

EUNICE ATSUKO TOTUMI CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*
DA POPULAÇÃO INDÍGENA E NÃO-INDÍGENA DE MATO GROSSO DO SUL**

**Campo Grande, MS
2011**

EUNICE ATSUKO TOTUMI CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*
DA POPULAÇÃO INDÍGENA E NÃO-INDÍGENA DE MATO GROSSO DO SUL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa.

**Campo Grande, MS
2011**

Aos pacientes indígenas e não-indígenas.

**À equipe do Setor de Micobacteriologia do Laboratório Central de Saúde Pública de Mato
Grosso do Sul.**

Ao meu pai (*in memoriam*), que sempre acreditou que eu poderia fazer alguma diferença.

AGRADECIMENTOS

No decorrer deste estudo muitos me ajudaram, direta ou indiretamente. Agradeço imensamente. Muito obrigada.

Primeiramente, ao Laboratório Central de Saúde Pública, representado pela Dra. Suely Aparecida Correa Antonialli, por permitir realizar esse trabalho.

À minha família, por me auxiliar em todos momentos da minha vida. Às minhas filhas Brenda e Carla, a razão da minha vida.

Aos meus amigos e colegas de trabalho da Micobacteriologia do LACEN-MS, Leila Lempke, Luciana Teixeira, Carmen Mocheister, Odenir Amorim, Ana Paula Almeida, Helena Yoshie Matsuo Dias e Aleuyr Oliveira Lima, na execução dos exames laboratoriais e colaboração.

Ao Cassiano Ribeiro, do Hospital Porta da Esperança de Dourados, ao dar continuidade à realização das baciloscopias e semeaduras em Ogawa–Kudoh, iniciada pela inesquecível D. Irene Castilho.

Ao mais recente colaborador Alexsandro Heirish, da Casa do Índio de Amambai, pela realização de baciloscopia e semeaduras em Ogawa–Kudoh. Também à enfermeira Maísa Rodrigues Nascimento, pelo acompanhamento e dedicação aos pacientes com tuberculose.

À família de Dayse Sato, pelas orientações sábias e pelo acolhimento em sua casa.

Ao Adolfo Barreto, por todo apoio logístico e profissional.

À professora Clarice Queico Fujimura Leite, por confiar em mim e no meu trabalho.

A Fátima Sonia Silva, pela amizade e hospedagem.

À Coordenação do Programa de Controle Estadual de Tuberculose, principalmente na pessoa de Marli Marques, pela parceria.

Ao Instituto Adolfo Lutz, principalmente nas pessoas de Lucilaine Ferrazoli e Vera Simonsen, na realização dos RFLPs.

À DAHW, ONG alemã, na pessoa de Manfred Göbel, pela ajuda financeira na execução da técnica de biologia molecular fora do estado de Mato Grosso do Sul.

Aos meus amigos Lincoln Uchoa e Mayara Angelo, por me auxiliarem na elaboração e consolidação dos dados.

Ao Nelson Olasar, diretor do Departamento de Saúde Indígena de Mato Grosso do Sul.

À responsável de Programa de Controle da Tuberculose, Roselene Figueiredo, pelo livre acesso às informações e por acreditar em nosso trabalho.

Ao meu orientador, Izaias Pereira da Costa, pela compreensão pelos inúmeros adiamentos.

RESUMO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa com diagnóstico laboratorial conhecido há mais de 100 anos. Embora o tratamento permita cura em quase 100% dos casos, continua sendo um grande problema de saúde pública no mundo. Em Mato Grosso do Sul, sua incidência é próxima à média nacional (37,9/100 000 hab.), mas na população indígena a incidência em 2010 alcançou 199,8/100 000 hab. Este estudo avaliou, quanto à resistência a drogas antituberculose, isolados colhidos no período de 2000 a 2008 na população indígena e não-indígena de Mato Grosso do Sul. Constatou-se resistência às drogas antituberculose em 17,4% e multidrogarresistência em 3,7%, índice este maior que o estimado para o Brasil (1,4%). Considerando-se apenas a população indígena, constatou-se resistência em 4,63% e a multidrogarresistência inferior a 1%. A análise dos perfis por RFLP permitiu diferenciar transmissão recente e infecção endógena. Foram analisadas 149 amostras, sendo excluídos três isolados que apresentavam menos que seis bandas e 18 por serem repetidos. Encontraram-se *clusters* entre indígenas e não-indígenas envolvendo 77 isolados (59,6%). Foram considerados não-*cluster* 29 isolados. Os perfis únicos totalizaram 22 amostras. Foram identificadas duas famílias de isolados em *cluster* ao longo de 12 anos, todos do município de Amambai, cuja população indígena é de cerca de 12 000. Os resultados obtidos caracterizam transmissão recente e também infecção endógena, reforçando a importância do diagnóstico precoce e da continuidade da quimioprofilaxia.

ABSTRACT

Tuberculosis, a contagious infectious disease, has been diagnosed by laboratory methods for over 100 years. Despite the availability of treatments that ensure complete recovery in nearly 100% of cases, the disease remains a major public health issue worldwide. In Mato Grosso do Sul state, in West-Central Brazil, its incidence is similar to the national average of 37.9 per 100 000 population, whereas in the indigenous population it reached 199.8 per 100 000 in 2010. This study investigated antituberculosis drug resistance in isolates collected from indigenous and non-indigenous patients in Mato Grosso do Sul in the period 2000-2008. Resistance was found in 17.4% of cases and multidrug resistance in 3.7%. The latter percentage was higher than that estimated for Brazil (1.4%). Drug-resistant isolates accounted for 4.63% of indigenous patients and multidrug resistance for less than 1%. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis allowed recent transmission to be distinguished from endogenous infection. A total of 149 samples were analyzed. Three isolates were excluded for showing less than six bands; another 18 were excluded for being repeated. Clusters between profiles of indigenous and nonindigenous samples encompassed 77 isolates (59.6%); 29 isolates were found to be non-clustered. Unique profiles accounted for 22 samples. Two families of isolates clustered over 12 years were identified, all of them from Amambai county, whose indigenous population is around 12 000. The results obtained revealed the occurrence of recent transmission, as well as endogenous infection, emphasizing the importance of early diagnosis and continuous chemoprophylaxis.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

BCG	"Bacille Calmette–Guerin"
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
CIM	Concentração inibitória mínima
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTAB	Hexadecil-trimetil-brometo de amônio
dATP	"2-Deoxyadenosine 5-triphosphate"
dCTP	"2-Deoxytidine 5-triphosphate"
dGTP	"2-Deoxyguanosine 5-triphosphate"
DIG	Digoxigenina
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPI	"Dots per inch"
DR	"Direct repeat"
DSS	Dodecil-sulfato de sódio
DTT	"Dithiothreitol"
dTTP	"Deoxythymidine 5-triphosphate"
dUTP	"2-Deoxyuridine 5-triphosphate"
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EMB	Etambutol
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
H	Isoniazida
HIV	"Human immunodeficiency virus"
HPE	Hospital Porta da Esperança
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC	Intervalo de confiança
IRS	Sequência repetida invertida
IS	"Insertion sequence"
Kb	Quilobase (10^3 pares de bases)
LACEN-MS	Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul
M	Molar
mbar	Milibar (1 bar = 10^5 pascais)
MDR	"Multiple-drug-resistant"
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normal
NBT	"Nitro-blue-tetrazolium"
ND	Não-definido
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	"Odds ratio"
OPAD	Outros padrões de associação de drogas

Pb	Pares de bases
PCR	Reação da cadeia em polimerase
PECT-MS	Programa Estadual de Controle da Tuberculose de Mato Grosso do Sul
PGRS	"Polimorphic guanine-cytosine rich repetitive sequence"
PM	Peso molecular
PNCT-MS	Programa Nacional de Controle da Tuberculose, Ministério da Saúde
RFLP	"Restriction fragment length polymorphism"
RMP	Rotações por minuto
RC	Resistência combinada
S	Estreptomicina
SSC	Solução salina com citrato
TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	Tuberculose
TE	Tris- EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
UDEV	Usuário de droga endovenosa
UPGMA	"Unweighted pair method with arithmetic averages"
XDR	Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> extensivamente resistentes
Z	Pirazinamida
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
x	Vezez

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	TUBERCULOSE NO MUNDO	12
1.2	HIV NO MUNDO	14
1.3	TUBERCULOSE E HIV	14
1.4	POVOS INDÍGENAS NO MUNDO E A TUBERCULOSE	15
1.5	A TUBERCULOSE NO BRASIL	16
1.5	TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL	19
1.6	TUBERCULOSE INDÍGENA EM MATO GROSSO DO SUL	19
1.7	RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTITUBERCULOSE E ESQUEMA DE TRATAMENTO.....	22
1.8	CLASSIFICAÇÃO DOS MEDICAMENTOS	24
1.9	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	26
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	MATERIAL E MÉTODO	32
3.1	TIPO DE ESTUDO	32
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	32
3.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	33
3.4	COLETA DE INFORMAÇÕES	33
3.5	ANÁLISE DE INFORMAÇÕES	34
3.6	PACIENTES ENVOLVIDOS NA PESQUISA	34
3.7	DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE	34
3.8	ANÁLISE CRÍTICA DOS RISCOS E BENEFÍCIOS	34
3.9	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	35
3.10	ROTEIRO DO PROCEDIMENTO LABORATORIAL	36
3.11	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TUBERCULOSE REALIZADO NO LACEN-MS	37
3.12	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM ÁREAS INDÍGENAS E FRONTEIRAS.....	37
3.13	CONTROLE DE QUALIDADE DAS BACILOSCOPIAS	38
3.14	ISOLAMENTO DAS CEPAS BACTERIANAS	38

3.15	CEPAS DE REFERÊNCIA.....	38
3.16	CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> QUANTO À SUSCETIBILIDADE ÀS DROGAS	38
3.17	CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> QUANTO AO PERFIL GENÉTICO PELO MÉTODO RFLP- <i>IS6610</i>	39
3.18	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	39
3.18.1	Preparo do DNA bacteriano (VAN EMBDEN et al., 1993)	39
3.18.2	Preparo da sonda genética.....	41
3.18.3	Hibridação do DNA bacteriano com a sonda de DNA marcada	44
3.19	ANÁLISE DOS PERFIS GENÉTICOS DAS CEPAS	45
3.20	ANÁLISE DOS DADOS	46
3.21	MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	46
3.21.1	Meio de Löwenstein–Jensen	46
3.21.2	Meio de Ogawa–Kudoh	47
3.21.3	Solução-tampão tris- EDTA (TE)	47
3.21.4	Solução de lisozima	48
3.21.5	Solução de proteinase K.....	48
3.21.6	Solução de dodecil sulfato de sódio (DSS)	48
3.21.7	Solução CTAB-NaCl	48
3.21.8	Solução-tampão tris-acetato EDTA (TAE), 50 vezes	49
3.21.9	Solução de arraste	49
3.21.10	Solução de brometo de etídio	49
3.21.11	Solução salina com citrato (SSC), 20 vezes.....	50
3.21.12	Solução de despurinação (HCl 0,25 M)	50
3.21.13	Solução desnaturante.....	50
3.21.14	Solução neutralizante.....	51
3.21.15	Solução-tampão 1.....	51
3.21.16	Solução bloqueadora.....	51
3.21.17	Solução de N-lauroilsarcosina 10%	52
3.21.18	Solução de hibridação	52
3.21.19	Solução A	52
3.21.20	Solução B	53
3.21.21	Solução-tampão 2.....	53
3.21.22	Solução-tampão 3.....	53
3.21.23	Solução de nitro-blue-tetrazolium (NBT)	54

3.21.24 Solução de 5-bromo-5-cloro-3-indoil-fostato (BCIP)	54
3.21.25 Solução de revelação.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 IMPLEMENTAÇÃO DA ROTINA	55
4.2 PERFIL DOS CASOS COM INVESTIGAÇÃO DE RESISTÊNCIA	56
4.3 NÍVEIS DE RESISTÊNCIA PRIMÁRIA, RESISTÊNCIA ADQUIRIDA E RESISTÊNCIA COMBINADA	57
4.4 DROGAS RESPONSÁVEIS PELOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA COMBINADA (RC)	59
4.5 NÍVEIS DE MULTIDROGARRESISTÊNCIA (MDR) PRIMÁRIA, ADQUIRIDA E COMBINADA	61
4.6 ABANDONO DE TRATAMENTO DA TUBERCULOSE E NÍVEIS DE MDR COMBINADA	64
4.7 RESISTÊNCIA ÀS DROGAS NA ÁREA INDÍGENA DE MATO GROSSO DO SUL	67
4.8 BIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL	68
6 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXO	91

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, cujo diagnóstico laboratorial foi descoberto há mais de 100 anos por Robert Koch. O bacilo acomete principalmente o pulmão, mas também outros órgãos, incluindo rins, medula, intestino e ossos. Com o tratamento possibilitado pela descoberta de drogas antituberculose acreditou-se na viabilidade de controlar a doença.

1.1 TUBERCULOSE NO MUNDO

Em 2009, a incidência estimada da doença foi de 9,4 milhões de casos (com notificação de 5,8 milhões), com maior número na Ásia, África e Mediterrâneo Oriental, com 35%, 30% e 20% respectivamente. Apesar de 1,3 milhão de mortes estimadas, morreram em decorrência da doença 1,7 milhão de indivíduos, o que corresponde a 4 700 por dia. Anualmente, são descobertos cerca de 440 000 casos novos de tuberculose multidrogarresistente (MDR), com confirmação de casos de *M. tuberculosis* extensivamente resistente (XDR) em 58 países (WHO, 2010). A cada ano, cerca de 10 milhões de crianças se tornaram órfãos no mundo por conta da morte dos pais por tuberculose (WHO, 2010).

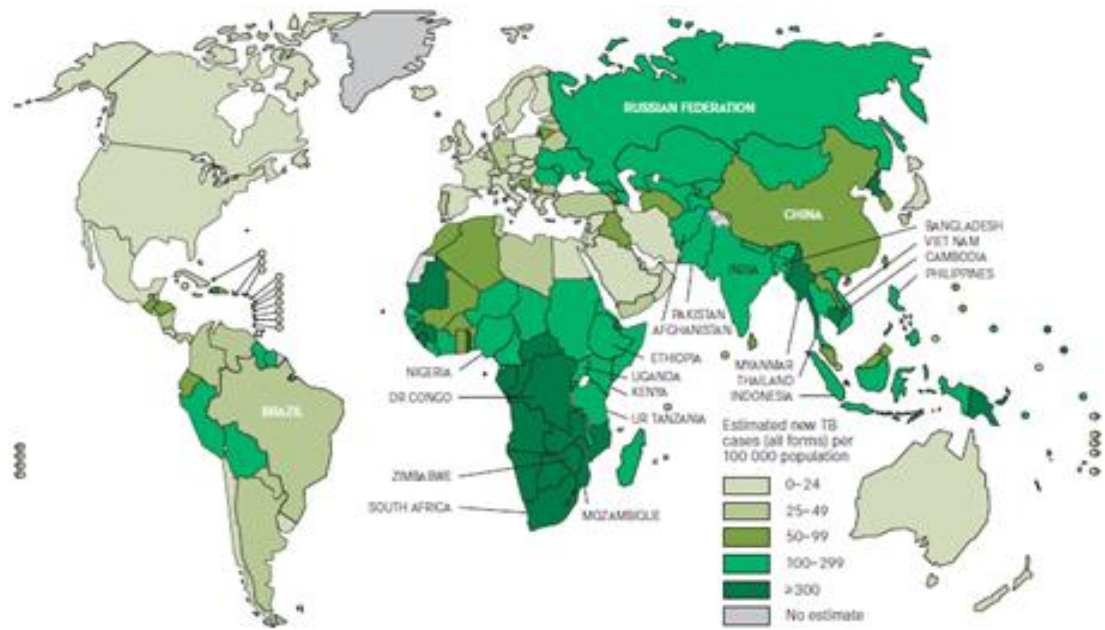


Figura 1. Estimativa da incidência da tuberculose no mundo em 2010.

Fonte: WHO Report (2011)

Os indicadores de casos de tuberculose tem demonstrado mundialmente o declínio significativo da doença desde 2006, com drástica redução de mortes na China e melhoria nas informações principalmente da África (WHO, 2011).

As metas do desenvolvimento do milênio, bem como da iniciativa Stop TB Partnership, na Assembleia Mundial da Saúde, consideraram como principais objetivos globais os indicadores para controle da tuberculose. Foram consideradas metas de impacto reduzir, até 2015, a incidência para 25,9/100 000 habitantes e as taxas de prevalência e de mortalidade à metade em relação às de 1990. Além disso, espera-se que até 2050 a incidência global de tuberculose ativa seja menor que 1/1 000 000 habitantes por ano (WHO, 2011).

1.2 HIV NO MUNDO

Segundo os dados da OMS (2011), em 2010 existiam cerca de 34 milhões de pessoas vivendo com HIV, sendo que 2,7 milhões eram casos novos. As mortes perfizeram aproximadamente 1,8 milhão.

1.3 TUBERCULOSE E HIV

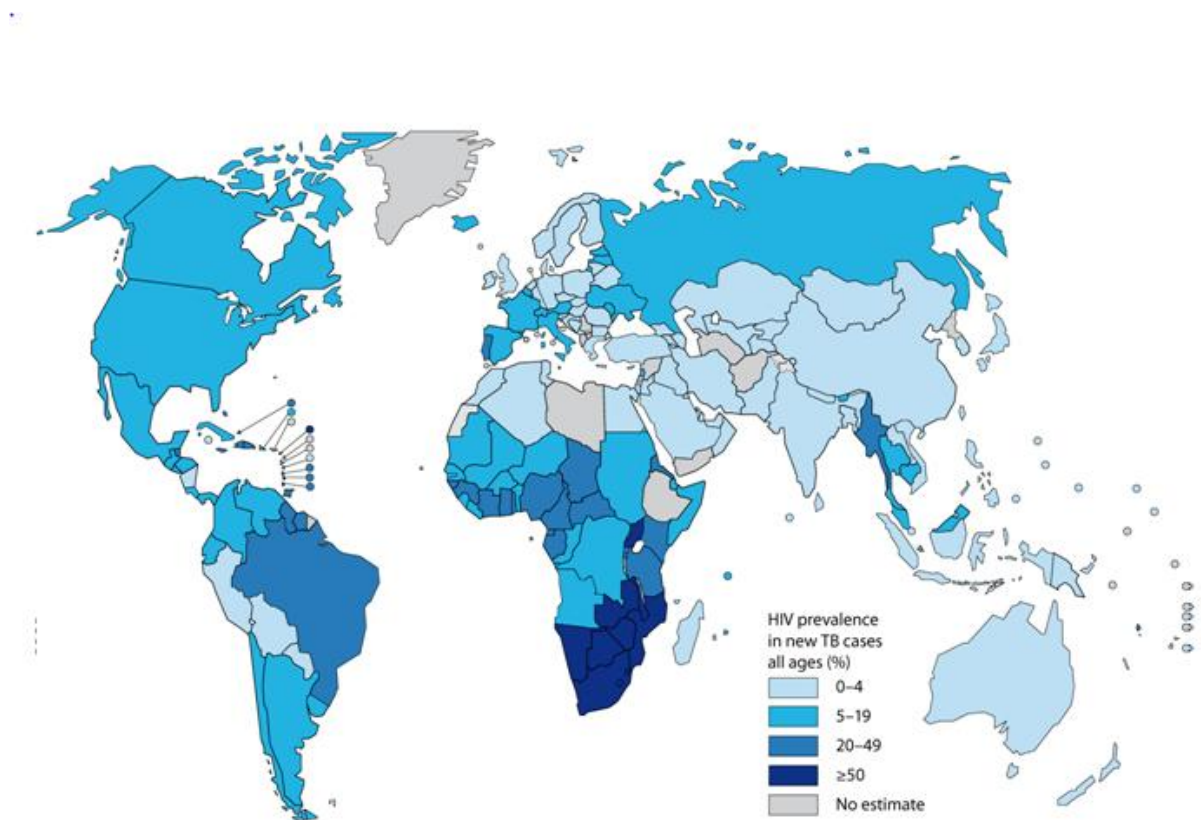


Figura 2. Estimativa da prevalência de HIV em novos casos de tuberculose no mundo em 2010.

Fonte: WHO Report (2011).

De acordo com a OMS (2011), morreram cerca de 1,1 milhão de pessoas com tuberculose entre indivíduos HIV-negativos, ao passo que 320 mil morreram entre os HIV-positivos.

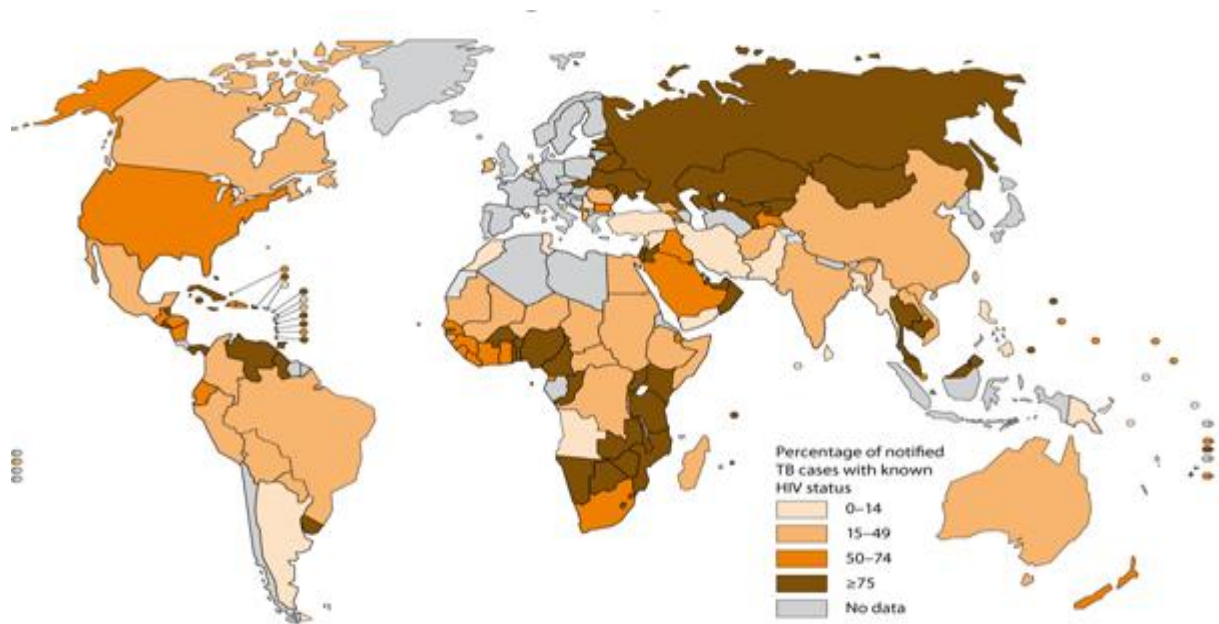


Figura 3. Porcentagem de indivíduos com tuberculose notificada que conheciam seu *status* de HIV, em 2010.

Fonte: WHO Report (2011)

Em 2009, 1,6 milhão de pessoas sabiam ter HIV, ao passo que em 2008 esse número era de 1,4 milhão.

1.4 POVOS INDÍGENAS NO MUNDO E A TUBERCULOSE

Em 2008 ocorreu em Toronto, Canadá, o encontro denominado *A global indigenous people initiative to stop TB*, que reuniu representantes de mais de 60 países. A proposta do encontro foi reunir especialistas na área indígena que pudessem contribuir no desenvolvimento de um plano estratégico para a redução mundial da tuberculose indígena. As estratégias foram resumidas com seguintes prioridades:

1. Envolver a comunidade indígena
2. Compartilhar as melhores práticas em saúde
3. Defender junto aos governos a inclusão das comunidades indígenas no controle da tuberculose
4. Entender melhor a magnitude da doença nas comunidades indígenas (<http://fnpublichealth.ca/tb/global-indigenous-stop-tb/>).

Há 370 milhões de indígenas no mundo, distribuídos em mais de 70 países, mas a prevalência da tuberculose indígena no mundo não é conhecida.

Mundialmente a população indígena tem desigualdades graves em relação ao risco de tuberculose, em comparação com a população não-indígena.

