associação entre a Concentração inibitória mínima, as Características Genéticas dos Isolados e o Desfecho dos Casos

Para as associações realizadas a seguir, foram consideradas as CIMs da leitura por microscopia após 14 dias de incubação.

Não houve diferença significativa entre as CIMs para isoniazida ou rifampicina e as sublinhagens de *M. tuberculosis* no estudo ($p=0,28$ e $p=0,94$, respectivamente). Os isolados resistentes à isoniazida estavam distribuídos em diferentes sublinhagens, com CIM = 4 $\mu\text{g/mL}$ pertenciam às sublinhagens LAM9, LAM4, LAM2 e H3, e com CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ pertenciam à LAM2 e perfil desconhecido. Os isolados com CIM de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ para isoniazida, considerada concentração crítica, pertenciam às sublinhagens T (SIT73: dois isolados) e X2 (SIT137: um isolado). Os dois isolados resistentes à rifampicina (CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$), pertenciam às sublinhagens H3 e T1 (SIT50 e SIT823, respectivamente) (Figura 41 e 42). Entre os 17 isolados que apresentaram CIM de 1 $\mu\text{g/mL}$ para rifampicina, considerada concentração crítica, seis isolados pertenciam à sublinhagem T1, sendo cinco do SIT53, dois isolados pertenciam à SIT50/H3, SIT33/LAM3 e SIT137/X2, os demais isolados estavam distribuídos entre SIT908/LAM2, e SITs não classificados dentro das sublinhagens H1, LAM, LAM2 e T1RUS.

Figura 41: Proporção de distribuição das CIMs para Rifampicina entre as seis sublinhagens mais frequentes no estudo.

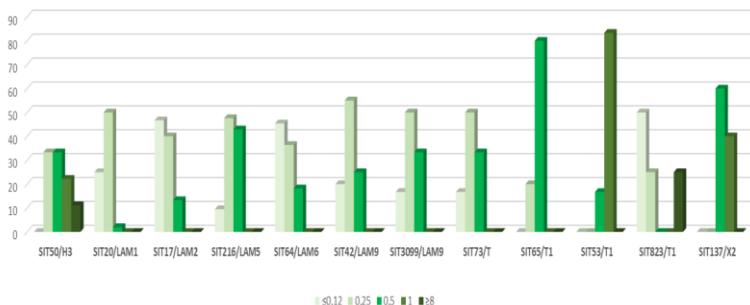


Concentrações em $\mu\text{g/mL}$

Nota: para alguns isolados a CIM não pode ser determinada: (T1=1), (LAM9=1), (LAM5=3), (LAM2=2), e (LAM1=1).

Fonte: a autora

Figura 42: Proporção de distribuição das CIMs para Rifampicina entre os SITs que apresentaram maior associação com CIMs mais elevadas.



Concentrações em $\mu\text{g/mL}$

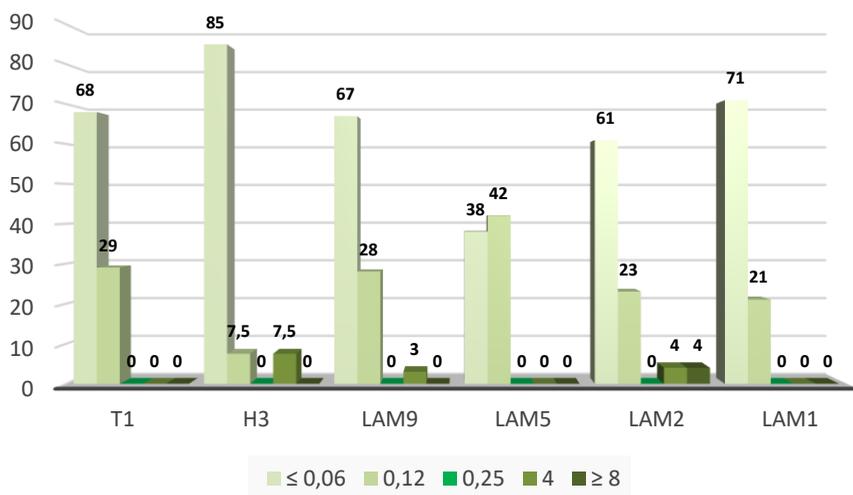
Nota: para alguns isolados a CIM não pode ser determinada: (T1=1), (LAM9=1), (LAM5=3), (LAM2=2), e (LAM1=1).

Fonte: a autora

Seis sublinhagens representaram aproximadamente 64% (143/223) dos isolados do estudo. Avaliando-se a distribuição das CIM para Rifampicina em relação à proporção de isolados entre estas sublinhagens, observou-se CIMs predominantemente mais baixas ($\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$) entre isolados LAM9 (77,0%), LAM5 (50%), LAM2 (69%) e LAM1 (64%) (Figura 39). Entre os isolados das sublinhagens T1 e H3 observou-se CIMs predominantemente mais altas ($\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$), 71% e 69%, respectivamente. Considerando-se que a concentração crítica para a isoniazida é $> 0,25 \mu\text{g/mL}$, observou-se CIMs mais baixas ($\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$) para cinco das seis sublinhagens predominantes, somente a LAM5 apresentou maior proporção de CIM ($\geq 0,12 \mu\text{g/mL}$) (Figura 43)

A associação entre as CIMs e a presença da deleção RD^{Rio} mostrou que as CIMs foram predominantemente mais baixas nos microrganismos com a deleção, sendo esta diferença considerada significativa apenas para a Rifampicina ($p < 0,01$). (Tabela 15)

Figura 43: Proporção de distribuição das CIMs para Isoniazida entre as seis sublinhagens mais frequentes no estudo.



Concentrações em $\mu\text{g/mL}$

Nota: para alguns isolados a CIM não pode ser determinada: (T1=1), (LAM9=1), (LAM5=3), (LAM2=2), e (LAM1=1).

Fonte: a autora

A associação entre CIM mais alta e a permanência da baciloscopia positiva no segundo e quarto meses de tratamento, foi observada para isoniazida, mas não foi estatisticamente significativa, no entanto, devido a não realização de baciloskopias de controle para muitos pacientes, aproximadamente 40% no segundo mês e 50% no quarto mês, incluindo casos que apresentaram resistência ao antimicrobiano, esta avaliação foi considerada prejudicada (Tabela 16). Não foi observada associação entre CIM mais altas para rifampicina e a permanência de baciloskopias positivas durante o tratamento (Tabela 16).

Tabela 15: Associação entre a CIM categorizada e a presença da deleção RD^{Rio} nos isolados de *M. tuberculosis* do estudo.

	Sem deleção N (%)	Com deleção N (%)	p ^a	^a p ≤ 0,05
Isoniazida				
S (CIM baixa)	93 (65,0)	51 (71,8)		
S (CIM alta)	45 (31,5)	18 (25,4)		
R	5 (3,5)	2 (2,8)	0,61	
Rifampicina				
S (CIM baixa)	73 (51,8)	53 (74,7)		
S (CIM alta)	66 (46,8)	18 (25,3)		
R	2 (1,4)	0	<0,01 ^a	

Isoniazida-CIM baixa ≤ 0,06 µg/mL, CIM alta 0,12 a 0,25 µg/mL, R ≥ 0,5 µg/mL
 Rifampicina-CIM baixa ≤ 0,25 µg/mL, CIM alta 0,5 a 1 µg/mL, R ≥ 2 µg/mL

Associação entre as CIMs baixas, altas ou resistência para isoniazida e rifampicina, e o desfecho do tratamento, não mostrou diferenças significativas, p=0,49 e p=0,14 respectivamente. Apesar do pequeno número de isolados, CIM altas ou resistência à isoniazida parece não ter relação com casos de falência terapêutica e óbito. No entanto, para rifampicina, esta relação não pode ser descartada, visto que 50% dos casos de falência tiveram CIM mais altas para o antimicrobiano e em 60% dos casos de óbito foram observadas CIM mais altas ou resistência (Tabela 17). Os sete casos de monorresistência para a isoniazida estudados evoluíram para cura, já os dois casos de monorresistência para rifampicina tiveram desfechos desfavoráveis, um abandonou o tratamento e o outro foi a óbito.

Tabela 16: Associação entre a CIM categorizada e os resultados das baciloscopias de controle do segundo e quarto meses de tratamento para os pacientes do estudo.

		CIM Isoniazida			Isolados analisados	p ^a
		≤ 0,06 µg/mL	0,12 a 0,25 µg/mL	≥ 0,5 µg/mL		
Baciloscopia diagnóstico	Positiva	126 (89,4)	55 (88,7)	7 (100)	210	0,09
	Negativa	15 (10,6)	7 (11,3)	0		
	Total	141	62	7		
Baciloscopia 2ºmês	Positiva	30 (21,2)	17 (27,4)	1 (14,4)	121	0,87
	Negativa	49 (34,8)	21 (33,9)	3 (42,8)		
	Não realizada	62 (44,0)	24 (38,7)	3(42,8)		
Baciloscopia 4ºmês	Positiva	9 (6,4)	8 (12,9)	0	103	0,41
	Negativa	59 (41,8)	22 (35,5)	4 (57,1)		
	Não realizada	73 (51,8)	32 (51,6)	3(42,9)		
		CIM Rifampicina				
		≤ 0,25 µg/mL	0,5 a 1 µg/mL	≥ 2 µg/mL		
Baciloscopia diagnóstico	Positiva	110 (88,7)	76 (90,5)	2 (100)	210	0,85
	Negativa	14 (11,3)	8 (9,5)	0		
	Total	124	84	2		
Baciloscopia 2ºmês	Positiva	29 (23,4)	19 (22,6)	0	121	0,71
	Negativa	39 (31,4)	33 (39,3)	1 (50,0)		
	Não realizada	56 (45,2)	32 (38,1)	1 (50,0)		
Baciloscopia 4ºmês	Positiva	11 (8,9)	6 (7,1)	0	103	0,90
	Negativa	53 (42,7)	32 (38,1)	1 (50,0)		
	Não realizada	60 (48,4)	46 (54,8)	1 (50,0)		

^a p ≥ 0,05

Tabela 17: Associação entre a CIM categorizada e o desfecho do tratamento dos pacientes do estudo.

	Isoniazida			p^a
	Sensível		Resistente	
	≤ 0,06 µg/mL	0,12 a 0,25 µg/mL	≥ 0,5 µg/mL	
Sucesso no tratamento	104 (67,5)	43 (27,9)	7 (4,5)	0,49
Abandono	30 (68,2)	14 (31,8)	0	
Falha	4 (100)	0	0	
Óbito	5 (50,0)	5 (50,0)	0	
Total	143 (66,8)	63 (29,4)	7 (3,2)	
	Rifampicina			p^a
	Sensível		Resistente	
	≤ 0,25 µg/mL	0,5 a 1 µg/mL	≥ 2 µg/mL	
Sucesso no tratamento	95 (61,3)	60 (38,7)	0	0,14
Abandono	25 (56,8)	18 (40,9)	1 (2,3)	
Falha	2 (50,0)	2 (50,0)		
Óbito	4 (40,0)	5 (50,0)	1(10,0)	
Total	126 (58,9)	82 (38,2)	2 (0,9)	

Nota: foi excluído da análise um paciente cujo desfecho foi transferência para outro Estado

^ap ≥ 0,05

6 DISCUSSÃO

6.1 Perfil Epidemiológico da Tuberculose na Região Estudada

A distribuição espacial dos casos de TB pulmonar bacilífera nos municípios de Florianópolis e São José (Figura 8) possibilitou a visão da heterogeneidade da doença na região, que é de fundamental importância para sua compreensão e para definição de prioridades nas ações de controle da TB, permitindo a racionalização dos recursos. Em ambos os municípios, áreas com alta densidade populacional associadas à baixa renda, higiene e saneamento inadequados, representaram os locais com maior número de casos de tuberculose no período estudado (Figura 44). Estudos mostram que a TB tem relação direta com condições precárias de vida, populações socialmente desfavorecidas e marginalizadas são desproporcionalmente mais atingidas pela doença (VICENTIN et al., 2002; SANTOS et al., 2007; HINO et al., 2011; SAN PEDRO; OLIVEIRA, 2013; APOLINÁRIO et al., 2017). Pobreza, condições precárias de higiene e aglomerados habitacionais têm sido associadas ao aumento no número de casos de TB desde a era medieval (ROBERTS, 2015).

Dye e colaboradores (2009) demonstraram uma relação inversa entre a incidência de TB e o aumento do PIB, índice de desenvolvimento humano (IDH) e acesso a saneamento básico, em estudo envolvendo 134 países nos cinco continentes. As cidades de Santa Catarina com as maiores incidências de TB, paradoxalmente, estão entre os maiores PIB e IDH do Brasil (IBGE, 2016). Apesar disso, áreas constituídas por aglomerados populacionais, com acesso restrito ao saneamento básico, e baixas condições de higiene, que representam bolsões de pobreza em ambos os municípios, foram associadas ao maior número de casos de TB (Figura 44). As comunidades científicas e de saúde pública reconhecem que para diminuir a TB, é necessário expandir o controle da doença além dos esforços habituais, abordando um dos principais impulsionadores da epidemia, o determinante socioeconômico da saúde (RASANATHAN et al., 2011; APOLINÁRIO et al., 2017).

Figura 44: Mapa com distribuição dos casos de tuberculose do estudo, com fotografias registrando a associação das áreas com maior número de casos da doença e baixas condições de higiene e saneamento e aglomerados populacionais.



Fonte: a autora

A aglomeração de pessoas favorece a disseminação da doença, principalmente em locais pouco ventilados e iluminados. A transmissão do bacilo de pessoa para pessoa, por meio de gotículas eliminadas principalmente pela tosse, coloca em risco todos os contatos. No entanto, o risco de transmissão aumenta quando o caso índice tem alta densidade bacilar nas secreções respiratórias, em condições de alta densidade populacional, e quando há grande proximidade, portanto, aqueles que vivem sob o mesmo teto estão em maior risco do que os contatos casuais (SINFIELD et al., 2006; FOK et al., 2008; FOX et al., 2013). No presente estudo, entre os indivíduos que responderam à questão sobre contato com pessoas que tiveram ou estavam em tratamento para TB, aproximadamente 80% respondeu afirmativamente, sendo que 56,6% deles conviveu sob o mesmo teto (50 eram parentes de primeiro grau, 10 ex-presidiários e 4 ex-internos ou internos em clínicas de recuperação/113). Contatos de pacientes com TB constituem um grupo de alto risco para desenvolver a doença, particularmente no primeiro ano, especialmente crianças menores de cinco anos e pessoas vivendo com HIV (FOX et al., 2013). Para reduzir a incidência de TB, prevenindo e detectando rapidamente novos casos, os programas de controle da doença devem investir ainda mais na investigação e tratamento dos contatos, pois a exposição destes indivíduos ao *M. tuberculosis* é muito maior. Além disso, os programas devem intensificar ações de educação que proporcionarão informação sobre a doença aos indivíduos e seus familiares, ampliando conhecimentos e conseqüentemente a rede de controle de TB junto à comunidade.

A patogênese da TB é caracterizada por um período de infecção subclínica assintomática que pode levar semanas a décadas, como resultado, existe um grande reservatório de indivíduos infectados, entre os quais novos casos podem ocorrer a qualquer momento (RANGAKA et al., 2015). A OMS reconhece que para reverter a epidemia mundial de TB, é necessário ir além da busca ativa de sintomáticos respiratórios, não basta encontrar precocemente e tratar todos os casos, é essencial acabar com os reservatórios da doença, investindo no diagnóstico e tratamento da TB latente (WHO, 2015).

No entanto, muito aquém das metas da OMS, preocupada com os reservatórios da doença, não estamos conseguindo sequer realizar o diagnóstico precoce dos indivíduos doentes. O presente estudo observou um tempo médio de aproximadamente 10 semanas entre o início da tosse e o diagnóstico da TB em pacientes bacilíferos, aproximadamente um a cada três pacientes demorou mais que dois meses para diagnosticar a doença. Não existe consenso na definição de atraso/tempo “aceitável”

para início do tratamento, esse fator é dependente do serviço de saúde, da situação epidemiológica, com um período menor sendo esperado em locais com alta incidência da doença (WARD et al., 2001). Segundo as diretrizes para TB da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (Conde et al., 2009), estudos realizados no Brasil demonstraram um intervalo de sete semanas entre a primeira visita ao médico, e entre 10 a 12 semanas entre o início dos sintomas, em relação ao início do tratamento. A Índia, país que se mantém entre as maiores incidências mundiais de TB, relatou em revisão sistemática, atrasos no diagnóstico de TB e consequente início do tratamento semelhantes ao encontrado neste estudo (mediana de 7,9 semanas e 8 semanas, respectivamente) (SREERAMAREDDY et al., 2014).

Em países como Zimbábue e Etiópia, o atraso em iniciar o tratamento parece estar relacionado a longa distância até o centro de saúde, além de falta de conhecimento sobre a doença e da automedicação (TAKARINDA et al., 2015; TSEGAYE et al., 2016). Uma Metanálise que incluiu 38.947 pacientes na China, relatou que os principais determinantes do atraso no diagnóstico individual e consequente início do tratamento, foram fatores sócio demográficos e econômicos, principalmente a pobreza, residência em área rural (difícil acesso ao sistema de saúde), baixos níveis de escolaridade, estigma e pouco conhecimento sobre a doença (LI et al., 2013). Duas revisões sistemáticas mostraram que indivíduos do sexo feminino tiveram maior risco de atraso em realizar o diagnóstico (STORLA et al., 2008; LI et al., 2013). No presente estudo, o baixo nível de escolaridade (≤ 8 anos de estudo), assim como o gênero do indivíduo não apresentaram relação significativa com o atraso no diagnóstico. Além disso, em ambientes urbanos como o do presente estudo, os atrasos parecem não ter relação direta com a dificuldade de acesso aos serviços de saúde, e sim ao desemprego, e a atitude geral em relação a saúde, refletindo a maneira como os serviços de saúde estão organizados (SANTOS et al., 2005).

Fato preocupante registrado no presente estudo foram os dois pacientes, que mesmo referindo contato íntimo anterior com casos da doença, levaram mais de 10 meses para diagnosticar e iniciar o tratamento. Atrasos no diagnóstico e consequente início do tratamento da TB constituem uma enorme barreira ao rompimento do ciclo da doença, aumentando o risco de transmissão e o número de contatos expostos. Um exemplo disso foi um caso deste estudo que demorou 48 semanas para realizar o diagnóstico, levando três familiares de convivência íntima a adoecer no ano seguinte, expondo inúmeros outros contatos ao *M. tuberculosis*.

Em revisão sistemática, Storla e colaboradores (2008) relataram que o principal problema na demora do diagnóstico pareceu ser um ciclo vicioso de repetidas visitas ao mesmo nível de cuidado de saúde, resultando em tratamentos antimicrobianos inespecíficos com consequente atraso no diagnóstico da TB. Esse fato não foi mensurado sistematicamente no presente estudo, mas foi relatado muitas vezes pelos pacientes entrevistados. De qualquer maneira, seja devido à demora do paciente em procurar uma unidade de saúde ou a falta de capacitação dos diversos níveis de saúde para diagnosticar TB, o tempo para iniciar o tratamento está acima do aceitável. O atraso no diagnóstico é ruim para o prognóstico individual do paciente e para o aumento da transmissão na comunidade, visto que a maioria das transmissões acontece entre o aparecimento da tosse e o início do tratamento (STORLA et al., 2008). Neste estudo, foi observada uma tendência ao aumento da carga bacilar e da presença de lesões pulmonares (cavitações), a medida que aumentava o tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença (Tabela 3). A ocorrência de hemoptise foi significativamente associada ao atraso no diagnóstico, reforçando o prognóstico individual ruim correlacionado a demora em iniciar o tratamento. Achados semelhantes aos relatados por Santos e colaboradores (2005) em estudo realizado em Recife.

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), as ações prioritárias para controle da TB são de responsabilidade das UBSs e das Unidades Ambulatoriais de Referência, no entanto, 46,8% dos pacientes deste estudo realizaram diagnóstico em unidades hospitalares. Somente o Hospital Nereu Ramos, referência em doenças infectocontagiosas em Santa Catarina, realizou 22% das notificações de casos novos entre 2010 a 2014 (SANTANA, 2014). Quase metade dos diagnósticos de TB do presente estudo foi realizado em hospitais, refletindo diferentes problemas: um estágio de maior gravidade da doença devido à demora no diagnóstico; a falta de capacitação profissional em diversos níveis de assistência à saúde (incapacidade de realizar o diagnóstico na primeira visita); e ainda falha dos programas de combate à TB que deveriam estar investindo em estratégias de busca ativa dos sintomáticos respiratórios e em conscientização da população sobre a doença.

Historicamente os homens são mais acometidos pela TB e no presente estudo representaram 66,7% dos casos, uma proporção de 2:1. Recente revisão sistemática, compreendendo 83 publicações entre 1993 e 2016, em 28 países, envolvendo 3,1 milhões de participantes, concluiu que a prevalência de TB é significativamente maior entre homens (HORTON et al., 2016). Em 2015, dos 10,4 milhões de casos novos de TB, 5,9 milhões eram homens e 3,5 milhões eram mulheres, proporção de

1,6:1 (WHO, 2016). Esta diferença pode ser reflexo, pelo menos parcialmente, de fatores socioeconômicos e culturais. Os homens estão mais expostos porque são mais propensos a trabalhar fora de casa, viajam mais, tem mais contatos sociais, permanecem mais tempo em locais favoráveis a transmissão, como bares, e são a maioria em profissões associadas ao risco de TB como mineração (NHAMOYEBONDE; LELIE 2014; KATSNELSON, 2017).

Outro argumento para esclarecer o fato, é dado pela maior exposição dos homens à fatores de risco associados à TB, como tabagismo, abuso de álcool e drogas ilícitas, que pode indiretamente influenciar nas taxas da doença (WATKINS; PLANT, 2006; NARASIMHAN et al., 2013, NHAMOYEBONDE, LELIE 2014). No presente estudo, foi observado predomínio significativo de indivíduos do sexo masculino associado a fatores de risco como tabagismo ($p < 0,01$), uso excessivo de álcool ($p < 0,01$), uso de drogas ilícitas ($p < 0,01$) e de indivíduos vivendo em situação de rua ($p < 0,01$). Um outro fator de risco associado a TB é a coinfeção com HIV, no Brasil, as taxas de notificação de HIV registraram em 2015 uma razão entre os sexos de 2,4 indivíduos do sexo masculino para cada um do sexo feminino (BRASIL, 2016b). A razão de prevalência de coinfeção TB/HIV para casos novos de TB em 2016 foi de 2,6:1 (BRASIL, 2017). No presente estudo, a razão encontrada entre os coinfectados TB/HIV foi de 2,4:1 (29 masculino:12 feminino), reforçando a influência indireta da maior prevalência de HIV/TB em indivíduos do sexo masculino.