1.5 A TUBERCULOSE NO BRASIL

O Brasil permanece entre os 22 países priorizados pela OMS, perfazendo 80% da carga mundial de tuberculose. Em 2010, notificaram-se no país 81 946 casos novos da doença. Dos casos novos notificados, 41 117 foram bacilíferos, com baciloscopia positiva ao exame de escarro, correspondendo a uma incidência de 41/100 000 habitantes. No Brasil, a tuberculose é a terceira causa de morte por doenças infecciosas, com cerca de 4,8 mil óbitos por ano, e a primeira causa de morte de pacientes com AIDS. Esses indicadores colocam o país na 19.^a posição quanto ao número de casos e na 104.^a quanto ao coeficiente de incidência (WHO, 2009).

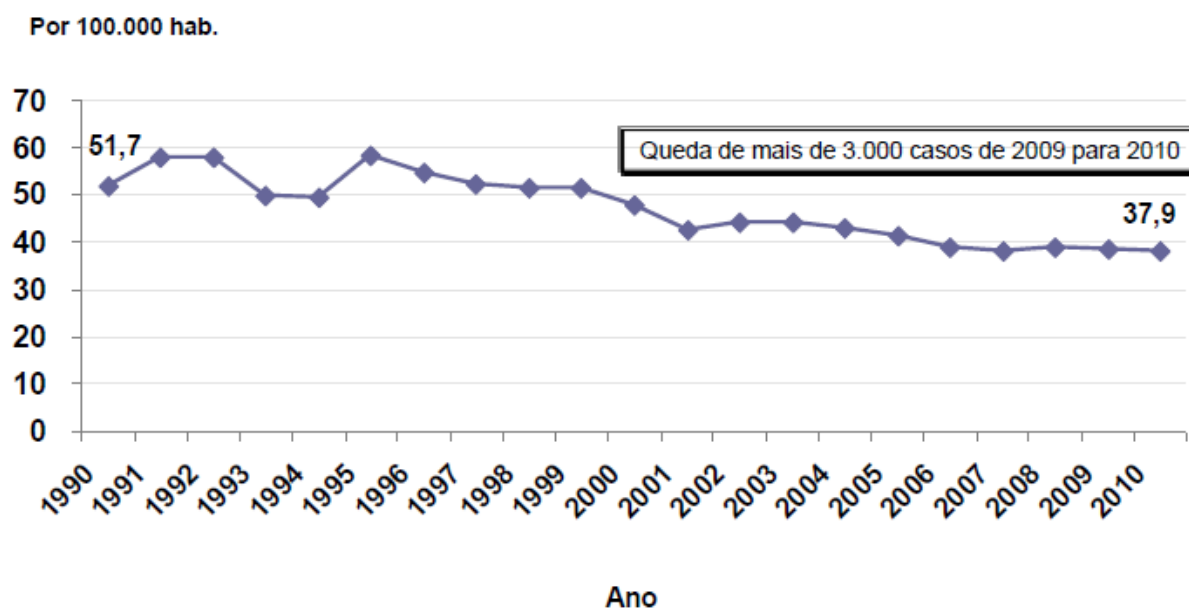


Figura 4. Taxa de incidência de tuberculose no Brasil, 1990 a 2010.

Fonte: MS/SINAN (2011). (Os dados de 2010 são preliminares, sujeitos portanto a revisão.)

Embora se perceba uma queda em relação à incidência, quando analisamos os dados por região verificamos que ainda existem estados em que o número de casos é

relativamente alto. O estado do Rio de Janeiro tem incidência de 71,8/100 000, representando quase o dobro da média nacional (37,9/100.000).

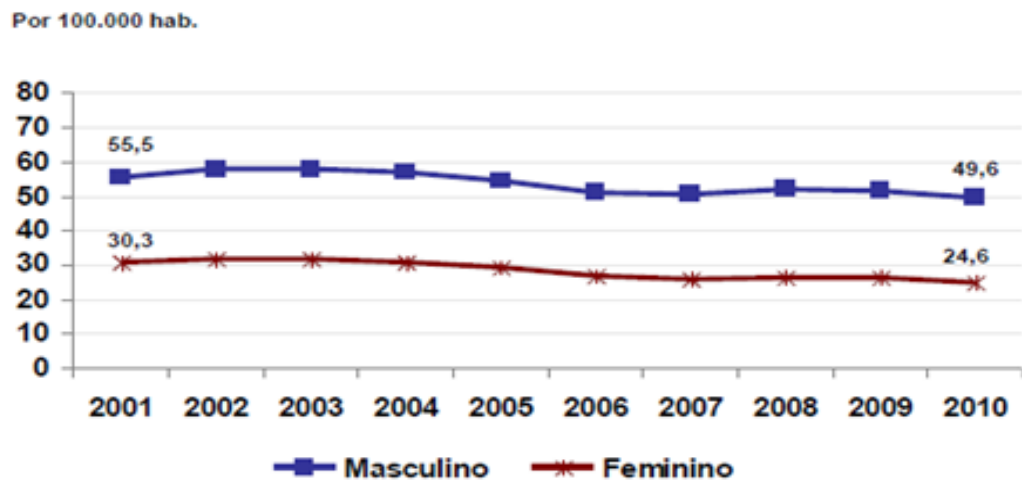


Figura 5. Taxa de incidência de tuberculose, por sexo. Brasil, 2001 a 2010.

Fonte: MS/SINAN (2011). (Os dados de 2010 são preliminares, sujeitos portanto a revisão.)

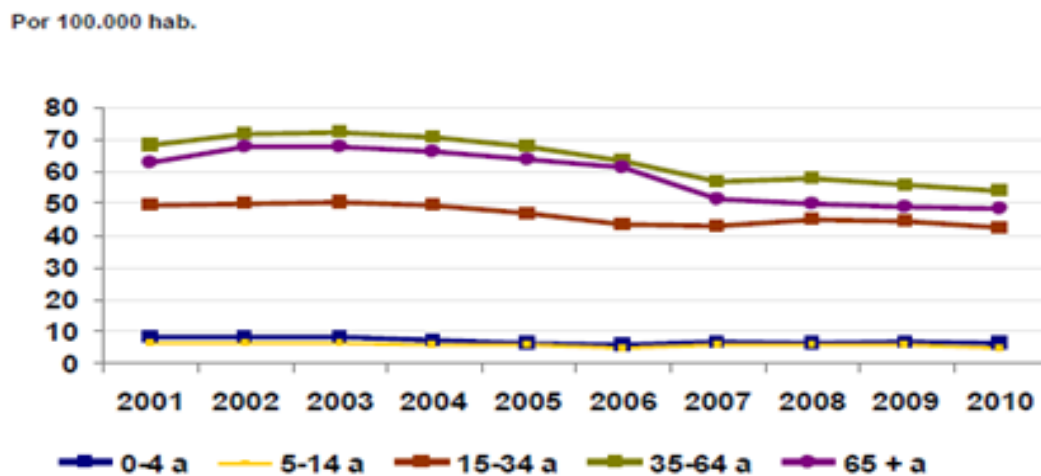


Figura 6. Taxa de incidência de tuberculose, por faixa etária. Brasil, 2001 a 2010.

Fonte: MS/SINAN (2011). (Os dados de 2010 são preliminares, sujeitos portanto a revisão.)

Quanto ao perfil sociodemográfico, os dados disponíveis para o Brasil não diferem dos de outros países, nos quais também há predomínio de casos de tuberculose na população masculina, principalmente na fase mais produtiva da vida.

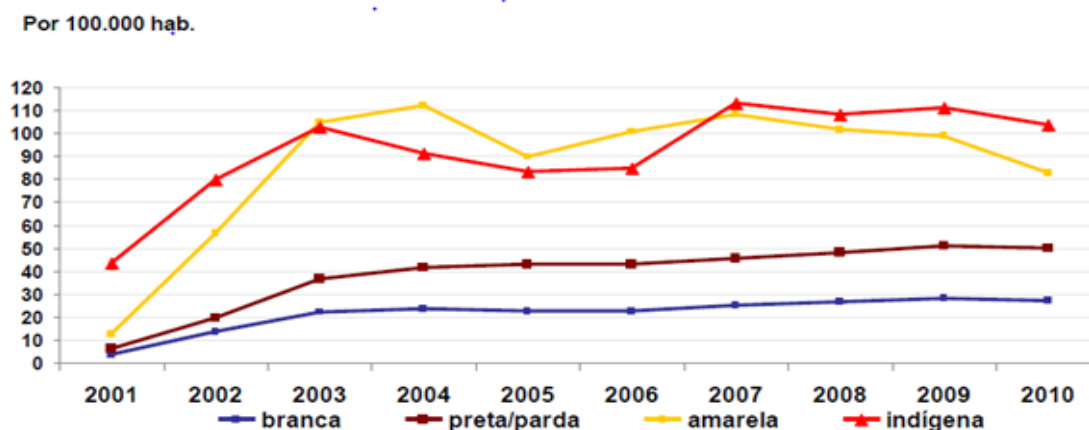


Figura 7. Taxa de incidência de tuberculose, por raça. Brasil, 2001 a 2010.

Fonte: MS/SINAN (2011). (Os dados de 2010 são preliminares, sujeitos portanto a revisão.)

Existem no Brasil 546 949 indígenas, representantes de 210 povos e falantes de mais de 170 línguas, residentes em 3 751 aldeias distribuídas em 611 Terras Indígenas, presentes em 410 municípios em praticamente todo território nacional. Em sua grande maioria, as sociedades indígenas são consideradas de pequena escala, com aproximadamente 50% dos grupos étnicos sendo compostos por até 500 pessoas e 40% constituídos de 500 a 5 000 indivíduos. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na composição demográfica das sociedades indígenas há grande contingente de crianças e adolescentes menores de 15 anos (41,8%).

De acordo com recente levantamento dos registros das notificações realizado pelo grupo técnico assessor da FUNASA nos distritos prioritários, a incidência média de tuberculose atingiu 144,1/100 000 e 140,2/100 000 em 2006 e 2007, respectivamente (BRASIL, 2011).

Amarante (2000), retrata a condição social dos indígenas e os fatores que influenciam a disseminação, o tratamento e controle da tuberculose nessa população.

Gómes i Prat (2000) apontam que o diagnóstico laboratorial de tuberculose na área indígena se restringia basicamente à baciloscopia. Depois de uma década, a realidade no diagnóstico continua a mesma, exceto por algumas ações pontuais com realização de culturas para diagnóstico da tuberculose.

No novo *Manual de controle da tuberculose*, é sugerido que populações vulneráveis (índios, detentos e privados de liberdade) tenham acesso a exame de cultura para diagnóstico da tuberculose, de forma universal (BRASIL, 2011).

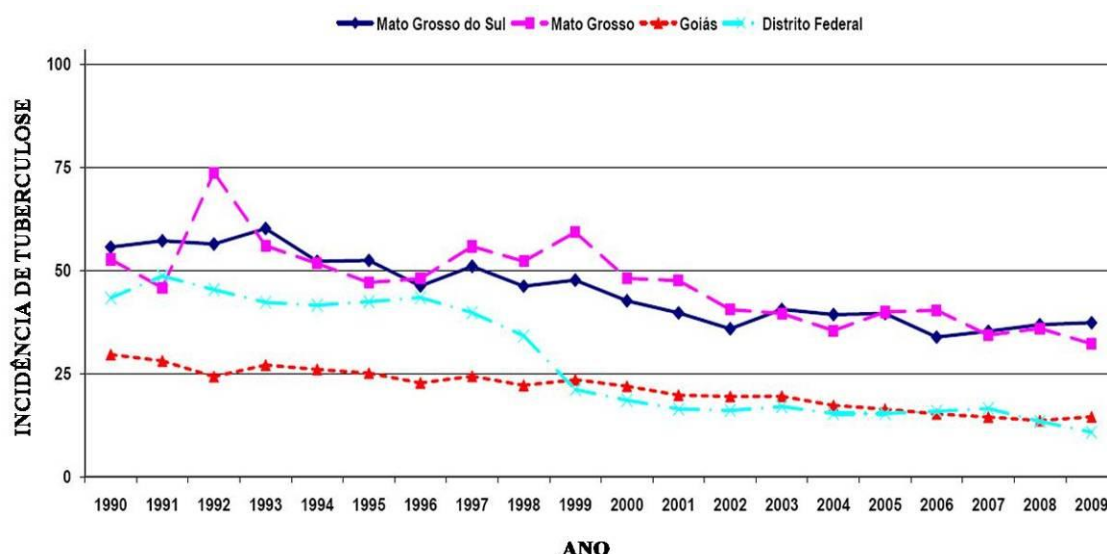


Figura 8. Incidência da tuberculose na região Centro-Oeste. De 1990 a 2010.

Fonte: MS/SINAN (2011). (Os dados de 2010 são preliminares, sujeitos portanto a revisão.)

1.6 TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL

Em 1990, a incidência da tuberculose no Mato Grosso do Sul foi de 55,6/100 000 habitantes e reduziu-se a 32,7/100 000 em 2010 (Figura 8). De 2000 a 2008 foram notificados 9 319 casos no SINAN, representando uma média anual de cerca de 800 casos ao ano. Destes, cerca de 25% ocorreram em áreas indígenas (PECT-MS).

1.7 TUBERCULOSE INDÍGENA EM MATO GROSSO DO SUL

Mato Grosso do Sul apresenta a segunda maior população de indígenas do país. A incidência de tuberculose em 1999 foi de 700/100 000 (MARQUES; CUNHA, 2003).

Nutels *et al.* (1961) já atuavam na região sul do então estado de Mato Grosso (área hoje correspondente ao sul de Mato Grosso do Sul) e apontaram a importância do diagnóstico laboratorial em tuberculose.

Mesmo com a queda bastante expressiva dos níveis de incidência depois de uma década, com monitoramento constante das equipes, utilização de DOTS, quimioprofilaxia, acesso a baciloscopias e culturas para diagnóstico da tuberculose de forma universal, com realização do teste de sensibilidade para resultados positivos, a incidência continua bastante elevada (199, 8/100 000) em relação a média nacional (37,9/100 000) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das aldeias indígenas (AL) segundo polo-base (PB), município (MN), população, casos novos de tuberculose (CNTB) bacilífera (BK+), todas as formas (TF) e coeficiente de incidência por 100 000 habitantes. MS-2010.

Área Geográfica			População indígena (hab.)			CN TB bacilífera (BK+)			Incidência de TB		
Pólo Base (PL)	Município (MUN)	Aldeia (AL)	AL	MUN	PB	PB	AL	BK+	TF	BK+	PB
AMAMBAÍ	AMAMBAI	AMAMBAI	7.083				12	7	169,4	98,8	
		JAGUARI	335	8.602			2	1	597,0	298,5	
		LIMÃO VERDE	1.184		11.895	38	6	5	506,8	422,3	
		A. MOREIRA	467	467			4	3	856,5	642,4	
		CEL. SAPUCAIA	2.826	2.826			14	5	495,4	176,9	319,5
ANTÔNIO JOÃO	A. JOAO	CAMPESTRE	428	988					0,0	0,0	
		CERRO MARANGATU	560						0,0	0,0	
		PIRAKUÁ	464	464	1.783	3	3	2	646,6	431,0	
		KOKUE-Y	131	331					0,0	0,0	
		LIMA CAMPO	200						0,0	0,0	168,3
AQUIDAUANA	ANASTACIO	ALDEINHA	356	356			2		561,8	0,0	
		ÁGUA BRANCA	703						0,0	0,0	
		BANANAL	1.170				4	2	341,9	170,9	
		COLONIA NOVA	189						0,0	0,0	
		CÓRREGO SECO	158						0,0	0,0	
	AQUIDAUANA	IMBIRUSSÚ	188	5.425					0,0	0,0	
		LAGOINHA	616		7.210	11			0,0	0,0	
		LIMÃO VERDE	1.177				1		85,0	0,0	
		MORRINHOS	280						0,0	0,0	
		YPEGUE	944				1	1	105,9	105,9	
	NIOAQUE	ÁGUA BRANCA	286				1	1	349,7	349,7	
		BREJÃO	520	1.429					0,0	0,0	
		CABECEIRA	318				1	1	314,5	314,5	
BODOQUENA	PTO MURTINHO	TABOQUINHA	305				1	1	327,9	327,9	152,6
		ALVES DE BARROS	812						0,0	0,0	
		CAMPINA	104		953				0,0	0,0	
		CORREGO DE OURO	37	1.587					0,0	0,0	0,0
		BARRO PRETO	47						0,0	0,0	
BONITO	G. L. LAGUNA	SÃO JOÃO	361		729				0,0	0,0	
		TOMÁSIA	226						0,0	0,0	
		CERRO Y	95	95					0,0	0,0	0,0
CAARAPÓ	CAARAPÓ	CAARAPÓ	4.452	4.821			21	18	471,7	404,3	
		GUIRA-ROKA	77						0,0	0,0	
		TAQUARA	292		5.968	21			0,0	0,0	
	JUTI	JARARÁ	288						0,0	0,0	
	LAG. CARAPÁ	GUAIMBÉ	448	859					0,0	0,0	
CAMPO GRANDE	C. GRANDE	RANCHO JACARÉ	411						0,0	0,0	351,9
		MARÇAL DE SOUZA	2.807	2.807	2.875				0,0	0,0	
		BÁLSAMO	68	68					0,0	0,0	
BRASILÂNDIA	BRASILÂNDIA	OFAÍE XAVANTE	105	105	105	1	1	1	952,4	952,4	952,4
CORUMBA	CORUMBA	UBERABA	149	149	149				0,0	0,0	
		PANAMBI	860	860			3	2	348,8	232,6	
		BORORÓ	6.077				17	11	279,7	181,0	
		JAGUAPIRÚ	6.219	12.716	13.826	32	9	7	144,7	112,6	
		PANAMBIZINHO	338				1	1	295,9	295,9	
DOURADOS	DOURADOS	PORTO CAMBIRA	82						0,0	0,0	
		SUCURI	250	250			2		800,0	0,0	231,4
		CERRITO	570	570					0,0	0,0	
IGUATEMI	JAPORA	ACAMP. YVY KATU	305	3.838	4.606	7	1	1	327,9	327,9	
		PORTO LINDO	3.533				5	2	141,5	56,6	
		ACAMP. SOMBRERITO	198	198			1	1	505,1	505,1	152,0
MIRANDA	MIRANDA	ARGOLA	682						0,0	0,0	
		BABAÇU	685						0,0	0,0	
		CACHOEIRINHA	1.481						0,0	0,0	
		LAGOINHA	136	6.771	6.771	4			0,0	0,0	
		LALIMA	1.374				1		72,8	0,0	
		MOREIRA	1.031				1		97,0	0,0	
		MORRINHO	309						0,0	0,0	
PARANHOS	PARANHOS	PASSARINHO	1.073				2	1	186,4	93,2	59,1
		ARROIO CORÁ	449						0,0	0,0	
		PARAGUASSÚ	634						0,0	0,0	
		PIRAJUÍ	2.052	4.253	4.253	5	5	4	243,7	194,9	
		POTRERO-GUASSU	638						0,0	0,0	
SIDROLÂNDIA	DOIS I. BURITI	SETE CERROS	480						0,0	0,0	117,6
		ÁGUA AZUL	282						0,0	0,0	
		BARRERINHO	106						0,0	0,0	
		BURITI	848	1.777			1		117,9	0,0	
		OLHO DAGUA	193						0,0	0,0	
	SIDROLÂNDIA	OLIVEIRA	136		3.211	1			0,0	0,0	
		RECANTO	212						0,0	0,0	
		CÓRREGO DO MEIO	485						0,0	0,0	
		LAGOINHA	281	1.434					0,0	0,0	
TACURU	TACURU	TERERÉ	668						0,0	0,0	31,1
		JAGUAPIRÉ	959	3.240	3.240	12	2	2	208,6	208,6	370,4
TOTAL	29	SASSORÓ	2.281				10	7	438,4	306,9	
			67.574	67.574	67.574	135	135	87	199,8	128,7	199,8

Fonte: SIASI - FUNASA/MS. Dados atualizados em 30/01/2010.

1.8 RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTITUBERCULOSE E ESQUEMA DE TRATAMENTO

A tuberculose é uma doença grave, porém curável em praticamente a totalidade dos casos novos, desde que obedecidos os princípios da quimioterapia. A associação medicamentosa adequada, a dosagem correta, o uso por tempo adequado e a adesão ao tratamento são os meios para evitar a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência às drogas (BRASIL, 2008). Até a década de 1980, o número de casos da doença estava em declínio em todo o mundo. O recrudescimento verificado na década de 1990 se deveu a fatores estruturais e demográficos, e também à infecção por HIV (SCHWOEBEL *et al.*, 1998; RIEDER, 2001; KRITSKI, 2005).

A resistência aos medicamentos deve-se à amplificação, induzida pelo homem, do fenômeno natural das mutações espontâneas no bacilo *M. tuberculosis* (WHO, 1977). A seleção de mutantes é facilitada pela rápida multiplicação, no interior de cavidades pulmonares, de até 10^8 a 10^9 bacilos, devido à alta oxigenação local e à proteção desses micro-organismos por paredes espessas que impedem a ação das drogas em concentrações inibitórias adequadas (CANETTI, 1965). Na concomitância de tratamentos inadequados, tais condições tornam esse ambiente propício ao desenvolvimento de tuberculose multirresistente (TBMR) (BRASIL, 2008a).

No Brasil, até 2008, considerava-se multirresistente o bacilo que apresentava resistência *in vitro* à rifampicina, à isoniazida e a uma terceira droga dos esquemas padronizados.

O critério internacional, adotado neste estudo considera como multirresistência a resistência *in vitro* à rifampicina e isoniazida simultaneamente (PABLO *et al.*, 1998; BRASIL, 2008a).

As resistências do bacilo da tuberculose podem ser classificadas de acordo com o teste de sensibilidade em:

- monorresistência: resistência a um fármaco antituberculose;
- polirresistência: resistência a dois ou mais fármacos antituberculose, exceto à associação R e I;
- multirresistência: resistência a R e H (Ministério da Saúde, 2010).

Em 1979, o Brasil preconizou um sistema de tratamento composto pelo Esquema I (2RHZ/4RH) para casos novos, Esquema I reforçado 2RHZE/4RHE) para retratamentos, Esquema II (2RHZ/7RH) para a forma meningoencefálica e Esquema III (3SZEet/9EEt) para falência. Tal padronização permaneceu em vigência até 2008 (BRASIL, 2011).

Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com seu Comitê Técnico Assessor, reviu o sistema de tratamento da tuberculose no Brasil. Baseado nos resultados preliminares do II Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos Antituberculose, que mostrou aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6,0%), introduz o etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema básico (BRASIL, 2011).

A apresentação farmacológica desse esquema passa a ser em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos (RHZE), nas seguintes dosagens: R: 150 mg; H: 75 mg; Z: 400 mg; E: 275 mg.

Essa recomendação e apresentação farmacológica são as preconizadas pela OMS e utilizadas para adultos e adolescentes na maioria dos países. Para crianças (abaixo de 10 anos), permanece a recomendação do Esquema RHZ.

Outras mudanças no sistema de tratamento da tuberculose são a extinção do Esquema I reforçado e do Esquema III. Para todos os casos de retratamento, será solicitada cultura, identificação e teste de sensibilidade, iniciando-se o tratamento com o Esquema básico até o resultado destes (BRASIL, 2010).

O Ministério da Saúde propôs um novo sistema de tratamento da doença a partir de 2009. Basicamente, esta são as mudanças:

1. Alteração das dosagens de pirazinamida e hidrazida.
2. Introdução de uma quarta droga, o etambutol, nos dois primeiros meses de tratamento.
3. Formulação das quatro drogas num único comprimido – a dose fixa combinada. Assim, os esquemas vigentes até agora (I, II e de retratamento) são substituídos pelo esquema básico e o esquema III deixa de ser utilizado.
4. Para a forma meningoencefálica da tuberculose em crianças, utilizar o esquema básico para crianças, prolongando-se a fase de manutenção (Brasil, 2011).