Recentemente, especialistas têm discutido que a diferença entre gêneros na TB também possa ter uma base biológica (BURNS et.al., 2015; KATSNELSON, 2017). Alguns autores começaram a explorar diferenças sexo-específicas nas funções do sistema imune, simplificada, estudos apontam que o estradiol sustenta/mantém a imunidade, e que a testosterona seria um mediador inibindo a resposta imune (GOURDY et al., 2005; JANELE et al., 2006; CALIPPE et al., 2008; NHAMOYEBONDE; LELIE, 2014). Os hormônios sexuais masculinos e femininos podem influenciar a função de células do sistema imunológico, e assim ter relevância no controle da TB. Revisando o assunto, Nhamoyebonde e Lelie (2014), mostraram que a robusta resposta imune Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ e TNF- α , vital para o controle da TB, é regulada negativamente pela testosterona e parece ser melhorada pelo estrogênio. Além disso, os macrófagos, centrais ao controle da TB, são regulados negativamente pela testosterona, por redução da expressão de receptor Toll-Like4, e a ativação dos macrófagos

é melhorada pelo estradiol (FISH, 2008; NEYROLLES; QUINTANA-MURCI, 2009; NHAMOYEBONDE; LELIE, 2014).

Estudo avaliando variações genéticas que poderiam estar envolvidas no desenvolvimento de TB ativa, encontrou quatro polimorfismos no cromossomo X, mais especificamente no gene do receptor Toll-Like8, associados a maior suscetibilidade à TB em homens (DAVILA et al., 2008). Estudo posterior corroborou o efeito sexo-específico relacionado ao receptor Toll-Like8, sugerindo que esse achado poderia explicar parcialmente o viés masculino na TB (SALIE et al., 2015).

Ademais, evidências indicam que os homens estão em desvantagem na busca e/ou acesso aos cuidados de saúde em muitos contextos, sinalizando que os programas nacionais de controle da TB devam reconhecer os indivíduos do sexo masculino como um grupo de alto risco, para que busquem melhorar o acesso ao diagnóstico e serviços de rastreio para estes pacientes, com o objetivo de reduzir a carga global de TB de forma mais eficaz, garantindo equidade de gênero (HORTON et al., 2016).

Um fato inusitado chamou a atenção entre os dados do presente estudo, a observação de uma inversão na predominância entre gêneros na faixa etária mais jovem (15-24 anos), com a maioria dos casos diagnosticados pertencendo ao sexo feminino (58,5%). Nos gráficos do Relatório Global da OMS de 2016, pode-se observar esta mesma inversão, com predomínio do sexo feminino na mesma faixa etária (15-24 anos) na região do mediterrâneo oriental (WHO, 2016). Estudo que avaliou casos novos de TB notificados entre 2006 e 2010 no Brasil, já havia descrito que na faixa etária mais jovem (15-19 anos) a proporção de casos entre homens e mulheres era mais equilibrada (BARBOSA; COSTA, 2012). Considerando somente a hipótese comportamental, e utilizando a explicação de alguns autores para o predomínio de TB em homens, como o produto de diferenças culturais no desempenho de papéis entre os sexos, englobando o modo de vida determinado pela inserção social de cada indivíduo (HINO et al., 2011), pode-se pensar em uma nova tendência, ditada por mudanças comportamentais observadas mais intensamente na população mais jovem.

A TB acomete principalmente adultos jovens, justamente a população economicamente ativa, contribuindo para diminuição da capacidade produtiva da comunidade (ARAUJO et al., 2013). No presente estudo, aproximadamente 50% dos indivíduos acometidos pela doença encontravam-se entre 25 a 45 anos, enquadrados justamente na categoria economicamente ativa, agravando ainda mais a vulnerabilidade social.

A associação entre a doença e a carência socioeconômica e consequente vulnerabilidade social, é refletida também no alto nível de desemprego entre os doentes do estudo (28%), comparado ao índice de desemprego no Brasil (7,9%) e no Estado de Santa Catarina (3,9%), no mesmo período (IBGE/PNAD-2015). A proporção de desempregados mostrou associação direta com notificação de casos de TB em recente estudo realizado em Portugal, no qual, os municípios com altos índices de desemprego registraram as mais altas taxas da doença (APOLINÁRIO et al., 2017). Nogueira (2012), também relatou desemprego de 21,6% entre os pacientes com TB em Santa Catarina, com a maior parte dos empregados realizando atividades de baixa qualificação profissional, destacando-se atividades relacionadas à construção civil (15%: 45/292). No presente estudo, a construção civil também representou a principal atividade relatada pelos doentes empregados (15%: 28/187). Uma das hipóteses para a alta incidência de TB em trabalhadores da construção civil, poderia ser a associação da doença com a silicose, doença ocupacional que atinge os pulmões devido a inalação do pó de sílica, principal constituinte da areia. Os indivíduos com silicose expostos ao *M. tuberculosis* são mais propensos a desenvolver TB, risco que pode variar de 2,8 a 39 vezes, dependendo da gravidade da doença de base (BARBOZA et al., 2008). Por outro lado, estudo brasileiro relatou baixa escolaridade, alto índice de tabagismo e abuso de álcool entre trabalhadores da construção civil (GAVIOLI, et al., 2014), todos fatores associados significativamente ao aumento do risco de TB no presente estudo.

A predominância de indivíduos com baixa escolaridade observada no presente estudo (65,5%), corrobora o padrão para TB observado em estudos realizados em outras regiões do país (COELHO et al., 2010; THEME et al., 2012; HINO et al., 2013; ARAÚJO et al., 2013). A baixa escolaridade configura-se como reflexo de um conjunto de condições socioeconômicas desfavoráveis (BOWKALOWSKI; BERTOLOZZI, 2010), e influencia diretamente a capacidade do sujeito de compreender as informações de promoção e prevenção das doenças, além da terapêutica prescrita (ARAUJO et al., 2013). Indicadores socioeconômicos referentes aos baixos níveis de renda e escolaridade, poderiam aumentar a vulnerabilidade à TB ao refletir o acesso individual e desigual à informação, a benefícios oriundos do conhecimento e ao serviço de saúde (SAN PEDRO et al., 2013). Fica implícito, portanto, que melhorar o acesso e a qualidade da educação, é uma ação necessária ao combate a TB, com contribuições diretas nos índices relacionados a doença.

6.2 Perfil Clínico da Tuberculose na População Estudada

A infecção pelo HIV emergiu como um importante fator de risco para o desenvolvimento da TB em indivíduos infectados por *M. tuberculosis*, um risco até 37 vezes maior que nos indivíduos HIV soronegativos (GETAHUN et al., 2010). A coinfeção com HIV amplificou a epidemia de TB (DERIEMER et al., 2007). HIV e TB são responsáveis por uma carga significativa de morbidade e mortalidade globais, TB é a infecção mais comum afetando os indivíduos HIV soropositivos (WHO, 2016). O HIV complica todos os aspectos da TB pulmonar, do diagnóstico ao tratamento, demandando uma abordagem diferente para combater efetivamente ambas as doenças (GOPALAN et al., 2016). Por outro lado, a TB é a principal causa de óbito por doença infecciosa em pessoas vivendo com HIV, causando um terço das mortes relacionadas ao HIV (WHO, 2015a). *M. tuberculosis* e HIV potencializam um ao outro, acelerando a deterioração das funções imunológicas e resultando em morte prematura dos indivíduos não tratados (PAWLOWSKI et al., 2012).

Como ferramenta para auxiliar no enfrentamento da epidemia de TB relacionada ao HIV e desenvolvimento de estratégias baseadas no esforço conjunto, a OMS promove a iniciativa de testagem sistemática de HIV nos pacientes com TB. A investigação de TB é recomendada como componente essencial do pacote de cuidados de pessoas vivendo com HIV (WHO, 2016). O Brasil está entre os 20 países com maior incidência de TB, e de coinfeção TB/HIV. Mundialmente, em 2015, 3,4 milhões de pacientes notificados por TB foram testados para HIV (55%), dos quais 15% eram positivos. A maior proporção de coinfeção foi encontrada no continente Africano (31%), e excedeu 50% em partes do sul da África (WHO, 2016). No Brasil, dos 81.137 casos de TB notificados em 2015, 82% foram testados para HIV, com coinfeção observada em 15% dos testados (WHO, 2016). Entre os casos novos de TB notificados no Brasil em 2016, 76,3% realizou testagem para HIV, com coinfeção de 9,4%, sendo que em Santa Catarina, a testagem foi realizada em 83,6% com 16,2% de coinfeção, e em Florianópolis em 75% com 22,6% de coinfeção (BRASIL, 2017). No presente estudo, testagem para HIV foi realizada em 89,2% dos pacientes, e a coinfeção foi 2,2 vezes a média nacional para casos novos, sendo detectada em 20,6% dos casos testados. A coinfeção TB/HIV foi ainda maior nos indivíduos do sexo masculino e na faixa etária entre 35-44 anos, apresentando taxas de 22,3% e 29,3%,

respectivamente. Nesta faixa etária ocorreu a maior porcentagem de testagem para HIV (95,3%).

Na faixa etária mais jovem (15-24), o presente estudo encontrou menor proporção de coinfeção 5,4%, significativamente menor do que o observado para os demais grupos etários ($p=0,02$). Considerando as notificações de HIV no país, entre 2007 a 2016, 22,7% delas foram de indivíduos entre 15-24 anos, 35,2 % entre 25-34 e 22,3% entre 35-44 (BRASIL, 2016). Nos registros disponíveis no sistema da DIVE/SC para a grande Florianópolis, que são somente de AIDS, nos anos de 2014 e 2015 foram notificados 15,5% de indivíduos entre 15-24 anos, 34,2% entre 25-34 anos e 26,1% entre 35-44 anos (TABNET/DIVE/SC). Outros estudos brasileiros descrevem a coinfeção TB/HIV com idade mediana de 41/44 anos (BARBOSA; COSTA, 2012; NETO et al., 2013). Apesar das taxas de notificação de HIV/AIDS variarem entre 15,5% e 22,7% na população entre 15/24 anos, a taxa de coinfeção foi de apenas 5,4%, em uma área de alta prevalência de HIV. Inferimos que a baixa coinfeção nesta faixa etária poderia ser justificada por uma menor proporção de TB latente na faixa etária mais jovem, devido a menor exposição e maior probabilidade de infecção primária na infância, associada também a possível proteção pela BCG, que poderia reduzir o risco de infecção na população mais jovem.

Entre os indivíduos soropositivos do estudo, que realizaram quantificação de CD4 no diagnóstico da TB, 72% apresentou contagem inferior a 200 células/ mm³. A imunidade mediada por células, com ativação de CD4 e CD8 é essencial para controle da infecção por *M. tuberculosis*, sendo os linfócitos CD4, especialmente o subgrupo Th1, os mais críticos (NORTH; JUNG, 2004; COOPER, 2009; PREZZEMOLO et al., 2014). Células CD4 Th1 tem um papel protetivo na TB, por sua habilidade polifuncional de produzir citocinas como IFN- γ e TNF- α , que contribuem com a ativação e recrutamento de células da resposta imune inata. O indivíduo HIV soropositivo tem alto risco de desenvolver TB ativa por progressiva depleção de células CD4 (PREZZEMOLO et al., 2014). Além disso, estudos em indivíduos coinfectados caracterizaram defeitos funcionais nas células CD4, que apresentaram reduzida capacidade de secretar mais que uma citocina quando a carga viral estava aumentada, ou seja, em HIV soropositivos as células Th1 têm reduzida capacidade polifuncional antígeno específica (DAY et al., 2008). O comprometimento das células T antígeno micobacteriano específicas, poderia contribuir para o desenvolvimento de TB ativa, sugerindo que a infecção por HIV afeta a frequência de células T polifuncionais em pessoas com TB latente (KALSDORF et al., 2009).

Alterações no sistema imunológico ao longo da vida, podem contribuir para a reativação da TB latente, assim, o próprio HIV ou doenças crônicas como diabetes, doença hepática alcoólica, ou em algumas circunstâncias como o uso de esteroides ou outros imunossupressores, podem desencadear TB ativa (PREZZEMOLO et al., 2014). No presente estudo, a segunda comorbidade mais associada à TB foi o diabetes mellitus tipo 2 (DM) afetando 6,7% dos indivíduos. Porcentagem semelhante foi descrita em outro estudo realizado na Bahia (6,2%) (GIL-SANTANA et al., 2016). No entanto, estes números podem estar subestimados, visto que não foram observados rastreios sistemáticos para DM entre os pacientes em tratamento para TB nos municípios estudados.

Ambas as patologias influenciam a história natural e o desfecho do tratamento uma da outra, assumindo importância clínica e de saúde pública (KALRA; ATREJA, 2016). Pacientes com DM apresentam risco três vezes maior de desenvolver TB (JEON et al., 2008; WHO, 2011), além de aumento no tempo de conversão da cultura do escarro, falha terapêutica, recorrência da TB e morte (BAKER et al., 2011; KALRA; ATREJA, 2016). Entre as possíveis razões associadas ao aumento da suscetibilidade do paciente diabético à TB, estão as mudanças na imunidade humoral e celular (NIAZI; KALRA, 2012). Estudo recente demonstrou que um aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia curta, em especial o butirato (observado em pacientes com deficiência à insulina), pode estar associado à diminuição da resposta de citocinas pró-inflamatórias na infecção por *M. tuberculosis*, com aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL 10 (LACHMANDAS et al., 2016). Por outro lado, pacientes com TB e DM apresentaram concentrações aumentadas de biomarcadores inflamatórios no plasma, que poderiam estar envolvidos no aumento da suscetibilidade ao pior desfecho clínico relacionado à TB (ANDRADE et al., 2014).

Segundo Ruslami e colaboradores (2010), aproximadamente 15% dos casos estimados de TB poderiam estar relacionados ao DM. A proporção de DM entre os casos de TB no Brasil aumentou de 380/100.000 habitantes para 6.150/100.000 habitantes entre 2001 a 2011 (REIS-SANTOS et al., 2014). Mudanças no estilo de vida e na dieta têm contribuído para um aumento na prevalência do DM, em países de renda baixa e média nos quais a incidência de TB é alta (WHO, 2011), tornando a doença um fator de risco cada vez mais importante para o controle da TB. A melhor abordagem para rastreio do DM em pacientes com TB, incluindo tempo e método utilizado para diagnóstico, ainda não foi estabelecida. Como uma doença infecciosa, TB pode elevar

temporariamente a glicemia e resultar em diagnósticos falso-positivos se as investigações forem feitas muito no início, por outro lado, a hiperglicemia, mesmo que temporária, pode ser um fator de risco para pior desfecho do tratamento da tuberculose. Além disso, estudos de coorte concluem que o DM pode exacerbar a severidade da TB (ALISJAHBANA et al., 2007; GIL-SANTANA et al., 2016). Estas, entre outras razões, justificam o rastreio para diabetes no início do tratamento para todos os pacientes com TB, recomendado pela OMS (WHO, 2011), bem como o controle da glicemia para melhorar o desfecho do tratamento (ALISJAHBANA et al., 2007; GIL-SANTANA et al., 2016).

Em relação às manifestações clínicas, os indivíduos do estudo relataram a presença dos sintomas clássicos da TB pulmonar, como tosse (96,3%), expectoração (94,5%), febre (83,9%) e sudorese noturna (82,0%). Além destes sintomas, 31,7% relataram episódios de hemoptise, que foram associados significativamente a pacientes HIV soronegativos, e ao atraso no diagnóstico da TB (≥ 16 semanas/ $p=0,05$). Recente revisão sistemática associou a presença de hemoptise ao atraso no diagnóstico (CAI et al., 2015), que conseqüentemente, piora o prognóstico e aumenta o risco de morte por TB (YEMER et al., 2005). A perda ponderal severa, superior a 10% da massa corporal, foi relatada por 60,6% dos indivíduos respondentes, e assim como os demais sintomas clássicos de TB, não apresentou diferença significativa entre indivíduos HIV soropositivo ou negativo. A presença dos sintomas clássicos de TB entre HIV soropositivos verificada no estudo, é uma informação importante, especialmente pela característica do estudo realizado em pacientes com cultura positiva, sendo que 21,9% dos soropositivos apresentaram baciloscopia negativa. Pelo fato de que outras complicações infecciosas do HIV podem causar as mesmas manifestações, a triagem baseada em sintomas como ferramenta para diagnóstico de TB em pacientes soropositivo, parece ter alto valor preditivo negativo, auxiliando na exclusão do diagnóstico de TB (GETAHUN et al., 2011). Nossos resultados corroboram outros estudos que relataram a presença de tosse, febre de qualquer duração, suor noturno e perda ponderal, com alta sensibilidade, para TB em pacientes HIV soropositivos (CAIN et al., 2010, GETAHUN et al., 2011, SARA et al., 2016, HENOSTROZA et al., 2016).

As imagens radiográficas para diagnóstico de TB pulmonar ativa são limitadas pela pobre especificidade e inconsistência de leitura (KOPPAKA; BOCK, 2004; PINTO et al., 2013). Em conjunto com a baciloscopia do escarro, constituem os dois testes mais amplamente utilizados para diagnóstico de TB na maioria dos países com alta

incidência da doença. Além disso, a utilização de exames radiológicos na fase inicial e periodicamente, a partir do segundo mês de tratamento, permite acompanhar a regressão ou o agravamento das lesões na forma pulmonar da doença, sendo um recurso útil para controle do tratamento (BRASIL, 2011). Revisão sistemática, utilizando cultura como padrão ouro, relatou que a presença de infiltrados nos lobos superiores e cavitações estão significativamente associadas com TB pulmonar (PINTO et al., 2013). A infecção pelo HIV, no entanto, leva ao aumento na frequência de padrões radiológicos atípicos em pacientes com TB, incluindo um aumento na frequência de linfadenopatias, infiltrados miliares e derrames pleurais, além de diminuição na frequência de cavitações (BADIE et al., 2012). Padrões radiológicos atípicos podem levar a sub-diagnóstico de TB em pacientes HIV soropositivos e estão relacionados ao nível de imunidade do paciente (BADIE et al., 2012). No presente estudo, consolidações foram o padrão mais frequente entre os pacientes, caracterizando a alta inespecificidade dos achados radiológicos. A presença de cavitações foi observada em 43,7% dos pacientes HIV soronegativos e em 26,8% dos soropositivos ($p=0,03$). Entre os pacientes HIV soropositivos, foi observada maior frequência de infiltrados ($p=0,01$), bem como dos padrões considerados atípicos como derrame pleural e padrão miliar ($p=0,01$ e $p=0,08$, respectivamente), em consonância com a literatura. Estes padrões estão relacionados ao envolvimento extrapulmonar, mais frequente entre pacientes HIV soropositivos (PRADO et al., 2011). A presença de derrame pleural foi associada a contagens de $CD4 < 200$ células/ mm^3 , no entanto, a proporção do padrão miliar foi ligeiramente superior naqueles indivíduos com contagens de $CD4 \geq 200$ células/ mm^3 , fato que poderia estar relacionado aos possíveis defeitos funcionais descritos para estas células em indivíduos com coinfeção TB/HIV.

Segundo o *III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis* (CONDE et al., 2009), os primeiros testes requisitados para diagnóstico de TB são a radiografia de tórax e a baciloscopia de escarro, que apresentam alto valor preditivo positivo no Brasil ($>95\%$), mas baixa sensibilidade (40-60%). Entre os pacientes deste estudo, nos quais a TB foi confirmada bacteriologicamente pela cultura como critério de inclusão, a baciloscopia foi positiva em 88,2% dos casos, sendo paucibacilar em 20,2% dos casos. Quando selecionados somente pacientes HIV soropositivos, baciloscopias negativas representaram 21,9% dos casos ($p<0,01$), um risco 2,34 (CI 95%= 1,05-5,23) vezes maior do que entre os indivíduos HIV soronegativos, e somada à baciloscopia com baixa carga bacilar, corresponderam a

aproximadamente metade dos casos diagnosticados (Figura 13). Estudos que incluíram maior número de indivíduos HIV soropositivos, encontraram aproximadamente 33% de baciloscopia negativas (APERS et al., 2004; PRADO et al., 2011). Estes achados reforçam a necessidade de realização de cultura para TB em todos os pacientes com suspeita clínica, e a relevância da realização do teste molecular, especialmente por estarmos em área de alta prevalência para HIV. Além de corroborar as evidências de Apers e colaboradores (2004), de que resultados de baciloscopia negativa não devem ser limitantes no processo de decisão de iniciar o tratamento para TB em pacientes HIV soropositivos.

Por outro lado, a baciloscopia positiva, especialmente com grandes quantidades de bacilos (BAAR ++ ou +++), esteve fortemente associada a presença de cavitações nos exames radiológicos (Figura 14). Em 1965, Canetti e Grosset compararam a carga bacilar no tecido pulmonar de pacientes com TB e observaram que nas paredes das cavidades a carga bacilar foi de 10^7 a 10^9 UFC em contraste com 10^2 a 10^4 UFC nas áreas de necrose caseosa (CANETTI, 1965). Outros estudos têm mostrado que baciloscopia/cultura de pacientes com TB pulmonar cavitária tem alta carga bacilar (GOMES et al., 2003; MATSOUKA et al., 2004; PALACI et al., 2007; O'SHEA, 2014). A carga bacilar no paciente com TB aumenta de acordo com a progressão da doença, baseada na extensão do envolvimento pulmonar, na densidade das lesões, e na presença e extensão das lesões cavitárias (YODER et al., 2004; PALACI et al., 2007). No estudo, apesar de não apresentar significância estatística, foi observada uma tendência de aumento na carga bacilar e na presença de cavitação, com a progressão da doença (maior tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico de TB: Tabela 3). Indivíduos com alta carga bacilar e cavitações, apresentaram um curto tempo para detecção de positividade em cultura líquida (< nove dias), e foram associados a maior infectividade, ou seja, maior risco de transmissão da TB (YODER et al., 2004; O'SHEA 2014). Além disso, casos de recaída e falência terapêutica foram mais frequentemente associados com presença de cavitação (BENATOR et al., 2002, KUABAN et al., 2009, HORNE et al., 2010, KANG et al., 2016), que foi considerada fator de risco independente para falência e recaída (ZIERSKI et al., 1980, BENATOR et al., 2002). O ambiente com alta tensão de oxigênio encontrado nas cavitações, facilita a multiplicação bacilar, e conseqüentemente a ocorrência de mutações espontâneas, que podem resultar em resistência antimicrobiana, portanto, existe uma alta probabilidade de mutantes resistentes emergirem de lesões cavitárias (YODER et al., 2004). Portanto, indivíduos com cavitações

e/ou alta carga bacilar devem ser foco de maior atenção pelo sistema de saúde e pelo controle da TB.

Os cuidados com o paciente com TB são responsabilidade essencial das instituições de saúde pública e incluem o diagnóstico rápido e preciso, regimes de tratamento padronizados e com eficácia comprovada, que devem ser realizados em conjunto com apoio e supervisão adequados, monitorando a resposta ao tratamento (FAIR et al., 2007). Como parte do monitoramento, as orientações do Manual de Recomendações para Controle da TB no Brasil (BRASIL, 2011) preconizam a realização de baciloscopia de controle mensal, sendo indispensáveis as dos 2º, 4º e 6º meses, para o esquema básico de tratamento. No presente estudo, baciloscopias de controle foram realizadas somente em 57,8% dos pacientes no segundo mês e em 48,0% no quarto mês. A dificuldade de expectoração referida pelo paciente, a partir do início do tratamento, faz com que esse controle essencial não seja realizado na sua plenitude. A recomendação do Ministério da Saúde nesses casos seria a realização de coleta de escarro induzido (BRASIL 2011). A adequação da estrutura física dos postos de atendimento para permitir a realização da coleta desse tipo de amostra é uma medida que poderia garantir a realização do acompanhamento por baciloscopia em 100% dos pacientes em tratamento.

Entre os critérios de infecciosidade para pacientes hospitalizados ou institucionalizados, o *guideline* de Controle da TB nos Estados Unidos (ATS; CDC; IDSA, 2005) sugere que o paciente deva permanecer em isolamento respiratório até apresentar três amostras de escarro com baciloscopia negativa. Esta recomendação deve ser estendida a pacientes que residem no mesmo ambiente que crianças e indivíduos imunocomprometidos (HORNE et al., 2010). A conversão do escarro está associada a inúmeros fatores individuais, autores sugerem que a carga bacilar e características radiográficas como a presença de cavitação, possam ser preditivas para o aumento no tempo de conversão, pois estes são marcadores da severidade da doença (KUABAN et al., 2009; HORNE et al., 2010; PEFURA-YONE et al., 2014). No presente estudo, apesar de um a cada três pacientes com BAAR +++ não terem realizado nenhuma baciloscopia de controle durante o tratamento, foi significativa a permanência de baciloscopias positivas no segundo e quarto meses de tratamento entre os pacientes com alta carga bacilar ($p=0,02$ e $p=0,05$, respectivamente). Nossos dados corroboram a associação entre a alta carga bacilar e o maior tempo de conversão do escarro, sendo que o risco do paciente BAAR +++ manter baciloscopia positiva foi 1,62 (CI95%=1,03-2,54) vezes maior no segundo mês e 2,96 (CI95%=1,14-

7,73) vezes maior no quarto mês de tratamento. Além disso, nossos dados mostraram que, entre os indivíduos que permaneceram eliminando bacilos no segundo e quarto meses de tratamento, 68,6% e 66,7% respectivamente, apresentaram cavitação na imagem de diagnóstico ($p < 0,01$ e $p = 0,11$, respectivamente).

Além disso, devido a associação da alta carga bacilar e presença de lesões cavitárias, como fatores de risco para falência terapêutica, a permanência da eliminação de bacilos após quatro meses de tratamento, deve sugerir a extensão do tratamento para nove meses (ZUMLA et al., 2013). Kang e colaboradores (2016) observaram que 97,7% dos pacientes com TB pulmonar sensível aos antimicrobianos, com esfregaço positivo no quinto mês de tratamento, concluíram o tratamento com êxito após o prolongamento do regime primário (fase de manutenção). As causas de baciloscopia positiva no final do tratamento de primeira linha foram principalmente bacilos inviáveis (80,5%) ou MNT (17,1%), por essa razão os autores recomendaram a realização da cultura e teste de sensibilidade antes de alterar o esquema terapêutico nos pacientes (KANG et al., 2016). Em 1984, Kim e colaboradores já relataram que a observação de baciloscopias positivas com culturas negativas estava relacionada à extensão da doença e a regimes de tratamento que utilizavam rifampicina, antimicrobiano padronizado atualmente para o tratamento de primeira linha pela OMS, e que a extensão do mesmo regime convertia a baciloscopia para negativa. Para Kuaban e colaboradores (2009), pacientes que não convertem o esfregaço do escarro, já no segundo mês, devem receber tratamento totalmente supervisionado durante todo o tempo da terapia para evitar as falhas no tratamento autoadministrado, com consequentes desfechos desfavoráveis.

Diante da importância da realização das baciloscopias de controle e dos exames radiológicos para o acompanhamento da TB, na busca de desfechos favoráveis, acreditamos que uma mudança na organização do serviço seria positiva na cidade de Florianópolis. Quando observada isoladamente, Florianópolis tem apresentado aumento na incidência de TB nos últimos anos, de 40/100.000 habitantes em 2005 para 53.3/100.000 habitantes em 2014. Entre os fatores que colaboraram com esse aumento está a diminuição observada nas taxas de cura, que alcançaram níveis próximos a 80% em 2005 e em 2014 ficaram próximos a 60% (FLORIANÓPOLIS, 2015). O município, com uma extensão territorial 675,409km² e uma população de 469.690 habitantes, seguindo o modelo de Styblo (WHO, 1999), poderia substituir a atenção ao paciente em tratamento para TB hoje pulverizada nas 70 UBSs, por poucas equipes especializadas, responsáveis exclusivamente pelo

atendimento aos pacientes com TB, localizadas nas UPAs municipais já existentes. A cobertura territorial e populacional seria satisfatória, além disso, a estrutura atual das UPAs conta com exames radiológicos e poderiam ser adaptadas para realização de coleta de escarro induzido, garantindo a realização em uma única visita de todos os procedimentos necessários ao acompanhamento ideal do paciente em tratamento. A equipe dedicada exclusivamente ao atendimento de pacientes com TB teria mais disponibilidade, sendo mais capacitada para dar suporte ao tratamento e apta para ações educacionais com o paciente e seus familiares, reforçando a importância de completar o tratamento e da ingestão regular da medicação, fatores que fortaleceriam o vínculo entre o paciente e o sistema de saúde, diminuindo o abandono (TOSGT et al., 1995; WALLEY et al., 2001; LIENHARDT et al., 2012).

6.3 Perfil Comportamental da População Estudada

Conhecer os fatores de risco para uma doença infecciosa como a TB possibilita identificar grupos alvos para intervenções, como busca ativa de sintomáticos respiratórios, triagem e profilaxia, otimizando os recursos disponíveis para alcançar de maneira mais efetiva a redução na incidência da doença. Embora os fatores de risco para TB sejam classicamente conhecidos, estudos locais devem ser realizados para guiar os alvos das intervenções. A OMS estima que um terço da população mundial esteja infectada por *M. tuberculosis*, portanto é imprescindível para o sistema de saúde conhecer qual parcela desta população apresenta maior chance de desenvolver TB. Segundo Narasimhan e colaboradores (2013), o risco de infecção e progressão para doença envolve dois aspectos diferentes, o risco de TB seguinte à exposição, que é regido principalmente por fatores exógenos, determinados por uma combinação intrínseca de infecciosidade do caso fonte, da proximidade entre os contatos e de fatores de risco sociais e comportamentais, incluindo tabagismo, consumo abusivo de álcool e poluição do ar internamente; e o risco de progressão da infecção latente para a doença ativa, determinado principalmente por fatores endógenos. Condições que alteram a resposta imune aumentam o risco de progressão, com a coinfeção por HIV como a mais importante entre elas. Diabete, alcoolismo, má nutrição e tabagismo, são fatores que têm impacto sobre uma grande parcela da população, e podem acelerar a progressão para doença (NARASIMHAN et al., 2013).

O tabagismo, portanto, aumenta o risco de infecção no momento da exposição, bem como de progressão da infecção latente para a doença

ativa. No presente estudo, 64,7% dos doentes tinham histórico de tabagismo, 59,9% eram fumantes e 4,8% ex-fumantes no momento do diagnóstico. Quando considerados apenas os indivíduos do sexo masculino o percentual subiu para 79,3%. Números muito acima da atual prevalência de tabagismo no Brasil, que reduziu de 32,7% em 1997 para 14,8% em 2011 (SILVA et al., 2014b). Em revisão sistemática, Bates e colaboradores (2007) mostraram que o risco relativo para TB foi 2,3-2,7 vezes maior entre os fumantes. Considerando que aproximadamente 65% dos indivíduos do presente estudo eram tabagistas, e que aproximadamente 15% da população geral é tabagista, é possível estimar um risco 4,81 (IC 95%=2,97-7,81) vezes maior de um indivíduo fumante desenvolver TB atualmente. Em 1994, Buskin e colaboradores já relatavam que as bases biológicas para o fumante ter risco aumentado de adoecer de TB envolvem diminuição da resposta imune e/ou outros mecanismos como efeitos hormonais e disrupção mecânica da função ciliar ou competência das membranas mucosas. Mais recentemente, Shang e colaboradores (2011) demonstraram em modelos *in vitro* que o tabagismo suprime a resposta imune protetiva ao *M. tuberculosis* em ratos, em células THP-1 humanas e em macrófagos alveolares primários humanos. Os ratos expostos ao tabaco tiveram maior carga bacteriana, piores lesões, menor produção de interleucina 12 e de TNF- α pelos macrófagos e células dendríticas, e maior produção de interleucina 10, foi observada também tendência ao aumento no número de *M. tuberculosis* viáveis isolados em macrófagos humanos expostos ao tabaco (SHANG et al., 2011).

O uso abusivo de álcool foi relatado por 36,8% dos indivíduos do presente estudo, incluindo 5,5% que informaram ser ex-alcoolistas. Da mesma forma, considerando somente o sexo masculino, mais da metade dos indivíduos (59,2%) relatou problemas com álcool. Segundo Relatório Global sobre álcool e saúde da OMS (WHO, 2014), estimou-se que cerca de 6,0% (homens 8% e mulheres 3,5%) dos brasileiros preenchiam critérios para abuso ou dependência do álcool. Em revisão sistemática, Lönnroth e colaboradores (2008), concluíram que o risco de TB é substancialmente mais elevado entre pessoas que abusam do álcool (RR = 2,94). Considerando que aproximadamente 37% dos indivíduos do presente estudo faziam uso abusivo de álcool, e a estimativa da OMS, é possível estimar um risco 6,17 (IC 95%=2,72-13,96) vezes maior de um indivíduo que abusa de álcool desenvolver TB atualmente. Além disso, essas pessoas têm maior probabilidade de viver em condições de rua, em abrigos, ou em centros de reabilitação de drogas e álcool, fatores que aumentam o risco de exposição ao *M. tuberculosis*. O uso abusivo de

álcool foi considerado fator de risco para disseminação clonal (“clustering”) ou transmissão recente da doença em países de alta e baixa incidência de TB (FOK et al., 2008). Além de poder aumentar o risco de progressão para TB ativa por meio de maus hábitos alimentares e nutrição inadequada, resultando em deficiência imunológica, e por outros mecanismos diretos como alterações da função ciliar, da resposta imune humoral e celular (BURSKIN et al., 1994).

Taxas de infecções por HIV, hepatites virais e TB são substancialmente mais elevadas entre pessoas que utilizam drogas ilícitas, compreendendo todos os níveis de uso, abuso e dependência, pois cada nível é associado com comportamentos que aumentam o risco de contrair e transmitir doenças infecciosas (CDC, 2012). No presente estudo, o uso de drogas ilícitas foi relatado por 34,3% dos indivíduos, e em 44,1% quando considerado somente o sexo masculino. Nos Estados Unidos, o principal comportamento de risco associado à TB entre 153.268 casos estudados foi o uso de drogas ilícitas, que entre aqueles nascidos no país, representaram um terço dos casos (OELTMANN et al., 2009). Além disso, Oeltmann e colaboradores (2009) relataram que estes pacientes eram mais contagiosos (baciloscopia positiva) e permaneciam contagiosos por mais tempo, devido a falhas no tratamento, estendendo presumivelmente os períodos de infectividade/transmissibilidade. O aumento da transmissão foi comprovado com a localização de clones genotípicos entre os usuários de drogas ilícitas, que pode representar transmissão recente da doença. Em revisão sistemática, Nava-Aquilera e colaboradores (2009) concluíram que a transmissão recente da TB está associada, entre outros fatores, ao uso de drogas, consumo excessivo de álcool e pessoas vivendo em situação de rua.

Estudo de TB entre pessoas vivendo em condições de rua, realizado em Houston, Texas, que fundiu a quantificação dos moradores de rua com dados de vigilância da TB, calculou a incidência da doença em 411/100.000 habitantes entre os sem-teto, comparando com 9,5/100.000 habitantes entre pessoas alojadas (FESKE et al., 2013). Entre os indivíduos do presente estudo, 19 (8,5%), todos do sexo masculino, viviam em situação de rua. Segundo o resultado do levantamento feito pelo Projeto Contagem da População em Situação de Rua, da Secretaria Municipal de Assistência Social da Prefeitura de Florianópolis, no município existem 421 pessoas em situação de rua, sendo que 144 estão em casa de acolhimento (46 no Albergue Municipal, 66 nas Casas de Apoio e 32 em unidades cofinanciadas pela prefeitura) e 277 não utilizam nenhum abrigo, destes, a maioria (67,1%) se concentra no centro da cidade. No presente estudo, 16 dos 19 indivíduos com TB em situação de

rua, viviam no município de Florianópolis. Considerando somente os pacientes com cultura positiva, localizados para tratamento, incluídos no estudo, eles representaram 3,8% do total de indivíduos vivendo em situação de rua em Florianópolis no período de dois anos, o que corresponde a um risco 131,23 vezes maior de adoecer por TB em relação às pessoas alojadas. O PNCT considerou a prevalência 67 vezes maior de TB nessa população, de acordo com estudo realizado em 2004 (BRASIL, 2012). Feske e colaboradores (2013) demonstraram ainda que os casos de TB entre a população em situação de rua não estariam relacionados a comorbidades, mas sim a determinantes sociais.

6.4 Desfecho dos Casos e Associação com Variáveis Epidemiológicas

Em relação ao tratamento da TB, a meta da OMS com a estratégia DOTS era alcançar taxas de cura de 85% para todos os pacientes, e foi ampliada para 95% em 2016 com a nova estratégia *End TB* (WHO 2015b). No entanto, segundo o Relatório Global da OMS (WHO 2016) o Brasil mantém as taxas de sucesso terapêutico na faixa de 70% desde o ano 2000 (71% em 2015), bem abaixo da primeira meta da OMS. De fato, desde 2001 a OMS já afirmava que entre as maiores deficiências em relação ao controle de TB estavam as altas taxas de abandono (S BARBARO et al., 2001). No presente estudo, a taxa de sucesso no tratamento foi de 72,6%, com 20,6% de abandono e 4,5% de óbito. Segundo o boletim epidemiológico da SMS de Florianópolis, as taxas de cura no município foram de 62% em 2014. A pobre adesão e a interrupção prematura do tratamento contribuem para a infectividade prolongada, aumentando o número de pessoas expostas ao *M. tuberculosis* e por consequência a incidência da TB (LIENHARDT et al., 2012). A Adesão ao tratamento continua a ser uma barreira ao sucesso dos cuidados com o paciente de TB. Reduzir a frequência de abandono é importante tanto para saúde dos pacientes quanto para saúde da comunidade (LACKEY et al., 2015).

Para compreender e buscar alternativas para reverter as baixas taxas de sucesso no tratamento da TB na região estudada realizou-se associação de diferentes variáveis ao desfecho do tratamento. Constatou-se que desfechos favoráveis foram associados a indivíduos do sexo feminino, a faixa etária mais alta (55-64 anos) e a indivíduos com maior escolaridade ($p=0,02$, $p=0,07$ e $p=0,03$, respectivamente). Por outro lado, viver em situação de rua, usar drogas ilícitas, soropositividade para o HIV, abusar de álcool e ser tabagista diminuíram a probabilidade de sucesso no tratamento em 51%, 44%, 34%, 26% e 25%, respectivamente

($p < 0,01$). Em coorte com 1.233 pacientes e 10% de insucesso terapêutico, realizada no Peru, Lackey e colaboradores (2015) relatam que vários fatores foram associados com a falha no tratamento, sugerindo um conjunto complexo de causas. No presente estudo, utilizando modelo de regressão multivariável, somente a baixa escolaridade, soropositividade para HIV e uso de drogas ilícitas foram fatores preditivos independentes associados a desfechos desfavoráveis no tratamento entre os indivíduos estudados (Figura 20).

A baixa escolaridade foi associada ao maior risco de abandono de tratamento em outros estudos brasileiros (NATAL, et al., 1999; CAMPANI et al., 2011; MARUZA et al., 2011; GARRIDO et al., 2012; MACEDO et al., 2013; SILVA et al., 2014a; CAMÊLO et al., 2016). O baixo nível de escolaridade pode comprometer a percepção da gravidade da doença, bem como a capacidade de compreensão das orientações e da prescrição médica (NATAL et al., 1999). Um estudo sobre a escolaridade de todos os casos de TB notificados no Brasil no ano de 2013 (91,576 casos) mostrou que pacientes com baixa escolaridade são mais propensos a ter TB e a abandonar o tratamento (CAMÊLO et al., 2016). No presente estudo, indivíduos com baixa escolaridade apresentaram um risco 1,99 (IC95% = 1,15-3,43) vezes maior de abandonar o tratamento para TB. No estudo de Camêlo e colaboradores (2016), Santa Catarina aparece entre os três principais Estados onde a baixa escolaridade foi fortemente associada aos casos novos de TB, e a taxas mais altas de abandono. Os autores concluem que programas destinados a reduzir o impacto da TB no Brasil devem levar em conta a importância dos níveis de educação. A educação é, portanto, uma importante ferramenta de capacitação, pois além de facilitar a compreensão da informação de saúde, gera meios para fortalecer a autonomia individual e o autocuidado em matéria de saúde e prevenção de doenças (HINO et al., 2013).

Pessoas vivendo com HIV são consideradas mais propensas a resultados desfavoráveis no tratamento da TB. Considerando os casos novos notificados no Brasil em 2016, somente 49,1% dos indivíduos soropositivos que iniciaram tratamento evoluíram para cura, sendo que 22,6% foram a óbito e 13,9% abandonaram o tratamento (BRASIL, 2017). No presente estudo, o sucesso no tratamento foi observado em 51,2% dos indivíduos soropositivos, a taxa de abandono foi de 31,7% entre eles, mais que o dobro da média nacional, e 14,6% foram a óbito, sendo que o risco de morte foi 7,85 vezes maior do que entre os indivíduos soronegativos para HIV. Prado e colaboradores (2017), avaliando o desfecho de 68,295 casos de coinfeção TB/HIV no Brasil, notificados entre 2001 a 2011, descreveram cura em 55% dos casos e óbito em 25,7%.

O estudo, que utilizou fontes secundárias (SINAN), incluiu TB pulmonar e extrapulmonar, e considerou todos os tipos de entrada, inclusive retratamento, concluiu que desfechos desfavoráveis em pacientes HIV soropositivos foram associados a idade (15-19 e ≥ 60 anos), uso de álcool, viver em situação de rua e baixo nível educacional, no entanto, não avaliou o uso de drogas ilícitas. Como a maioria dos fatores associados com mortalidade no estudo são considerados marcadores socioeconômicos de vulnerabilidade, os autores concluíram que um melhor suporte socioeconômico para os pacientes, seria a chave para melhorar os desfechos entre soropositivos (PRADO et al., 2017). Estudos recentes na Europa e África confirmaram o HIV como forte fator de risco para desfechos desfavoráveis no tratamento da TB, aumentando a mortalidade (KARO et al., 2016; GEBREMARIAN et al., 2016). É importante ressaltar que a coinfeção TB/HIV já representa um estado avançado da doença pelo HIV/Aids, deixando o paciente em maior situação de vulnerabilidade e risco aumentado de morte (BRASIL, 2017). No entanto, o diagnóstico precoce da coinfeção com início da terapia antirretroviral apresenta impacto significativo na sobrevivência desses pacientes, sendo importante medida para redução da mortalidade (BRASIL, 2017). Estudo que avaliou o risco de morte entre pessoas vivendo com HIV que abandonaram o tratamento para TB, encontrou uma probabilidade quatro vezes maior do que entre aqueles que completaram o tratamento, o risco foi mais alto entre aqueles que abandonaram o tratamento nos primeiros três meses (CUNHA et al., 2017). Neste contexto, a taxa de abandono de 31,7% observada entre os pacientes soropositivos do presente estudo é um fator alarmante e demanda atenção dos programas de controle da TB e HIV locais.

Entre os fatores individuais associados ao abandono, a utilização de drogas ilícitas apresentou o maior risco (RR 3,14 – IC95%=1,77-5,58). Nossos dados corroboram estudos anteriores nos quais a utilização de drogas ilícitas foi o principal determinante associado à falha no tratamento (CAYALA et al., 2009, LACKEY et al., 2015). No entanto, vários estudos realizados em diferentes regiões do Brasil que avaliaram fatores associados ao abandono não incluíram a variável uso de drogas ilícitas (GARRIDO et al., 2012; FURLAN et al., 2012; MACEDO et al., 2013; PRADO et al., 2017; CUNHA et al., 2017). Um estudo utilizando abordagem qualitativa elenca o uso de drogas ilícitas, além do etilismo, reações adversas, problemas socioeconômicos, vínculo com o profissional de saúde, sensação de cura antes do término do tratamento, entre outros, como fatores que levaram o paciente a abandonar o tratamento da TB (COUTO et al., 2014). Conhecer os principais fatores

associados com falha pode ajudar a identificar, no início do tratamento, pacientes com alto risco para intervenções suplementares antes deles interromperem do tratamento (LACKEY et al., 2015). A utilização de drogas ilícitas, especialmente o crack, é fator de risco fortemente associado ao abandono de tratamento na região estudada, devendo ser motivo para intervenções e maior atenção da equipe de saúde desde o início do tratamento.