1.9 CLASSIFICAÇÃO DOS MEDICAMENTOS

Os medicamentos atualmente disponíveis para tratamento da tuberculose são classificados em cinco grupos:

- **Grupo 1:** Medicamentos orais de primeira linha: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Caracterizam-se por tolerância e eficácia, sendo mais bem utilizados a partir do histórico terapêutico do paciente e do teste de sensibilidade.
- **Grupo 2:** Medicamentos injetáveis: estreptomicina (1.^a linha), amicacina, canamicina e capreomicina (2.^a linha). Na MDR-TB, é obrigatória a utilização de um desses, sendo que a estreptomicina é o fármaco recomendado, devido ao baixo custo e alta eficácia.
- **Grupo 3:** Fluoroquinolonas, ofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina. Estes também participam obrigatoriamente do esquema terapêutico da MDR-TB. A levofloxacina e a moxifloxacina apresentam maior eficácia, porém, a ofloxacina tem menor custo que as demais drogas do Grupo 3.
- **Grupo 4:** Medicamentos orais de segunda linha: terizidona, etionamida e ácido paraminossalisílico. Também utilizados no regime terapêutico de tuberculose resistente.
- **Grupo 5:** Linezolida, amoxicilina/clavulanato, tiacetazona, imipenen, isoniazida em altas doses. Por apresentarem menor eficácia, não são recomendados para uso de rotina (BRASIL, 2010).

Na década de 1980, nos países desenvolvidos, acreditava-se na erradicação da tuberculose, o que levou a redução do interesse em pesquisas. No entanto, epidemias de tuberculose multirresistentes (TBMR) em portadores de HIV, ocorridas no início da década de 1990 nos Estados Unidos e Europa, reacenderam o interesse da comunidade científica internacional (ALLAND *et al.*, 1994). Publicações dessas epidemias levaram a OMS a declarar a tuberculose como “emergência global”, dando início em 1994 ao Projeto Global de Vigilância à Resistência às Drogas Antituberculose para se conhecer a prevalência da TBMR combinada (primária + adquirida) (PABLO *et al.*, 1998), identificando “regiões críticas”. O Brasil participou desse projeto e a prevalência de TBMR primária encontrada foi de apenas 0,9%, enquanto a de TBMR combinada foi de 1,3%, inferior a média mundial de 2,2% – achados que não enquadraram o país entre as áreas críticas (PABLO *et al.*, 1998).

A TBMR é um problema crescente em quase todo o mundo e se constitui em ameaça aos programas de controle da tuberculose, tendo-se em vista que os pacientes infectados com cepas resistentes a múltiplas drogas têm menor probabilidade de cura (GOBLE *et al.*, 1993). O conhecimento da resistência inicial a drogas é dificultado quando não se realiza o teste de sensibilidade para todos os casos diagnosticados, favorecendo com isso tratamentos inadequados e aumentando o período de disseminação de bacilos multirresistentes na comunidade (FAUSTINE, 2006; ESPINAL, 2001). O teste de sensibilidade, além de fornecer informações úteis para definição do esquema terapêutico individual, subsidia o planejamento das estratégias de tratamento em grande escala (CAMPOS, 1999).

A vigilância da resistência aos fármacos é um meio suplementar para avaliar o desempenho dos serviços no controle da tuberculose. Os níveis de prevalência estão relacionados com a qualidade do tratamento da tuberculose, tais como utilização de quimioterapia de curta duração, tratamento diretamente observado e taxa de sucesso de tratamento (RAVIGLIONE; ESPINAL, 2001).

A eficácia dos esquemas de primeira linha (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) está vinculada aos níveis de resistência primária. A resistência adquirida reflete a qualidade dos esquemas utilizados, e os níveis de resistência múltipla mostram a qualidade do sistema de saúde e a necessidade de esquemas de tratamento de reserva (BRASIL, 2008a).

Em Mato Grosso do Sul, o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-MS) realiza cultura para micobactérias e teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos desde 1995, rotina que vem sendo implementada ao longo dos anos, seja pelo atendimento das solicitações médicas, seja por iniciativa do laboratório em processar a cultura de espécimes de casos suspeitos de tuberculose entre grupos de risco (indígenas, detentos, infectados por HIV), mesmo que o pedido médico se limite à baciloscopia, pois a cultura pode incrementar o diagnóstico da tuberculose em até 30% nos casos de baciloscopia negativa (BRASIL, 2004b).

1.10 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

A distribuição de uma doença e as causas dessa distribuição na população humana podem ser avaliadas através de estudos de epidemiologia molecular utilizando métodos moleculares. As técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas para classificar um organismo e uma nova estratificação, de acordo com os agrupamentos estabelecidos, e também podem ser empregadas em análises epidemiológicas.

O método RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) associado à hibridização com sonda produzida a partir da sequência IS6110 (presente apenas em espécies do complexo *M. tuberculosis*, constitui uma ferramenta nova e promissora para o estudo epidemiológico da enfermidade (VAN EMBDEN et al., 1993). Esse método baseia-se na detecção e no polimorfismo do DNA gerado pela sequência IS6110, presente em diferentes números de cópias e integrado em vários sítios cromossômicos. O método consiste na digestão de DNA por uma endonuclease específica PvuII (derivada de *Proteus vulgaris*). A restrição por PvuII corta a sequência IS6110 em um único sítio. Como a localização do sítio-alvo para a enzima é constante, a distância entre esse sítio de restrição dentro da IS6110 e o próximo sítio é variável, formando fragmentos de tamanhos diferentes. Esses diferentes fragmentos de DNA obtidos são separados por eletroforese em gel-agarose e transferidos para uma membrana de náilon. Em seguida, é feita hibridização com sonda genética marcada que se liga às sequências IS6110 na proximidade do sítio de restrição da enzima. Dessa forma são produzidos padrões de bandas denominados RFLP, que funcionam como uma impressão digital do DNA das cepas de *M. tuberculosis* (FANDINHO; FONSECA, 1997).

A identificação de semelhanças e/ou diferenças entre cepas pertencentes a uma mesma espécie bacteriana é extremamente importante na epidemiologia dos agravos à saúde por elas causados.

Até o final da década de 1980, apenas a fagotipagem e a determinação do perfil de resistência aos agentes antimicrobianos permitiam a diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*. A fagotipagem, que tem como princípio a suscetibilidade das cepas à infecção por diferentes bacteriófagos, é um método trabalhoso e com baixo poder de diferenciação, visto que permite a identificação de um número reduzido de fagótipos. Como a grande maioria das cepas de *M. tuberculosis* é sensível a todos agentes antimicrobianos, a tipagem

por meio da determinação do perfil de resistência a esses agentes tem aplicação limitada às cepas com perfis inusitados (HOPEWELL; SMALL, 1996; SUFFYS *et al.*, 1997).

A aplicação de técnicas moleculares na diferenciação de cepas de *M. tuberculosis* só foi implementada no final da década de 1980 e início da de 1990, quando foram detectados e caracterizados elementos repetitivos no genoma de bactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (EISENACH *et al.*, 1988; HERMANS *et al.*, 1990; 1991; MCADAM *et al.*, 1990; THIERRY *et al.*, 1990a,b). Entre os diversos elementos repetitivos identificados, a sequência de inserção (*insertion sequence*, IS) denominada IS6110 e as sequências repetitivas DR (*direct repeat*) e PGRS (*polymorphic guanine-cytosine rich repetitive sequence*) foram qualificadas como marcadores para diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*. Essa diferenciação foi feita por meio de análise de polimorfismo no comprimento dos fragmentos obtidos após digestão com enzimas de restrição (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), pelo fato de estarem presentes no genoma em número e sítios variáveis (VAN SOOLIGEN *et al.*, 1993).

A IS6110, originalmente detectada em uma cepa de *M. tuberculosis*, consiste em uma sequência de 1355 pares de bases, sendo 28 desses pares idênticos, mas com sequência invertida em ambas as extremidades e sendo encontrada exclusivamente em cepas pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (THIERRY *et al.*, 1990b).

O método RFLP, resultante da combinação das técnicas Southern Blot e da hibridação com sondas construídas a partir da sequência de DNA IS6110 (RFLP-IS6110), tem sido o mais empregado para a caracterização molecular das cepas de *M. tuberculosis* (HOPEWELL; SMALL, 1996; SUFFYS *et al.*, 1997; COHN; O'BRIEN, 1998). Embora o polimorfismo detectado por esse método seja resultante da própria natureza móvel da IS6110, a mobilização desse elemento parece ser pouco frequente. Alterações no perfil de restrição não foram verificadas em diversas cepas de *M. tuberculosis* após o cultivo em meio líquido durante seis meses com subcultivos semanais ou em monocamadas de uma linhagem de macrófagos por quatro semanas (VAN SOOLIGEN *et al.*, 1990). A estabilidade do perfil determinado pela IS6110 durante a infecção humana foi demonstrada pela análise de cepas isoladas de um mesmo indivíduo em intervalo de seis meses a quatro anos e meio (OTAL *et al.*, 1991; VAN SOOLIGEN *et al.*, 1991; GODFREY-FAUSSET; STOKER, 1992; CHEVREL-DELLAGI *et al.*, 1993; VAN SOOLIGEN *et al.*, 1993; CAVE *et al.*, 1994; CHAVES *et al.*, 1996; STRÄSSLE *et al.*, 1997). Em geral, todas as cepas isoladas de um único paciente em diferentes

períodos apresentaram o mesmo perfil e, ocasionalmente, foram detectadas alterações no tamanho ou presença de um ou dois fragmentos.

A importância do método RFLP-IS6110 para a epidemiologia da tuberculose foi demonstrada pela primeira vez por Hermans *et al.* (1990). Esses pesquisadores estudaram 15 cepas de *M. tuberculosis* e verificaram que nove apresentavam perfil genético idêntico, havendo sido isoladas de pacientes atendidos por um médico especializado no tratamento de artrite, enquanto as seis cepas isoladas de pacientes sem nenhuma relação conhecida apresentavam perfis completamente distintos.

Posteriormente, diversos estudos demonstraram que as cepas isoladas durante surtos de tuberculose em comunidades fechadas apresentavam perfis de RFLP-IS6110 idênticos ou com diferenças restritas apenas ao tamanho e/ou presença de um ou dois fragmentos (DALEY, 1992; EDLIN *et al.*, 1992; BECK-SAGUÉ *et al.*, 1992; THIERRY *et al.*, 1993; CORONADO *et al.*, 1993; JEREB *et al.*, 1993; KENT *et al.*, 1994; WENGER *et al.*, 1995). Outros estudos mostraram que pacientes infectados por cepas que apresentavam perfis genéticos idênticos (cepas pertencentes a grupos genéticos) frequentemente tinham conexões epidemiológicas (MAZURECK *et al.*, 1991; GENEWEIN *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 1994; TABET *et al.*, 1994; KLINE *et al.*, 1995; TORREA *et al.*, 1995; SAFI *et al.*, 1997).

Small *et al.* (1994) realizaram estudo epidemiológico de base populacional realizado na cidade de San Francisco, Estados Unidos, no qual a análise por RFLP-IS6110 das cepas isoladas de todos os casos de tuberculose notificados de tuberculose com confirmação laboratorial, no período de um ano, revelou a existência de 326 perfis genéticos distintos entre 487 cepas analisadas. Em estudo semelhante realizado em um bairro da cidade de Nova York, Alland *et al.* (1994) detectaram também uma grande diversidade genética entre as cepas isoladas de 104 pacientes (77 perfis) e concluíram que parece ser pequena a probabilidade de ocorrência de perfis de RFLP-IS6110 idênticos entre cepas isoladas de pacientes não relacionados epidemiologicamente. Com base nesses achados e nos resultados obtidos nos surtos de tuberculose, foi possível inferir que casos de da doença associados a cepas de *M. tuberculosis* com perfis genéticos idênticos são decorrentes de transmissão recente do bacilo e que os casos de doença causada por cepas com perfil único resultam de reativação endógena de uma infecção latente adquirida no passado (SMALL *et al.*, 1994; ALLAND *et al.*, 1994).

Os dois estudos epidemiológicos de base populacional realizados nos Estados Unidos revelaram que a transmissão recente de apenas algumas cepas de *M. tuberculosis* entre subgrupos específicos da população é um fator importante no recrudescimento da tuberculose. Em San Francisco, foi verificado que pelo menos 31% dos casos da doença aparentemente ocorreram em razão de infecções exógenas recentes. O estudo também mostrou que entre os pacientes com menos de 60 anos de idade o diagnóstico de AIDS, a nacionalidade americana, a raça negra e a etnia hispânica eram fatores de risco independentes para a infecção por cepas pertencentes a grupos genéticos relacionados (SMALL *et al.*, 1994).

No estudo realizado em Nova York, aproximadamente 40% dos casos de tuberculose foram considerados como resultantes de infecção recente, e os fatores de risco identificados foram infecção por HIV, etnia hispânica combinada com a ausência de infecção por HIV, idade adulta jovem e infecção por cepa resistente a um ou mais agentes tuberculostáticos (ALLAND *et al.*, 1994).

A caracterização de cepas de *M. tuberculosis* pelo método de RFLP-IS6110 tem permitido um avanço na compreensão da dinâmica da transmissão da tuberculose, pois possibilitou:

1. a confirmação de cadeias de transmissão aventadas pelas investigações epidemiológicas clássicas (SMALL *et al.*, 1994; ALLAND *et al.*, 1994; BIFANI *et al.*, 1996);
2. a identificação de cadeias de transmissão que dificilmente seriam identificadas por investigações clássicas (SMALL *et al.*, 1994; ALLAND *et al.*, 1994; GOLUB *et al.*, 2001);
3. a detecção de transmissão em comunidades fechadas (BECK-SAGUÉ *et al.*, 1994; DROBNIIEWSKI, 2002);
4. o monitoramento de padrões de transmissão dentro e entre comunidades e regiões (HERMANS *et al.*, 1995, FERRAZOLI, 2003, TELLES, 2005);
5. a demonstração da progressão rápida da infecção para a doença em pacientes infectados por HIV (DALLEY *et al.*, 1992);
6. a diferenciação entre reativação endógena e reinfecção exógena (SMALL *et al.*, 1993; VAN RIE *et al.*, 1999).

Além disso, o método tem permitido a detecção de contaminação intralaboratorial (SMALL *et al.*, 1993; DUNLAP *et al.*, 1995; BAUER *et al.*, 1997; JASMER *et al.*, 2002, ALONSO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009).

De acordo com Cunha (2003), foram avaliadas 57 cepas de *M. tuberculosis*, das quais 52 pertenciam a indígenas e 5 a não-indígenas, constatando-se possível conexão epidemiológica entre cepas de indígenas e não-indígenas, já que foi detectado *cluster* em pelo menos dois pacientes, sendo um *cluster* entre paciente indígena e profissional de saúde e outro entre indígena da aldeia Bororo e indígena do Paraguai residente na comunidade Bororo. Os achados foram também comparados aos perfis de pacientes de 500 pacientes de São Paulo, isolados no Instituto Adolfo Lutz, com semelhança somente em dois perfis. Com a finalidade de conhecer se houve transmissão recente entre indígenas e não-indígenas e se existe um perfil com características próprias circulante na região, foi proposto o presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Conhecer o genótipo do *Mycobacterium tuberculosis* do estado de Mato Grosso do Sul empregando-se a técnica de biologia molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conhecer quais são os genótipos predominantes de *M. tuberculosis* em Mato Grosso do Sul.
2. Comparar os genótipos do *M. tuberculosis* da população não-indígena com os da população indígena do estado.
3. Contribuir com o Programa Estadual de Controle da Tuberculose, estabelecendo a conexão epidemiológica entre os genótipos analisados.
4. Conhecer o genótipo da população carcerária e estabelecer conexão epidemiológica.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo epidemiológico descritivo foi realizado em duas fases:

- 1.^a fase: Coleta no LACEN-MS de informações secundárias dos exames e de testes de sensibilidade de pacientes notificados no SINAN nos anos de 2000 a 2008.
- 2.^a fase: Processamento das amostras a partir de cepas congeladas em meio de Salton com a finalidade aplicar a técnica de biologia molecular. O critério de escolha foi aleatório, obtendo-se 4 amostras do ano de 2002, 34 de 2003, 20 de 2004 e 16 de 2011 (Anexo A).
- 3.^a fase: Utilização do banco de dados com dendrograma dos genótipos analisados, referentes ao ano de 1999, 2000 e 2001 (CUNHA, 2003) e comparação com banco de dados obtidos na 2.^a fase.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo:

- Casos de tuberculose, independentemente da forma (pulmonar ou extrapulmonar), registrados no banco de dados do LACEN-MS no período de 2000 a 2008, para avaliação dos testes de sensibilidade as drogas antituberculose.
- Pacientes residentes nos municípios de Mato Grosso do Sul e registrados no SINAN-MS, bem como o perfil clínico dos casos com MDR-TB registrados no LACEN-MS armazenados no programa Excel.
- Pacientes dos anos de 2002 (4), 2003 (34), 2004 (20) e 2011 (16), para se conhecer o genótipo através da técnica RFLP (Anexo A).
- Banco de dados com dendrograma dos genótipos realizados de isolados de 1999, 2000 e 2001 (75 pacientes), (Anexo A).

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo pacientes:

- pacientes com agravos associadas à tuberculose;
- casos de duplicidade, sendo o segundo registro (mais atual) excluído do SINAN;
- casos não notificados no SINAN;
- casos em que não foram realizados testes de sensibilidade a drogas antituberculose;
- casos com ausência de informações nas bases de dados.

3.4 COLETA DE INFORMAÇÕES

Foram coletadas informações secundárias de casos de tuberculose notificados na base de dados do SINAN-MS e suas variáveis constantes na ficha de investigação, complementando-se com acesso ao banco de dados do LACEN-MS, onde foi avaliado o perfil clínico, ou seja, dados de casos de tuberculose com teste para *M. tuberculosis* e realização do teste de sensibilidade em pacientes registrados no período de 2000 a 2008.

A seleção inicial foi feita consultando-se no banco de dados do LACEN-MS os casos do período de 2000 a 2008, excluindo-se aqueles que não constavam no SINAN, aqueles em que a informação sobre o teste de sensibilidade estava em branco, os pacientes com nomes duvidosos quando comparados os dois sistemas e também os diagnosticados por outras micobactérias não-tuberculose (MNT). Essas informações foram organizadas por ano, abrangendo notificações referentes ao período 2000-2010, selecionado-se os anos de 2000 a 2008 para confrontar a base de dados do SINAN-MS com a do LACEN-MS e para seleção dos casos comuns aos dois sistemas.

Para avaliação da resistência, os casos foram classificados de acordo com critérios da OMS, sendo considerado tuberculose-resistentes aqueles com resistência a uma ou mais drogas e como MDR-TB aqueles com resistência simultânea a R e a H.

Pesquisaram-se no SINAN-MS as seguintes variáveis constantes na ficha de investigação de tuberculose: idade, sexo, tipo de entrada, forma clínica e encerramento.

Também foram pesquisadas as duplicidades, sendo o registro mais atual excluído da contagem.

3.5 ANÁLISE DE INFORMAÇÕES

As informações foram analisadas a partir dos registros em tabelas Excel, elaborando-se uma planilha contendo as variáveis e os resultados obtidos a partir da análise das fichas. Os resultados foram comparados com a literatura. Posteriormente, utilizou-se o programa Epi Info para avaliar as informações, permitindo geração de estatística.

3.6 PACIENTES ENVOLVIDOS NA PESQUISA

Pacientes notificados com tuberculose pulmonar e extrapulmonar notificados no SINAN e casos comuns de MDR-TB constantes no banco de informação do LACEN-MS e SINAN do estado de Mato Grosso do Sul.

3.7 DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Declarou-se não haver conflitos de interesse da parte dos pesquisadores para o progresso dessa pesquisa.

3.8 ANÁLISE CRÍTICA DOS RISCOS E BENEFÍCIOS

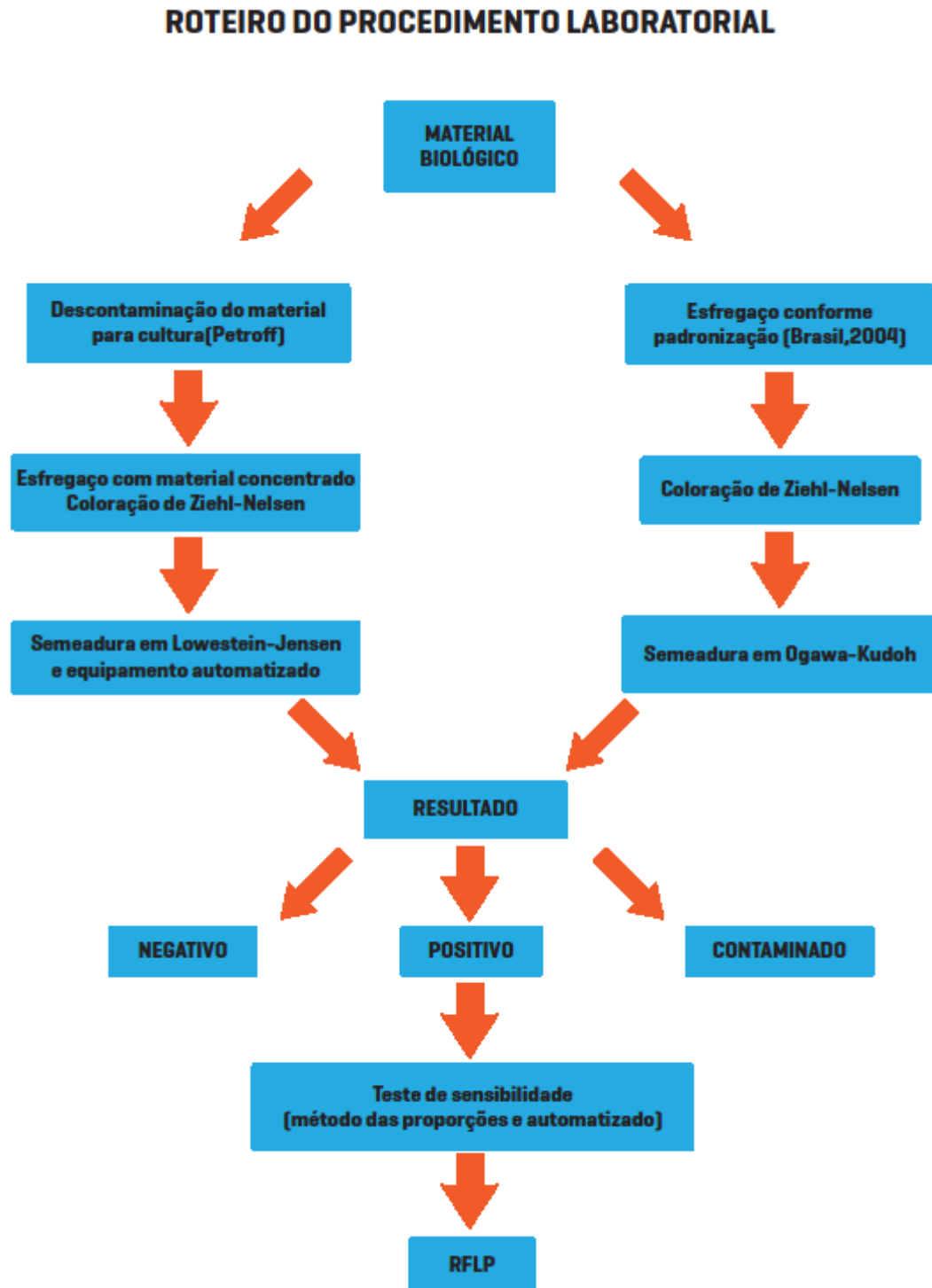
A pesquisa inicial, que não significou riscos à saúde a nenhum pesquisador, teve como propósito delinear o perfil epidemiológico dos municípios através de análise estatística sobre casos de tuberculose multirresistente ocorridos de 2000 a 2008.

Em uma segunda etapa, foram utilizadas cepas bacterianas para extração de DNA, partindo de amostras congeladas a -20°C conservadas em meio de Salton e posteriormente repicadas para reativação de crescimento, sempre atendendo às normas de biossegurança do LACEN-MS.

3.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo utiliza informações secundárias, respeitando-se a confidencialidade e o anonimato dos sujeitos notificados nos sistemas de informação de agravos de notificação e no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul. A pesquisa foi registrada e aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob número 890/07 e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob número 14 138.

3.10 Roteiro do procedimento laboratorial



3.11 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TUBERCULOSE REALIZADO NO LACEN-MS

O processo de descontaminação para posterior semeadura em meio de Löwenstein–Jensen foi pelo método de Petroff. Após o procedimento, com uma parte da amostra concentrada procedeu-se a esfregaço e coloração pelo método de Ziehl–Neelsen para realização de baciloscopia (BRASIL, 1994; BRASIL, 2001; OMS, 1998), e outra parte foi semeada em meio de Lowestein–Jensen (BRASIL, 1994; OMS, 1998). A técnica foi utilizada para materiais oriundos de hospitais e unidades de saúde.