A despeito de que características como o uso de drogas ilícitas foram altamente associadas ao abandono, muitos pacientes com vários fatores de risco foram capazes de completar o tratamento com sucesso, sendo que o contrário também foi observado no estudo. Em revisão sistemática Toczek e colaboradores (2013) apontam que entre outros fatores que podem contribuir com a interrupção precoce do tratamento está a falta de engajamento e empenho do serviço de saúde em integrar e educar o paciente com a finalidade de promover a cura. O impacto da estratégia de educação intensiva na adesão foi demonstrado em Bangladesh (LEE et al., 2013). Diminuição significativa do abandono devido a intervenções educacionais e aconselhamento psicológico também foi demonstrada na Etiópia (TOLA et al., 2016).

6.5 Caracterização Genética

Com exceção de um isolado caracterizado como *M. bovis*, os demais isolados do estudo pertenciam a linhagem moderna 4 ou Euro-Americana, predominantemente LAM, T e *Haarlem*, que constituem as famílias mais frequentes na Europa, África, América Central e América do Sul (BRUDEY et al., 2006). Não foram observados isolados pertencentes às linhagens CAS, EAI, *Beijing* e *Africanum* na região. A linhagem LAM representou 62,1% dos isolados do presente estudo, sendo 16,4% identificados como LAM9 principalmente SIT42/LAM9 (9,6%), no entanto, o SIT mais frequente foi o SIT216/LAM5 que representou 11,0% de todos isolados. Em estudo recente realizado, por nosso grupo de pesquisa, nos complexos penitenciários de Santa Catarina, Medeiros (2015) descreveu o SIT216/LAM5 como o mais frequente entre os presidiários do Estado. Prisões superlotadas, com altas taxas de HIV e usuários de drogas ilícitas constituem um excelente meio para transmissão da TB. O presente estudo evidenciou alta circulação na comunidade do principal *cluster* de *M. tuberculosis* isolado nos presídios catarinenses. De fato, a circulação de visitantes e trabalhadores nas prisões, entre prisões e dentro da população em geral, além da liberação de presidiários, leva à rápida transmissão da TB dentro e fora do sistema

penitenciário, conforme demonstrado no presente estudo, representando um grave problema de saúde pública, pois os muros são irrelevantes diante do movimento de indivíduos e de uma doença infecto contagiosa de transmissão por via aérea (OLIVEIRA; CARDOSO, 2004; MACNEIL et al., 2005; TODRYS et al., 2011). No presente estudo, entre os 24 indivíduos dos quais foram isolados microrganismos da sublinhagem SIT216/LAM5, um informou ser ex-presidiário, um informou que visitava um amigo presidiário com TB, dois eram moradores de rua, um era ex-interno de clínica de recuperação para dependentes químicos, 11 informaram ter parentes que trataram ou estavam em tratamento para TB e oito informaram não conhecer ninguém com a doença. O índice de transmissão recente calculado com base no *spoligotyping* para o SIT216 foi 0,85, ou seja, 85% dos isolados circulantes na região estariam associados com transmissão recente da TB.

A região da grande Florianópolis foi colonizada por imigrantes portugueses no século XVIII, fato que pode estar associado à similaridade entre a maioria das linhagens circulantes em ambas as regiões. Estudo realizado em Portugal descreveu um predomínio da linhagem LAM (51%), sendo 18,5% LAM9 e 11,50% SIT42/LAM9 (DAVID et al., 2007). No presente estudo, a família T representou 20,5% dos isolados, sendo 12,8% T1, e a *Haarlem* 9,6% dos isolados sendo 5,9% H3, principalmente SIT50 (4%). Resultados semelhantes aos observados em Portugal, no qual 23% dos isolados pertenciam à família T, sendo 18% T1 e 10% H sendo 4,1% H3, principalmente SIT50 (4%) (DAVID et al., 2007). Nogueira e colaboradores (2016), em estudo com amostras do Estado de Santa Catarina, também descreveram o predomínio de LAM (47,5%), sendo 16,5% LAM9 e 9,6% SIT42/LAM9, seguido pela superfamília T (25,9%) e *Harleem* (12,3%). No referido estudo, o principal SIT isolado entre as 135 amostras da região da grande Florianópolis, no entanto, foi SIT64/LAM6 (9,6%), seguido pelos SIT73/T (8,1%), SIT42/LAM9(6,7%), SIT93/LAM5 (5,9%) e SIT65/T1 e SIT50/H3 (4,4%), sendo que não foram descritos isolados SIT216/LAM5. Tais diferenças podem ser referentes aos períodos de coletas de amostras de ambos os estudos (2010-2011 e 2014/2016), informação relevante para caracterizar uma recente e importante disseminação da sublinhagem SIT216/LAM5 na região, com aumento na circulação do SIT42/LAM9 e SIT17/LAM2, e diminuição do SIT64/LAM6, SIT73/T, sendo que SIT65/T1 e SIT50/H3 se mantiveram em proporções semelhantes. No entanto, estas diferenças podem representar um viés de amostragem, visto que no período do estudo de Nogueira e colaboradores (2010-2011), a grande Florianópolis realizava

cultura somente para casos de retratamento, pacientes imunocomprometidos, baciloscopias positivas no final de segundo mês de tratamento, e pacientes com suspeita de TB resistente. Em meados de 2013, os laboratórios municipais e hospitais da região passaram a realizar culturas para todas as amostras enviadas para pesquisa de bacilo álcool ácido resistente, o que torna a amostragem do presente estudo mais representativa dos isolados circulantes em toda a comunidade.

Um estudo com amostras de 11 Estados brasileiros, sendo 51% o delas do Rio de Janeiro, e no qual não foram incluídas amostras de Santa Catarina, descreveu uma frequência de 46,2% de isolados LAM, apresentando distribuição bastante heterogênea da linhagem, chegando a 81,6% dos isolados de Sergipe e 70% dos isolados do Ceará, regiões também colonizadas por portugueses, caindo para 35% em São Paulo (GOMES et al., 2012). Vasconcelos e colaboradores (2014) descreveram em estudo com isolados mais recentes no Rio de Janeiro, que a linhagem LAM representou 43,6% dos isolados, sendo 14,7% LAM9 e 8,2% SIT42, a superfamília T representou 34,9% dos isolados, sendo 23,8% T1 e a *Haarlem* 18,3%, sendo 11% H3. Diferentes regiões dos Estados vizinhos, Paraná e Rio Grande do Sul, apresentaram diferentes padrões de distribuição das principais linhagens encontradas, LAM 50,1/26,9%, T 20,8/11,8% e *Haarlem* 2,1/17,2% em estudos realizados no Paraná, e LAM 38/37% *Haarlem* 31/11,1% e T 20/27,4% em estudos realizados no Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009; CAFRUNE et al., 2009; NOGUTI et al., 2010; MACHADO et al., 2014). Este compilado de dados mostra que, apesar da proximidade geográfica, as linhagens de *M. tuberculosis* circulantes são bem diferenciadas, reforçando a importância de estudos locais de genotipagem para compreensão da distribuição e circulação dos isolados, que parece sofrer influência do tipo de colonização e de característica referentes com circulação de pessoas em cada região. O presente estudo encontrou isolados com descrição pouco frequentes no Brasil, sendo dois isolados LAM11 ZWE/SIT59, predominantes na região do Zimbábue, que foram recuperados de um paciente residente em São José, de raça branca, que trabalha como vigilante na mesma cidade e o outro recuperado de paciente residente em Florianópolis, raça branca, dentista, sem vínculo aparente entre os casos; além de um isolado T1-RUS2, recuperado de paciente morador de rua e usuário de crack da cidade de Florianópolis.

Analisando a distribuição das principais sublinhagens nos bairros com maior prevalência de TB, o presente estudo evidenciou uma possível disseminação de *clusters* em alguns bairros da região (Figura 22). No bairro José Mendes 85,7% (6/7) dos isolados pertenciam aos SITs

216/LAM5 e 42/LAM9; no bairro Ipiranga 33,3% (3/9) dos isolados pertenciam ao SIT241/T1, 22,2% (2/9) ao SIT65/T1 e 22,2% (2/9) ao SIT 216/LAM5; no Saco dos Limões 28,6% (2/7) dos isolados do pertenciam ao SIT3099; em Forquilha 25% (3/12) e dos isolados pertencia ao SIT73/T e 25% ao SIT216/LAM5; e no bairro Monte Cristo, os SITs 20/LAM1, 47/H1, 73/T, 216/LAM5 e 823/T1 representaram pequenos *clusters* (2/14). Embora ligações epidemiológicas específicas não puderam ser determinadas no estudo, nossos dados sugerem que a alta prevalência de TB nesses bairros possa estar sendo influenciada pela transmissão ativa destes pequenos *clusters*, chamando atenção para o SIT216 associado a *clusters* em quatro dos sete bairros com maior número de casos de TB nos dois municípios. Ribeiro e colaboradores (2015) realizaram análise espacial e genotípica da transmissão de *M. tuberculosis* na cidade de Vitória/ES, que assim como Florianópolis, tem apresentado aumento na incidência de TB, e revelaram uma transmissão ativa e contínua da TB causada por pequenos *clusters* em bairros específicos da cidade. Os autores sugerem que a TB é transmitida dentro de pequenas áreas de pobreza com condições precárias de habitação e saneamento. Além disso, o agrupamento espacial pode representar redes sociais dentro de áreas urbanas, a rede provavelmente se rompe por barreiras raciais e econômicas como um movimento que atravessa a paisagem urbana, ou seja, pessoas de bairros pobres provavelmente estão interagindo e participando de atividades, assim, uma vez que determinada linhagem entra em uma rede social, aquele isolado em particular tende a se propagar e permanecer naquela rede, revelando vias de transmissão que seguem classes sociais distintas (RIBEIRO et al., 2015). Os dados sugerem que os programas de controle de TB, devem focar em rigorosa investigação dos contatos, intensificar o monitoramento dos pacientes em tratamento, mantendo-os em isolamento respiratório até a comprovada negativação da baciloscopia, além de investir em novas estratégias para reduzir o abandono, rompendo de forma específica e ativa a transmissão dentro das comunidades ou núcleos sociais.

Em 2007 foi identificado um genótipo de *M. tuberculosis* predominante na cidade do Rio de Janeiro. A sublinhagem RD^{Rio} é um derivado da família LAM que apresentou uma deleção de aproximadamente 0,6% do genoma (LAZZARINNI et al., 2007). Entre os genes deletados encontram-se alguns associados ao reconhecimento da micobactéria pelo sistema imune do hospedeiro (LAZZARINNI et al., 2007). No presente estudo, a deleção foi observada em 33,6% dos isolados de *M. tuberculosis*, compreendendo 16 perfis diferentes, todos pertencentes à linhagem LAM, representando seis perfis únicos e 10

clusters (2 a 17 isolados). Apesar da descrição mais recente, Soares e colaboradores (2013) demonstraram que a sublinhagem estava presente em 28,9% dos isolados da cidade de Rio Grande-RS entre 1998 e 2001 e que alta diversidade clonal foi observada entre esses isolados. Assim como descrito por Lazarinni em 2007, as sublinhagens LAM1 e LAM2 do presente estudo foram exclusivamente formadas pelo genótipo RD^{Rio}, e em nenhum isolado da sublinhagem LAM3 foi encontrada deleção. O presente estudo, no entanto, descreveu a presença da deleção em dois isolados LAM11, sublinhagem que não foi encontrada no estudo de Lazarinni e colaboradores. Além disso, todos os 11 isolados LAM6 do presente estudo não apresentaram a deleção, diferentemente do observado nos isolados do Rio de Janeiro, dos quais 11,8% (2/17) apresentaram a deleção RD^{Rio} (LAZARINNI et al., 2007).

Segundo Brudey e colaboradores (2006), LAM9 seria o *spoligotype* LAM básico e presumivelmente a origem da linhagem LAM. Partindo desta informação e verificando o inter-relacionamento genético entre os isolados LAM, Lazarinni e colaboradores (2007) sugeriram que a deleção RD^{Rio} pode ter se originado em um progenitor LAM9, que então diversificou e expandiu com sucessivas perdas ou disrupções de elementos espaçadores DR. Por outro lado, os autores apontam ainda que a presença de isolados LAM9, LAM4 e LAM5 com e sem deleção, poderia sugerir homoplasia de polimorfismo de grande sequencias como origem da deleção. Independentemente da sua origem, a diversidade de padrões de *spoligotypes* entre os isolados da família LAM, segundo os autores, sugere que provavelmente a linhagem deva ter uma história relativamente longa de circulação no Brasil (LAZARINNI et al., 2007).

6.6 Associação entre Características Genéticas dos Isolados, População Estudada e Desfecho

No presente estudo, as sublinhagens T1, H3 e T foram predominantemente isoladas em indivíduos do sexo masculino (78,6%, 69,2% e 66,7%, respectivamente), sendo LAM9 e T associadas predominantemente a usuários de drogas ilícitas (51,5% e 41,7%, respectivamente), H3, LAM1 e LAM2 a indivíduos que abusavam de álcool (50%, 41,7% e 38,5%, respectivamente), e T1 associada a ambos (47,8%). T1 e H3 foram também associadas a indivíduos vivendo em situação de rua ($p < 0,01$). As sublinhagens LAM1, LAM9, LAM5 e H3, apresentaram maiores proporções de indivíduos HIV soropositivos. Considerando a representatividade em número de indivíduos e a

associação ao uso de drogas ilícitas, os SITs 42, 65, 73, 216 e 3099 representaram *clusters* de no mínimo 5 isolados. Associando ao abuso de álcool, os SITs 17, 42, 65, e 216 também representaram *clusters* de no mínimo 5 isolados. Este achado demonstra transmissão relacionada a hábitos, possivelmente devido a formação de redes sociais, conforme discutido anteriormente. O uso abusivo de álcool e de drogas ilícitas foi considerado fator de risco para disseminação clonal (“clustering”) ou transmissão recente da doença em países de alta e baixa incidência de TB (FOK et al., 2008).

Ao avaliar algumas características clínicas associadas à gravidade da doença e à maior transmissibilidade os SITs 20/LAM1 e 3099/LAM9 destacaram-se pela alta carga bacilar, presença de hemoptise e cavitação, além da perda ponderal severa observadas em mais de 50% dos indivíduos (Figura 31). Todos os isolados destes dois SITs apresentam a deleção RD^{Rio}. No entanto, considerando todos os isolados RD^{Rio} do estudo, que representaram um terço dos casos novos de TB na região (33,6%), não foram encontradas associações positivas entre a presença da deleção e fatores relacionados à maior transmissibilidade como a presença de alta carga bacilar e cavitações. Mas corroboram os relatos de alta prevalência da deleção em diversas regiões do Brasil (LAZZARINI et al., 2008, GIBSON et al., 2008, VON GROLL et al., 2010b, GOMES et al., 2012; MORAES et al., 2017). Em relação à gravidade da doença, foi observada maior porcentagem de pacientes com hemoptise associada à presença da deleção ($p=0,16$), e foi significativamente associada ao aparecimento de nódulos nas imagens radiográficas ($p=0,04$), implicando maior probabilidade de doença disseminada. Outro achado do presente estudo foi a menor porcentagem de microrganismos com deleção em indivíduos do sexo masculino ($p=0,09$), sendo significativamente mais baixa entre a população vivendo em situação de rua ($p=0,04$), que no presente estudo foi constituída exclusivamente pelo sexo masculino. Diferentemente do encontrado por Moraes e colaboradores (2017), o presente estudo não observou associação entre a presença da deleção e o uso abusivo de álcool ($p=0,65$). Por outro lado, a despeito das diferenças na segregação entre faixas etárias, Moraes e colaboradores (2017) relataram uma probabilidade 2,59 vezes maior e 2,94 vezes maior da deleção estar presente em indivíduos entre 36-60 anos e >60 anos, respectivamente. No presente estudo, em indivíduos das faixas etárias inferiores a 54 anos, as porcentagens de microrganismos com deleção foram próximas a 30%, subindo para 46,2% entre 55-64 anos e 71,4% em indivíduos com 65 anos ou mais ($p=0,18$). Assim, considerando todos os indivíduos do presente estudo, na faixa etária ≥ 55 anos a probabilidade

da presença deleção foi 1,69 (CI95%=1,14-2,50) vezes maior, e em ≥ 65 anos foi 2,20 (CI95%=1,33-3,66) vezes maior, corroborando, embora em menor proporção, os achados de Moraes e colaboradores (2017).

Os primeiros estudos sobre a sublinhagem RD^{Rio} revelaram uma alta taxa de transmissão, que foi associada como possível causa de doença mais severa (LAZZARINNI et al., 2008), associação questionada por estudos posteriores que não observaram diferenças clínicas, radiológicas ou laboratoriais (BARBOSA et al., 2012; DALLA COSTA et al., 2013; MORAES et al., 2017). Os achados do presente estudo sugerem que a associação à maior transmissibilidade, descrita por Lazzarinni e colaboradores, possa não estar relacionada diretamente à presença da deleção, mas talvez a outras características de *clusters* específicos, representados aqui pelos SITs 20 e 3099 que precisam ser melhor avaliados. Da mesma forma, a associação observada no presente estudo entre a presença da deleção e a ocorrência de hemoptise, pode não estar relacionada à deleção em si, mas a outras características específicas destes *clusters*.

Como observado no estudo de Lazarinni e colaboradores (2007), os isolados RD^{Rio} do presente estudo estiveram dispersos por toda área geográfica e período estudados e foram responsáveis por grande proporção da carga de TB. Nosso estudo também não confirmou características de maior transmissibilidade associadas diretamente à deleção. No entanto, diante da alta prevalência, ampla distribuição e da associação às faixas etárias mais velhas/avançadas, poderíamos especular que a deleção RD^{Rio} influenciaria a capacidade de reativação do bacilo em estado de latência. Entre os 10 genes deletados encontram-se dois que codificam proteínas da família PE/PPE, cujo papel ainda não foi completamente elucidado, mas que representam aproximadamente 10% da capacidade codificadora do genoma do *M. tuberculosis*. Estudo realizado com proteínas PE/PPE demonstrou que elas formam um complexo solúvel, localizado na superfície bacteriana ou secretado, que interage com células do hospedeiro, induzindo a morte de macrófagos por necrose, independentemente de TNF α , óxido nítrico ou NF- κ B, utilizando mecanismo ainda desconhecido (TUNDUP et al., 2014). Os autores sugerem que o complexo poderia estar envolvido ainda em uma espécie de “*quórum sensing* imune”, que seria secretado para detectar o *status* imune do hospedeiro, e após isso, transmitiria um sinal para o microrganismo permanecer em dormência ou promover a necrose do macrófago. Estas proteínas teriam importante papel na virulência e reativação da TB, associadas com multiplicação e disseminação bacteriana após a morte do macrófago por necrose (TUNDUP et al.,

2014). Embora necessitando de comprovação, os dados sugerem que a deleção poderia estimular respostas compensatórias associadas ao aumento na expressão de genes, resultando no aumento da secreção de proteínas do complexo PE/PPE, e consequentemente em uma maior probabilidade de reativação da TB latente.

Por outro lado, a latência parece representar um porto seguro para infecções futuras, otimizando a persistência de *M. tuberculosis* em populações humanas (CHISHOLM; TANAKA, 2016). Estudo indica que a taxa de ativação é diferente entre as linhagens, sugerindo que este fenótipo está sob seleção evolutiva (De JONG et al., 2008). Utilizando modelos matemáticos, Zheng e colaboradores (2014), mostraram que uma latência prolongada pode prover uma vantagem evolucionária, melhorando a persistência na população, sendo a latência intermediária considerada ótima para persistência do microrganismo. Uma longa latência e baixa taxa de ativação poderia ser uma estratégia com benefícios evolucionários ao microrganismo por aumentar seu fitness. Para doenças infecciosas, a medida do fitness geralmente é a transmissibilidade, definida pelo número de reproduções (R_0), o isolado com maior R_0 será mais competitivo em uma disputa direta. No entanto, na ausência de concorrência direta, isolados com R_0 mais baixas poderiam ter vantagens, pois evitariam a sua extinção local e, portanto, venceriam a concorrência indireta contra isolados com maior transmissibilidade. Dessa forma, um modo alternativo de capturar o fitness de um patógeno seria pela quantificação de sua habilidade de persistir na população hospedeira (PARVIEN; DIECKMANN, 2013; ZHENG et al., 2014; CHISHOLM; TANAKA, 2016). Uma vez que *M. tuberculosis* é um microrganismo que infecta humanos por milênios, desenvolveu estratégias que lhe permitiram persistir promovendo infecção ativa em populações relativamente pequenas de hospedeiros e espacialmente estruturadas. Sob tais circunstâncias, os benefícios do fitness devido a não extinção podem ter tido um impacto importante na dinâmica evolutiva geral (ZHENG et al., 2014; CHISHOLM; TANAKA, 2016). Baseado nestas teorias evolucionárias, a alta prevalência de microrganismos com a deleção RD^{Rio}, poderia ser resultado de uma longa latência e uma baixa taxa de ativação, possivelmente relacionadas a perda de genes do completo PE/PPE, que evolutivamente levaram a persistência destes isolados na população.

A deleção não apresentou associação significativa com fatores como escolaridade ou comportamentos relacionados à TB no presente estudo. Da mesma forma, não foram observadas associações entre a presença da deleção e algum desfecho específico (cura, abandono, falha

ou óbito). Quando correlacionada com ao sucesso no tratamento, a presença da deleção foi significativamente associada a indivíduos do sexo feminino ($p=0,02$). No entanto, a deleção foi mais frequente no sexo feminino (41,0%), gênero que também apresentou maior probabilidade de sucesso no tratamento (82,1%) ($p=0,02$).

Em relação a maior transmissibilidade, o SIT216/LAM5, o mais frequente entre os isolados do estudo, que baseado no índice de transmissão recente calculado ($ITR_{n-1} = 0,85$) teria 85% dos isolados circulantes associados a transmissão recente, foi também o que apresentou maior proporção de indivíduos com alta carga bacilar, aproximadamente 60%. Nossos resultados corroboram estudos discutidos anteriormente, que associam a alta carga bacilar com maior infectividade, ou seja, maior risco de transmissão da TB (YODER et al., 2004; O'SHEA et al., 2014).