3.12 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM ÁREAS INDÍGENAS E FRONTEIRAS

A baciloscopia foi realizada pelo método de Ziehl–Neelsen (BRASIL, 1994; BRASIL, 2001; OMS, 1998) no laboratório do Hospital e Maternidade Porta da Esperança, que é referência para população indígena no município de Dourados, bem como a semeadura dos espécimes clínicos, utilizando-se meio de Ogawa–Kudoh, em *kits* fornecidos pelo LACEN-MS, a partir de 1999. O crescimento e a liberação dos resultados das culturas foram realizados na Seção de Micobacteriologia do LACEN-MS. Em 2006 foi descentralizada a metodologia para Amambai, na Casa do Índio, e em 2007 para Ponta Porã e Corumbá.

O isolamento de micobactérias foi feito pelo método do *swab*, com semeadura em meio de cultura Ogawa–Kudoh (CARMO, 2002; SUSEMICH, 1993; VARGAS, 1987; COELHO, 1999). Inicialmente os espécimes foram submetidos a descontaminação, de acordo com a técnica de Ogawa–Kudoh, que consiste no tratamento do espécime clínico com solução de hidróxido de sódio a 4% por 2 min. Após a descontaminação, as preparações foram inoculadas em meio de Ogawa–Kudoh (item 3.8.2, neste capítulo) e incubadas a 37 °C em estufa por um período de 60 dias nos casos negativos.

Os casos positivos foram liberados conforme seu crescimento, procedendo-se quando necessário a identificação no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, e atualmente no Centro de Referência Prof. Hélio Fraga.

3.13 CONTROLE DE QUALIDADE DAS BACILOSCOPIAS

As baciloscopias realizadas nos municípios foram encaminhadas ao LACEN-MS, onde foram submetidas a controle de qualidade segundo recomendações do Ministério da Saúde. O controle de qualidade consiste na releitura das lâminas e na avaliação da qualidade dos esfregaços e coloração (BRASIL, 2004a; BRASIL, 2008b).

3.14 ISOLAMENTO DAS CEPAS BACTERIANAS

As cepas de *M. tuberculosis* foram isoladas de espécimes clínicos, sendo a maioria de escarro.

3.15 CEPAS DE REFERÊNCIA

As cepas de referência de *M. tuberculosis* foram H37Rv-ATCC 27294 e Mt 14323 (VAN EMBDEN *et al.*, 1993), respectivamente empregadas nos testes de sensibilidade às drogas e no método RFLP-IS6110.

3.16 CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *M. TUBERCULOSIS* QUANTO À SUSCETIBILIDADE ÀS DROGAS

As amostras que apresentaram crescimento de *M. tuberculosis* foram avaliadas quanto à suscetibilidade às drogas que compõem os esquemas de tratamento recomendados pelo PNCT-MS. As drogas utilizadas foram isoniazida (H), rifampicina (R), estreptomicina (S) e etambutol (E), sendo para esta avaliação empregado o método das proporções (BRASIL, 1994, 2008), que consiste na inoculação de cepas de *M. tuberculosis* em meios de Löwenstein–Jensen com e sem as drogas, utilizando-se uma concentração crítica e fazendo-se comparações entre os números de colônias obtidas em cada meio. A partir de 2003, com aquisição do equipamento automatizado em comodato, têm sido realizados em meio líquido em equipamento automatizado MGIT960.

3.17 CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *M. TUBERCULOSIS* QUANTO AO PERFIL GENÉTICO PELO MÉTODO RFLP-IS6610

As cepas de *M. tuberculosis* foram submetidas ao método RFLP-IS6110, de acordo com as recomendações propostas por van Embden *et al.* (1993). O procedimento foi realizado no Núcleo de Tuberculose e Micobacteriose do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo.

3.18 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

3.18.1 Preparo do DNA bacteriano (VAN EMBDEN *et al.*, 1993)

Extração e purificação

Uma porção da cultura (aproximadamente 40 mg, peso úmido) de cada uma das cepas de *M. tuberculosis* isoladas e da cepa de referência Mt 14323 foi transferida com auxílio de uma alça descartável a um tubo tipo Eppendorf contendo 500 µL de água ultrapura esterilizada e incubada em banho-maria a 80 °C por 20 min. Após centrifugação a 12 000 rpm por 1 min em microcentrífuga (Fisher Scientific, Springfield, NJ, EUA), os sedimentos foram suspensos em 500 µL de solução-tampão TE (item 3.23.3), acrescidos de 50 µL da solução de lisozima (item 3.23.4) e incubados a 37 °C por 18 h. Um volume de 6 µL da solução de proteinase K (item 3.23.5) e um de 70 µL da solução de DSS (item 3.23.6) foram adicionados e as preparações foram incubadas em banho-maria a 65 °C por 10 min. Em seguida, foram adicionadas 100 µL de uma solução de NaCl 5M e 80 µL de solução CTAB-NaCl (item 3.23.7) previamente aquecida. As preparações foram novamente incubadas em banho-maria a 65 °C por 10 min. Posteriormente, foram adicionados 700 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1 e as preparações foram centrifugadas a 12 000 rpm por 20 min. A fase superior de cada preparação foi transferida para tubos do tipo Eppendorf esterilizados contendo 450 µL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada delicadamente e, após precipitação do DNA a -20 °C por 18 h, os tubos foram submetidos a centrifugação a 12 000 rpm por 20 min a 4 °C. Os sedimentos foram lavados com etanol a

70% (previamente mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período mínimo de 18 h) e submetidos a centrifugação a 12 000 rpm por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após secagem à temperatura ambiente, os sedimentos foram suspensos em 30 mL de solução-tampão TE (item 3.23.3), mantidos sob refrigeração por 2 h e, em seguida, armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para verificar a integridade do DNA obtido, 1 μL de cada preparação foi diluído em 10 μL de solução-tampão TE (item 3.23.2), acrescido de 4 μL da solução de arraste (item 3.23.9) e submetido a eletroforese em gel de agarose (Kodak Eastman, Rochester, NY, EUA) a 1,0% em solução-tampão TAE (item 3.23.8) diluída 50 vezes. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Sigma) a 50 V (fonte EPS 200, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) até a introdução do material no gel e, posteriormente, a 100 V por 40 min. Após esse período, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (item 3.23.10) por 10 min e examinado sob fonte de luz ultravioleta de 254 nm (Pharmacia Biotech).

Quantificação e digestão

Para determinar a concentração de DNA, 2 μL das preparações purificadas (item 3.18.1) foram diluídos em 200 μL de solução-tampão TE (item 3.23.3) e submetidos a leitura da absorbância em espectrofotômetro específico (Gene-Quant II, Pharmacia Biotech). Aproximadamente 3 μL de DNA de cada preparação foram transferidos para tubos tipo Eppendorf esterilizados, sendo-lhes adicionadas 5 unidades (U) da enzima de restrição *PvuII*, 2 μL da solução-tampão específica (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl_2 20 mM, DTT 1 mM, pH 7,9; New England-Biolabs, Beverly, MA, EUA) e um volume de água purificada esterilizada para completar o volume final de 20 μL . Os tubos foram incubados em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h.

Separação e transferência à membrana

À mistura de DNA e enzima (preparada como descrito no item 3.23.4) foram acrescentados 6 μL da solução de arraste (item 3.23.9) e a mistura resultante foi aplicada nos orifícios de gel de agarose (20 cm $\times$ 20 cm) a 1% em solução-tampão TAE (item 3.23.8) diluída 50 vezes. Em cada gel foi incluído o DNA da cepa de referência Mt 14323 em ambas

as posições laterais. A separação por eletroforese foi realizada a 30 V durante 17 h e a temperatura ambiente. A coloração do gel, a visualização do DNA e o registro fotográfico foram realizados como descrito no item 3.23.10.

Os procedimentos para despurinização, desnaturação, neutralização e transferência dos fragmentos de DNA separados no gel de agarose para as membranas de náilon foram realizados sob pressão de 50 mbar, utilizando-se equipamento VacuGene XL VacuumBlotting System (Pharmacia Biotech). Cada gel foi colocado sobre uma membrana de náilon (Genebrind 45, Pharmacia Biotech) previamente tratada com solução SSC 20× (item 3.23.11) por 20 min e coberto com 20 mL das seguintes soluções: a) solução de despurinização (item 3.8.12) por 7 min; b) solução desnaturante (item 3.23.13) por 7 min; c) solução neutralizante (item 3.23.14) por 7 min; d) solução SSC 20× (item 3.23.11) por 30 min. Em seguida, as membranas foram lavadas rapidamente em solução SSC (item 3.23.11) diluída dez vezes e mantidas a 37 °C por 30 min para secagem. Para a fixação dos fragmentos de DNA, as membranas foram expostas a 120 000 µJ de radiação ultravioleta (Stratalinker UV crosslinker, modelo 1800, Stratagene, La Jolla, CA, EUA) por aproximadamente 20 s.

3.18.2 Preparo da sonda genética

Amplificação do DNA

O DNA utilizado como sonda consiste em uma seqüência de 245 pares de bases (pb) do elemento de inserção *IS6110* (desenho esquemático abaixo) e foi preparado por reação em cadeia de polimerase (PCR) com utilização dos oligonucleotídeos iniciadores INSI (5' CGT GAG GGC ATC GAG OTG GC) e INS2 (5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA) (VAN EMBDEN *et al.*, 1993).

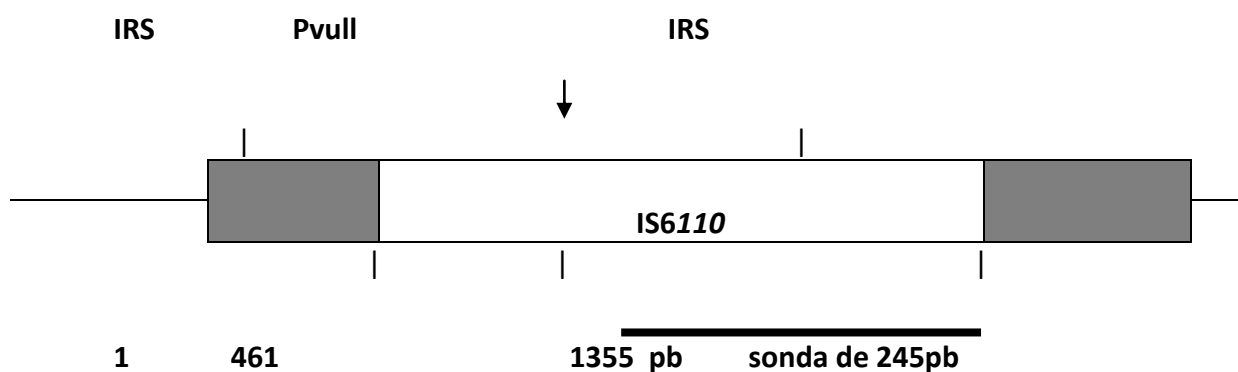


Figura 9. Esquema da IS6110, representando a região utilizada como molde para síntese da sonda de DNA, localizada à direita do sítio de restrição da enzima PvuII.

IRS = sequência repetida invertida de 28 pb.

Fonte: van Embden *et al.* (1993).

Uma pequena porção da cultura da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv em meio de Löwenstein–Jensen (item 3.18.1) foi transferida para um tubo do tipo Eppendorf contendo 500 µL de água ultrapura esterilizada fervida por 10 min, congelada a –20 °C e descongelada no momento da reação. Um volume de 5 mL dessa preparação foi adicionado a 11 tubos com capacidade de 200 µL mantidos em banho de gelo em uma câmara de fluxo laminar, contendo os seguintes reagentes (Pharmacia Biotech) para PCR: solução-tampão (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), MgCl₂ 1 mM, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (INS1 e INS2), 1,0 U de *taq* DNA-polimerase e água ultrapura esterilizada para completar o volume de 50 µL. Em um tubo, em lugar da preparação de DNA da cepa de referência, foram colocados 5 µL de água ultrapura esterilizada como controle negativo da reação.

Os tubos foram transferidos para um termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA) e aquecidos a 94 °C por 10 min para a desnaturação do DNA e submetidos por 2 min a 56 °C (hibridação) e 1 min a 72 °C (extensão). Um volume de 10 µL da preparação foi submetido a eletroforese em gel de agarose, como descrito no item 3.18.1. Como padrão de tamanho molecular, foi adotado o marcador de DNA "Ladder" de 100 pb (Pharmacia Biotech). A coloração, a visualização e a documentação do produto amplificado foram efetuadas como descrito no item 3.18.2. O fragmento amplificado foi considerado

correto quando uma banda de 245 pb foi observada contra o marcador de DNA "Ladder" 100 pb.

Purificação e marcação da sonda de DNA

Um volume de 500 µL do material amplificado (item 3.18.2) foi acrescido de 50 µL de solução esterilizada de acetato de sódio (3 M, pH 5,2) e 1,1 mL de etanol previamente refrigerado a -20°C , sendo a mistura mantida a -20°C por 18 h. Após a centrifugação a 12 000 rpm por 20 min em microcentrífuga (Fisher Scientific), o sedimento foi lavado com etanol 70% refrigerado, mantido à temperatura ambiente até a completa secagem e suspenso em 500 µL de solução-tampão TE (item 3.23.3). Para a marcação com digoxigenina (DIG) 11-dUTP (Genius DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer, Mannheim, Alemanha), aproximadamente 1 µg da sonda de DNA, cuja concentração foi determinada como descrito no item 3.6.1.2, foi desnaturado por fervura por 10 min e resfriamento rápido em banho de gelo. A seguir foram adicionados os seguintes reagentes: 2 µL da mistura de hexanucleotídeo, 2 µL da mistura de desoxirribonucleotídeo, 1 µL do reagente contendo o fragmento Klenow da DNA polimerase I (Genius DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim) e água ultrapura esterilizada para completar o volume a 20 µL. Após incubação do tubo em banho-maria a 37°C por 19 h, foram adicionados 2,5 µL de uma solução de LiCl_2 4 M e 75 µL de etanol 95% refrigerado, e a preparação foi mantida a -20°C por 18 h. O sedimento obtido por centrifugação a 12 000 rpm por 20 min foi então lavado com etanol 70% refrigerado, mantido à temperatura ambiente para secagem, suspenso em 50 µL de solução-tampão TE (item 3.23.3) e armazenado a -20°C .

Quantificação da sonda de DNA marcada

Para a determinação da concentração da sonda de DNA marcada, as preparações obtidas como descrito no item 3.18.2 foram diluídas em série (razão 10) em solução-tampão específica (Genius DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer, Mannheim), e 1 µL de cada diluição foi aplicado a uma membrana de náilon (Pharmacia Biotech). Após fixação do DNA, como descrito no item 3.18.1, a membrana foi colocada em uma placa de Petri, umedecida

com solução-tampão (item 3.23.15) e imersa em 10 mL da solução-tampão 2 (item 3.23.21) por 5 min. O anticorpo contra DIG (DIG DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim) conjugado a fosfatase alcalina, diluído a 1:5 000 em solução-tampão 2 (item 3.8.21), foi adicionado e, depois de 5 min, retirado com a realização de duas lavagens consecutivas da membrana com solução-tampão 1 (item 3.23.15) por 5 min. A solução-tampão 3 (item 3.23.22) foi adicionada e retirada após 2 min. A revelação da reação antígeno-anticorpo foi realizada pela adição de 10 mL da solução de revelação (item 3.23.25). A membrana foi mantida ao abrigo da luz e examinada periodicamente quanto ao aparecimento de cor. Após secagem da membrana, foi feita leitura da concentração do DNA em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, em equipamento adequado.

3.18.3 Hibridação do DNA bacteriano com a sonda de DNA marcada

As membranas contendo os fragmentos de DNA, preparadas como descrito no item 3.7.1.3, foram envoltas em uma tela de náilon e colocadas em tubos de vidro específicos, com a face contendo DNA voltada para cima. Depois de umidificadas por 2 min com a solução SSC (item 3.7.12) diluída 10 vezes, as membranas foram incubadas com 10 mL da solução de hibridação (item 3.7.19) a 42 °C por 1 h em forno de hibridação (WTC-Binder, Alemanha). A solução foi retirada e foram adicionados 10 mL da solução de hibridação, contendo aproximadamente 15 ng da sonda de DNA marcada, previamente desnaturada (100 °C por 10 min e resfriamento em banho de gelo por 5 min). Após hibridação a 42 °C por um período de 16 a 18 h, as membranas foram lavadas quatro vezes. As duas primeiras lavagens foram realizadas com 50 mL de solução-tampão A (item 3.23.19) à temperatura ambiente por 5 min, e as demais lavagens com 50 mL de solução-tampão B (item 3.23.20) a 68 °C por 15 min. Após o tratamento com 50 mL da solução-tampão I (item 3.23.15) por 3 min, as membranas foram mantidas em 80 mL da solução-tampão 2 (item 3.23.21) à temperatura ambiente por 30 min. Essa solução foi substituída por 20 mL da solução-tampão 2 (item 3.23.21), contendo 4 μL do anticorpo contra DIG conjugado a fosfatase alcalina. Após incubação à temperatura ambiente por 30 min, as membranas foram submetidas a duas lavagens em 50 mL de solução-tampão 1 (item 3.23.15) à temperatura ambiente por 15 min, retiradas do tubo de vidro e colocadas em um recipiente de vidro pirex contendo 20 mL de solução-tampão 3 (item 3.23.22) por 3 min. Após revelação

colorimétrica realizada como descrito no item 3.18.1, as membranas foram mantidas a 37 °C para secagem e armazenadas ao abrigo de luz.

3.19 ANÁLISE DOS PERFIS GENÉTICOS DAS CEPAS

O perfil genético de cada cepa de *M. tuberculosis* foi analisado visualmente e com o auxílio do programa de computação GelCompar II, versão 2.5, para Windows (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). A análise com esse programa foi feita com base na cópia das membranas obtidas por equipamento específico programado para 75 DPI (*scanner*, Sharp, Mahwah, NJ, EUA) e, após alinhamento dos fragmentos de DNA das preparações-teste com os da preparação da cepa de referência Mt 14323 (PM = 14.4, 7.2, 7.0, 4.4, 3.6, 3.0, 2.3, 2.0, 1.8, 1.5, 1.4, 1.0 kb), aplicados em ambas as posições laterais de cada gel.

O número de cópias de IS6110 foi determinado de acordo com o número de fragmentos de DNA hibridados com a respectiva sonda e visualizados em forma de banda compacta na membrana de náilon. Para cada banda visualizada, considerou-se uma cópia de IS6110.

A comparação dos perfis genéticos, designados aleatoriamente por letras, resultou na classificação das cepas em pertencentes ou não a um grupo genético. Cepas que apresentavam bandas de DNA idênticas em número e peso molecular, consideradas portanto de mesmo perfil genético, foram classificadas como pertencentes a um determinado grupo genético.

Os perfis genéticos que diferiram apenas em uma ou duas bandas foram considerados como pertencentes a uma família de grupos genéticos. Cepas com perfil genético único foram caracterizadas como não-pertencentes a um grupo genético.

Para a construção do dendrograma e para a obtenção de um alinhamento perfeito dos fragmentos de DNA hibridados, em cada gel, foram incluídas três amostras de DNA da cepa de referência Mt 14323, sendo duas posições laterais e uma central. Os perfis genéticos foram comparados com base no peso molecular e no número de cópias de fragmentos hibridados com a sonda IS6110 pelo método UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Dice e seguindo-se as instruções do manual de Programa GelCompar II, versão 2.0 (Applied Maths).

3.20 ANÁLISE DOS DADOS

A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa de computação Epi-Info, versão 6.04b.

3.21 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Exceto quando especificado, os reagentes utilizados foram das marcas Sigma (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA), Merck (Merck, Rio de Janeiro), Synth (Labsynth, Diadema, SP) ou Boehringer-Mannheim (Boehringer Mannheim Biochemicals, Alemanha). Todos os sais empregados apresentavam especificação para análise.

3.21.1 Meio de Löwenstein–Jensen

Fosfato monopotássico anidro	0,4 g
Citrato de magnésio	0,1 g
Sulfato de magnésio	0,04 g
Asparagina	0,6 g
Glicerina bidestilada	2,0 mL
Ovos homogeneizados	167,0 mL
Solução de verde-malaquita	3,3 mL
Água destilada	100,0 mL

O aminoácido e os sais foram dissolvidos em água destilada e a solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C por 15 min. Os ovos de galinha previamente desinfetados com álcool 70% por 30 min foram homogeneizados em liquidificador e adicionados à solução esterilizada. Em seguida, acrescentou-se a solução de verde-malaquita. Para a coagulação, aproximadamente 6 mL do meio foram distribuídos em tubos 18 mm × 160 mm e incubados em posição inclinada a 85 °C por 1 h. Feito o controle de esterilidade do meio, foram armazenados à temperatura ambiente (BRASIL, 1994).

3.21.2 Meio de Ogawa–Kudoh

Fosfato monopotássico anidro	2,0 g
Citrato de magnésio	0,1 g
Glutamato de sódio	0,5 g
Glicerina bidestilada	4,0 mL
Ovos homogeneizados	200,0 mL
Solução de verde-malaquita 2%	4,0 mL
Água destilada	100,0 mL

Os sais foram dissolvidos em água destilada e a solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C por 25 min. Os ovos de galinha, previamente desinfetados com álcool 70% por 30 min, foram homogeneizados em liquidificador e adicionados à solução esterilizada. Em seguida, acrescentou-se a solução de verde-malaquita. Para coagulação, aproximadamente 6 mL de meio foram distribuídos em tubos (18 mm × 160 mm) e incubados em posição inclinada a 85 °C por 1 h. Feito o controle de esterilidade do meio, foram armazenados à temperatura ambiente (SUSEMACHI *et al.*, 1993).

3.21.3 Solução-tampão tris- EDTA (TE)

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris base)	10 mM
Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético (Na ₂ EDTA)	1mM

Após a dissolução dos sais em água destilada, o pH da solução foi ajustado a 8,0. Em seguida, a solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C por 15 min e armazenada a temperatura ambiente.

3.21.4 Solução de lisozima

Lisozima	10 mg
Água ultrapura esterilizada	1 mL

A enzima foi dissolvida em água ultrapura esterilizada obtida de sistema Milli Q de purificação (Millipore). A solução foi distribuída em tubos Eppendorf e armazenada a -20°C .

3.21.5 Solução de proteinase K

Proteinase K	10 mg
Água ultrapura esterilizada	1 mL

Após completa dissolução da enzima, a solução foi distribuída em tubos tipo Eppendorf e armazenada a -20°C .

3.21.6 Solução de dodecil-sulfato de sódio (DSS)

DSS	10 g
Água destilada esterilizada	100 mL

O DSS foi dissolvido em água destilada esterilizada, sendo a solução armazenada à temperatura ambiente.

3.21.7 Solução CTAB-NaCl

Hexadeciltrimetil brometo de amônio (CTAB)	10%
Cloreto de sódio (NaCl)	0,7 M

Adicionou-se CTAB à solução de NaCl e a mistura foi aquecida a 65 °C, até completa dissolução. A solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C por 15 min e armazenada à temperatura ambiente.

3.21.8 Solução-tampão tris-acetato EDTA (TAE), 50 vezes

Tris-base	0,004 M
Na ₂ EDTA	0,002 M
Ácido acético glacial	0,02 M

Após dissolução dos sais em água destilada, acrescentou-se o ácido acético glacial e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.21.9 Solução de arraste

Ficoll 400	20%
Azul de bromofenol	0,07%
DSS	7,0%

Após dissolução de Ficoll 400 e DSS em água destilada esterilizada, adicionou-se azul de bromofenol e a solução foi armazenada a -20 °C. A solução de uso foi preparada misturando-se 1,8 mL desta solução com 300 mL da solução-tampão TAE 50 vezes (item 3.8.8).

3.21.10 Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio	50 mg
Água destilada esterilizada	10 mL

O brometo de etídio foi diluído em água destilada e a solução foi armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente. No momento de uso, duas a três gotas dessa solução foram diluídas em 2 L de água destilada.

3.21.11 Solução salina com citrato (SSC), 20 vezes

NaCl	3,0 M
Citrato trissódico	0,3 M

Os sais foram dissolvidos em água destilada, o pH foi ajustado para 7,0 com ácido cítrico e o volume da solução foi completado a 1000 mL. A solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C durante 15 min e armazenada à temperatura ambiente.

3.21.12 Solução de despurinização (HCl 0,25 M)

O ácido foi adicionado cuidadosamente à água e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.21.13 Solução desnaturante

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Os sais foram dissolvidos em água destilada e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.21.14 Solução neutralizante

NaCl	1,5 M
Tris-base	0,5 M
Na ₂ EDTA	0,001 M

Após dissolução dos sais em água destilada, o pH foi ajustado para 7,0 com HCl 4N. A solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C durante 15 min e armazenada à temperatura ambiente.

3.21.15 Solução-tampão 1

Ácido maleico	100 mM
NaCl	150 mM

Após a dissolução dos sais em água destilada, o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH. A solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C durante 15 min e armazenada à temperatura ambiente.

3.21.16 Solução bloqueadora

Reagente bloqueador	10 g
Solução-tampão 1 (item 3.8.16)	100 mL

O reagente bloqueador (Genius DNA Labeling and Detection Kit, Boehringer-Mannheim) foi adicionado à solução-tampão 1 e dissolvido a 65 °C. A solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C durante 15 min e armazenada a 4 °C.

3.21.17 Solução de N-lauroilsarcosina 10%

N-lauroilsarcosina	10 g
Água destilada esterilizada	100 mL

A N-lauroilsarcosina foi dissolvida em água destilada esterilizada, e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.21.18 Solução de hibridação

Formamida	10 mL
Solução SSC (item 3.8.12)	5 mL
Solução bloqueadora (item 3.8.16)	4 mL
Solução de N-lauroilsarcosina 10% (item 3.8.17)	0,2 mL
Solução de DSS (item 3.8.6)	0,04 mL

Os componentes foram misturados no momento do uso.

3.21.19 Solução A

Solução SSC, 2×	1000 mL
Solução de DSS (item 3.8.6)	10 mL

A solução SSC (item 3.7.12) foi diluída 10 vezes em água destilada e acrescida da solução de DSS. A solução resultante foi armazenada à temperatura ambiente.

3.21.20 Solução B

Solução de SSC, 0,5×	1000 mL
Solução de DSS (item 3.8.6)	10 mL

A solução SSC (item 3.7.12) foi diluída 40 vezes em água destilada e acrescida da solução de DSS. A solução resultante foi armazenada à temperatura ambiente.

3.21.21 Solução-tampão 2

Solução-tampão 1 (item 3.8.15)	90 mL
Solução bloqueadora (item 3.8.1)	10 mL

As soluções foram misturadas no momento do uso.

3.21.22 Solução-tampão 3

Tris base	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM

Os dois primeiros sais foram dissolvidos em 900 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado a 9,5 com HCl 4N e, após adição de MgCl₂, o volume da solução foi completado a 1000 mL. A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poros de 0,45 µm (Milipore) e armazenada à temperatura ambiente.

3.21.23 Solução de nitro-blue-tetrazolium (NBT)

NBT	0,5 g
Dimetilformamida 70%	10,0 mL

Dissolveu-se NBT em dimetilformamida 70% e a solução foi armazenada a -20°C .

3.21.24 Solução de 5-bromo-5-cloro-3-indoilo-fostato (BCIP)

BCIP	0,5 g
Dimetilformamida	10,0 mL

Dissolveu-se BCIP em dimetilformamida e a solução foi armazenada a -20°C .

3.21.25 Solução de revelação

Solução de NBT (item 3.8.24)	45 μL
Solução BCIP (item 3.8.25)	35 μL
Tampão 3 (item 3.8.23)	10,0 mL

A solução foi preparada no momento do uso.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 31 034 culturas para diagnóstico de tuberculose no período de 2000 a 2008, com positividade em 3 304 amostras (10,64%); 27 730 foram negativas ou estavam contaminadas (89,36%). Do total de culturas, 7 660 foram realizadas na população indígena. Do total de culturas, foram avaliadas 1 319 culturas positivas com testes de sensibilidade às drogas antituberculose.

4.1 IMPLEMENTAÇÃO DA ROTINA

De 2000 a 2008, foram notificados no SINAN 9 319 casos, 1 319 dos quais apresentaram cultura positiva para *M. tuberculosis* e foram submetidos ao teste de sensibilidade às quatro drogas, representando 14,2%. A evolução dessa rotina foi crescente, passando de 3,7% em 2000 para 25,5% em 2008 (Figura 10).

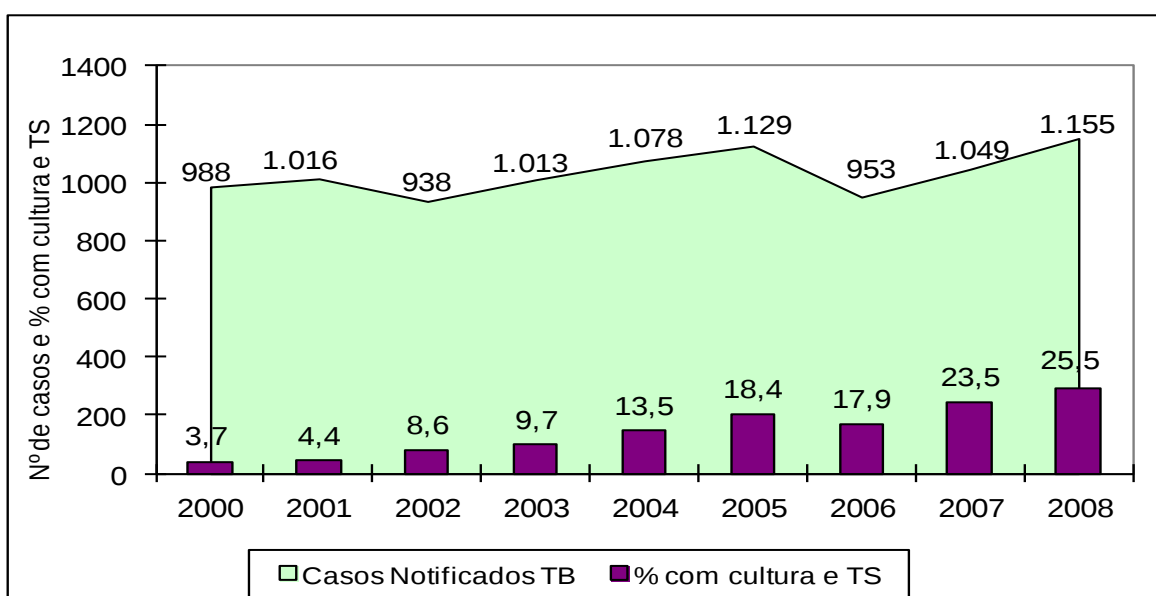


Figura 10. Evolução percentual de casos de tuberculose com cultura e teste de sensibilidade a drogas. Mato Grosso do Sul, 2000-2008.

Fonte: PECT-SES-LACEN-MS.

4.2 PERFIL DOS CASOS COM INVESTIGAÇÃO DE RESISTÊNCIA

A distribuição dos casos de acordo com registro ou não de tratamento anterior é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição anual dos casos de tuberculose entre indígenas e não-indígenas notificados ao SINAN, segundo história de tratamento de tuberculose. Mato Grosso do Sul, 2000-2008.

Ano	Casos novos*		Casos tratados**		Total
	n	%	n	%	
2000	30	81,1	7	18,9	37
2001	36	80,0	9	20,0	45
2002	56	69,1	25	30,9	81
2003	80	81,6	18	18,4	98
2004	114	78,1	32	21,9	146
2005	175	85,4	30	14,6	205
2006	154	90,1	17	9,9	171
2007	192	78,6	52	21,1	244
2008	232	79,4	60	20,4	292
Total	1 069	81,1	250	18,9	1 319 (100%)

Fonte: PECT-SINAN-MS.

*Casos novos: Indivíduos com cultura e teste de sensibilidade para pacientes com tuberculose, sem registro de tratamento anterior no SINAN ou em que o intervalo entre coleta do exame e início do tratamento seja inferior a 30 dias.

**Casos tratados: Indivíduos com cultura e teste de sensibilidade para pacientes com tuberculose com registro de tratamento anterior em mais de 30 dias.

Ao longo dos nove anos, apresentaram cultura positiva para *M. tuberculosis* e foram submetidos ao teste de sensibilidade 1 319 casos, dos quais 1073 (81,1%) foram classificados como novos e 250 (18,9%) como casos com registro de tratamento anterior de tuberculose. A distribuição desses casos de acordo com a história de tratamento mostrou predomínio de casos novos, os quais por cinco anos representaram mais de 80% dos casos, e entre os casos tratados também em cinco anos representaram mais de 20% dos investigados.

Ressalta-se em nosso estudo o universo investigado, sem que se enquadrasse nos critérios definidos pelo Ministério da Saúde, que recomendam cultura e teste de

sensibilidade a drogas antituberculose apenas para casos de recidiva, reingresso após abandono, falência de tratamento ou infecção por HIV (BRASIL, 2008).

4.3 NÍVEIS DE RESISTÊNCIA PRIMÁRIA, RESISTÊNCIA ADQUIRIDA E RESISTÊNCIA COMBINADA

Quando não exposto anteriormente a drogas antituberculose, *M. tuberculosis* pode manifestar resistência por resultado de mutação randômica (resistência natural ou primária) ou pela utilização inadequada dos fármacos prescritos, abandono ou irregularidade terapêutica (resistência adquirida), favorecendo a emergência de cepas resistentes. Estas podem infectar pessoas não tratadas anteriormente, levando ao aparecimento de formas clínicas multirresistentes primárias (BRASIL, 2008a).

No período do estudo foram encontrados níveis de resistência primária (RP) que oscilaram de 2,8% em 2001 a 16,3% em 2003 (Figura 11). Esses níveis foram inferiores a 10% nos três primeiros anos do estudo, provavelmente pela menor investigação de casos novos. O decréscimo progressivo verificado até 2007 não se manteve em 2008, em vista da implementação da cultura e teste de sensibilidade em novas áreas, o que permitiu o diagnóstico na região de fronteira com a Bolívia e Paraguai.

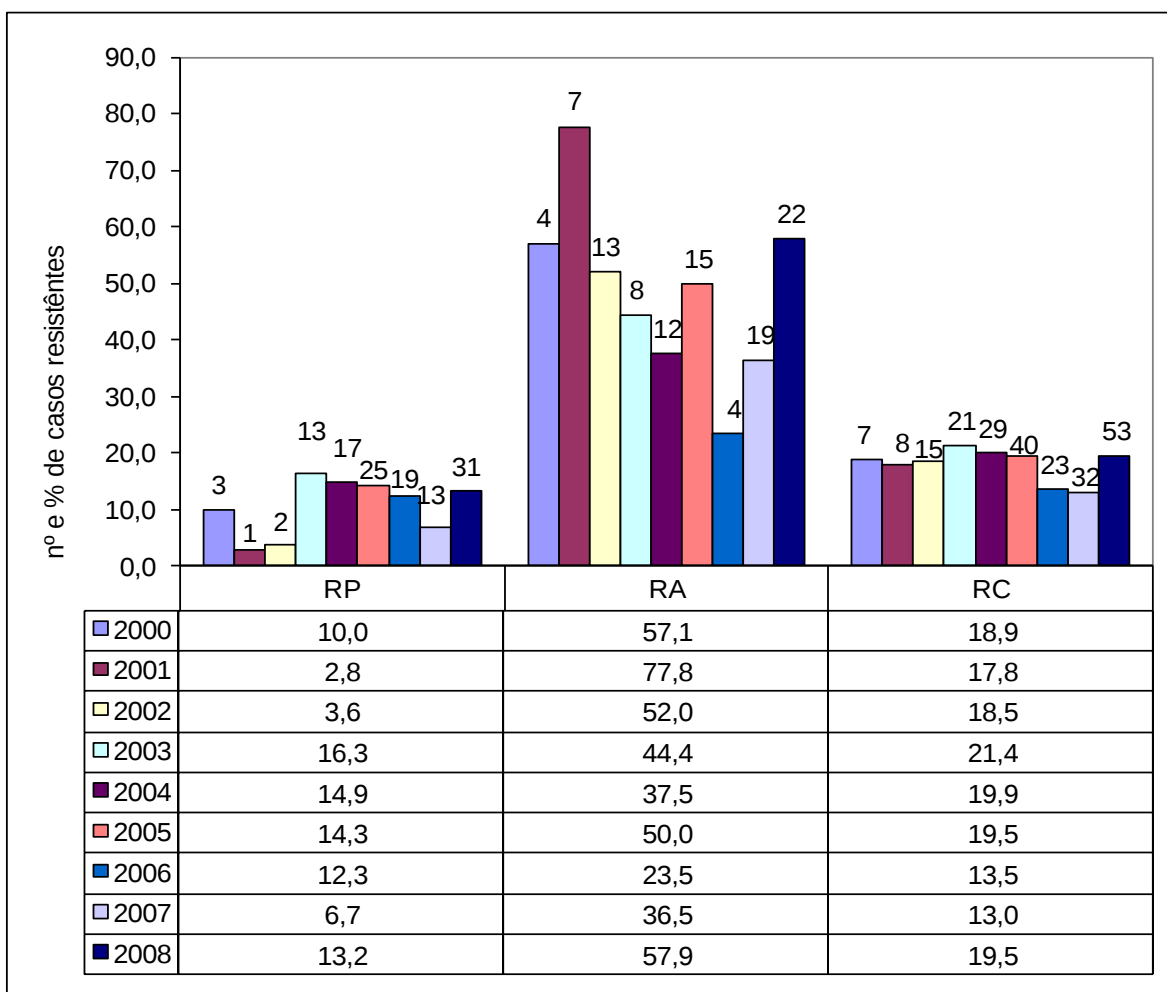


Figura 11. Distribuição dos casos e percentuais de resistência primária (RP), resistência adquirida (RA) e resistência combinada (RC) de *M. tuberculosis* a drogas. Mato Grosso do Sul, 2000-2008.

Fonte: PECT-SES-MS

Os níveis de RP encontrados ao longo dos anos de estudo mostraram-se inferiores a média global (17,0%) e aos registrados em duas regiões: leste Europeu (35,8%) e região do Pacífico (22,0%). Nos últimos cinco anos, os percentuais caíram, ficando muito próximos do verificado na região das Américas (14,9%), com valores próximos aos registrados no Canadá e em Honduras (12,0%) nos três últimos anos, porém superiores aos de países vizinhos (Paraguai, com 10,0%, e Argentina com 11,1%) (WHO, 2008).

A avaliação da resistência adquirida (RA) ao longo dos nove anos apresentou percentuais que oscilaram de 23,5% em 2006 a 77,8% em 2001, com percentuais decrescentes de 2001 a 2006 e com aumento progressivo nos dois últimos anos, provavelmente devido a ampliação da investigação em novas áreas, mas em níveis mais baixos que os registrados nos primeiros anos do estudo.

Na maioria dos anos, os valores de RA superaram a média mundial (35,0%), sendo inferiores apenas aos da região africana (21,4%) e da Europa central e ocidental (17,8%) (WHO, 2008). Comparando nossos achados com inquéritos mais recentes realizados em países das Américas, constatamos que também superam os registrados no Equador em 2003 (43,8%), Peru em 2006 (41,7%), Guatemala em 2002 (54,8%) e República Dominicana em 2005 (52,1%) (WHO, 2008). Apesar da queda em 2006, em mais de 50% em relação ao ano anterior, o valor encontrado em 2008 (57,9%) superou o dobro do registrado no último inquérito nacional de resistência (21,8%) (BRAGA *et al.*, 2003), sendo maior que os percentuais encontrados em São Paulo na década de 1990 (38,0%) em unidade de referência para tratamento de TBMDR (FIUZZA DE MELLO *et al.*, 2003).

A avaliação da resistência combinada (RC), que consolida os níveis de RP e RA, mostra ao longo dos nove anos percentuais que oscilaram de 13,0% em 2007 a 21,4% em 2003 (Figura 11).

Os percentuais registrados em sete anos, com exceção de 2006 e 2007, mostraram-se próximos da média mundial (20,0%) e da asiática (20,8%) e muito maiores que os registrados nas regiões da Europa Central e Ocidental (8,9%), africana (13,8%), das Américas (16,7%) e mediterrânea (17,6%) (WHO, 2008).

Estudos mais recentes realizados em diferentes unidades de saúde no Brasil, de amostras exclusivamente respiratórias, assinalaram grandes variações nos níveis de RC: 12,6% no município de São Vicente, SP; 19,17% em Minas Gerais; 21,3% no Complexo de Manguinhos, RJ; e 24,9% no Ceará (JARDIM *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2007).

4.4 DROGAS RESPONSÁVEIS PELOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA COMBINADA (RC)

A avaliação dos níveis de RC consolida os valores encontrados nos três grupos de drogas: monorresistência, MDR e outros padrões de associação de drogas (OPAD) (Figura 12).

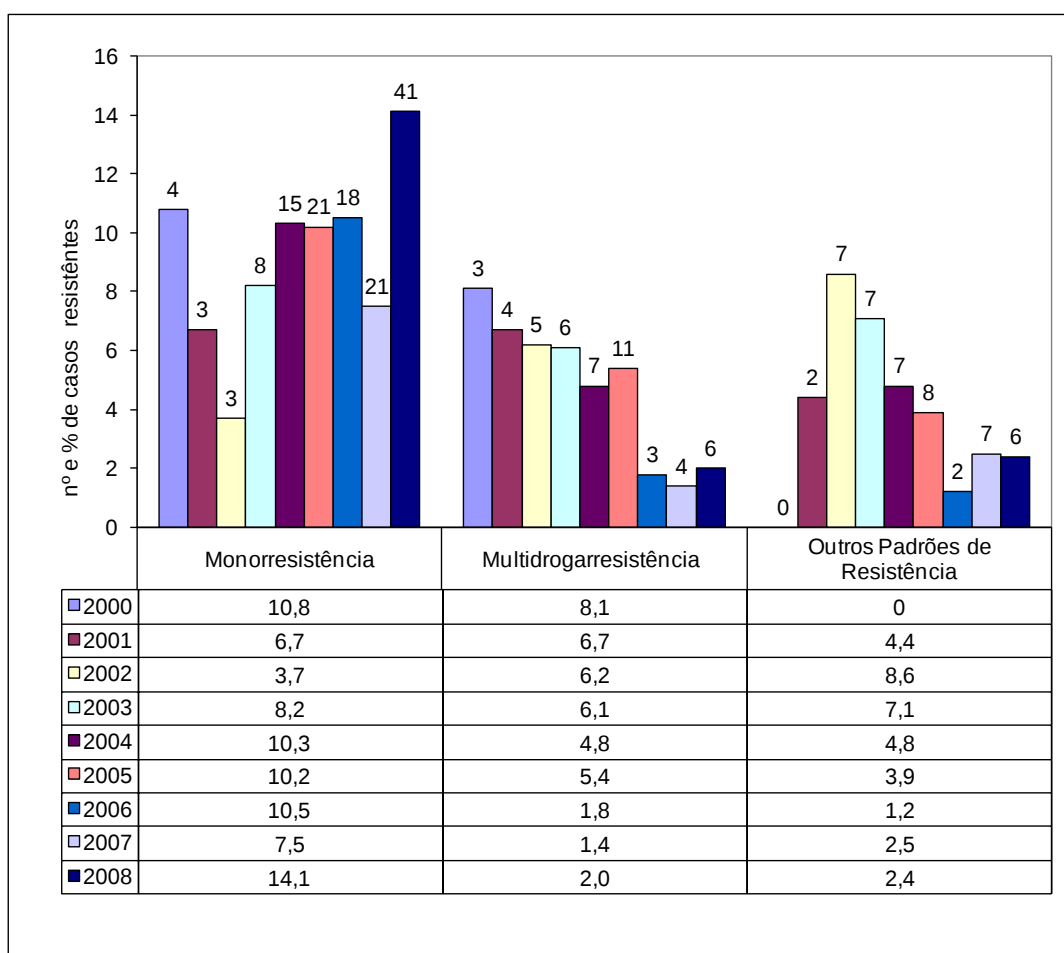


Figura 12. Distribuição dos casos e percentuais de resistência combinada de *M. tuberculosis* a drogas, segundo grupo de drogas. Mato Grosso do Sul, 2000 a 2008.

Fonte: PNCT SES-MS

A monorresistência totaliza os percentuais de resistência verificadas para a rifampicina, isoniazida, estreptomicina e etambutol; a multidrogarresistência (MDR) refere-se a resistência a pelo menos rifampicina e isoniazida associadas; outros padrões de associação de drogas (OPAD) referem-se a outras associações de drogas em que não esteja presente a associação rifampicina + isoniazida. A monorresistência apresentou níveis que oscilaram de 3,7% em 2002 a 14,1% em 2008, enquanto a MDR declinou de forma progressiva na maioria dos anos, caindo de 8,1% em 2000 para 2,0% em 2008. Em OPAD houve um crescimento inicial com maior registro em 2002 e redução nos anos subsequentes.

Os níveis de monorresistência combinada verificados em nosso estudo foram muito menores que os registrados por droga isolada, sendo que mundialmente a isoniazida isolada alcançou 13,3% e a estreptomicina 12,6% (WHO, 2008), níveis alcançados em nosso estudo

quando somadas as quatro drogas. Na região das Américas, a RC para isoniazida, rifampicina, estreptomicina e etambutol totalizam 26,8% (WHO, 2008), enquanto em nosso estudo o maior valor encontrado foi 14,1%. As drogas de maior contribuição nos níveis de monorresistência foram a isoniazida e a estreptomicina, que cresceram ao longo dos anos, ao passo que houve queda para a rifampicina e o etambutol.

Os níveis de MDR combinada decresceram ao longo dos anos, com percentuais registrados nos primeiros cinco anos em níveis superiores ao mundial (5,3%), mas com declínio significativo. Nos três últimos anos foram registrados valores menores que o verificado na Europa Central e Ocidental (1,5%) e semelhantes aos da região africana (2,2%). Apesar da queda nos três últimos anos, os valores registrados ainda superam o estimado pela OMS para o Brasil (1,4%), sendo porém menores que o estimado para a América Latina, (3,5%) (WHO, 2008).

O valor encontrado em nosso estudo nos último anos foi semelhante ao encontrado no Brasil no último inquérito de resistência (2,2%) (BRAGA *et al.*, 2003), maior que o encontrado no Espírito Santo (0,87%) (VIEIRA *et al.*, 2007) e muito menor que o verificado no Rio de Janeiro (10,6%) (MENDES *et al.*, 2007).

4.5 NÍVEIS DE MULTIDROGARRESISTÊNCIA (MDR) PRIMÁRIA, ADQUIRIDA E COMBINADA

Os níveis anuais de MDR primária, adquirida e combinada são apresentados na Figura 13.