O SIT73/T, a despeito da baixa taxa de realização de baciloscopia de controle, foi o que apresentou maior proporção de permanência de baciloscopias positivas no quarto mês de tratamento (60%). Neste SIT, a alta carga bacilar no diagnóstico e a presença de cavitação estiveram presentes somente em cerca de 30% dos indivíduos, fatores que foram associados à permanência de bacilos no segundo e quarto meses de tratamento e que são amplamente relacionados à falha terapêutica, recaída (BENATOR et al., 2002, KUABAN et al., 2009, HORNE et al., 2010, KANG et al., 2016). Por outro lado, o SIT73/T apresentou alta proporção de indivíduos que relataram uso de drogas ilícitas, representando um importante viés para desfechos desfavoráveis. Da mesma forma, o SIT42/LAM9 que também apresentou alta proporção de indivíduos usuários de drogas ilícitas, teve aproximadamente 30% de indivíduos com alta carga bacilar e cavitação no diagnóstico e 28,6% dos indivíduos que realizaram baciloscopia no quarto mês de tratamento permaneceram positivos. Entre os SITs mais prevalentes no estudo, outros três foram associados com permanência de baciloscopia positiva no quarto mês de tratamento, o SIT20/LAM1, que no presente estudo foi relacionado também à alta carga bacilar, cavitações e doença mais severa e foi o que apresentou maior proporção de baciloscopia positivas no segundo mês, o SIT65/T1 relacionado em 50% dos indivíduos com presença de cavitações, além de 60% deles utilizarem drogas ilícitas e álcool e o SIT50/H3. Os SITs T1 e H3 foram relacionados também a CIMs mais elevadas para Rifampicina (Figura 42), 80% dos microrganismos classificados no SIT65 apresentaram CIM entre 0,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ para rifampicina e 56% no SIT50, sendo que neste último um microrganismo foi resistente ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$).

Quando associamos as principais linhagens do estudo ao sucesso no tratamento, observamos que as sublinhagens T, H3, LAM9 e LAM5 representaram as menores proporções de desfecho favorável. No SIT 3099/LAM9, apenas um terço dos indivíduos obteve sucesso no tratamento, um pouco mais da metade dos indivíduos com infecções por microrganismos pertencentes ao SIT 50/H3 e aproximadamente 60% dos pertencentes aos SITs 73/T, 42/LAM9 e 216/LAM5 evoluíram com desfechos favoráveis. Estes representaram o primeiro, segundo, quarto, sétimo e nono maiores *clusters* isolados no estudo. Com exceção dos SITs 50/H3 e 216/LAM5, os demais foram também muito frequentes entre usuários de drogas ilícitas. Considerando que o uso de drogas ilícitas foi uma das variáveis independentes associadas ao abandono de tratamento, já seria esperado que os *clusters* relacionados a estes pacientes estivessem sendo transmitidos em maior frequência dentro da comunidade. Corroborando a afirmação de Lienhardt e colaboradores (2012), de que a interrupção prematura do tratamento aumenta o número de pessoas expostas ao *M. tuberculosis*, verificado pela disseminação dos *clusters*, e por consequência aumenta a incidência da TB. A linhagem LAM 4, por outro lado, foi representada no presente estudo por 11 isolados de quatro SITs diferentes (60/2514/Orphan1/Unknown2), ou seja, teve ampla diversidade genética, apresentou 90,9% de associação com sucesso no tratamento. Estes dados fortalecem a associação entre abandono e aumento na circulação de linhagens específicas (*clusters*), aumentando consequentemente o número de casos de TB na região.

A presença da deleção RD^{Rio}, que representou 33,6% dos isolados de *M. tuberculosis* do estudo, foi associada ao sucesso no tratamento em 36% dos indivíduos e ao abandono em 28,3%. A despeito de não haver diferenças significativas, a deleção foi mais frequentemente relacionada a desfechos favoráveis, reforçando a hipótese de que sua ampla distribuição (1/3 dos casos de TB na grande Florianópolis), poderia ser associada com reativação da TB latente.

6.7 Concentração Inibitória Mínima

Passados mais de 50 anos das considerações de Canneti (1963), sobre a superioridade de um teste de sensibilidade quantitativo para *M. tuberculosis* que proporcionasse informações sobre o nível de resistência, e com a urgente demanda atual por medidas quantitativas, ainda não existe um método universalmente aceito para determinação da CIM para *M. tuberculosis* (SCHÖN et al., 2017). Um dos métodos comerciais disponíveis, MGIT 960 é proposto por alguns especialistas como

referência para determinação da CIM (CAMBAU et al., 2015; SCHÖN et al., 2017). No entanto, seu alto custo torna a determinação da CIM inviável para utilização na rotina, especialmente nos países de baixa renda, onde a TB é mais frequente e os problemas com resistência são maiores. O presente estudo, determinou a CIM por metodologia de microdiluição em placa, amplamente utilizada como padrão ouro em microbiologia para bactérias Gram positivas e negativas, que além de não necessitar de equipamentos, apresenta baixo custo, realizando leitura por oxirredução e microscopia. Este método se constitui uma alternativa barata que poderia ser implementada em países com recursos escassos.

Na primeira avaliação, por comparação direta com resultados do LACEN/SC realizados no MGIT960 com concentração crítica, a metodologia apresentou excelentes resultados para rifampicina (sensibilidade de 100% e especificidade de 99,5%), mas a sensibilidade foi muito baixa para Isoniazida (50%), com boa especificidade (96,9% ponto de corte de 0,12 µg/mL e 98,4% ponto de corte de 0,25 µg/mL). Os resultados discordantes foram repetidos com novo repique da alíquota de estoque e confirmados por metodologia de microdiluição. Em um segundo momento, os isolados discordantes serão repetidos no MGIT960 e mantidas as discordâncias, serão avaliados por metodologia molecular para verificar a presença de mutações associadas à resistência aos respectivos antimicrobianos. A metodologia de microdiluição em placa, utilizando inóculo de mesma concentração e comparadas ao MGIT960/460, avaliada por outros estudos, apresentou boa sensibilidade para isoniazida (95,0-98,2), e rifampicina (91,5-96,2) (PALOMINO et al., 2002, RIBEIRO et al., 2004). Metanálise com estudos que incluíram como padrão de comparação o método das proporções, descreveu sensibilidade à isoniazida como 96% (94-98%) e rifampicina 97% (95-98%) (COBAN et al., 2014). No entanto, em todos estes estudos os isolados eram predominantemente multirresistentes. A determinação da CIM realizada com os isolados MDR no presente estudo (excluídos da análise) teve 100% de concordância com os resultados do MGIT (dados não mostrados). O estudo de Heysell e colaboradores (2015), comparando a microdiluição em placa comercial (Sensitre™) com MGIT 960, com sensibilidade para isoniazida de 93,8% (0,12 µg/mL) e 90,0% (0,25 µg/mL), encontrou oito isolados resistentes pelo MGIT que foram sensíveis pela microdiluição (CIM entre $\leq 0,03$ e 0,25), dois apresentaram mutação em *katG*, além de dois isolados sensíveis à isoniazida pelo MGIT que foram resistentes pela microdiluição (CIM 2,0 e 4,0 µg/mL), um apresentou mutação em *inhA* (CIM 2,0 µg/mL) (HEYSELL et al., 2015). Ainda no estudo de Heysell e colaboradores (2015), dois isolados

sensíveis à rifampicina pelo MGIT foram resistentes pela microdiluição (CIM >16,0 µg/mL) e um deles apresentava mutação em *rpoB*. Baixos níveis de resistência à rifampicina, ligados a mutações específicas no gene *rpoB*, com desfechos bacteriologicamente desfavoráveis, foram erroneamente classificados como sensíveis pelos sistemas MGIT em teste de proficiência em laboratórios de referência supra-nacionais, sugerindo necessidade de incubação prolongada ou aumento no inóculo ou ainda, diminuição no ponto de corte para o sistema automatizado para 0,5 µg/mL (VAN DEUN et al., 2009). O mesmo grupo de pesquisa, associou resultados falso sensíveis no sistema MGIT a mutações para rifampicina nos códons 511Pro, 516Tyr, 533Pro, 572Phe e diversas mutações 526 (RIGOUTS et al., 2013).

Comparando as duas metodologias de leitura utilizadas no estudo, inferimos que a microscopia foi superior à oxirredução por permitir a leitura e interpretação de resultados para os quais a resazurina não apresentou reatividade, por meio de alteração da cor dos controles positivos, após sete dias de incubação (20 isolados) ou apresentou redução do corante por provável contaminação (9 isolados), assim, em 13,5% das amostras a leitura de fato, só foi possível por microscopia. A vantagem da resazurina sobre a microscopia seria o tempo mais curto para liberação dos resultados, sete versus 10/14 dias. No entanto, para os isolados resistentes a altas concentrações do antimicrobiano, as leituras por microscopia em sete dias foram bem definidas, as dificuldades de leitura neste tempo foram em relação à visualização do ponto de corte para isolados com CIM mais baixas, que ficavam mais definidas à medida que os cordões, demonstrando o crescimento bacteriano, ficavam maiores (14 dias). A principal vantagem da microscopia seria a possibilidade de visualizar o crescimento bacteriano típico da micobactéria, evidenciando a ocorrência de contaminação por crescimento de outros microrganismos, no presente estudo, permitiu ainda a leitura de isolados com crescimento mais lento, possibilitando a interpretação de um número maior de resultados.

A definição do ponto de corte depende da distribuição Gaussiana dos níveis de CIM associados aos mecanismos de resistência, separando em resistência de baixo, moderado ou auto nível, o ponto de corte epidemiológico é a CIM mais alta para microrganismos desprovidos de resistência fenotípica detectável (BÖTTGER, 2011; KAHLMETER, 2015). O ponto de corte deve ser resultado de uma porcentagem cumulativa da distribuição dos níveis de CIM associados a diferentes mecanismos de resistência e a frequência da presença dos diferentes mecanismos de resistência na população (BÖTTGER, 2011). Para

isoniazida, a resistência fenotípica de baixo nível parece ser uma entidade genética distinta separada por medidas quantitativas do fenótipo de alto nível de resistência, já descrito na década de 90 e confirmado em estudo recente. Relacionando alta frequência de mutações em *KatG* (principalmente S315T) com níveis intermediários e altos de resistência e mutações na região promotora *inhA* com baixos níveis de resistência (VICTOR et al., 1997; CAMBAU et al., 2015). No entanto, segundo Böttger (2011), concentrações do fármaco que superam o fenótipo de resistência de baixo nível são facilmente obtidas *in vivo*, podendo não corresponder à resistência clínica. Características de biodisponibilidade utilizando dados de farmacocinética e farmacodinâmica dos antimicrobianos são utilizadas para sugerir pontos de cortes, mas podem não estar diretamente ligadas ao desfecho clínico, ainda mais no caso da TB que combina quatro fármacos simultaneamente. A eficiência de fármacos não antagônicos em terapia combinada será normalmente aditiva, reduzindo efetivamente a CIM, dessa forma concentrações suficientemente altas podem ser alcançadas *in vivo* a despeito da resistência de nível baixo ou moderado (BÖTTGER 2011). Portanto, pontos de corte clínicos deveriam ser definidos por meio da combinação da distribuição da CIM, desfecho clínico e dados de farmacocinética e farmacodinâmica (BÖTTGER 2011; ANGEBY et al., 2012; KAHLMETER 2015; SCHÖN et al., 2017).

Quando associados ao monitoramento terapêutico e resposta clínica os testes quantitativos determinarão o impacto das CIMs no desfecho do tratamento. A despeito da falta de informações robustas, criar a categoria intermediária, comum para outros microrganismos, parece uma alternativa interessante para *M. tuberculosis*, pois separaria isolados sensíveis daqueles com CIM mais elevadas, associadas a mutações. A categoria intermediária indica que um isolado pode ser tratado com doses maiores do antimicrobiano obtendo sucesso terapêutico (KAHLMETER, 2015). Evitando que isolados com baixos níveis de resistência, erroneamente classificados como sensíveis, sejam tratados com doses inadequadas do antimicrobiano, levando a desfechos desfavoráveis e desenvolvimento de resistência de alto nível conforme descrito por Pasipanodya e colaboradores (2013). Além disso, possibilitaria a utilização de doses mais elevadas de fármacos de primeira linha em isolados com resistência de baixo nível, classificados como resistentes pela concentração crítica, otimizando a terapia e melhorando os desfechos, visto que são mais potentes e menos tóxicos.

Considerando a concentração determinada pelo CLSI para o método das proporções, de 0,2 µg/mL para isoniazida e 1,0 µg/mL para

rifampicina, no qual os microrganismos que crescem nos meios com estas concentrações são considerados resistentes, e que a CIM é a menor concentração de um antimicrobiano que impede o crescimento visível do microrganismo, o presente estudo assumiu a CIM para isoniazida como $>0,25 \mu\text{g/mL}$ e para rifampicina como $> 1,0 \mu\text{g/mL}$. Estas CIMs também corresponderam a distribuição Gaussiana dos isolados do presente estudo considerados sensíveis pelo sistema MGIT 960 (Figura 39 e 40).

Entre os casos novos de TB pulmonar que receberam tratamento com esquema básico na grande Florianópolis, a sensibilidade à isoniazida foi observada em 96,7% (207/214) dos isolados, a CIM90 foi $0,125 \mu\text{g/mL}$ e a CIM50 foi $0,06 \mu\text{g/mL}$. A sensibilidade à rifampicina foi observada em 99,6% dos isolados, a CIM90 foi $0,5 \mu\text{g/mL}$ e a CIM50 foi $0,25 \mu\text{g/mL}$.

Nossa hipótese de que CIMs mais altas estariam relacionadas a um maior tempo para negatificação da baciloscopia no escarro não foi confirmada no presente estudo, mas a avaliação foi considerada prejudicada devido a não realização de baciloscopias de controle para 40% e 50% dos indivíduos do estudo no segundo e quarto meses de tratamento, respectivamente. No entanto, entre os isolados pertencentes ao SIT50/H3 que apresentaram CIMs mais altas para rifampicina, aproximadamente 70% dos indivíduos que realizaram baciloscopia de controle no segundo mês permaneceram positivos, e 20% no quarto mês de tratamento (Figura 30). Como os indivíduos infectados por microrganismos deste SIT, não apresentaram predominância de alta carga bacilar ou cavitação no momento do diagnóstico (Figura 29), e, além disso, apresentaram pouca associação com uso de drogas ilícitas e abuso de álcool (Figura 26), podemos inferir que as CIMs mais elevadas para rifampicina observadas nos isolados do SIT50/H3 influenciaram a permanência de bacilos nos controles de segundo e quarto meses de tratamento. Certamente, outros fatores estão envolvidos na resposta diminuída ao tratamento da TB, principalmente a biodisponibilidade do fármaco para aquele indivíduo (PK/PD), que não foi avaliada no presente estudo. Heysell e colaboradores (2010), em estudo com monitoramento terapêutico dos fármacos, relataram que a maioria dos pacientes com resposta lenta ao tratamento apresentou baixas concentrações de rifampicina e isoniazida duas horas após a ingestão. A baixa disponibilidade dos fármacos parece estar altamente relacionada com recidiva e demora na negatificação da cultura. Alguns autores sugerem que o monitoramento terapêutico com ajuste das dosagens, em situações como a presença do HIV, na qual é muito frequente a observação de concentrações dos fármacos abaixo da requerida para terapia efetiva,

aumentará a probabilidade de sucesso terapêutico (BABALIK et al., 2011; MAGIS-ESCURRA et al., 2012; ALSULTAN, PELOQUIM, 2014). Aproximadamente 80% dos pacientes com biodisponibilidade correta dos fármacos e isolados suscetíveis, terão baciloscopia e cultura negativas no segundo mês de tratamento (BTA, 1982). Como indivíduos com resposta mais lenta ao tratamento podem ter maior risco de desfecho desfavorável, aqueles com baciloscopia/cultura positiva no segundo mês, seriam candidatos ao monitoramento terapêutico (HEYSELL et al., 2010; ALSULTAN; PELOQUIM, 2014). A concentração absorvida e o tempo de absorção, especialmente da isoniazida e da rifampicina, são reduzidas com a ingestão de alimentos gordurosos, devendo sempre ser administradas em um estômago vazio (ALSULTAN, PELOQUIM, 2014). Além disso, polimorfismos no gene da N-acetiltransferase na população, afeta a biodisponibilidade da isoniazida. No estudo de Hemanth e colaboradores (2017), a concentração sérica variou de 4,1 µg/mL em acetiladores lentos versus 10,2 µg/mL em acetiladores rápidos.

Por outro lado, apesar do pequeno número de casos, o presente estudo observou uma tendência associando CIM mais altas para rifampicina ($\geq 0,5$ µg/mL) com falência terapêutica (50%) e óbito (60%), não observada para isoniazida. Além disso, os casos de monorresistência à isoniazida evoluíram para sucesso no tratamento, sendo que os de monorresistência à rifampicina tiveram desfechos desfavoráveis. Gumbo e colaboradores (2007), afirmaram que a rifampicina é o pilar da terapia anti-TB atual, devido a sua ação sobre *M. tuberculosis* em fase exponencial de crescimento e em bacilos não replicantes persistentes, sendo um importante agente esterilizante. Considerando que durante a fase de ataque há uma alta carga bacilar, com muitos bacilos extracelulares e em multiplicação, portanto, mais acessíveis à ação dos quatro antimicrobianos combinados, e que a fase de manutenção teria a função de eliminar os bacilos persistentes, a rifampicina pode ser considerada o alicerce da terapia combinada atual (ALSULTAN, PELOQUIM, 2014). Em uma revisão sistemática, Menzies e colaboradores (2009), relataram que o desfecho do tratamento foi significativamente pior, com altas taxas de falência, recidiva e aquisição de resistência, em tratamentos que utilizaram rifampicina somente na fase intensiva, quando comparado com regimes que utilizaram o antimicrobiano durante os seis meses de tratamento. Segundo Van Deun e colaboradores (2009), apesar da TB-MDR ser definida como resistência a pelo menos isoniazida e rifampicina, o determinante de falência no tratamento é a resistência à rifampicina. É possível inferir que a influência das CIMs altas (≥ 8 µg/mL) para a rifampicina sobre desfechos

desfavoráveis do tratamento observadas no presente estudo, seriam reflexo da diminuição ou ausência de sua ação esterilizante sobre os bacilos persistentes, especialmente durante a fase de manutenção.

Por outro lado, diferentes níveis de resistência fenotípica foram observados no presente estudo para isoniazida, 71,4% dos isolados resistentes apresentaram CIM de 4 µg/mL e 28,6% CIM ≥ 8 µg/mL. Diferenças que não aparecem quando se determina somente a concentração crítica, categorizando uniformemente os isolados como resistentes. No entanto, as implicações biológicas de uma resistência de baixo nível são diferentes de altos níveis de resistência, especialmente quando sabidamente os níveis séricos de isoniazida podem ser muito superiores à CIM (BÖTTGER, 2011). Além disso, é possível inferir que a menor influência de CIMs mais altas para isoniazida no desfecho do tratamento, poderia ainda ser relacionada a utilização concomitante do etambutol na fase intensiva, que apresentando mecanismo de ação semelhante ao da isoniazida, compensaria sua falta/diminuição no momento do tratamento em que sua ação é mais requerida.

Outrossim, a maior limitação da rifampicina no tratamento da TB seria sua curta meia vida, que possibilita a ocorrência de ciclos de recrescimento bacteriano com consequente emergência da resistência, motivo pelo qual a isoniazida é adicionada a fase de manutenção do tratamento (GUMBO et al., 2007). O recrescimento bacteriano parece não acontecer quando altas doses de rifampicina são administradas; segundo Peloquin e colaboradores (2017) a exposição do microrganismo a altas doses pode oferecer mais cura, menos seleção de mutantes resistentes aos fármacos e menor duração do tratamento.

6.8 Associação entre a Concentração Inibitória Mínima, as Características Genéticas dos Isolados e o Desfecho dos Casos.

A distribuição das CIMs não foi associada significativamente a linhagens específicas de *M. tuberculosis* no presente estudo. No entanto, observou-se uma tendência entre os isolados das sublinhagens H3 e T1, a apresentarem CIMs mais altas para rifampicina, incluindo os dois isolados resistentes. As CIMs mais elevadas para rifampicina na sublinhagem T1 foram associadas principalmente ao SIT 53 e o isolado resistente ao 823. Na sublinhagem H3, foram associadas exclusivamente ao SIT50/H3, que foi relacionado também com positividade de baciloskopias de controle no segundo e quarto meses de tratamento e a desfechos desfavoráveis em aproximadamente metade dos indivíduos, a despeito da baixa proporção de usuários de drogas ilícitas (33,3%) em

relação aos demais SITs. Diferentes estudos têm associado a linhagem *Haarlem* à resistência aos antimicrobianos, incluindo isolados XDR (PALMERO et al., 2003; FARNIA et al., 2008; CUBILLOS-RUIZ et al., 2010; RAMAZANZADEH et al., 2015; ALVAREZ et al., 2016). No presente estudo, outro SIT chamou a atenção pelas CIMs mais elevadas, o 137/X2, que entre os cinco isolados, 3 apresentaram CIM de 0,5 µg/mL e dois de 1 µg/mL, sendo que 40% dos indivíduos vivia em situação de rua e 60% utilizava drogas ilícitas. Os SITs H3 e T1, também foram associados a indivíduos vivendo em situação de rua, com possível associação à transmissão em redes sociais influenciando a disseminação primária de isolados mais resistentes. Quando associadas diretamente com viver em situação de rua, abuso de álcool e uso de drogas ilícitas, CIMs mais elevadas para rifampicina ($\geq 0,5$ µg/mL) foram observadas em 52,6%, 50% e 40% dos indivíduos de cada grupo, respectivamente. CIMs $\geq 0,5$ µg/mL para rifampicina foram associadas significativamente ao abuso de álcool ($p=0,04$), sendo a probabilidade destes indivíduos de apresentarem CIMs mais elevadas para rifampicina 1,44 (1,03-2,02) vezes maior do que na população não alcoolista. Além disso, estas variáveis foram significativamente associadas ao abandono do tratamento, que, por sua vez, tem relação com o aumento e disseminação da resistência aos antimicrobianos.

Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, mostrou que 9,4% dos isolados de *M. tuberculosis* MDR que circularam em Santa Catarina entre 2008 e 2012 pertenciam à linhagem *Haarlem*, todos sublinhagem H3 (PRIM et al., 2015). A linhagem *Haarlem* é amplamente distribuída ao redor do mundo, predominante nos países europeus e tem sido associada com resistência aos antimicrobianos e rápida expansão clonal (FARNIA et al., 2008; RAMAZANZADEH et al., 2015). Na América do Sul está presente em maiores proporções na Colômbia, associada a altas taxas de transmissão e a resistência aos antimicrobianos, inclusive com isolados TB-XDR (CUBILLOS-RUIZ et al., 2010; ALVAREZ et al., 2016), e na Argentina foi associada a surto prolongado de TB-MDR (PALMERO et al., 2003). *Haarlem* apresenta assinatura genética específica (associada a seis grandes polimorfismos: quatro deleções e duas inserções) que provavelmente tem consequências funcionais, relacionadas a ampla disseminação/difusão desta linhagem e que podem afetar a eficácia de novos fármacos e vacinas (CUBILLOS-RUIZ et al., 2010), além de contribuir para emergência e disseminação de TB-MDR (HERSHBERG et al., 2008).

Outra linhagem que assumiu características preocupantes na região foi justamente o SIT mais frequente entre os isolados do estudo,

STI216/LAM5. Esta sublinhagem, além de ser predominante entre as pessoas privadas de liberdade em Santa Catarina (Medeiros, 2015), não estava presente entre os isolados circulantes na grande Florianópolis em estudo realizado com isolados de 2010/2011, sugerindo intensa transmissão recente. No presente estudo, aparece como a única sublinhagem com CIMs predominantemente mais altas para isoniazida (0,25 µg/mL) e entre os demais isolados da linhagem LAM, apresentou a maior proporção de CIM mais altas para rifampicina ($\geq 0,5$ µg/mL). Somado a isso, dos 24 indivíduos com a sublinhagem STI216/LAM5 aproximadamente 60% apresentou alta carga bacilar no diagnóstico, 34,6% abandonou o tratamento, 33,3% fazia uso abusivo de álcool e 27,3% utilizava drogas ilícitas. O presente estudo evidenciou que, se mantido o ritmo de transmissão recente e abandono envolvendo especialmente as linhagens H3, T1, LAM5 e X2, em um futuro próximo a região da grande Florianópolis enfrentará um sério problema relacionado a disseminação de TB-MDR.

Entre os isolados do presente estudo que apresentaram a deleção RD^{Rio}, as CIMs foram predominantemente mais baixas, sendo a associação significativa para a rifampicina ($p < 0,01$). Dalla Costa e colaboradores (2013), associaram a presença da deleção a isolados MDR na cidade de Porto Alegre, o estudo demonstrou a disseminação de *clusters*, principalmente SIT93/LAM5, que representou aproximadamente 20% dos isolados MDR e 40% da deleção RD^{Rio} associada à MDR. A ampla disseminação da deleção em isolados MDR na cidade de Porto Alegre parece estar relacionada com intensa transmissão do clone SIT93/LAM5 especificamente. Em outro estudo que relacionou a presença da deleção com isolados MDR, realizado em Portugal, David e colaboradores (2012) estimaram que aproximadamente 60% dos isolados MDR eram RD^{Rio} e que a transmissão clonal, especialmente da sublinhagem SIT20/LAM1, foi responsável por 1/5 da resistência no país. A implicação da sublinhagem *M. tuberculosis* RD^{Rio} com TB-MDR parece estar altamente relacionada a transmissão de *clusters*, que devido a vantagem seletiva da multirresistência, estão sendo amplamente disseminados em determinadas regiões. Segundo Chisholm e Tanaka (2016) a estocástica, uma característica importante na dinâmica da evolução, permite que uma propriedade escondida pela latência, atravesse um cenário para uma região onde possa ser selecionada, fato que pode ter ocorrido com esses diferentes clones MDR que carregam a deleção RD^{Rio}. Por outro lado, a associação da presença da deleção com CIM baixas, observada entre os casos novos de TB do presente estudo,

fortalece nossa hipótese de que a ampla disseminação da deleção estaria relacionada à ativação da TB latente.

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS POR OBJETIVO ESPECÍFICO

A distribuição geográfica dos casos novos de TB apresentou bastante heterogeneidade na região estudada, sendo que os locais com maior número de casos da doença corresponderam a bairros com alta densidade populacional, baixa renda e condições precárias de higiene e saneamento.

O atraso no diagnóstico da TB entre os sintomáticos respiratórios, que foi realizado principalmente em unidades hospitalares, proporcionou um pior prognóstico individual ao paciente, com consequente aumento da transmissão na comunidade e manutenção de nichos de disseminação da doença.

A população acometida pela TB foi constituída principalmente por adultos jovens e indivíduos do sexo masculino, que apresentaram alto nível de desemprego e baixa escolaridade. O tabagismo, uso abusivo de álcool, uso de drogas ilícitas e viver em situações de rua foram fatores de risco fortemente associados a TB.

A coinfeção TB/HIV representou 1/5 dos casos novos de TB na região estudada, com alta proporção de contagens de CD4 inferiores a 200 células/mm³, sendo o diabetes mellitus a segunda comorbidade mais frequentemente associada à doença.

Todas as manifestações clínicas clássicas da TB estiveram presentes em mais de 80% dos indivíduos estudados, incluindo os soropositivos para HIV. Padrões radiológicos atípicos como derrame pleural e padrão miliar foram associados a indivíduos HIV soropositivos e a presença de cavitações aos soronegativos.

Baciloscopias negativas foram associadas a soropositividade para HIV. Demonstrando a relevância da realização da cultura e de testes moleculares para diagnóstico de TB para todos os casos investigados/suspeitos na região estudada.

A presença de cavitações e alta carga bacilar foram associadas ao maior tempo de negativação da baciloscopia no escarro, a despeito da baixa realização de baciloscopias de controle, e são consideradas essenciais ao acompanhamento do tratamento, por representarem maior probabilidade de falha terapêutica e recidiva. A realização da coleta de escarro na própria unidade de saúde, durante a consulta de acompanhamento, utilizando indução se necessário, especialmente em pacientes bacilíferos no diagnóstico deveria ser mandatária. A liberação do isolamento respiratório deveria acontecer somente após negativação da baciloscopia, sendo considerada medida essencial para reduzir a transmissibilidade da TB. Além disso, pacientes que não convertam a

baciloscopia no segundo mês de tratamento deveriam ser veementemente monitorados para evitar desfechos desfavoráveis.

As baixas taxas de sucesso terapêutico observadas, especialmente no município de Florianópolis, foram associadas ao sexo masculino, baixa escolaridade, tabagismo, uso abusivo de álcool, soropositividade para HIV, uso de drogas ilícitas e viver em situação de rua.

Utilizando regressão multivariável, a baixa escolaridade, soropositividade para HIV e principalmente o uso de drogas ilícitas representaram fatores preditivos independentes associados a desfechos desfavoráveis, especialmente ao abandono do tratamento, sendo a coinfeção TB/HIV associada ainda ao aumento na mortalidade.

A análise por *Spoligotyping* mostrou disseminação quase exclusiva da linhagem Euro-Americana (linhagem 4) na região estudada, predominantemente LAM, T e *Haarlem*, distribuídas em 65 perfis diferentes, 33 perfis únicos e 32 *clusters* (contendo entre 2 a 24 isolados).

O mapeamento dos principais SITs possibilitou visualizar a disseminação de pequenos *clusters* principalmente nos bairros Jose Mendes, Ipiranga, Saco dos Limões, Forquilha e Monte Cristo, demonstrando transmissão recente de TB nessas localidades.

Neste contexto, o SIT216/LAM5 foi o mais frequente entre as amostras do presente estudo e também o mais preocupante, pois emergiu na região nos últimos cinco anos, com ampla disseminação, segundo o cálculo do ITR_{n-1} 85% dos isolados circulantes estariam associados com transmissão recente, sendo ainda o SIT mais frequente entre os isolados de *M. tuberculosis* nos presídios catarinenses.

A variação genotípica caracterizada pela presença da deleção RD^{Rio} foi detectada em 1/3 dos casos novos de TB pulmonar estudados. No entanto, nosso estudo não observou fatores relacionados a maior transmissibilidade como alta carga bacilar e presença de cavitação nos indivíduos com microrganismos que apresentaram a deleção.

A deleção foi significativamente associada a presença de nódulos em imagens radiográficas (TB miliar), e consequentemente maior probabilidade de doença disseminada. Além disso, a deleção esteve presente em aproximadamente 30% dos indivíduos até 54 anos, subindo para 46% na faixa etária entre 55 e 64 anos, e para 71,4% naqueles com 65 anos ou mais.

O estudo demonstrou alta prevalência, ampla distribuição geográfica, CIM mais baixas, presença em 16 spoligotypes diferentes e maior frequência da deleção RD^{Rio} em faixas etárias mais velhas. Além disso, estudos associando proteínas codificadas por alguns dos genes deletados (família PE/PPE) com a reativação da TB latente, nos

permitiram especular uma possível associação da deleção RD^{Rio} com a capacidade de reativação de *M. tuberculosis* causando doença ativa.

Os SITs 20/LAM1 e 3099/LAM9 destacaram-se no estudo pela alta carga bacilar, associação com presença de hemoptise e cavitação, além da perda ponderal severa observadas em mais de 50% dos indivíduos infectados por estes *spoligotypes*. Todos os isolados destes dois SITs apresentaram a deleção RD^{Rio}, esses dados sugerem que a maior transmissibilidade e doença mais severa, descritas anteriormente como associadas a deleção, poderiam estar relacionadas a características de SITs específicos e não diretamente à deleção.

Os SITs 42, 65, 73, 216 e 3099, representaram *clusters* de no mínimo cinco indivíduos relacionados ao uso de drogas ilícitas, e os SITs 17, 42, 65 e 216 ao abuso de álcool, corroborando estudos anteriores que consideram tais hábitos como fatores de risco para disseminação clonal. Juntos, os SITs 216, 42, 17, 73, 65 e 3099 representam 41% (90/219) dos casos novos de TB diagnosticados na região, representando um nicho importantíssimo para desenvolvimento de estratégias para redução da incidência.

Os SITs com maior proporção entre os usuários de drogas ilícitas (3099, 42, 73) foram associados a desfechos desfavoráveis. Os SITs 42 e 73 também foram associados com maior positividade nas baciloscopias de controle no quarto mês de tratamento. Por outro lado, a sublinhagem LAM4, que apresentou alta diversidade genética entre os isolados do estudo, foi relacionada a sucesso no tratamento em 90,9% dos indivíduos. Estes dados, fortalecem a ligação entre o abandono de tratamento e o aumento da circulação de *clusters* específicos, com conseqüente aumento na incidência da TB.

A metodologia de microdiluição em placa para determinação da CIM apresentou alta concordância com a concentração crítica realizada por metodologia automatizada (MGIT960), sendo um método barato e de leitura rápida (entre 7 a 14 dias). Apresentou alta especificidade para isoniazida (96,9%) e rifampicina (99,5%), e sensibilidade de 100% para rifampicina. No entanto, devido à baixa porcentagem de resistência entre os isolados estudados, a discordância entre 3 de 214 isolados baixou a sensibilidade para isoniazida para apenas 50%.

A leitura da CIM por microscopia se mostrou superior à metodologia de oxirredução, pois permitiu detectar possíveis contaminações, e a realização de leituras em isolados com crescimento mais lento.

A distribuição Gaussiana dos níveis de CIM entre os casos novos de TB mostrou ponto de corte coincidente com a concentração crítica,

separando os isolados resistentes dos sensíveis fenotipicamente. Foi observada alta sensibilidade à isoniazida (96,7%) e à rifampicina (99,6%) entre os isolados, sendo CIM90 mais alta para isoniazida, apenas um log do ponto de corte para resistência.

A despeito do pequeno número de casos, o estudo observou uma tendência associando CIMs mais altas para rifampicina com falência terapêutica (50%) e óbito (60%), sendo que os dois casos de monorresistência também apresentaram desfechos desfavoráveis. Por outro lado, os casos de monorresistência à isoniazida foram na maioria associados ao sucesso no tratamento.

Nossos dados reforçam a necessidade de determinar a CIM, pelo menos para rifampicina, para os pacientes em tratamento, especialmente aqueles que não negavam a baciloscopia no segundo mês, para os quais um aumento na dose da rifampicina poderia significar mudança no desfecho do tratamento.

A linhagem *Haarlem* destacou-se no presente estudo com o SIT50/H3, que apresentou CIMs mais elevadas para rifampicina, incluindo um isolado monorresistente. Este SIT, foi associado a baciloscopias de controle positivas no segundo e quarto meses de tratamento, e responsável por desfechos desfavoráveis em aproximadamente metade dos indivíduos, a despeito da baixa proporção de usuários de drogas ilícitas.

Juntamente com o SIT 137/X2, que apesar do pequeno número de isolados no estudo, também foi associado à CIMs mais elevadas para rifampicina, o SIT50/H3 foi associado a indivíduos vivendo em situação de rua, sugerindo uma possível transmissão devido a formação de redes sociais.

CIMs mais elevadas para rifampicina ($\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$) foram observadas em 39% dos casos novos de TB, sendo mais frequentes entre indivíduos que viviam em situação de rua (52,6%), que abusavam de álcool (50%).

Na família LAM, o SIT216/LAM5 apresentou CIM predominantemente mais altas para isoniazida e maior proporção de CIM mais altas para rifampicina.

Se mantido o ritmo de transmissão e abandono de tratamento atuais, envolvendo especialmente as sublinhagens H3, T1, LAM5 e X2, a grande Florianópolis enfrentará sérios problemas com TB-MDR.

A associação da deleção RD^{Rio} à CIMs predominantemente mais baixas observadas entre os casos novos de TB do presente estudo, reforça a hipótese de que a ampla disseminação da deleção poderia ser relacionada a reativação de *M. tuberculosis* latente.

O estudo epidemiológico molecular possibilitou a associação entre dados clínicos e epidemiológicos, com a genotipagem e nível de resistência dos microrganismos circulantes, colaborando com a compreensão da dinâmica da doença. Conclui-se que os desfechos desfavoráveis foram influenciados diretamente pelo uso de drogas ilícitas, soropositividade para HIV, baixa escolaridade e diminuição de sensibilidade à rifampicina.

A compilação dos dados trouxe informações valiosas aos programas de controle da TB, podendo contribuir de maneira efetiva para a diminuição da incidência da doença na região estudada.

8 CONCLUSÕES

O estudo possibilitou melhor compreensão da dinâmica da TB na região, fornecendo dados que podem contribuir de maneira efetiva para a diminuição da incidência da doença;

É necessário melhorar o desempenho dos programas de controle da TB na busca ativa de sintomáticos respiratórios, e no diagnóstico e tratamento da TB latente. Ampliar a rede de controle com ações educacionais dirigidas aos profissionais de saúde e a comunidade;

A disseminação de *clusters* está contribuindo diretamente para a elevada incidência da TB na grande Florianópolis;

É necessário intensificar o monitoramento dos pacientes em tratamento, mantendo-os em isolamento respiratório até a comprovada negatificação da baciloscopia, além de investir em novas estratégias para reduzir o abandono, rompendo de forma específica e ativa a transmissão dentro das comunidades ou núcleos sociais;

Os desfechos desfavoráveis na região estudada estão sendo influenciados diretamente pelo uso de drogas ilícitas, soropositividade para HIV, baixa escolaridade e diminuição da sensibilidade a rifampicina.

9 PERSPECTIVAS

Frente aos resultados obtidos neste estudo, as principais perspectivas do trabalho são:

Em andamento:

- Caracterização dos *clusters* encontrados, por meio de MIRU 15 (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) que associado ao *spoligotyping* aumentará o poder discriminatório da genotipagem;
- Genotipagem por *spoligotyping* e MIRU 15 dos isolados MDRs circulantes em Santa Catarina no período de 2014 a 2017. A observação de um *spoligotype* predominante entre os isolados MDRs circulantes na grande Florianópolis sugeriu a disseminação de *clusters* resistentes;
- Acompanhamento dos pacientes do estudo durante dois anos para verificar recidivas;

Futuras:

- Caracterização genotípica de resistência entre os isolados que apresentaram CIM mais elevadas para rifampicina e isoniazida;
- Sequenciamento completo de isolados pertencentes aos SITs 216/LAM5, 20/LAM1, 3099/LAM9 e 50/H3;

REFERÊNCIAS

AKCALI, S. et al. E-Test: An Alternative Method for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Medical Principles and Practice**, v. 14, n. 4, p. 264–267, 13 jun. 2005.

ALISJAHBANA, B., et al. The Effect of Type 2 Diabetes Mellitus on the Presentation and Treatment Response of Pulmonary Tuberculosis. **Clinical Infection Disease**, v. 45, p. 428-435, 2007.

ALSULTAN, A.; PELOQUIN, C. A. Therapeutic Drug Monitoring in the Treatment of Tuberculosis: An Update. **Drugs**, v. 74, n. 8, p. 839–854, 21 jun. 2014.

ALVAREZ, N. et al. Whole-Genome Sequencing of a Haarlem Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolate from Medellín, Colombia. **Genome announcements**, v. 4, n. 3, p. e00566-16, 16 jun. 2016.

AMERICAN THORACIC SOCIETY, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Definitions and reporting framework for tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 1376-95, 2000.

AMERICAN THORACIC SOCIETY, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OS AMERICA. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: controlling tuberculosis in the United States. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, n. 9, p. 1169–1227, 2005.

ANDRADE, B.B., et al. Heightened plasma levels of heme oxygenase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 as well as elevated peripheral neutrophil counts are associated with TB-diabetes comorbidity. **Chest**, v. 145, n. 6, p. 1244-1254, 2014.

ÄNGEBY, K. et al. Challenging a dogma: antimicrobial susceptibility testing breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 90, n. 9, p. 693–698, 1 set. 2012.

APOLINÁRIO, D. et al. Tuberculosis inequalities and socio-economic deprivation in Portugal. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 21, n. 7, p. 784–789, 1 jul. 2017.

APERS, L., et al. Accuracy of routine diagnosis of pulmonary tuberculosis in an area of high HIV prevalence. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 8, n. 8, p. 945-951, 2004.

ARAÚJO, K.M.F.A., et al. Evolution of the spatial distribution of tuberculosis cases in the city of Patos (PB), 2001–2010. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 21, n. 3, p. 296-302, 2013.

ARBEX, M. A. et al. The challenge of managing extensively drug-resistant tuberculosis at a referral hospital in the state of São Paulo, Brazil: a report of three cases. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 6, p. 554–9, [s.d.].

BABALIK, A. et al. Therapeutic drug monitoring in the treatment of active tuberculosis. **Canadian Respiratory Journal**, v. 18, n. 4, p. 225–9, [s.d.].

BADIE, B.M., et al. Comparing Radiological Features of Pulmonary Tuberculosis with and without HIV Infection. **Journal AIDS & Clinical Research**, v. 3, n. 10, article 1000188, p. 1-3, 2012.

BAKER M.A., et al. Systematic review: the impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes. **BMC Medicine**, v. 9, n. 81, p. 1-15, 2011.

BANERJEE, A. et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, n. 5144, p. 227–30, 14 jan. 1994.

BARBOSA, C.B., et al. Tuberculosis caused by RDRio *Mycobacterium tuberculosis* is not associated with differential clinical features. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 16, p. 1377-1382, 2012.

BARBOSA, I.R.; COSTA, I.C.C. A emergência da co-infecção tuberculose - HIV no Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 8, n. 15, p. 232–244, 2012.

BARBOZA, C.E.G., et al. Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 11, p. 959-966, 2008.

BARRY, C.E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845–55, 26 dez. 2009.

BATES, M.N., et al. Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, n. 4, p. 335–342, 2007.

BEHAR, S.M. et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 279–287, 9 maio 2011.

BENATOR, D., et al. Rifapentine and isoniazid once a week versus rifampicin and isoniazid twice a week for treatment of drug-susceptible pulmonary tuberculosis in HIV-negative patients: a randomised clinical trial. **The Lancet**, v. 360, n. 9332, p. 528–534, 2002.

BETHLEM, N. A vingança da tuberculose: uma nova visada. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 3, n. 1, p.19-25, 1995.

BHAKTA, S. et al. Arylamine N -Acetyltransferase Is Required for Synthesis of Mycolic Acids and Complex Lipids in *Mycobacterium bovis* BCG and Represents a Novel Drug Target. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 9, p. 1191–9, 3 maio 2004.

BLANCHARD, J.S. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 215–239, 28 jun. 1996.

BORU, G.C.; SHIMELS, T.; ISSA BILAL, A. Factors contributing to non-adherence with treatment among TB patients in Sodo Woreda, Gurage Zone, Southern Ethiopia: A qualitative study. **Journal of Infection and Public Health**, 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2016.11.018>

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2004. Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ProgramaTB.pdf>. Acessado em outubro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância de Saúde. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Sobre o Cuidado à Saúde Junto a População em Situação de Rua**. Brasília, 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC): **Proposta de incorporação do Xpert MTB/RIF como teste para diagnóstico de tuberculose e para indicação de resistência à rifampicina**. Relatório 49, Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica da tuberculose: Análise de indicadores operacionais e epidemiológicos a partir da base de dados do Sinan versão 5.0**. Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde: **Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública**. Boletim epidemiológico v. 47 n. 13, Brasília, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde: **Boletim Epidemiológico HIV e AIDS**. 2016b. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2016/59291/boletim_2016_1_pdf_16375.pdf>. Acesso em: 8 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde: Boletim Epidemiológico: **Coinfecção TB-HIV no Brasil: panorama epidemiológico e atividades colaborativas 2017**. 2017.

BRENNAN, P.J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 83, n. 1–3, p. 91–7, 2003.

BRITISH THORACIC ASSOCIATION. A controlled trial of six months chemotherapy in pulmonary tuberculosis. Second report: results during the 24 months after the end of chemotherapy. **American Review Respiratory Disease**. v. 126, n.3, p.460–2, 1982.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p. 3684–3689, 19 mar. 2002.

BRUDEY, K., et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 23, p. 1-17, 2006.

BÖTTGER, E. C. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 8, p. 1128–1134, ago. 2011.

BOWKALOWSKI C., BERTOLOZZI, MR. Vulnerabilidades em pacientes com tuberculose no distrito Sanitário de santa felicidade – Curitiba, PR. **Cogitare Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 92-99, 2010.

BURNS K., et al. Gender and Tuberculosis Making the investment case for programming that addresses the specific vulnerabilities and needs of both males and females who are affected by or at risk of tuberculosis. UNDP Discussion Paper, 2015. Disponível em: [http://www.undp.org/content/dam/undp/library/HIV-AIDS/Gender%20HIV%20and%20Health/Gender%20and%20TB%20UNDP%20Discussion%20Paper%20\(1\).pdf](http://www.undp.org/content/dam/undp/library/HIV-AIDS/Gender%20HIV%20and%20Health/Gender%20and%20TB%20UNDP%20Discussion%20Paper%20(1).pdf), acessado em junho de 2017.

BUSKIN, S.E. et al. Tuberculosis Risk Factors in Adults in King Couty, Washington, 1988 through 1990. **American Journal of Public Health**, v. 84, n. 11, p. 1750-1756, 1994.

CAFRUNE, P. I. et al. Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. **Canadian journal of microbiology**, v. 55, n. 7, p. 895–900, jul. 2009.