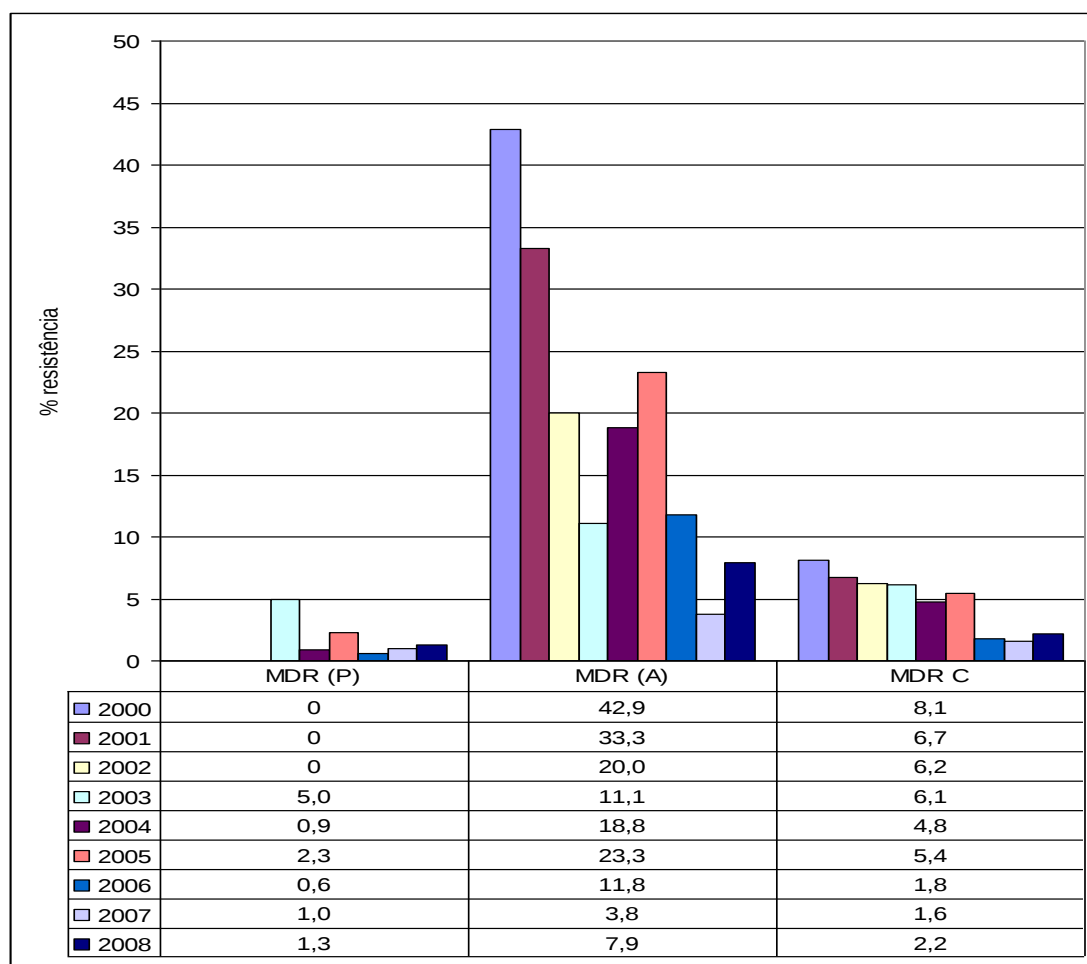


Figura 13. Distribuição dos níveis de multidrogarresistência primária (MDR-P), adquirida (MDR-A) e combinada (MDR-C) de *M. tuberculosis* a drogas. Mato Grosso do Sul, 2000-2008.

Fonte: PCT-SESMS

Na MDR primária não houve detecção nos três primeiros anos do estudo, sendo que o maior registro ocorreu em 2003 (5,0%), mantendo-se em níveis que não ultrapassaram a 1,3% nos últimos três anos. Os percentuais encontrados nos últimos cinco anos foram inferiores aos mundiais (2,9%) e menores também que os registrados nas Américas (2,2%). Entre alguns países das Américas, em inquérito recente (2000 e 2006) foram encontrados níveis de MDR primária de 1,5% na Colômbia e Costa Rica (WHO, 2008). No presente estudo, os níveis de MDR primária nos três últimos anos foram menores que os encontrados no Brasil (1,1%) no último inquérito de resistência (BRAGA *et al.*, 2003), porém maiores que o verificado em unidade de referência de doenças infecciosas em Minas Gerais (0,3%) (SOUZA *et al.*, 2006) e que o estimado pela OMS para o Brasil (0,9%) (WHO, 2008).

A MDR adquirida apresentou percentuais que decresceram de forma progressiva até 2003, porém com ligeiro crescimento em 2005 e importante queda nos últimos dois anos, não superando 7,9%.

A queda nos percentuais entre 2000 e 2007 (de aproximadamente 40% para 4%) não se sustentou em 2008, porém os percentuais registrados nos últimos três anos foram inferiores aos encontrados em inquéritos realizados em países da América Latina: 26,5% na Guatemala (2002), 24,3% no Equador (2006) e 23,5% no Peru (2006) (WHO, 2008).

O valor registrado no último ano foi semelhante ao encontrado no último inquérito de resistência no Brasil (7,9%) (BRAGA *et al.*, 2003), e semelhante ao encontrado em Minas Gerais (7,9%) (SOUZA, *et al.* 2006). As oscilações observadas nos três últimos anos podem estar refletindo achados de áreas de fronteira, que tinham pouca representatividade antes da implantação da sementeira ocorrida nessa região em 2007.

Os níveis encontrados ao longo dos anos mostram o quanto foi reduzido o grave quadro epidemiológico da resistência adquirida, sendo que tais reduções assinalam que as medidas voltadas a corrigir falhas nos sistemas de saúde e no programa de controle da tuberculose assinaladas por alguns autores (FIUZA DE MELLO *et. al*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2007) estão sendo progressivamente corrigidas em nosso meio.

A MDR combinada variou de 8,1% a 1,6%, com ligeira queda no período de 2000 a 2005 e queda expressiva nos três últimos anos, não ultrapassando 2,2%. Segundo a OMS (WHO, 2008) os níveis registrados nos últimos três anos foram menores que a média mundial (5,3%), menores que o registrado nas Américas (4,0%) e maiores que os valores estimados pela OMS para o Brasil (1,4%). No referido período, não ultrapassaram os percentuais encontrados no Brasil pelo último inquérito de resistência (2,2%) (BRAGA *et al*, 2003), sendo porém maiores que o encontrado no Espírito Santo (0,87%) (VIEIRA, 2007) e muito menores que o verificado no do Rio de Janeiro (10,6%) (MENDES *et al.* 2007).

4.6 ABANDONO DE TRATAMENTO DA TUBERCULOSE E NÍVEIS DE MDR COMBINADA

A quimioterapia para tuberculose, quando corretamente prescrita e administrada, cura quase 100% dos casos novos (nunca tratados) e com cepa de *M. tuberculosis* sensível a todos os medicamentos (BRASIL, 2008).

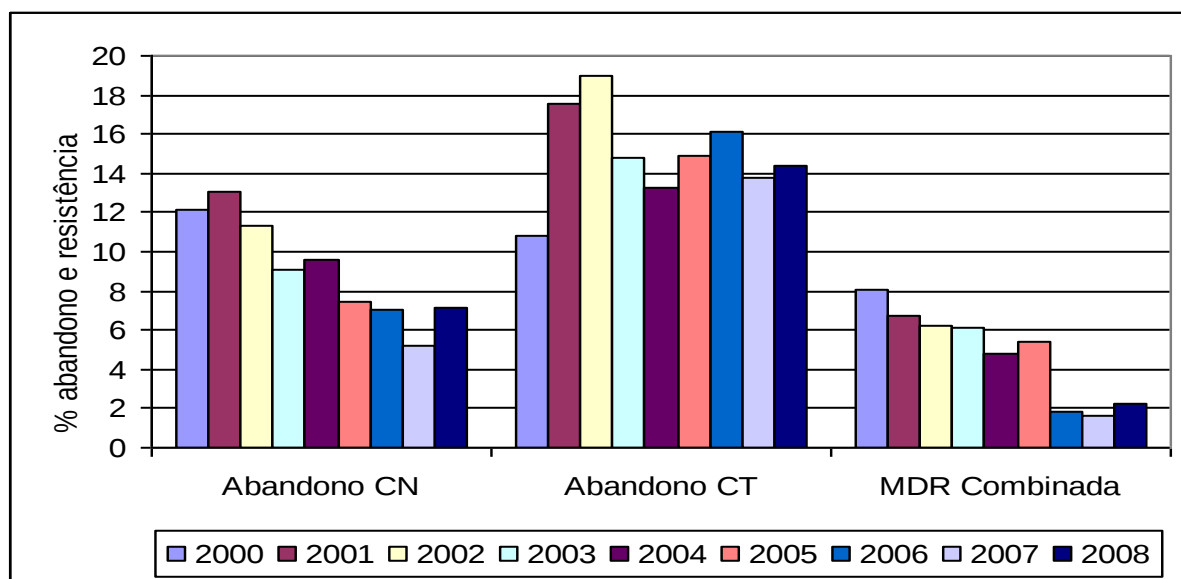


Figura 14. Distribuição dos níveis de abandono entre casos novos (CN), casos tratados (CT) e multidrogarresistência (MDR) combinada de *M. tuberculosis* a drogas. Mato Grosso do Sul, 2000-2008.

Fonte: PECT-SES-MS.

O abandono de tratamento dos pacientes com resistência primária tem decrescido ao longo dos anos, com exceção de 2008, mas em relação aos casos tratados o abandono, comparece ligeiramente aumentado até 2002, tendo em seguida com uma ligeira queda até 2004 e um aumento até 2005, seguido de certa estabilidade nos dois últimos anos. Em relação ao abandono dos multidrogarresistentes, houve diminuição gradativa, e que pode ser devido à implementação de uma unidade de referência para tratamento de pacientes multidrogarresistentes em 2006.

Em nosso estudo, entre os casos novos, os percentuais de resistência foram de 13,1% em 2001 e 5,2% em 2007, com níveis superiores a 10% nos três primeiros anos, mas caindo nos últimos anos entre 40% e 60%, acima dos parâmetros aceitáveis pela OMS (5%). Entre os casos tratados, o abandono foi de 19,0% em 2002 e 10,8% em 2000, em níveis que

superaram o dobro do verificado entre casos novos, embora com declínio entre 2002 e 2008 de 24,2%.

Tabela 3. Distribuição dos municípios com casos de tuberculose submetidos ao teste de sensibilidade a drogas antituberculose, apresentando 'qualquer resistência' ou 'multidrogarresistência'. Mato Grosso do Sul, 2000-2008.

Municípios	Amostras Testadas	Qualquer Resistência		MDR	
	nº	nº	%	nº	%
Água Clara	19	0	0	0	0
Alcinópolis	1	0	0	0	0
Amambaí	92	4	4,3	0	0
Anastácio	13	2	15,4	0	0
Anaurilândia	3	0	0	0	0
Angélica	2	1	50,0	1	50,0
Antônio João	6	1	16,7	0	0
Apda. Taboado	1	1	100,0	1	100,0
Aquidauana	50	8	16,0	1	2,0
Aral Moreira	6	1	16,7	1	16,7
Bataguassu	7	1	14,3	1	14,3
Bataiporã	1	0	0	0	0
Bela Vista	8	1	12,5	1	12,5
Bodoquena	1	0	0	0	0
Bonito	2	0	0	0	0
Brasilândia	10	5	50,0	0	0
Caarapó	31	7	22,6	1	3,2
Camapuã	3	2	66,7	1	33,3
Campo Grande	359	81	22,6	10	2,8
Caracol	2	0	0	0	0
Cassilândia	3	0	0	0	0
Cel. Sapucaia	31	4	12,9	0	0
Chap. do Sul	5	2	40,0	0	0
Corguinho	3	1	33,3	1	33,3
Corumbá	136	33	24,3	11	8,1
Costa Rica	6	2	33,3	0	0
Coxim	6	3	50,0	2	33,3
D. I. do Buriti	9	1	11,1	1	11,1
Douradina	7	0	0	0	0
Dourados	146	9	6,2	3	2,1
Eldorado	3	0	0	0	0
Fátima do Sul	2	1	50,0	0	0
G. L. da Laguna	6	1	16,7	0	0
Iguatemi	5	1	20,0	0	0
Inocência	5	2	40,0	0	0
Itaporã	2	0	0	0	0
Itaquiraí	12	2	16,7	1	8,3
Ivinhema	3	0	0	0	0
Japorã	14	4	28,6	0	0
Jardim	23	2	8,7	2	8,7
Juti	2	1	50,0	0	0
Ladário	7	3	42,9	1	14,3
Laguna Carapã	5	0	0	0	0
Maracaju	17	3	17,6	1	5,9
Miranda	22	3	13,6	0	0
Mundo Novo	4	0	0	0	0
N. Alv. do Sul	5	1	20,0	1	20,0
N. H. do Sul	2	0	0	0	0
Naviraí	10	3	30,0	2	20,0
Nioaque	17	3	17,6	0	0
Nova Andradina	5	3	60,0	1	20,0
Paranaíba	1	0	0	0	0
Paranhos	13	2	15,4	0	0
Pedro Gomes	1	1	100,0	0	0
Ponta Porã	32	2	6,3	1	3,1
Porto Murtinho	8	4	50,0	0	0
R.R.Pardo	4	1	25,0	0	0
R.V.de MT	3	0	0	0	0
Rio Brilhante	6	1	16,7	0	0
Rio Negro	6	3	50,0	0	0
Rochedo	3	2	66,7	1	33,3
S. R. Pardo	1	0	0	0	0
S.G.D'Oeste	6	0	0	0	0
Sete Quedas	2	0	0	0	0
Sidrolândia	10	0	0	0	0
Sonora	1	0	0	0	0
Tacuru	23	1	4,3	0	0
Taquarussu	1	0	0	0	0
Terenos	7	0	0	0	0
Três Lagoas	50	9	18,0	2	4,0
Vicentina	1	0	0	0	0
Mato Grosso do Sul	1319	229	17,4	49	3,7

Fonte:PECT-SES-MS.

Como a análise é realizada sobre culturas com positividade, constatam-se na Tabela 3 altas taxas de resistência em determinados municípios, pelo fato de se haver realizado apenas uma cultura, o que demonstra existir um viés em relação à avaliação da resistência. Assim o percentual obtido em determinado município para o qual se disponha de apenas uma cultura positiva com resistência as drogas pode não representar a realidade local

No período de 2000 a 2008 foram realizadas em Mato Grosso do Sul culturas para *M. tuberculosis* e testes de sensibilidade à rifampicina (R), isoniazida (I), estreptomicina (S) e etambutol (E) em 1 319 amostras oriundas de 71 (91,0%) dos 78 municípios do estado, o que revelou sensibilidade às quatro drogas em 1 090 amostras (82,6%).

A resistência combinada encontrada em 229 amostras foi avaliada em termos de cobertura geográfica, número de amostras processadas e percentuais encontrados em cada município e em nível estadual (Tabela 3).

As amostras oriundas de 91,0% dos municípios sul-mato-grossenses apontaram ausência de resistência em 25 (35,2%) de 71 municípios, representada por um universo de 1 090 amostras. Outros 46 (64,8%) dentre 71 municípios enquadraram-se na categoria 'qualquer resistência', em 229 amostras (17,4%). Dentre estes, 24 (33,8%) dos 71 municípios registraram multidrogarresistência em um universo de 49 amostras processadas (3,7%). O número de amostras testadas por município variou de 1 a 359 amostras. Os níveis de 'qualquer resistência' variaram de 100,0% a 4,3%, ambos representados por um único caso, enquanto as variações da MDR oscilaram de 100,0% a 2,0% , ambos também representados por apenas uma amostra.

Embora a avaliação abrangesse 1 319 amostras oriundas de 91,0% dos municípios do estado, não se constatou resistência em 35% dessas localidades. Por outro lado, mais de 60% dos municípios avaliados apresentaram a categoria 'qualquer resistência' em níveis superiores a 4,3% e níveis de MDR superiores a 2,0%, considerados elevados tanto em nível estadual quanto na maioria dos municípios, comprometendo o controle da doença em Mato Grosso do Sul.

4.7 RESISTÊNCIA ÀS DROGAS NA ÁREA INDÍGENA DE MATO GROSSO DO SUL

Para melhor visualização, procedeu-se a análise separada para a resistências às drogas antituberculose na população indígena, embora essas informações estejam incluídas na análise acima exposta. Como já apontamos, desconhece-se a realidade da tuberculose na população indígena, particularmente em termos de resistência a drogas.

No Brasil, Basta *et al.* (2006) examinaram 147 amostras de escarro na população indígena Suruí, avaliando 5 em relação à resistência a drogas antituberculose. Uma delas revelou-se multidrogarresistente.

Tabela 4. Distribuição dos casos de tuberculose submetidos ao teste de sensibilidade a drogas e níveis de resistência global encontrados na população indígena de Mato Grosso do Sul, 2000-2008.

Testes de sensibilidade a drogas realizados	541	100,0 (%)
Sensíveis	516	95,37
Resistentes	25	4,63
Isoniazida	5	0,92
Rifampicina	2	0,37
Etambutol	2	0,37
Estreptomicina	9	1,67
Monorresistência	18	3,33
Rifampicina + isoniazida	3	0,56
Multidrogarresistência (MDR)	3	0,56
Isoniazida + etambutol	2	0,37
Isoniazida + estreptomicina	2	0,37
Polirresistência	4	0,74

Fonte: LACEN-MS.

A descentralização da cultura a partir de 1999 possibilitou monitorar a resistência a drogas também na população indígena. As sementeiras das amostras são realizadas localmente, cabendo ao LACEN a identificação presuntiva e posteriormente a realização de

todos os testes de sensibilidade a drogas, seguindo as recomendações do manual elaborado pelo Ministério da Saúde em 2008. Embora o percentual de resistência na população indígena seja inferior ao encontrado entre não-indígenas, verifica-se a importância do monitoramento naquela população.

Não foi encontrado nenhum artigo publicado no Brasil contendo avaliação de testes de sensibilidade a drogas antituberculose de todo sintomático respiratório da população em questão, o que impossibilita comparações.

4.8 BIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM MATO GROSSO DO SUL

Foram submetidos a técnica de RFLP 149 isolados, 75 dos quais referentes aos anos de 1999 (11 isolados), 2000 (21) e 2001 (43). Foram também submetidos a RFLP 4 isolados do ano 2002, 34 de 2003, 20 de 2004 e 16 de 2011. Foram excluídos da análise 18 isolados por serem repetidos, um por apresentar duas bandas e dois por apresentarem quatro bandas.

Figura 15. Dendrograma de 149 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes indígenas e não-indígenas de Mato Grosso do Sul.

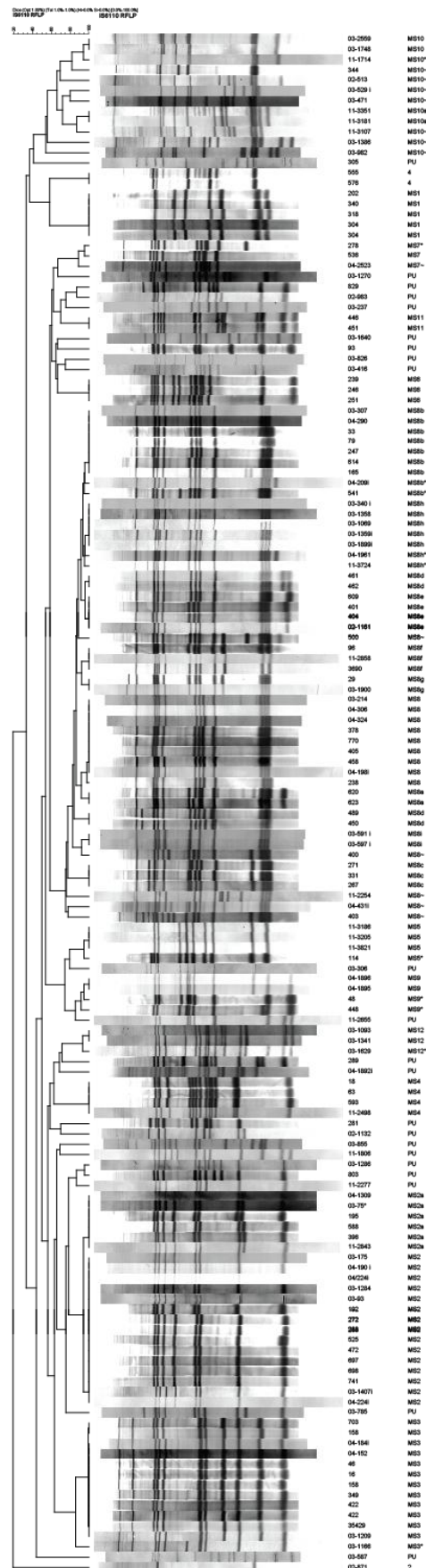


Tabela 5. Distribuição das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, por tipo genético e família.

Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>					
Família	N (%) 128 (100%)	Cluster	N (%) N = 77 (60,1)	Não-cluster	N (%) N = 29 (24,7)
MS1	2	MS1	2		
MS2	19	MS2	13		
		MS2A	6		
MS3	12	MS3	11		
				MS3*	1
MS4	3	MS4	3		
MS5	4	MS5	3		
				MS5*	1
MS6	2	MS6	2		
MS7	3			MS7	1
				MS7~	1
				MS7*	1
MS8	42	MS8	8		
				MS8~	5
				MS8A	1
		MS8B	6		
				MS8B*	2
		MS8C	2		
		MS8D	2		
		MS8E	3		
		MS8F	3		
		MS8G	2		
		MS8H	5		
				MS8H*	2
				MS8I	1
MS9	3			MS9	1
				MS9*	2
MS10	12	MS10	2		
				MS10*	1
		MS10A	2		
				MS10~	7
MS11	1			MS11	1
MS12	3	MS12	2		
				MS12*	1
Perfil único (PU)					22(17,2)

Realizou-se genotipagem de 149 isolados. Foram excluídos 18 isolados por se tratar de amostras repetidas do mesmo paciente e três com menos de seis bandas. Portanto, 128

amostras foram analisadas, sendo classificadas em *clusters* quando havia similaridade acima de 90%. Destas, 77 (60,1%) se encontravam em *cluster*, 29 (24,7%) em não-*cluster* e 22 (17,2%) em perfis únicos.

Os isolados foram classificados em 12 famílias, totalizando 106 cepas. Destas, 77 (72,6%) se encontravam em *cluster* dentro de suas respectivas famílias e 29 (27,3%) não se encontravam em *cluster*.

Foram classificados como de perfil único os isolados que não apresentavam características semelhantes a nenhuma família.

A nomeação dos isolados foi realizada sem seguir nenhuma padronização prévia. As letras MS, porém, foram atribuídas a esses nomes para relacioná-los com o estado de Mato Grosso do Sul.

A classificação inicialmente foi feita em diferentes famílias. Posteriormente, a disponibilização de bandas permitiu classificação em subfamílias, quando havia características comuns.

Isolados que diferiam de apenas uma banda, mas com disposição semelhante, foram classificadas no mesmo grupo, diferenciados com apenas por um asterisco.

Cepas com o mesmo número de bandas, mas com disposição diferente, foram classificadas na família correspondente, mas indicadas com um til, mesmo não pertencendo ao grupo genético. À medida que diferiam os números de bandas, foram classificadas em famílias diferentes.

As famílias MS1, MS2 e MS3, com respectivamente 2, 20 e 10 isolados, correspondem as maiores números de pacientes que se encontram em *clusters* e provêm exclusivamente de indígenas, exceto para um paciente (isolado bacteriano), da família MS2.

Na família MS5, com três isolados, embora em *cluster*, não foi estabelecida nenhuma conexão epidemiológica, embora dois isolados fossem de pacientes de presídios de localidades diferentes, os quais afirmaram não se conhecer. O terceiro isolado provinha de um paciente do Hospital Universitário da UFMS, caminhoneiro e HIV-positivo.

Já a família MS8 abrangeu 9 isolados em *cluster*, sendo sete de indígenas e dois de não-indígenas, demonstrando possível conexão entre indígenas e não-indígenas. Sendo que sete dos isolados foram oriundos do municípios de Dourados. Na família MS8, dois isolados

já haviam sido avaliados por Cunha (2003), caracterizando transmissão nosocomial entre profissional de saúde e indígena.

Em relação à sorologia de HIV, 39 pacientes não realizaram, 31 obtiveram resultados negativos, 56 não tinham nenhuma informação e dois tiveram resultados positivos.

Quanto à resistência a drogas antituberculose, cinco pacientes eram MDR, mas não houve estabelecimento de nenhuma conexão epidemiológica.

A família MS8E abrangeu três isolados, diagnosticados em 1999, 2001 e 2011. Na família MS8F houve dois isolados, um deles de 2000 e outro de 2011, ambos da aldeia de Amambai. De acordo com informação obtida dos responsáveis pelo diagnóstico laboratorial dessa aldeia, há conexão epidemiológica entre os três primeiros, assim como entre os dois últimos.

Na família MS10 os isolados em *cluster* foram de pacientes presidiários, sendo uma amostra de 2003 e outra de 2004, com espaçamento de cerca de um ano. O terceiro paciente encontrava-se internado em hospital público. A família MS10A também apresentou *cluster*, sendo as amostras de presidiários. Não foi possível estabelecer nenhuma ligação, pois os arquivos foram queimados durante uma rebelião.

Tabela 6. Distribuição dos 128 perfis genéticos, por cidade e/ou aldeia de origem.