CAI, J. et al. Factors Associated with Patient and Provider Delays for Tuberculosis Diagnosis and Treatment in Asia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120088, 25 mar. 2015.

CAIN, K.P., et al. An algorithm for tuberculosis screening and diagnosis in people with HIV. **New England Journal of Medicine**. v. 362, n. 8, p. 707-716, 2010.

CALIPPE, B. et al. Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 12, p. 7980–8, 15 jun. 2008.

CAMBAU, E. et al. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European

multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 686–696, 1 mar. 2015.

CAMÊLO, E.L.S. et al. Tuberculosis In Brazil: New Cases, Healing and Abandonment in Relation to Level of Education. **International Archives of Medicine**, v. 9, 2016.

CAMPANI S.T.A.; MOREIRA J.S; TIETBOHEL C.N. Fatores preditores para o abandono do tratamento da tuberculose pulmonar preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil na cidade de Porto Alegre (RS). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n. 6, p. 776–782, 2011.

CANETTI, G. et al. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 29, n. 5, p. 565–78, 1963.

CANETTI, G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 92, n. 5, p. 687–703, nov. 1965.

CAYLÀ, J.A. et al. Tuberculosis treatment adherence and fatality in Spain. **Respiratory research**, v. 10, n. 1, p. 121, 1 dez. 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Integrated prevention services for HIV infection, viral hepatitis, sexually transmitted diseases, and tuberculosis for persons who use drugs illicitly: summary guidance from CDC and the U.S. Department of Health and Human Services. *MMWR Recomm Rep*. v.9, n. 61, p 1-40, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Tuberculosis (TB) Disease: Symptoms & Risk Factors. Disponível em <http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/signsand symptoms.htm>, acessado em outubro de 2016.

CHISHOLM, R. H.; TANAKA, M. M. The emergence of latent infection in the early evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings Royal Society B**, 283, 20161499, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Development of *In Vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters** – 4th edition. M23-A3, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes**; approved standard - second edition. M24-A2, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard – Tenth Edition. M07-A10, 2015.

COBAN, A.Y. et al. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: Updated meta-analysis. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 3, n. 4, p. 230–241, dez. 2014.

COELHO D.M.M., et al. Perfil epidemiológico da tuberculose no Município de Teresina-PI, no período de 1999 a 2005. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 19, n. 1, p.33-42, 2010.

COLE, S.T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 11 jun. 1998.

COLE S.T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiology**, v. 148, p. 2919–2928, 2002.

COMAS, I. et al. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. e7815, 12 nov. 2009.

CONDE M.B., et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

COOPER, A.M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 393–422, 2009.

COUTO, D.S. et al. Determinant factors for tuberculosis treatment dropout: representations of patients at a public hospital. **Saúde Debate**, v. 38, n. 102, p. 572-581, 2014.

CUBILLOS-RUIZ, A. et al. Genomic Signatures of the Haarlem Lineage of *Mycobacterium tuberculosis*: Implications of Strain Genetic Variation in Drug and Vaccine Development. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3614–3623, 1 out. 2010.

CUNHA, R. et al. Survival of people living with HIV who defaulted from tuberculosis treatment in a cohort, Recife, Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 137, 10 fev. 2017.

DALLA-COSTA E.R., et al. *Mycobacterium tuberculosis* of RDRio Genotype is the Predominant Cause of Tuberculosis and Associated with Multi-Drug Resistance in Porto Alegre City, South Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 1071-7, 2013.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, p. 1862-1870, 2006.

DA SILVA, P. E. A. et al. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Table 1. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1-9, 1 out. 2011.

DAVID, S. et al. Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 5, p. 609-617, set. 2007.

DAVID, S. et al. Implication of the RDRio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1362-1367, 2012.

DAVILA, S. et al. Genetic Association and Expression Studies Indicate a Role of Toll-Like Receptor 8 in Pulmonary Tuberculosis. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 10, p. e1000218, 10 out. 2008.

DAY, C. L. et al. Detection of Polyfunctional *Mycobacterium tuberculosis* -Specific T Cells and Association with Viral Load in HIV-1-Infected Persons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 7, p. 990-999, 1 abr. 2008.

DE JONG, B.C. et al. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in The Gambia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 7, p. 1037-43, 1 out. 2008.

DERIEMER, K. et al. Quantitative impact of human immunodeficiency virus infection on tuberculosis dynamics. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 9, p. 936-44, 1 nov. 2007.

DITTRICH, N. et al. Toll-like receptor 1 variations influence susceptibility and immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 95, n. 3, p. 328-335, maio 2015.

DIVE – DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Controle da tuberculose em Santa Catarina, avanços e desafios. Barriga Verde

Informativo Epidemiológico, 2016. Disponível em <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Informativo_Tuberculose.pdf> acessado em outubro de 2016.

DYE C., et al. Trends in tuberculosis incidence and their determinants in 134 countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 87, n. 9, p. 683-691, 2009.

ERNST JD. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, p. 581-591, 2012.

FAGUNDEZ, G. et al. Treatment Adherence of Tuberculosis Patients Attending Two Reference Units in Equatorial Guinea. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0161995, 13 set. 2016.

FAIR E., HOPEWELL P.C., PAI M. International Standards for Tuberculosis Care: revisiting the cornerstones of tuberculosis care and control. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, n. 1, p. 61-65, 2007.

FARNIA, P.P et al. The Recent-Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Strains among Iranian and Afghan Relapse Cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 109, 6 dez. 2008.

FESKE M.L., et al. Counting the Homeless: A Previously Incalculable Tuberculosis Risk and Its Social Determinants. **American Journal of Public Health**, v. 103, n. 5, p. 839-848, 2013.

FISH, E. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, p. 737-44, 2008.

FLEISCHMANN, R.D. et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 19, p. 5479-90, out. 2002.

FLORIANÓPOLIS. Secretaria Municipal de Saúde. Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. n. 2, p. 6-9, 2015. Disponível em http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/10_09_2015_14.12.59.8b25de9b1fe7279ef9cc7a19e062bfcd.pdf. Acessado em outubro de 2016.

FOK A., et al. Risk factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, n. 5, p. 480-492, 2008.

FORRELLAD, M.A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 1 jan. 2013.

FOX G.J., et al. Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **European Respiratory Journal**, v. 41, p. 140–156, 2013.

FRANKE M.F., et al. Risk Factors and Mortality Associated with Default from Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1844–51, 2008.

FURLAN, M. C. R.; OLIVEIRA, S. P. DE; MARCON, S. S. Factors associated with nonadherence of tuberculosis treatment in the state of Paraná. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 25, n. spe1, p. 108–114, 2012.

GAGNEUX, S.; SMALL, P. M. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 328–337, maio, 2007.

GALAGAN J.E. Genomic insights into tuberculosis. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, p. 307–320, 2014.

GANGADHARAM, P.R.J. Mycobacterial dormancy. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, n. 6, p. 477–479, dez. 1995.

GARRIDO, M.D.S. et al. Factors Associated with Tuberculosis Treatment Default in an Endemic Area of the Brazilian Amazon: A Case Control-Study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39134, 12 jun. 2012.

GAVIOLI, A. et al. Risks related to drug use among male construction workers. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 27, n. 5, p. 471–478, out. 2014.

GEBREMARIAM, G. et al. Impact of HIV Status on Treatment Outcome of Tuberculosis Patients Registered at Arsi Negele Health Center, Southern Ethiopia: A Six Year Retrospective Study. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153239, 2016.

GETAHUN H., et al. HIV infection associated tuberculosis: the epidemiology and the response. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 201–207, 2010.

GETAHUN H., et al. Development of a standardized screening rule for tuberculosis in people living with HIV in resource-constrained settings:

individual participant data meta-analysis of observational studies. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 1, e1000391, 2011.

GIBSON AL., et al. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover the global dissemination of the major RDRio sublineage of the Latin AmericanMediterranean Mycobacterium tuberculosis spoligotype family. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p.1259 –1267, 2008.

GILLESPIE S.H. Evolution of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 267-274, 2002.

GIL-SANTANA Leonardo, et al. Diabetes Is Associated with Worse Clinical Presentation in Tuberculosis Patients from Brazil: A Retrospective Cohort Study. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, e0146876, 2016.

GONÇALVES, H.A. A tuberculose ao longo dos tempos. **Hist Cienc saúde-Manguinhos**, v. 7, n. 2, p. 305-327, 2000.

GOLDBERG, M.F.; SAINI, N.K.; PORCELLI, S.A. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by Mycobacterium tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 5, 3 out. 2014.

GOMES M.; SAAD JUNIOR R. and STIRBULOV R. Pulmonary tuberculosis: relationship between sputum bacilloscopy and radiological lesions. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 275-281, 2003.

GOMES HM., et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. **Infect. Genet. Evol.**, v. 12, p. 649 – 656, 2012.

GOODFELLOW M. and MAGEE J.G. Taxonomy of Mycobacteria. In: Gangadharam P.R.J and Jenkins P.A. **Mycobacteria I Basic Aspects**. Chapman & Hall, 1998 p. 1-12.

GOPALAN N., et al. Current trends and intricacies in the management of HIV-associated pulmonary tuberculosis. **AIDS Research and Therapy**, v. 13, n. 34, p. 1-19, 2016.

GOURDY, P. et al. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN- production by invariant natural killer T cells. **Blood**, v. 105, n. 6, p. 2415–2420, 15 mar. 2005.

GUMBO, T. et al. Concentration-Dependent *Mycobacterium tuberculosis* Killing and Prevention of Resistance by Rifampin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3781–3788, 1 nov. 2007.

GUTIERREZ, M. G. et al. Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* Survival in Infected Macrophages. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 753–766, 17 dez. 2004.

HALL R.G; LEFF, R.D; GUMBO, T. Treatment of Active Pulmonary Tuberculosis in Adults: Current Standards and Recent Advances: Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **Pharmacotherapy**, v. 29, p. 1468-1481, 2009.

HEMANTH KUMAR, A. et al. N-acetyltransferase gene polymorphisms & plasma isoniazid concentrations in patients with tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 145, n. 1, p. 118, jan. 2017.

HENOSTROZA G., et al. High prevalence of tuberculosis in newly rolled HIV patients in Zambia: need for enhanced screening approach. **Internatinal Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 20, n. 8, p. 1033-1039, 2016.

HERRERO, M. B.; RAMOS, S.; ARROSSI, S. Determinants of non adherence to tuberculosis treatment in Argentina: barriers related to access to treatment. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 2, p. 287–298, jun. 2015.

HERSHBERG, R. et al. High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography. **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. e311, 16 dez. 2008.

HETT, E.C.; RUBIN, E.J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 1, p. 126–56, table of contents, mar. 2008.

HEYSELL, S. K. et al. Therapeutic drug monitoring for slow response to tuberculosis treatment in a state control program, Virginia, USA. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 10, p. 1546–53, out. 2010.

HEYSELL, S. K. et al. Sensititre MycoTB Plate Compared to Bactec MGIT 960 for First- and Second-Line Antituberculosis Drug Susceptibility Testing in Tanzania: a Call To Operationalize MICs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 7104–7108, nov. 2015.

- HINO, P., et al. Spatial patterns of Tuberculosis and its association with living conditions in the city of Ribeirão Preto in the State of São Paulo. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 12, p. 4795-802, 2011.
- HINO, P., et al. The presence of tuberculosis in an administrative district of São Paulo. **Esc Anna Nery**, v. 17, n. 1, p. 153-159, 2013.
- HORNE, D.J., et al. How soon can smear positive TB patients be released from inpatient isolation? **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 1, p. 78-84, 2010.
- HORTON, K.C., et al. Sex Differences in Tuberculosis Burden and Notifications in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Medicine**, v. 13, n. 9, e1002119, 2016.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua (PNAD, População). 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=149> Acessado em junho de 2017.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua (PNAD, População). 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=149> Acessado em maio de 2017.
- IBRAHIM, L.M., et al. Factors associated with interruption of treatment among Pulmonary Tuberculosis patients in Plateau State, Nigeria. 2011. **The Pan African medical journal**, v. 17, p. 78, 2014.
- JAGIELSKI T., et al. Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. **Clinical Microbiol Reviews**, v. 29, n. 2, p. 239-290, 2016.
- JANELE, D. et al. Effects of Testosterone, 17beta-Estradiol, and Downstream Estrogens on Cytokine Secretion from Human Leukocytes in the Presence and Absence of Cortisol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1069, n. 1, p. 168–182, 1 jun. 2006.
- JEON C.Y. and MURRAY M.B. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 7, p. 1091-1101, 2008.

JOLOBA, M. L.; BAJAKSOUZIAN, S.; JACOBS, M. R. Evaluation of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3834–6, out. 2000.

JOSE L., et al. Hypothetical protein Rv3423.1 of *Mycobacterium tuberculosis* is a histone acetyltransferase. **FEBS Journal**, v. 283, n. 2, p. 265–281, jan. 2016.

KAHLMETER, G. The 2014 Garrod Lecture: EUCAST – are we heading towards international agreement? **Journal Antimicrobiol Chemother**, v. 70, p. 2427-39, 2015.

KALSDORF, B. et al. HIV-1 infection impairs the bronchoalveolar T-cell response to mycobacteria. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 180, n. 12, p. 1262–70, 15 dez. 2009.

KALRA S. and ATREJA A. Diabetic tuberculosis. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 66, n. 9, p. 1194-1195, 2016.

KAMERBEEK J., et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.4, p. 907-914, 1997.

KANG, H.K., et al. Clinical significance of smear positivity for acid-fast bacilli after >5 months of treatment in patients with drug-susceptible pulmonary tuberculosis. **Medicine**, v. 95, n. 31, p. 1-7. 2016.

KARO, B. et al. Impact of HIV infection on treatment outcome of tuberculosis in Europe. **AIDS**, v. 30, n. 7, p. 1089–1098, 24 abr. 2016.

KATO-MAEDA, M.; METCALFE, J. Z.; FLORES, L. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: application in epidemiologic studies. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 203–216, fev. 2011.

KATSNELSON, A. Beyond the breath: Exploring sex differences in tuberculosis outside the lungs. **Nature Medicine**, v. 23, n. 4, p. 398–401, 7 abr. 2017.

KHAN, N. et al. Innate Immunity Holding the Flanks until Reinforced by Adaptive Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 328, 2016.

KIESER, K.J., and RUBIN, E.J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 550–562, 2015.

KIM, TC., et al. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post-treatment. **American Review of Respiratory Disease**, v. 129, n. 2, p. 264-268, 1984.

KIM, S.J. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. **European Respiratory Journal**, v. 25, n. 3, p. 564-569, 2005.

KONDRATIEVA, T. et al. Latent tuberculosis infection: What we know about its genetic control? **Tuberculosis**, v. 94, n. 5, p. 462-468, set. 2014.

KOPPAKA, R and BOCK, N. How reliable is chest radiography? In: Frieden T, ed. Toman's Tuberculosis: Case Detection, Treatment, and Monitoring – Questions and Answers. 2nd Edn. Geneva, World Health Organization, p. 51-60, 2004.

KUABAN, C., et al. Non conversion of sputum smears in new smear positive pulmonary tuberculosis patients in Yaoundé, Cameroon. **East Afr Med J**, v. 86, n. 5, p. 219-225, 2009.

LACHMANDAS, E. et al. Diabetes Mellitus and Increased Tuberculosis Susceptibility: The Role of Short-Chain Fatty Acids. *Journal of Diabetes Research*, v. 2016, p. 1-15, 2016.

LACKEY, B., et al. Patient Characteristics Associated with Tuberculosis Treatment Default: A cohort Study in a High-Incidence Area pf Lima, Peru. **PLOS ONE**, v. 10, p. 1-11, 2015.

LAZZARINI L.C.O., et al. Discovery of a novel Mycobacterium tuberculosis lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, v. 45, n.12, p. 3891- 3902, 2007.

LAZZARINI L.C.O., et al. RDRio Mycobacterium tuberculosis infection is associated with a higher frequency of cavitary pulmonary disease. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2175-2183, 2008.

LEE S., et al. Impact of Physician's Education on Adherence to Tuberculosis Treatment for Patients of Low Socioeconomic Status in Bangladesh. **Chonnam Med J**, v. 49, p. 27-30, 2013.

LEE, J. et al. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second-line drugs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 11-8, 2014.

LI Ying., et al. Factors associated with patient, and diagnostic delays in Chinese TB patients: a systematic review and meta-analysis. **BMC Medicine**, v. 11, n. 156, p. 1-15, 2013.

LIENHARDT C., et al. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. **Nature Review Microbiology**, v. 10, p. 407-416, 2012.

LIENHARDT, C. et al. Translational Research for Tuberculosis Elimination: Priorities, Challenges, and Actions. **PLoS Med**, v. 13, n. 3, 2016.

LIN, S.; MELENDEZ-TORRES, G. J. Systematic review of risk factors for nonadherence to TB treatment in immigrant populations. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 5, p. 268–280, maio 2016.

LIU, P.T., et al. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770–1773, 24 mar. 2006.

LIU, Q., et al. TIRAP C539T polymorphism contributes to tuberculosis susceptibility: Evidence from a meta-analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 27, p. 32–39, out. 2014.

LÖNNROTH, K., et al. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis—a systematic review. **BMC Public Health**, v. 8, article 289, 2008.

MAARTENS, G.; WILKINSON, R.J. Tuberculosis. **The Lancet**, v. 370, n. 9604, p. 2030–2043, 15 dez. 2007.

MACEDO, L.R., et al. Treatment outcomes of tuberculosis patients in Brazilian prisons: a polytomous regression analysis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 17, n. 11, p. 1427–1434, 1 nov. 2013.

MACHADO, D. et al. Contribution of Efflux to the Emergence of Isoniazid and Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34538, 6 abr. 2012.

MACHADO, L. N. C. et al. First Baseline of Circulating Genotypic Lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in Patients from the Brazilian Borders with Argentina and Paraguay. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107106, 9 set. 2014.

- MACHADO, D. et al. Interplay between Mutations and Efflux in Drug Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 711, 2017.
- MACNEIL, J.R.; LOBATO, M.N.; MOORE, M. An unanswered health disparity: tuberculosis among correctional inmates, 1993 through 2003. **American journal of public health**, v. 95, n. 10, p. 1800–5, out. 2005.
- MAGEE, J. G. et al. *Mycobacterium*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–84.
- MAGIS-ESCURRA, C. et al. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis patients. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, n. 1, p. 83–86, fev. 2012.
- MARUZA, M. et al. Risk factors for default from tuberculosis treatment in HIV-infected individuals in the state of Pernambuco, Brazil: a prospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, 11:351, 8pages, 2011.
- MATSOUKA S., et al. Relationship between CT findings of pulmonary tuberculosis and the number of acid-fast bacilli on sputum smears. **Clinical Imaging**, v. 28, n. 2, p.119–123, 2004.
- MCGILLIVRAY, A.; GOLDEN, N. A.; KAUSHAL, D. The *Mycobacterium tuberculosis* Clp Gene Regulator Is Required for in Vitro Reactivation from Hypoxia-induced Dormancy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 4, p. 2351–2367, 23 jan. 2015.
- MDLULI, K. et al. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. **Science**, v. 280, n. 5369, p. 1607–10, 5 jun. 1998.
- MEDEIROS, T.F. **Epidemiologia molecular de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes em unidades do sistema prisional do Estado de Santa Catarina**. 2015, 112p. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- MENZIES, D. et al. Effect of Duration and Intermittency of Rifampin on Tuberculosis Treatment Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 9, p. e1000146, 15 set. 2009.
- MITCHISON, D.A. Basic mechanisms of chemotherapy. **Chest**, v. 76, p. 771-81, 1979.

MITCHISON, D.A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. **Tubercle**, v. 66, n. 3, p. 219–25, set. 1985.

MORAES, E. B. et al. Tuberculosis associated factors caused by *Mycobacterium tuberculosis* of the RDRio genotype. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 182–187, mar. 2017.

MSHANA, R. N. et al. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1214–9, maio 1998.

MUKHERJEE J.S., et al. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **The Lancet**, v. 363, p. 474–81, 2004.

NARASIMHAN P., et al. Risk Factors for Tuberculosis: Review Article. **Hindawi Pulmonary Medicine**, v. 2013, article 828939, 11 pages, 2013.

NATAL, S. et al. Modelo de predição para o abandon do tratamento da tuberculose pulmonar. **Boletim de Pneumologia Sanitária**. v. 7, n. 1, 1999.

NAVA-AGUILERA, E., et al. Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 1, p. 17–26, 2009.

NAVARRO, Y. et al. Unmasking subtle differences in the infectivity of microevolved *Mycobacterium tuberculosis* variants coinfecting the same patient. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 8, p. 693–696, dez. 2013.

NEBENZAHL-GUIMARAES, H. et al. Genomic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 7 and a proposed name: “Aethiops vetus”. **Microbial genomics**, v. 2, n. 6, p. e000063, jun. 2016.

NETO, L.F.S.P. Prevalência da tuberculose em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 11, n. 2, p. 118–22, 2013.

NEYROLLES, O.; QUINTANA-MURCI, L. Sexual Inequality in Tuberculosis. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 12, p. e1000199, 22 dez. 2009.

NHAMOYEBONDE, S.; LESLIE, A. Biological Differences Between the Sexes and Susceptibility to Tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. suppl 3, p. S100–S106, 15 jul. 2014.

- NIAZI A.K. and KALRA S. Diabetes and tuberculosis: a review of the role of optimal glycemetic control. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**. v. 11, n. 28, p. 1-4, 2012.
- NIEMANN, S.; SUPPLY, P. Diversity and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: moving to whole-genome-based approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 12, p. a021188, 4 set. 2014.
- NOGUERIA C.L. **Diagnóstico e epidemiologia Molecular de cepas de Mycobacterium tuberculosis no Estado de Santa Catarina**. 2012. 235 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- NOGUEIRA, C. L. et al. First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil. **Tuberculosis**, v. 97, p. 57–64, mar. 2016.
- NOGUTI, E. N. et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 779–785, set. 2010.
- NORTH, R.J.; JUNG, Y.-J. Immunity to Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 599–623, 19 abr. 2004.
- NUNES-ALVES, et al. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature Review Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289-299, 2014.
- OELTMANN, J.E., et al. Tuberculosis and substance abuse in the United States, 1997–2006. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, n. 2, p. 189-197, 2009.
- OLATUNJI, A.A.; OLATUNJI, P.O.; and SALAKO, A.A. Radiographic chest findings and immunological status in HIV-positive patients with tuberculosis coinfection in a sub-urban Nigeria tertiary hospital. **Indian Journal Tuberculosis**, v. 63, n. 2, p. 74-78, 2016.
- OLIVEIRA, H.B.; CARDOSO, J.C. Tuberculose no sistema prisional de Campinas, São Paulo, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 15, n. 3, p. 185–193, mar. 2004.
- O’SHEA, M. K., et al. Time-to-Detection in Culture Predicts Risk of *Mycobacterium tuberculosis* Transmission: A Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 2, p. 177–185, 15 jul. 2014.

PEDDIREDDY, V. et al. Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. **Front. Immunol**, v. 8, n. 8, 2017.

PALACI Moises, et al. Cavitory Disease and Quantitative Sputum Bacillary Load in Cases of Pulmonary Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 4064-4066, 2007.

PALMERO, D. et al. Multidrug-resistant tuberculosis in HIV-negative patients, Buenos Aires, Argentina. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 8, p. 965–9, ago. 2003.

PALOMINO, J.C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2, ago. 2002.

PALOMINO, J.; MARTIN, A. Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 317–340, 2 jul. 2014.

PARVINEN, K.; DIECKMANN, U. Self-extinction through optimizing selection. **Journal of theoretical biology**, v. 333, p. 1–9, 21 set. 2013.

PASIPANODYA, J. G. et al. Serum Drug Concentrations Predictive of Pulmonary Tuberculosis Outcomes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 9, p. 1464–1473, 1 nov. 2013.

PAWLOWSKI, A. et al. Tuberculosis and HIV Co-Infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002464, 16 fev. 2012.

PEFURA-YONE, E.W.; KENGNE, A.P., KUABAN C. Non-conversion of sputum culture among patients with smear positive pulmonary tuberculosis in Cameroon: a prospective cohort study. **BMC Infection Disease**, v. 14, n. 138, p.1-6, 2014.

PELOQUIN, C. A. et al. Pharmacokinetic evidence to support increased doses of rifampin for tuberculosis: results from the HIRIF trial. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC.00038-17, 30 maio 2017.

PINTO, L.M., et al. Scoring systems using chest radiographic features for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in adults: a systematic review. **European Respiratory Journal**, v. 42, p. 480-494, 2013.

PHILIPS, J.A. and ERNST, J.D. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 353-384, 2012.

PRADO, T.N., et al. Epidemiological profile of adult patients with tuberculosis and AIDS in tuberculosis and AIDS in the state of Espírito Santo, Brazil: cross-referencing tuberculosis an AIDS databases. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n. 1, p. 93-99, 2011.

PRADO, T.N. et al. Clinical and epidemiological characteristics associated with unfavorable tuberculosis treatment outcomes in TB-HIV co-infected patients in Brazil: a hierarchical polytomous analysis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 162–170, mar. 2017.

PREZZEMOLO, T. et al. Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 180, 22 abr. 2014.

PRIM, R. I. et al. Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Santa Catarina, southern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 618–23, ago. 2015.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352–66, 20 abr. 2012.

RAMAZANZADEH, R. et al. Prevalence and occurrence rate of *Mycobacterium tuberculosis* Haarlem family multi-drug resistant in the worldwide population: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 78–88, jan. 2015.

RANGAKA Molebogeng X., et al. Controlling the seedbeds of tuberculosis: diagnosis and treatment of tuberculosis infection. **The Lancet**, v. 386, n. 10010, p. 2344-2353, 2015.

RASANATHAN, K. et al. The social determinants of health: key to global tuberculosis control. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 15, n. 6, p. 30–36, 1 jun. 2011.

RASTOGI N. and SOLI C. Molecular Evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITTACO, V. Tuberculosis - From basic science to patient care. 1 ed., 2007.

RAUT, U. et al. Evaluation of rapid MTT tube method for detection of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin and isoniazid. **Indian journal of medical microbiology**, v. 26, n. 3, p. 222–7, 2008.

REIS-SANTOS Bárbara, et al. Treatment outcomes in tuberculosis patients with diabetes: a polytomous analysis using Brazilian surveillance system. **PLoS One**, v. 9, n. 7, e100082, 2014.

RIBEIRO, M.O. et al. Evaluation of rapid microplate assays using cellular-viability indicators to determine patterns of susceptibility to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 304, p. 455–60, 2004.

RIBEIRO, F. K. C. et al. Genotypic and Spatial Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Transmission in a High-Incidence Urban Setting. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 5, p. 758–766, 1 set. 2015.

RIGOUTS, L. et al. Rifampin Resistance Missed in Automated Liquid Culture System for *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Specific rpoB Mutations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2641–2645, 1 ago. 2013.

ROBERTS, C. A. Old World tuberculosis: Evidence from human remains with a review of current research and future prospects. **Tuberculosis**, v. 95, p. S117–S121, jun. 2015.

RUSLAMI, R., et al. Implications of the global increase of diabetes for tuberculosis control and patient care. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 11, p. 1289-1299, 2010.

RYNDAK, M.B. et al. Transcriptional Profile of *Mycobacterium tuberculosis* Replicating in Type II Alveolar Epithelial Cells. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123745, 6 abr. 2015.

SALIE, M. et al. Association of toll-like receptors with susceptibility to tuberculosis suggests sex-specific effects of TLR8 polymorphisms. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 34, p. 221–229, ago. 2015.

SANTANA A.A.M. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de tuberculose internados no Hospital Nereu Ramos no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2014. 2014. 33f. Artigo de conclusão de Residência – Programa de residência Médica em Infectologia, Hospital Nereu Ramos, Florianópolis, 2014.

- SANTOS M.A.P.S., et al. Risk factors for treatment delay in pulmonary tuberculosis in Recife, Brazil. **MC Public Health**, v. 5, n. 25, p. 1-8, 2005.
- SANTOS J. Brazilian response to tuberculosis control. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, supl. 1, p. 89-94, 2007.
- SAN PEDRO A. e OLIVEIRA R.M. Tuberculose e indicadores socioeconômicos: revisão sistemática da literatura. **Revista Panamericana Salud Publica**, v. 33, n. 4, p. 294-301, 2013.
- SARA C., et al. Clinical Correlates and Drug Resistance in HIV-Infected and - Uninfected Pulmonary Tuberculosis Patients in South India. **World J AIDS**, v. 6, n. 3, p. 87-100, 2016.
- SBARBARO J.A. Kochi's tuberculosis strategy article is a "classic" by any definition. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, p. 69-70, 2001.
- SELVARAJ, S. et al. In silico analysis of DosR regulon proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene**, v. 506, n. 1, p. 233–241, 10 set. 2012.
- SCHÖN, T. et al. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 3, p. 154–160, mar. 2017.
- SILVA, A.B.S. et al. Clonal diversity of *M. tuberculosis* isolated in a sea port city in Brazil. **Tuberculosis**, v. 89, n. 6, p. 443–447, nov. 2009.
- SILVA, P.D.F. et al. Fatores associados ao abandono do tratamento da tuberculose pulmonar no Maranhão, Brasil, no período de 2001 a 2010. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 8, p. 1745–1754, ago. 2014a.
- SILVA S.T., et al. Combating smoking in Brazil: the strategic importance of government actions. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, p. 539-552, 2014b.
- SINFIELD, R. et al. Risk factors for TB infection and disease in young childhood contacts in Malawi. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 26, n. 3, p. 205–213, 18 set. 2006.
- SHANG, S., et al. Cigarette smoke increases susceptibility to tuberculosis-evidence from in vivo and in vitro models. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 9, p. 1240–1248, 2011.
- SHARMA, S.; SHARMA, M.; BOSE, M. *Mycobacterium tuberculosis* infection of human monocyte-derived macrophages leads to apoptosis of

T cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 87, n. 3, p. 226–234, 23 mar. 2009.

SHARMA, G. et al. Genome-wide non-CpG methylation of the host genome during *M. tuberculosis* infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25006, 26 jul. 2016.

SCHÖN, T. et al. Mycobacterium tuberculosis drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 3, p. 154–160, 2017.

SOARES R.O., et al. *Mycobacterium tuberculosis* belonging to family LAM and sublineage RD^{Rio}: common strains in Southern Brazil for over 10 years. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1251-1255, 2013.

SPRINGER B., et al. Quantitative Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of MGIT 960 and EpiCenter Instrumentation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 1773-1780, 2009.

SREERAMAREDDY CT., et al., Delays in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis in India: a systematic review. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 3, p. 255-266, 2014.

STORLA D.G., YIMER S. and BJUNE G.A. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. **BMC Public Health**, v. 8, n. 15, p. 1-9, 2008.

TABNET/DIVE/SC. Diretoria de Vigilância epidemiológica – Sistemas de Informação: TABNET: Morbidade: agravo - Tuberculose <http://200.19.223.105/cgi-bin/dh?sinan/def/tuber.def> acessado em maio de 2017.

TAKARINDA, K. C. et al. Tuberculosis treatment delays and associated factors within the Zimbabwe national tuberculosis programme. **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, p. 29, 29 dez. 2015.

TELENTI, A. et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Lancet**, v. 341, n. 8846, p. 647–651, mar. 1993.

THERON G., et al. Data for action: collection and use of local data to end tuberculosis. **Lancet**, v. 386, p. 2324-33, 2015.

THEME F, et al. Analysis of tuberculosis in a unit of Primary Health Care in the city of Rio de Janeiro: clinical profile, treatment outcome and quality of records. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 20, n. 2, 2012.

TIEMERSMA E.W., et al. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. **PLoS One**, v. 6, n. 4, e17601, 2011.

TOCZEK, A., et al. Strategies for reducing treatment default in drug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease** v. 17, p. 299-307, 2013.

TODRYS, K.W. et al. Imprisoned and imperiled: access to HIV and TB prevention and treatment, and denial of human rights, in Zambian prisons. **Journal of the International AIDS Society**, v. 14, n. 1, p. 8, 11 fev. 2011.

TOLA, H.H., et al. Psychological and Educational Intervention to Improve Tuberculosis Treatment Adherence in Ethiopia Based on Health Belief Model: a Cluster Randomized Control Trial. **PLOS ONE**, v. 11, p. 1-15, 2016.

TSEGAYE, D. et al. Delay in Seeking Health Care and associated Factors among Pulmonary Tuberculosis Patients in North Wollo Zone, Northeast Ethiopia: Institution Based Cross-sectional Study. **Archives of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 3:17, 2016.

TSOGT G., et al. DOTS pilot Project in Mongolia, 1995. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 3, p. 886-890, 1999.

TUNDUP, S.; MOHAREER, K.; HASNAIN, S. E. *Mycobacterium tuberculosis* PE25/PPE41 protein complex induces necrosis in macrophages: Role in virulence and disease reactivation? **FEBS open bio**, v. 4, p. 822–8, 2014.

TURNER R.D. and BOTHAMLEY G.H. Cough and the transmission of tuberculosis. *Journal of Infection Disease*, v. 211, p. 1367–1372, 2015.

UNISSA, A.N. et al. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 45, p. 474–492, nov. 2016.

VAN DEUN, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Highly Discordant Rifampin Susceptibility Test Results. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3501–3506, 1 nov. 2009.

VAN SOOLINGER, D. et al. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods in Enzymology*, v. 235, p. 196-204, 1994.

VASCONCELLOS, S. E. G. et al. Strain Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Brazil Based on Genotypes Obtained by Spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing and the Presence of Large Sequence and Single Nucleotide Polymorphism. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e107747, 14 out. 2014.

VICENTIN G., SANTO A.H., Carvalho M.S. Tuberculosis mortality and social indicator in Rio de Janeiro city. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 253-263, 2002.

VICTOR, T. C. et al. Genome and MIC stability in *Mycobacterium tuberculosis* and indications for continuation of use of isoniazid in multidrug-resistant tuberculosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 847–857, 1 out. 1997.

VIVEIROS, M. et al. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 9, p. 983–998, 10 set. 2012.

VON GROLL A., et al. Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. **PLoS One**, v. 5, n. 4, e10191, 2010a.

VON GROLL A., et al. Fitness study of the RDRio lineage and Latin American-Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. **FEMS Immunology Medicine Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 119-127, 2010b.

WADA, T. et al. High transmissibility of the modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* in homeless patients of Japan. **Tuberculosis**, v. 89, n. 4, p. 252–255, jul. 2009.

WALLEY, J. D. et al. Effectiveness of the direct observation component of DOTS for tuberculosis: a randomised controlled trial in Pakistan. **The Lancet**, v. 357, n. 9257, p. 664–669, 3 mar. 2001.

WANGER, A.; MILLS, K. Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin, and streptomycin by using Etest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1672–6, jul. 1996.

WARD J., SISKIND V., KONSTANTINOS A. Patient and health care system delays in Queensland tuberculosis patient, 1985–1998.

International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v. 5, n. 11, p. 1021-1027, 2001.

WATKINS, R. E.; PLANT, A. J. Does smoking explain sex differences in the global tuberculosis epidemic? **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 2, p. 333, 19 ago. 2005.

WEISENBERG S.A., et al. Distinct clinical and epidemiological features of tuberculosis in New York City caused by the RD(Rio) *Mycobacterium tuberculosis* sublineage. **Infect. Genet. Evol.** v. 12, p. 664–670, 2012.

WHITE, P. J.; ABUBAKAR, I. Improving Control of Tuberculosis in Low-Burden Countries: Insights from Mathematical Modeling. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 394, 2016.

WOIMO, T. T. et al. The prevalence and factors associated for anti-tuberculosis treatment non-adherence among pulmonary tuberculosis patients in public health care facilities in South Ethiopia: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 17, 2017.

WOLF, A.J. et al. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 205, n. 1, p. 105–115, 21 jan. 2008.

WONG E.M., COHEN K.A., BISHAI W.R. Rising to the challenge: new therapies for tuberculosis. **Trends Microbiology**, v. 21, n. 9, p.493-501, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **What is DOTS? A guide to Understanding the WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS.** 1999 Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/65979/1/WHO_CDS_CPC_TB_99.270.pdf>, acesso em outubro de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global DOTS Expansion Plan. Progress in TB Control in high-burden countries.** Geneva: World Health Association, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expanding DOTS in the context of a changing health system.** Geneva: World Health Organization 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Stop TB Strategy – Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millenium Development Goals.** Geneva: World Health Organization, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION and INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE. **Collaborative framework for care and control of tuberculosis and diabetes**. 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44698/1/9789241502252_eng.pdf>, acesso em outubro de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definitions and reporting framework for tuberculosis** – 2013 revision 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79199/1/9789241505345_eng.pdf>. Acesso em: 8 jul. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Status Report on Alcohol and Health** 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf acesso em outubro de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2015**. 2015a. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1. Acesso em outubro de 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Implementing the End TB Strategy: the essentials**. 2015b Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/2015/end_tb_essential.pdf Acesso em Outubro de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2016**. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ Acesso em Outubro de 2016.

YAJKO, D. M. et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2324–7, set. 1995.

YASEEN, I. et al. *Mycobacteria* modulate host epigenetic machinery by Rv1988 methylation of a non-tail arginine of histone H3. **Nature Communications**, v. 6, p. 8922, 16 nov. 2015.

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

- YIMER, S.; BJUNE, G.; ALENE, G. Diagnostic and treatment delay among pulmonary tuberculosis patients in Ethiopia: a cross sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 112, 2005.
- YODER, M.A.; LAMICHHANE, G.; BISHAI, W.R. Cavitory pulmonary tuberculosis: The Holy Grail of disease transmission. **Current Science**, v. 86, n. 1, 2004.
- YU, X. et al. Sensititre® MYCOTB MIC plate for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*; complex isolates. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 20, n. 3, p. 329–334, 1 mar. 2016.
- ZAYAS G., et al. A new paradigm in respiratory hygiene: increasing the cohesivity of airway secretions to improve cough interaction and reduce aerosol dispersion. **BMC Pulm Med**, v. 11, p. 1-11, 2005.
- ZHENG, N.; WHALEN, C. C.; HANDEL, A. Modeling the Potential Impact of Host Population Survival on the Evolution of *M. tuberculosis* Latency. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105721, 26 ago. 2014.
- ZHENG, H. et al. Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* DosRST signaling and persistence. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 2, p. 218–225, 19 dez. 2016.
- ZIERSKI Marian, et al. Short-course (6 month) cooperative tuberculosis study in Poland: results 18 months after completion of treatment. **American Review of Respiratory Disease**. v. 122, n. 6, p. 879–889, 1980.
- ZINK, A. R. et al. Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons. *International Journal of Osteoarchaeology*, v. 17, n. 4, p. 380–391, 1 jul. 2007.
- ZUMLA A., et al. Tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, p. 745-55, 2013.

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: “Avaliação da influência da deleção RD^{Rio} e da Concentração Inibitória Mínima na falência da resposta ao tratamento de primeira linha de tuberculose pulmonar: uma coorte prospectiva de 2 anos na grande Florianópolis/SC”.

Prezado (a) Voluntário (a):

Esta pesquisa visa estudar características moleculares e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos do microrganismo causador da tuberculose pulmonar, correlacionando com os dados clínicos e com o desfecho do tratamento, tendo o objetivo de avaliar fatores de risco para falência terapêutica, e consequentemente, otimizar o desempenho do tratamento atual. A pesquisa não tem por objetivo fazer diagnóstico nem fornecer tratamento, porque para isso o voluntário deve seguir as orientações do médico e os procedimentos adotados pela Secretaria Municipal de Saúde

Você está sendo convidado (a) a responder às perguntas do questionário e a autorizar a utilização do microrganismo (*Mycobacterium tuberculosis*) que foi isolado de sua amostra de escarro e da imagem das suas radiografias pulmonares realizadas no início e no término do tratamento, para posterior análise, de forma totalmente voluntária.

Riscos: possível desconforto causado devido aos questionamentos durante a entrevista. O presente estudo não trará nenhum risco a sua integridade física ou moral, também não implicará em quaisquer benefícios pessoais e não resultará em prejuízo individual ou coletivo.

Benefícios: O estudo fornecerá indicadores epidemiológicos da doença que serão utilizados para promover ações de controle da tuberculose. A sua participação é muito importante, pois você estará contribuindo para produção de conhecimentos que possibilitarão um melhor desempenho dos serviços de saúde no combate à tuberculose pulmonar.

Garantia de sigilo: Seu questionário, microrganismo e radiografia receberão uma numeração de forma que quando os resultados forem analisados e divulgados sua identidade não será revelada, mantendo o caráter oficial da informação.

Garantia a informação: Você tem a garantia de receber todos os esclarecimentos sobre as perguntas do questionário, e sobre a

metodologia da pesquisa antes e durante o transcurso da pesquisa, podendo afastar-se a qualquer momento se assim o desejar, bem como está assegurado o absoluto sigilo das informações obtidas.

Toda e qualquer responsabilidade nas diferentes fases da pesquisa é dos pesquisadores. Fica assegurado que haverá divulgação dos resultados finais da pesquisa nos meios de comunicação e nos órgãos de divulgação científica em que a mesma seja aceita. Em todas as publicações ou divulgações dos resultados da pesquisa será mantido o sigilo e a confidencialidade dos dados referentes à identificação dos participantes.

. O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC, para atender a Resolução 466/12 e suas complementares. O CEPSH pode ser contatado pelo telefone (48) 3721-9206 ou pelo endereço eletrônico: cep.propesq@contato.ufsc.br.

A sua participação é completamente voluntária. Antes de concordar em participar desta pesquisa e responder a este questionário, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores responderão todas as suas dúvidas sobre a pesquisa. Caso não queira participar ou queira retirar sua participação em qualquer fase da pesquisa, isto é possível e não lhe trará qualquer consequência. Caso tenha alguma dúvida sobre o estudo ou não queira mais fazer parte do mesmo, você pode entrar em contato pelos telefones: (48) 37218142 ou (48) 3721-2066, e-mail marascheffer@yahoo.com.br ou no endereço: Rua Prof. Maria Flora Pausewang, s/n - Trindade, Florianópolis - SC, CEP 88036-800, Divisão de Análises Clínicas/HU-UFSC.

Pesquisadores responsáveis: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Bazzo (Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina) e Mara Cristina Scheffer (doutoranda).

Antecipadamente agradecemos a colaboração.

Consentimento Pós-Informação

Eu,.....
, portador do documento de identidade (RG)
 nº....., declaro que fui
 esclarecido(a) sobre a pesquisa “Avaliação da influência da deleção
 RD^{Rio} e da Concentração Inibitória Mínima na falência da resposta ao
 tratamento de primeira linha de tuberculose pulmonar: uma coorte
 prospectiva de 2 anos na grande Florianópolis/SC” e aceito participar
 livremente da mesma. Declaro ainda que fui informado(a) de que a
 participação na pesquisa não me trará prejuízos ou despesas, contudo,
 poderá contribuir para o conhecimento científico, e que recebi uma cópia
 deste documento. Sei que a qualquer momento posso deixar de participar
 desta pesquisa, com a retirada do consentimento, sem precisar haver
 justificativa e sem penalização, através de contato com os pesquisadores.

Local e data: _____

Telefone para contato: _____

Assinatura do participante: _____

Assinatura do responsável: _____

Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Bazzo

e-mail: m.l.bazzo@ufsc.br

Telefone: (48) 3721-2066

Mara Cristina Scheffer

e-mail: marascheffer@yahoo.com.br

Telefone (48)37218142

APÊNDICE B

Questionário aplicado aos pacientes na forma de entrevista

Identificação numérica			
Idade			
Sexo			
Local residência (rua e bairro)			
Local de trabalho			
Dados Clínicos:			
Tosse		() sim	() não
Produção de escarro		() sim	() não
Hemoptise (sangue escarro)		() sim	() não
Febre		() sim	() não
Sudorese Noturna		() sim	() não
Perda de peso		() sim ____Kg	() não
HIV	() não testado	() positivo	() negativo
Teste tuberculínico (PPD)		() sim _____mm	() não
Tabagismo		() sim () menos de 10/dia () 11 a 20/dia () 21 a 30/dia () mais de 31/dia	() não
Ingestão Alcoólica		() sim () moderada	() não

	() excessiva () adicta	
Drogas	() sim Qual: _____	() não
Tempo entre início dos sintomas e o diagnóstico		
Conhece alguém com TB	() sim Quem _____ Tempo _____	(...) não
Escolaridade		
Dados Radiológicos:		
FOTO	() sim	() não
Presença de cavitação	() sim	() não
Infiltrado homogêneo	() sim	() não
Derrame pleural	() sim	() não
Dados laboratoriais:		
Esfregaço	Negativo	
	(+)	
	(++)	
	(+++)	
Cultura inicial	() positivo _____	() negativo
Cultura segundo mês	() positivo	() negativo
Cultura quarto mês (falha)	() positivo	() negativo