Município	RFPL-IS6110	N	GP Genético	Aldeia	Raça/cor
Dourados					
	PU	1		Bororo	Indígena
	PU	1	-	Jaguapiru	Indígena
	PU	2	-	Urbano	Não-Indígena
	MS1	2	MS1	Jaguapiru	Indígena
	MS2	2	MS2	UBS	Não-Indígena
		1	MS2	Jaguapiru	Indígena
		1	MS2	Sardinha	Indígena
		4	MS2	Bororo	Indígena
		1	MS2A	Jaguapiru	Indígena
		1	MS2A	Bororo	Indígena
	MS3	3	MS3	Bororo	Indígena
	MS3	1	MS3	Jaguapiru	Indígena
	MS6	1	MS6	Urbano	Não-Indígena
	MS7*	1	-	Urbano	Não-Indígena
	MS8	5	MS8	Bororo	Indígena
	MS8	2	MS8	Urbano	Não-Indígena
	MS8B	1	MS8B	Jaguapiru	Indígena
	MS8B	1	MS8B	Bororo	Indígena
	MS8B	1	MS8B	UBS	Não-Indígena
	MS8B*	1		Sardinha	Indígena
	MS8C	1	MS8C	Missão	Não-Indígena
	MS8C	2	MS8C	Itaum	Indígena
	MS8D	2	MS8D	Bororo	Indígena
	MS8E	1	MS8E	Bororo	Indígena
	MS8~	1	-	Urbano	Não-Indígena
	MS8~	1	-	Jaguapiru	Indígena
	MS8~	2	-	Bororo	Indígena
	MS8I	1		Bororo	Indígena
	MS9	1	MS9	Urbano	Não-Indígena
	MS10~	2	-	Jaguapiru	Indígena

Tabela 6. Distribuição dos 128 perfis genéticos, por cidade e/ou aldeia de origem (continuação).

Município	RFPL-IS6110	N	GP Genético	Aldeia	Raça/cor
Amambai					
	PU	1	-	Limão Verde	Indígena
	MS2A	1	MS2A	Limão Verde	Indígena
	MS2A	1	MS2A	Amambai	Indígena
	MS3	2	MS3	Limão Verde	Indígena
	MS3	2	MS3	Amambai	Indígena
	MS7	1	-	Amambai	Indígena
	MS8A	1	MS8A	Guassuty	Indígena
	MS8B	1	MS8B	Amambai	Indígena
	MS8F	1	MS8F	Amambai	Indígena
	MS8G	2	MS8G	Amambai	Indígena
	MS8H	1	MS8H	Amambai	Indígena
	MS8H	1	MS8H	Guassuty	Indígena
	MS8H*	1	-	Limão Verde	Indígena
	MS9	1	MS9	Taquaperi	Indígena
	MS9*	1	-	Amambai	Indígena
	MS9*	1	-	Taquaperi	Indígena
Campo Grande					
	PU	4	-	Hosp. São Julião	Não-Indígena
	PU	1	-	Hosp.Universitário	Não-Indígena
	PU	2	-	Presídio	Não-Indígena
	PU	3	-	UBS	Não-Indígena
	MS5	2	MS5	Presídio	Não-Indígena
	MS5	1	MS5	Hosp.Universitário	Não-Indígena
	MS8H	1	MS8H	UBS	Não-Indígena
	MS10	2	MS10	Presídio	Não-Indígena
	MS10A	2	MS10A	Presídio	Não-Indígena
	MS10~	1	-	Hosp. Universitário	Não-Indígena
	MS10~	1	-	UBS	Não-Indígena
	MS12	1	MS12	Santa Casa	Não-Indígena

Tabela 6. Distribuição dos 128 perfis genéticos, por cidade e/ou aldeia de origem (continuação).

Município	RFPL-IS6110	N	GP Genético	Aldeia	Raça/cor
Coronel Sapucaia					
	MS2	1	MS2	Guaimbé	Indígena
	MS2A	1	MS2A	Taquaperi	Indígena
	MS5	1	MS5	Guaimbé	Indígena
	MS8	1	MS8	Taquaperi	Indígena
	MS8F	2	MS8F	Taquaperi	Indígena
	MS9	1	MS9	Taquaperi	Indígena
	MS9*	2		Taquaperi	Indígena
Caarapó					
	MS2	2	MS2	Caraapó	Indígena
	MS3	1	MS3	Jarará	Indígena
	MS8	1	MS8	Caraapó	Indígena
	MS8E	1	MS8E	Caraapó	Indígena
Miranda					
	PU	1	-	Miranda	Indígena
	MS11	1	-	Passarinho	Indígena
Japorã					
	PU	1		Porto Lindo	Indígena
	MS2	1	MS2	Porto Lindo	Indígena
	MS3	1	MS3	Porto Lindo	Indígena
	MS6	1	MS6	Porto Lindo	Indígena
	MS8E	1	MS8E	Porto Lindo	Indígena
Antônio João					
	MS8B*	1	-	Pirajuí	Indígena
Nova Alvorada do Sul					
	MS8E	1	MS8E	UBS	Não indígena
Paranhos					
	PU	1	-	Pirajui	Indígena
Paranaíba					
	PU	1	-	UBS	Não indígena

Continuação

Tabela 6. Distribuição dos 128 perfis genéticos, por cidade e/ou aldeia de origem (conclusão).

Município	RFPL-IS6110	Nº	GP Genético	Aldeia	Raca/Cor
Rio Verde					
	PU	1	-	USB	Não indígena
	MS8	1	MS8	USB	Não indígena
Eldorado					
	PU	1	-	Serrito	Indígena
Naviraí					
	MS8	1	MS8	UBS	Não indígena
	PU	1	-	UBS	Não indígena
Aral Moreira					
	MS2	1	MS2	Sem informação	Indígena
Tacuru					
	MS8B	1	MS8B	Sassoro	Indígena
	MS8H	1	MS8H	Sassoro	Indígena
Corumbá					
	MS10	1	MS10	USB	Não indígena
Ponta Porã					
	MS10*	2	-	USB	Não indígena
Itaquiraí					
	MS10~	1	-	USB	Não indígena
Água Clara					
	MS10	1	MS10	UBS	Não indígena
	MS10~	1		UBS	Não indígena
Aquidauana					
	MS12*	1	-	UBS	Não indígena
Guia Lopes					
	MS12	1	MS12	UBS	Não indígena

Dos 128 isolados, 28 (22,6%) eram de pacientes não-indígenas. Embora o número de isolados de não-indígena fosse pequeno, também podem estar em *cluster*, com possível conexão epidemiológica. Verificou-se também que 5 (22,7%) eram perfis únicos. Foram obtidos isolados de 22 municípios.

O município com maior número de RFLP realizados foi Dourados, com 47 isolados, seguido de Campo Grande com 21 e Amambai com 19.

Nas famílias MS2 e MS3 constatou-se *clusters* na mesma aldeia e em aldeia de outra localidade.

No município de Campo Grande os isolados eram somente de pacientes não-indígenas, ao passo que em Amambai eram somente de indígenas.

A utilização da cultura universal no LACEN-MS e a descentralização da metodologia permitem proporcionar aos pacientes maior incremento no diagnóstico, em média de 30% (BRASIL, 2008b), mas somente com culturas positivas podem-se realizar os testes de sensibilidade a drogas antituberculose, bem como a identificação das cepas – fato bastante importante em pacientes com HIV, cuja vulnerabilidade imunológica facilita o contágio por micobactérias não-tuberculosas. Nesse caso, o tratamento é padronizado pelo Ministério da Saúde, com protocolo e medicações diferentes dos recomendados para *M. tuberculosis*.

O estudo permitiu conhecer o comportamento dos níveis de resistência ao longo dos anos, sendo observados na RP níveis inicialmente crescentes, mas que declinaram nos últimos anos. Tal comportamento este que pode estar relacionado à investigação ampliada de casos novos, bem como à redução das fontes resistentes circulando na comunidade.

Na RA, os níveis verificados apresentaram declínio progressivo, mas com percentuais ainda elevados. Quando comparados com a RP, nos anos iniciais os níveis foram até 28 vezes maiores, caindo para cinco vezes nos últimos seis anos.

Na MDR primária, a redução observada ao longo do estudo foi de 80% e na MDR adquirida foi ainda maior (82%). Os níveis verificados ao longo do estudo representaram para a MDR combinada, uma redução de 73% em relação aos registros nos primeiros anos.

Uma das principais causas da resistência é o abandono do tratamento. A redução dos níveis de abandono entre casos novos foi de aproximadamente 60% e entre casos tratados de 24%, evidenciando maior adesão ao tratamento. Essa redução se sustenta quando confrontada com a MDR em níveis progressivamente decrescentes, permitindo inferir que houve melhoria no controle da tuberculose ao longo do estudo, ou seja, maior adesão ao tratamento, maior regularidade (não-interrupção do uso) e uso correto (ingestão de todos os medicamentos do esquema em tempo adequado).

Ressalte-se que a RP pôde ser identificada, na grande maioria dos casos, pela iniciativa do LACEN-MS em realizar culturas e testes de sensibilidade com todo material suspeito. Tal medida favoreceu ajustes nos esquemas terapêuticos, redução do tempo de tratamento e redução do risco de falência, contribuindo para a redução dos níveis de resistência ao longo do estudo. Os níveis de RP encontrados no estado estão dentro do estimado para a região das Américas e, se mantidos em tais patamares, não comprometerão o sucesso do tratamento com esquemas de primeira linha. Os níveis ainda elevados de RA

refletem as dificuldades dos serviços de saúde em controlar efetivamente os novos casos de tuberculose.

Conclui-se que a investigação da resistência cresceu e houve predomínio entre casos novos. Os níveis de RA superam os de RP em mais de 20 vezes, sendo que entre os três grupos de drogas a monorresistência cresceu e a MDR e OPAD declinaram. A MDR primária e a MDR adquirida decresceram em torno de 80% e a MDR combinada em 74%.

Os percentuais de abandono entre casos novos foram reduzidos em 60% e entre casos tratados em 24%, principalmente nos últimos anos. Apesar da queda, os níveis de resistência são elevados, ameaçando o controle da tuberculose em Mato Grosso do Sul.

Quanto à avaliação realizada por RFLP, o alto grau de similaridade entre as cepas descrito para indígenas de Mato Grosso do Sul difere dos padrões descritos em outras localidades, tanto no Brasil (SUFFYS, 2000; FERRAZOLI, 2000; FANDINHO, 2000; VALIM, 2006) como em outros países (FRIEDEN, 1999; FERDINAND, 2003; VIDALÓN, 2003; HU, 2011), mesmo que essas pesquisas tenham focalizado cepas multidrogarresistentes ou HIV. Entretanto, é importante destacar que o nível de similaridade relatado entre os Inuit do Canadá (76%) (NGUYEN, 2003) e entre os Warao da Venezuela é de 78% (MAES, 2008), em comunidades indígenas onde tradicionalmente a tuberculose é mais frequente que na população geral. Em Mato Grosso do Sul, no presente estudo, 60 (78%) dos isolados da população indígena se encontravam em *cluster*, ao passo que na população não-indígena isso ocorreu com 17 (22%).

Além disto, a análise por meio de biologia molecular revelou que 22 casos apresentaram cepas com perfis únicos, indicando que também houve adoecimento por reativação endógena, assinalando dessa maneira que tanto os indígenas quanto os não-indígenas em Mato Grosso do Sul apresentam-se altamente vulneráveis ao adoecimento por tuberculose.

Verificou-se que isolados das famílias MS8E e MS8F apresentam *cluster*, com um isolado em 1999, um em 2000, um em 2001 e, recentemente, outro em 2011, fato que já foi relatado por Suffys (2000), dada a estabilidade da sequência de inserção e permanência do bacilo na comunidade.

Na família MS10, o grupo MS10A abrange isolados oriundos de presídios, dos anos 2003 e 2011.

Validando os achados oriundos da genotipagem, foi possível verificar que o maior número de casos, assim como as maiores incidências registradas no SINAN, concentraram-se nas populações indígenas adscritas aos Polos-Base de Dourados e Amambai, indicando dessa maneira que há ganhos na compreensão da transmissão quando se associam abordagens da epidemiologia clássica com as da epidemiologia molecular.

Em Amambai e Dourados, a proximidade das aldeias com os centros urbanos, permitindo contatos frequentes entre indígenas e não-indígenas, constitui fator determinante para o contágio. Nesse sentido, a análise do dendrograma indica que pode ter havido transmissão de *M. tuberculosis* entre indígenas e não-indígenas. Ademais, assim como descrito por Jerebet *et al.* (1993), pode haver ocorrido transmissão nosocomial, pois isolados do grupo MS8C (com perfis iguais) foram isoladas de um paciente indígena e de um profissional de saúde do HPE.

Todavia, um agrupamento de casos de tuberculose (*cluster*) pode nem sempre ser produto de infecção recente, pois alguns autores afirmam que cepas idênticas podem ser isoladas de pacientes que nunca tiveram contato (VAN DEUTEKOMET *et al.*, 2004; BRADEN, 1997) – fato verificado no grupo MS10A, em que um paciente de um hospital público apresentou o mesmo isolado que um de presídio, tendo o primeiro atividade profissional de caminhoneiro, sendo HIV-positivo e com óbito recente, sem vínculo epidemiológico aparente.

Nesse sentido, quando se comparam as 128 cepas de *M. tuberculosis* identificadas neste estudo com um banco de aproximadamente 500 perfis genéticos isolados em São Paulo (dados não mostrados) (FERRAZOLI, 2000), verifica-se que apenas duas cepas da família F (F e F3) apresentaram perfis semelhantes aos descritos naquele município, sendo que um dos pacientes residia em Dourados e não era indígena, como já descrito por Cunha em 2003. Embora reavaliados com perfis de não-indígena no presente estudo, não houve nenhum acréscimo em relação à similaridade com o banco de cepas de São Paulo.

Os dados aqui mostrados apresentam algumas limitações em termos de cobertura, pois não foi possível realizar a análise genética de todas as culturas em que houve crescimento de *M. tuberculosis*. Outra limitação é que as análises foram realizadas em um centro de pesquisa situado em fora do estado em que os dados foram coletados. Esse fato dificultou o estabelecimento de vínculos epidemiológicos entre os casos identificados, dada

a alta mobilidade da população indígena e a exiguidade do tempo para a realização de entrevistas.

A despeito dessas limitações, os achados deste estudo não deixam dúvidas de que a tuberculose constitui um dos principais agravos no cenário epidemiológico de indígenas em Mato Grosso do Sul.

Em decorrência disso, o serviço local se organizou de forma a concentrar esforços nos Polos-Base identificados como principais fontes de infecção. Foram implantadas ações visando interromper a transmissão recente, com diagnóstico precoce e de qualidade e início imediato do tratamento. Além disto, a partir de 2001, foram iniciadas ações voltadas a evitar o adoecimento por reativação endógena, com tratamento da infecção latente da tuberculose (ILTb) nos contatos dos doentes identificados na comunidade.

Essas ações resultaram em importante controle da enfermidade na região. Entretanto, em razão das precárias condições de vida a que estão sujeitos os indígenas em Mato Grosso do Sul, associadas a fome, desnutrição, altos índices de infestação parasitária e limitado acesso às terras, as incidências ainda permanecem próximas de 200 casos por 100 000 habitantes (Tabela 1).

6 CONCLUSÃO

A resistência a drogas antituberculose em Mato Grosso do Sul é bastante elevada em relação à média do Brasil. Torna-se necessário monitorar esses níveis, com o propósito de identificar novas áreas de risco para a resistência, implementando ações que venham reduzir essas cifras para níveis aceitáveis, além de manter a rotina de culturas e testes de sensibilidade para diagnóstico precoce da resistência e seu correto manejo.

O estudo permitiu conhecer os genótipos circulantes entre a população indígena e a não-indígena, e identificar qual foi o de maior de predomínio entre eles, com *cluster*.

A pesquisa revelou também que a família do genótipo MS8 permaneceu na comunidade por um longo período, de 12 anos.

Foi possível identificar quais isolados estão em *cluster*, com possibilidade de transmissão recente entre eles, e quais são perfis únicos, podendo significar infecção endógena. Tais achados reforçam a importância do diagnóstico precoce e quimioprofilaxia na comunidade.

Para uma melhor caracterização dos perfis genéticos das cepas circulantes na região e um efetivo controle da tuberculose, são necessários importantes investimentos. Somente dessa forma será possível incorporar à rotina dos serviços investigações mais criteriosas acerca da dinâmica de transmissão da tuberculose na população em estudo, e buscar por meio de políticas intersetoriais reduzir as desigualdades observadas em Mato Grosso do Sul.

Referências

- Agasino CB, Ponce de Leon A, Jasmer RM, Small PM. Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains in San Francisco that do not contain IS6110. **Int J Tuberc Lung Dis**, 2:518-20, 1998.
- Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, Drucker E, Boom BR. Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. **N Engl J Med**, 330:1710-6, 1994.
- Alonso V, Paul R, Barrera L, Ritacco V. Falso Diagnóstico de tuberculose por cultivo. **Medicina**. Buenos Aires, 67: 287-294, 2007.
- Amarante JM, Costa VLA. A tuberculose nas comunidades indígenas brasileiras na virada do século. **Bol Pnemolog Sanit**, 8(2): jul./dez. 2002.
- Araújo AK, Menezes EA, Santos CD, Cunha FA, Campelo CL. Avaliação da resistência de drogas antituberculosas no estado do Ceará no período de 2000-2002. **Rev Bras Anal Clín.**;37(1):15-8, 2005.
- Baruzzi RG, Barros VL, Rodrigues D, Souza ALM, Pagliaro E. Saúde e doença em índios Panará (Kreen-Akarôre) após vinte cinco anos de contato com o nosso mundo, com ênfase na ocorrência da tuberculose (Brasil Central). **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 17(2):407-12, mar./abr. 2001.
- Basta PC, Coimbra Jr. CEA, Escobar AL, Santos RV, Alves LCC, Fonseca LS. Survey for tuberculosis in an indigenous population of Amazonia: the Suruí of Rondônia, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100: 579-585, 2006.
- Bauer J, Thomsen VO, Poulsen S, Anderson AB. False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. **J Clin Microbiol**, 35:988-91, 1997.
- Bauer J, Kok-Jensen A, Farurschou P, Thuensen J, Taudorf E, Anderson AB. A prospective evaluation of the clinical value of nation-wide DNA fingerprinting of tuberculosis isolates in Denmark. **Int J Tuberc Lung Dis**, 4:295-9, 2000.
- Black FL. Infecção mortalidade e populações indígenas homogeneidade biológica como possível razão para tantas mortes. In: Santos RV. (Org.). **Saúde e povos indígenas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 63-87, 1994.
- Beck-Sagué, Dooley SW, Hutton MD, Otten J, Breeden A, Crawford JT, Pichenik AE, Woodley C, Cauthen G, Jarvis WR. Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections: factors in transmission to staff and HIV-infected patients. **JAMA**, 268: 1280-6, 1992.
- Behr MA, Small PM. Molecular fingerprint of *Mycobacterium tuberculosis*: how can it help the clinician? **Clin Infect Dis**, 25:806-10, 1997.
- Bifani PJ, Plikayts BB, Kapur AB et al. Origin and interstate spread of a New York City multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. **JAMA**, 275:452-7, 1996.

Braden CR, Templeton GL, Cave MD, Valways S, Onorato IM, Castro Kg, Moers D, Yang Z, Stead WW, Bates JH. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a State with a large rural population. **J Infect Dis**, 175:1446-52, 1997.

Braga JU, Barreto AMW, Hijjar MA. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995-97, IERDTB. Parte III: Principais resultados. **Bol. Pneumol. Sanit.** 2003;11(1):76-81.

BRASIL. UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA A TUBERCULOSE E DOENÇAS PULMONARES. **Gerência de rede de laboratórios de tuberculose** (Título original: International Course on Management of Tuberculosis laboratory. Net work in LowIncome Contries. Ottawa – Canada. October 2–13, 2000) 2ª edição atualizada. Brasília – DF, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. **Centro de Referência Prof. Hélio Fraga**. Rio de Janeiro, 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz.. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Educação a Distância. **Controle da Tuberculose: uma proposta de Integração Ensino-Serviço**. 5ª ed. Rio de Janeiro: 6ª ed. FIOCRUZ/ENSP; 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**, 436p, 2008b .

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. I Consenso Brasileiro de Tuberculose - 1997. **J Pneumol**, 23:281-342, 1997.

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. **Tuberculose. Diagnóstico Laboratorial - Baciloscopia**. Brasília: MS, 2001. 72p. (Série TELELAB).

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro: FNS, 2002.

Buchillet DE, Gazin P. A situação na população indígena do alto rio Negro (Estado do Amazonas, Brasil). **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 14(1):181-5, jan./mar. 1998.

Campos, Hisbello S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência? **Bol. Pneumol. Sanit.**, , vol.7, no.1, p.51-64, Jun 1999.

Carmo MAS, Silvia RRF, Hamatsu LS, Avaliação da positividade em culturas para micobactérias, realizadas pelo método de Ogawa-Kudoh, frente as baciloscopias negativas. Instituto Adolfo Lutz de Santo André, SP. **Laes & Raes**, 126-132, 2002.

Caron Ruffino M, Ruffino Neto A. Associação entre alcoolismo e tuberculose pulmonar. **Rev Saúde Públ, São Paulo**, 13:183-94, 1979 .

Casper C, Singh SP, Rane S et al. The transcontinental transmission of tuberculosis: a molecular epidimemiological assessment. **Am J Public Health**, 86:551-3, 1996

Cave MD, Eisenach KD, Templeton G, Salffinger M, Mazureck G, Bates JH, Crawford JK. Stability of DNA fingerprinting pattern with IS6110 in produced strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, 32: 262-6, 1994.

Chaves F, Yang Z, El-Hajj H, Alonso M, Burman WJ, Eisenach, KD, Dronda F, Bates JH, Cave MD. Usefulness of secondary probe pTBN12 in DNA fingerprint of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, 34:1118-23, 1996.

Coelho AGV, Zamarioli LA, Vicente MP, Ferro e Silva RR. Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o isolamento de micobactérias. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 58(2):57-61, 1999.

Cohn DL, O'Brien RJ. The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries. **Int J Tuberc Lung Dis**, 2:16-26, 1998.

Chevrel-Delagi D, Abderrhman A, Haltiti R, Koubaji H, Gicquel B, Dellagi K. Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. **J Clin Microbiol**, 1:2446-50, 1993.

Coronado VG, Beck-Sagué CM, Hutton MD, Davis BJ, Nicholas P, Vilareal C, Woodley CL, Kilburn JO, Crawford JT, Frieden TR, Sinkowitz RL, Jarvis WR. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human Immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. **J Infect Dis**, 168:1052-5, 1993.

Cunha, EAT. **Avaliação epidemiológica e operacionalização para diagnóstico da Tuberculose na população indígena Guarani-Kaiowa do Estado de Mato Grosso do Sul**. Dissertação.UFMS, 2003.

Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR, Hopewell PC. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the immunodeficiency virus. An analysis using restriction fragment length polymorphisms. **N Engl J Med**, 326:231-5, 1992.

Das S, Paramasivan C, Lowrie DB, Prabhakar R, Narayanan N. IS6110 resticcion fragment length polimorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. **Tuberc Lung Dis**, 76:550-4, 1995.

Drobniewski F, Balabanova Y, Ruddy M, Weldon L, Jeltkova K, Brown T, Malomanova N, Elizarova E, Melentyey A, Mutovkin E, Zhakharova S, AND Ivan Fedorin I. Rifampin-and multidrug-resistant tuberculosis in Russian Civilians and prison inmates: Dominance of the Beijing Strain Family. **Emerging Infectious Diseases** Vol. 8, No. 11, November, 2002

Dunlap NE, Harris RH, Benjamin WH, Harden JW, Hafner D. Laboratory contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. **AM J Respir Crit Care Med**, 152:1702-4,1995

Edlin BR, Tokars JI, Grieco H, Crawford JT, William J, Sordillo M, Ong KR, Kilburn JO, Doley SW, Castro KJ, Jarvis WR, Holmberg SD. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired imunodeficiency syndrome. **N Engl J. Med**, 326:1514-21, 1992.

Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, 26:2240-5, 1988.

Escobar AL, Coimbra Jr CEA, Camacho LA, Portela MC. Tuberculose em populações indígenas de Rondônia, Amazônia, Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 17(2):285-298, mar./abr., 2001.

- Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. **N Engl J Med**;344(17):1294-303, 2001
- Fandinho FCO, Kritski AL, Hofer C, Conde H, Ferreira RMC, Saad MHF, Silva MG, Riley LW, Fonseca LS. RFLP and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 94:271-5, 2000.
- Fandinho FCO, Fonseca LS. Epidemiologia molecular da tuberculose. **Rev Ciênc Farm**, São Paulo, 18(1):57-73, 1997.
- Faustini A, Hall AJ, Perucci CA. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. **Thorax**;61(2):158-63, 2006
- Ferreira MMC, Ferrazoli L, Palaci M, Salles PS, Medeiros AS, Novoa P, Kiefer CR, Schecthmann M, Kritski A, Johnson WD, Riley LW, Ferreira O. Tuberculosis and HIV infection among female inmates in São Paulo, Brazil: a prospective cohort study. **J Acquir Immune Defic Syndr**, 13:177-83, 1996.
- Ferrazoli L, Palaci M, Marques LRM, Jamal LF, Afiune JB, Chimara E, et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**; 4:1-8, 2000.
- Fiúza de Melo FA, Afiune JB. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. **J Pneumol**, 19:19-24, 1993.
- Fiúza de Mello, FA , Afiune, JB. Ide neto, j., almeida, e., a., spada, d. t. a., Antel, A. NL., Cruz, ML. I. Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, n. 36; 733-40, 2003.
- Fomukong NG, Tang TH, A-Maamary S, Ibrahim WA, Ramayah S, Yates M, Zanuddin ZF, Dale JW. Insertion sequence typing of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. **Tuberc Lung Dis**, 75:435-40, 1994.
- FUNASA. Relatório anual de gestão 2010 – Ações do DSEI/MS. Fundação Nacional de Saúde, **Coordenação Regional de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande, 2010.
- Gerhardt Filho G, Hiiar M. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Brasil. **J. Pneumol**, 19(1):4-10, mar. 1993.
- Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen DE. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. **Emerg Infect Dis**, 8(8), 2002.
- Godfrey-Fausset P, Stoker NG. Aspects of tuberculosis in Africa. Genetic fingerprinting for clues to the pathogenesis of tuberculosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 86:472-5, 1992.
- Gonçalves H. A tuberculose ao longo dos tempos. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, 7(2):303-25, jul./out. 2000
- Gutiérrez MC, Vincent V, Aubert DE, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, Pendeven C, Le Pennec MP, Mathieu DE, Offredo C, Pagon B, Pierre-Audigier C. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. **J Clin Microbiol**, 37:3975-9, 1999.

Goble M, Iseman MD, Madsen LA, Waite D, Ackerson L, Horsburgh CR Jr. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. **N Engl J Med.**1993;328(8):527-32.

Gómez i Prat J. **A tuberculose nas populações indígenas das Américas: com uma visão especial para as populações indígenas do norte da Amazônia; uma revisão de literatura.** Dissertação - Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ. 2000.

Haas WH, Engelmann G, Amthor B, Shyamba S, Mugala F, Felten M, Rabbow M, Leichsenring M, Oosthizen OJ, Bremer HOJE. Transmission dynamics of tuberculosis in a high-incidence country: prospective analysis by PCR DNA fingerprinting. **J Clin Microbiol**, 37:3975-9, 1999.

Hermans PWM, van Soolingen DE, Dale JW, Schutema AR, McAdam RA, Catty DE, van Ebdén JDA. Insertion element IS (86 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **J Clin Microbiol**, 28:2051-8, 1990.

Hermans PWM, Messadi F, Guebresabher H, van Soolingen DE, Has PEW, Herrsma H, de Neweling H, Ayoub A, Portaels F, Frommel DE, Zribi M, van Edden JDA. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. **J Infect Dis**, 171:1504-13, 1995.

Hökerberg YHM, Duchiae MP, Barcellos B. Organização e qualidade da assistência à saúde dos índios Kaigáng do Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 17(2):261-272, mar./abr. 2001.

Hopewell PC, Small P. Applications of molecular epidemiology to the prevention control, and study of tuberculosis. In: Rom, WN, Garay SM (Eds.). **Tuberculosis**. New York: Little, Brown and Company, 113-27,. 1996.

Hu YI, Mathema B, Jiang W, Kreiswirth B, Weibing W, Xu B. Transmission pattern of drug-resistant tuberculosis and implication for tuberculosis control in eastern rural China. **PloS ONE**, vol: 6(5), 2011.

Jardim PCR, Zamarioli LA, Coelho AGV, Figueiredo TR, Rozman MA. Resistência do

Mycobacterium tuberculosis às drogas no município de São Vicente. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 2001;60:119-23.

Jasmer RM, Roemer M, Hamilton J, Bunter J, Braden CR, Shinnick TM et al. A prospective, multicenter study of laboratory cross - contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. **Emerg Infect Dis**, 8(11), 2002.

Jereb JA, Burwen DR, Dooley SW, Haas WH, Crawford JT, Geiter LJ, Edmond MB, Dowling JN, Shapiro R, Pasculle AW, Shanahan SL, Jarvis WR. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J Infect Dis**, 168:1219-24, 1993.

Kent RJ, Utley AHC, Sotcker NG, Miller R, Poziniak AL. Transmission of tuberculosis in a British center for patients infected with HIV. **BMJ**, 309:639-40, 1994.

Kline SE, Hedemark LL, Davies SF. Outbreak of tuberculosis among regular patrons of a neighborhood bar. **N J Engl Med**, 333:222-7, 1995.

McNabb, Braden CR, Navin TR. DNA Fingerprint of *Mycobacterium tuberculosis*: lessons learned and implications for the future. **Emerg Infect Dis**, 8(11), 2002.

Maes M, Kremer K, Soolingen DV, Takiff H, Waard JH. 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. **Tuberculosis**, vol. 88, 490-494, 2008.

Marques AMC, Cunha RV. A medicação assistida e os índices de cura de tuberculose e de abandono de tratamento na população indígena Guarani-Kaiúá no município de Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Cad Saude Publica**, 19 (5):1405-1411, 2003

Mazureck GH, Cave MD, Eisenach KD, Wallace RJ, Bates JH, Crawford JT. Chromosome DNA fingerprinting patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. **J Clin Microbiol**, 29:2030-3, 1991.

McAdam RA, Hermans PWM, van Sooligen DE, Zanuidin ZF, Catty DE, van Embden JDA, Dale JW. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. **Mol Microbiol**, 4:1607-13.

Mendes JM, Lourenço MC, Ferreira RMC, Fonseca LS, Saad MHF. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from sputum samples from symptomatic outpatients: Complexo de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. **J Bras Pneumol**. 2007;33(5):579-82.

Nguyen D, Proulx JF; Westley J ; Louise T, Dery S, Behr M. Tuberculosis in the Inuit Community of Quebec, Canada. **Am J Respir Crit Care Med**. Vol. 168:1353-1357, 2003

Nutels N, Nunes de Miranda JA, Beigel I, Yamasaki I, Hautequest AF. Atividades do SUSA em 18 aldeamentos de índios do sul de Mato Grosso. **Revista do Serviço Nacional de Tuberculose**, 77-83, 1967.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Grupos em riesgo. **Informe de la OMS sobre la epidemia de tuberculosis**, 1996.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. União Internacional Contra a Tuberculose e Doenças Pulmonares. Instituto Adolfo Lutz. **Gerência de Rede de Laboratórios de Tuberculose**, módulos 1, 2, 3 e 4. São Paulo: IAL, 2002.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Los servicios de laboratorio en el control de la tuberculosis**. Ginebra, Suiza: OMS, 1988. Partes 1, 2 e 3.

Pablo-Méndez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance, **The New England Journal of Medicine** v. 338, n. 23, p. 1641-1649, jun, 1998.

Park YK, Bai GH, Kim SJ. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the Western Pacific Region. **J Clin Microbiol**, 38: 191-7, 2000.

Pineda-Garcia I, Ferreira A, Hoffner SE. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. **J Clin Microbiol**, 35: 2393-7, 1997.

- Ramos MC, Soini H, Roscanni GC, Jacques M, Villares MC, Musser JM. Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. **J Clin Microbiol**, 37: 916-9, 1969.
- Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA**, 273:220-6, 1995.
- Ribeiro FKC, Lemos EM, Hadad DJ, Leão SC, Viana-Niero, Dietze R, Jonhson Eisenach KD, Palaci M. Evaluation of low colony-number counts of *M. tuberculosis* on solid media as a microbiological markers of cross-contamination. **J ClinMicrobiol** , p.1950-1952, 2009.
- Safi, H, Aznar J, Palomares JC, Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville, Spain. **J Clin Microbiol**, 35:2472-6, 1997.
- Samper, S, Inglesias MJ, Rabanaque MJ, Lezcano MA, Vitoria LA, Rubio MC, Gómez-Lus R, Gómez LI, Otal I, Martin C. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. **Int J Tuberc Lung Dis**, 2:281-7, 1998.
- Shafer RW, Small PM, Larkin C, Singh SP, Kelly P, Sierra, Schoolnik G, Chirgwin KD. Temporal trends and transmission patterns during the emergence of multidrug-resistant tuberculosis in New York City: a molecular epidemiologic assessment. **J Infect Dis**, 171:170-6, 1995.
- Small PM, McClenny NB, Singh SP, Schoolnik GK, Tmpkins LS, Mickelsen PA. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. **J Clin Microbiol**, 1993; 31:1677-82.
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Scheter GF, Daley CL, Schoolnik GK. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. **N England J Med**, 330:1703-9, 1994.
- Small PM, Shafer RW, Hopewell PC et al. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. **N England J Med**, 328:1137-44, 1993.
- Souza MB, Antunes CM, Garcia GF. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* at a referral center for infectious diseases in the state of Minas Gerais, Brazil: sensitivity profile and related risk factors. **J Bras Pneumol.**, 26;32(5):430-7.
- Stead WW, Senner JW, Reddick WT, Lofgren JP. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. **N England J Med**, 322:422-7, 1990.
- Srträssle A, Putnik J, Weber R, Fehr Merhof A, Wüst J, Pfyffer GE. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in a human immunodeficiency virus cohort in Switzerland. **J Clin Microbiol**, 35: 374-8, 1997.
- Suffys, PN, Ivens de Araújo ME, Degraive WM. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 92:297-316, 1997.
- Susemichi MAMM, Ferrazoli L, Ueki SYM, Gimenez RD, Palaci M. Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias. **Rev Bras Patol Clin**, 2951-3, 1993.

- Tabet SR, Goldbaum GM, Hooton TN, Eisenach KD, Cave MD, Nolan CM. Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. **J Infect Dis**, 169:189-92, 1994.
- Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Nucleic Acids Res**, 18:188, 1990a.
- Thierry D, Brisson-Noel A, Vicent-Lévy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insert sequence IS6110, and its application in diagnosis. **J Clin Microbiol**, 28:2668-73, 1990b.
- Thierry D, Matisiote-Bernard P, Pitsouni E, Costopoulos C, Guesdon JL. Use of the insertion element IS6110 for DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates presenting various profiles of drug susceptibility. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 287-98, 1993.
- Torrea G, Levee G, Grimont P, Martin C, Chanteau S, Gicquel B. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. **J Clin Microbiol**, 33:1899-904, 1995.
- Torrea G, Offredo C, Simonetti M, Gicquel B, Berche B, Pierre-Audigier C. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J Clin Microbiol**, 34:1043-9, 1996.
- van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Herman P, Martin C, McAdam R, Schinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprint: recommendations for a standardized methodology. **J Clin Microbiol**, 31:406-9, 1993.
- van Rie A, Warren R, Richardson M, Vitor TC, Gie RP, Enarson DA, Beyers N, van Helden PD. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. **N England J Med**, 341:1174-79, 1999.
- van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Soll DR, van Embden JDA. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J Clin Microbiol**, 29:2578-86, 1991.
- van Soolingen D, Haas PEW, Groenen PMA, van Embden JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, 31: 1987-95, 1993.
- Vargas LCO, Franco CIL, Blanco EG, Ramos OQ, Moreno AIU. El cultivo de esputo para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. **Biomedicina**, 5:24-25, 1985.
- Vargas LCO, Leon CI, Riviera MB. El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar por cultivo de esputo en unidades de salud con recursos mínimos. **Biomedicina**, 7:35-36, 1987.
- Valim ARM, Possuelo GL, Cfrune PI, Borges M, Ribeiro MO, Rossetti, ZAHA A. Evaluation and genotyping of multidrug-resistant cases of tuberculosis in Southern Brazil. **Microbial Drug resistant**. Vol.12(3), 2006.
- Vieira RCA, Fregona G, Palaci M, Dietze R, Maciel ELN. Perfil epidemiológico dos casos de tuberculose multirresistente do Espírito Santo. **Rev Bras Epidemiol**, 2007;10(1):56-65.

Wenger PN, Otten J, Breeden A, Orfas De, Beck-Sagué CM, Jarvis WR. Control on nosocomial transmission of multidrug resistant *M. tuberculosis* among health care workers and HIV-infect patients. **Lancet**, 345:235-9, 1995.

WHO - World Health Organization. The Global Plan to Stop TB 2011-2015: Transforming the fight towards elimination of tuberculosis. WHO report 2010. Disponível:
http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf com
acesso em 03/08/2011

WHO - World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009. Disponível em:
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf com acesso em
20/07/2011.

WHO - World Health Organization. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World. **Fourth Global Report**. The WHO/IUATLD. Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007. Geneva: WHO; 2008.

WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Programme: **Guidelines for the Management of Drug-Resistance** Tuberculosis, Geneva: WHO; 1977.

Wilkinson DE, Pillay M, Crump J, Lombard C, Davies GR, Sturm AW. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in rural Africa. **Trop Med Int Health**, 2:747-53, 1997.

Yang ZH, de Haas PEW, van Soolingen DE, van Embden JDA, Andersen ÅB. Restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* strain isolated from Greenland during 1992: evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. **J Clin Microbiol**, 32: 3018-25, 1994.

Yang ZH, Mtoni I, Chonde M, Mwasekaga M, Fuursted K, Askgård DS, Bennedsen J, de Haas PEW, van Soolingen DE, van Embden JDA, Andersen ÅB. DNA fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. **J Clin Microbiol**, 33: 1064-9, 1995a.

Yang ZH, De Haas PEW, Wachmann CH, van Soolingen DE, van Embden JDA, Andersen ÅB. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. **J Clin Microbiol**, 33:2077-81, 1995b.

Yuen LKY, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of *M. tuberculosis* strains from vietnamese patients by southern blot hybridization. **J Clin Microbiol**, 31:1615-8, 1993.

Anexo A. Lista de isolados de *M. tuberculosis* que foram submetidos a técnica de RFLP, com data da coleta da amostra, localidade e/ou origem, de municípios de Mato Grosso do Sul.

RFLP	NÚMERO DA AMOSTRA	IDADE (ANOS)	DATA DA COLETA DA AMOSTRA	LOCALIDADE(origem)	MUNICÍPIO
PU	02/1132	38	04/12/2002	Hospital São Julião	Campo Grande
PU	02/983	65	29/10/2002	Hospital Universitário	Campo Grande
PU	03/1286	50	18/09/2003	UBS	Rio Brilhante
PU	11/1806	33	12/04/2011	PRESIDIO	Campo Grande
PU	11/2257	53	28/06/2011	UBS	Paranaíba
PU	11/2655i	25	19/05/2011	Pirajuí	Paranhos
PU	04/1892i	73	23/08/2004	Limão Verde	Amambai
PU	93	38	20/02/2001	UBS	Miranda
PU	281	43	13/07/2001	Jaguapiru	Dourados
PU	829	33	24/10/2001	Missão	Dourados
PU	289	23	17/07/2001	Porto Lindo	Paranhos
PU	04/305	55	29/01/2004	UBS	Rio verde
PU	03/306	49	24/03/2003	Serrito	Eldorado
PU	03/1270	31	17/09/2003	UBS	Campo Grande
PU	03/237	42	28/02/2003	UBS	Campo Grande
PU	03/1640	51	13/11/2003	Presídio	Campo Grande
PU	03/826	46	11/07/2003	UBS	Campo Grande
PU	03/416i	49	27/08/2003	Bororo	Dourados
PU	03/855	58	17/07/2003	Hospital São Julião	Campo Grande
PU	803	34	30/10/2001	UBS	Dourados
PU	03/785	66	03/07/2003	Hospital São Julião	Campo Grande
PU	03/587	24	21/05/2003	Hospital São Julião	Campo Grande
MS1	202	21	01/06/2001	Jaguapiru	Dourados
MS1	340	17	27/07/2001	Jaguapiru	Dourados
MS1	304	17	03/08/2001	Jaguapiru	Dourados
MS1	318	17	30/07/2001	Jaguapiru	Dourados
MS1	304	17	03/08/2001	Jaguapiru	Dourados
MS2	03/175i	36	29/04/2003	(sem informação)	Aral Moreira
MS2	04/190i	11	14/05/2003	Bororo	Dourados
MS2	04/224i	41	30/07/2004	Caarapo	Caarapó
MS2	03/1284	24	17/09/2003	UBS	Dourados
MS2	03/93	93	09/01/2004	UBS	Dourados
MS2	03/1407i	39	07/10/2003	Caarapo	Caarapo
MS2	04/224i	39	30/07/2004	Caarapo	Caarapo
MS2	192	22	23/03/2000	Caarapo	Caarapo
MS2	272	19	12/07/2001	Sardinha	Dourados
MS2	288	61	06/07/2001	Bororo	Dourados
MS2	472	13	02/08/2000	Bororo	Dourados
MS2	525	40	21/10/2000	Jaguapiru	Dourados
MS2	697	50	16/10/2000	Porto Lindo	Japorã

RFLP	NÚMERO DA AMOSTRA	IDADE (ANOS)	DATA DA COLETA DA AMOSTRA	LOCALIDADE(origem)	MUNICÍPIO
MS2	698	17	25/11/1999	Gaimbé	Cel Sapucaia
MS2	741	19	20/09/2001	Bororo	Dourados
MS2A	11/2843i	27	30/06/2011	Amambai	Amambai
MS2A	195	19	27/03/2000	Taquaperi	Cel Sapucaia
MS2A	588	27	14/10/1999	Limão Verde	Amambai
MS2A	396	23	01/10/2001	Bororo	Dourados
MS2A	03/75	75	12/03/2003	Jaguapiru	Dourados
MS2A	04/1309	39	17/06/2004	La lima	Miranda
MS3	04/152i	42	11/05/2004	Bororo	Dourados
MS3	158	23	12/04/2001	Amambai	Amambai
MS3	16	25	11/01/2000	Bororo	Dourados
MS3	46	36	26/01/2000	Limão Verde	Amambai
MS3	422	16	24/10/2001	Limão Verde	Amambai
MS3	349	16	15/08/2001	Limão Verde	Amambai
MS3	703	57	25/11/1999	Jarará	Caarapo
MS3	03/1209	23	05/09/2003	Amambai	Amambai
MS3	158	23	12/04/2001	Amambai	Amambai
MS3	04/184 i	42	15/06/2004	Bororo	Dourados
MS3	422	16	24/10/2001	Limão Verde	Amambai
MS3	35429	34	28/09/2001	Jaguapiré	Tacuru
MS3 *	03/1166	71	01/09/2003	Porto Lindo	Japorã
MS4	63	28	07/02/2000	Amambai	Amambai
MS4	593	28	08/02/2000	Amambai	Amambai
MS4	11/2498	44	06/05/2011	Amambai	Amambai
MS4	18	23	12/01/2000	Amambai	Amambai
MS5	11/3186	47	10/06/2011	Presídio	Campo Grande
MS5	11/3205	38	10/06/2011	Hospital Universitário	Campo Grande
MS5	11/3821	43	06/07/2011	Presídio	Campo Grande
MS5*	114	16	02/02/2000	Guaimbé	Coronel Sapucaia
MS6	239	40	14/04/2000	Dourados	Dourados
MS6	246	48	14/04/2000	Porto Lindo	Japorã
MS6	251	48	17/04/2000	Porto Lindo	Japorã
MS7	536	8	05/10/1999	Amambai	Amambai
MS7*	278	12	13/07/2001	Missão	Dourados
MS7~	04/2523	54	26/10/2004	UBS	Campo Grande
MS8	04/198i	19	16/06/2004	Bororo	Dourados
MS8	238	28	13/06/2001	Missão	Dourados
MS8	378	28	20/02/2001	Bororo	Dourados
MS8	405	19	09/10/2001	Bororo	Dourados
MS8	458	29	19/11/2001	Bororo	Dourados
MS8	770	42	05/12/2000	Caarapó	Caarapó
MS8	04/306	55	29/01/2004	UBS	Rio Verde
MS8	03/214i	22	25/05/2003	Bororo	Dourados

RFLP	NÚMERO DA AMOSTRA	IDADE (ANOS)	DATA DA COLETA DA AMOSTRA	LOCALIDADE(origem)	MUNICÍPIO
MS8	04/324i	28	09/07/2004	Bororo	Dourados
MS8A	620	25	28/10/1999	Gassuty	Amambai
MS8A	623	25	28/10/1999	Guassuty	Amambai
MS8B	33	48	17/01/2001	Amambai	Amambai
MS8B	79	48	07/02/2001	Amambai	Amambai
MS8B	165	35	23/04/2001	Bororo	Dourados
MS8B	03/307i	37	07/07/2003	Sassoro	Tacuru
MS8B	04/290i	33	15/09/2004	Jaguapiru	Dourados
MS8B	247	62	02/06/2001	Dourados	Dourados
MS8B	614	12	22/10/1999	Taquaperi	Coronel Sapucaia
MS8B*	541	37	06/10/1999	Pirakuá	Antonio João
MS8B*	04/209	45	03/07/2004	Sardinha	Dourados
MS8C	271	22	12/07/2001	Itaum	Dourados
MS8C	331	22	02/08/2001	Itaum	Dourados
MS8C	267	47	10/07/2001	Missão	Dourados
MS8D	461	51	19/11/2001	Bororo(Paraguai)	Dourados
MS8D	462	51	20/11/2001	Bororo(Paraguai)	Dourados
MS8D	450	28	26/07/2000	Bororo	Dourados
MS8D	489	28	07/08/2000	Bororo	Dourados
MS8~	400	11	03/10/2001	Bororo	Dourados
MS8~	04/431	37	22/11/2004	Missão	Dourados
MS8~	11/2254i	81	14/04/2011	Paranhos	Paranhos
MS8~	403	58	04/10/2001	Bororo	Dourados
MS8~	500	18	11/08/2000	Jaguapiru	Dourados
MS8E	401	23	03/10/2001	Bororo	Dourados
MS8E	404	23	04/10/2001	Bororo	Dourados
MS8E	609	17	20/10/1999	Caarapo	Caarapo
MS8E	02/1161	18	10/12/2002	UBS	N. Alvorada do Sul
MS8F	96	41	15/02/2000	Taquaperi	Cel Sapucaia
MS8F	11/3690	38	1/09/2011	Amambai	Amambai
MS8F	11/2858	33	03/10/2011	Taquaperi	Cel. Sapucaia
MS8G	03/1900i	22	9/12/2003	Amambai	Amambai
MS8G	29	24	13/01/2000	Amambai	Amambai
MS8H	03/340i	17	03/08/2001	Jaguapiru, 550	Dourados
MS8H	03/1069	59	18/08/2003	Hospital São Julião	Naviraí
MS8H	03/1385	27	06/10/2003	Hospital Universitário	Campo Grande
MS8H	03/1359i	23	26/09/2003	Gassuty	Amambai
MS8H	03/1899i	22	09/12/2003	Amambai	Amambai
MS8H*	04/1961	24	01/09/2004	Sassoro	Tacuru
MS8H*	11/1324	29	2011	Limão Verde	Amambai
MS8 I	03/591i	18	12/12/2003	Bororo	Dourados
MS8 I	03/597i	18	12/12/2003	Bororo	Dourados
MS9	04/1895i	35	23/08/2004	Taquaperi	Cel. Sapucaia

RFLP	NÚMERO DA AMOSTRA	IDADE (ANOS)	DATA DA COLETA DA AMOSTRA	LOCALIDADE(origem)	MUNICÍPIO
MS9	04/1896i	35	24/08/2004	Taquaperi	Cel. Sapucaia
MS9*	48	25	26/10/2000	Amambai	Amambai
MS9*	448	65	05/11/2001	Taquaperi	Cel. Sapucaia
MS10~	11/3107	37	01/04/2011	UBS	Corumbá
MS10~	03/1386	42	06/10/2003	Hospital Universitário	Campo Grande
MS10~	03/982	32	01/08/2003	Areias/SP	Água Clara
MS10A	11/3351	30	17/06/2011	Presidio	Campo Grande
MS10A	11/3181	35	08/06/2011	Presidio	Campo Grande
MS10	04/2259	37	30/10/2004	Presidio	Água Clara
MS10	03/1748	41	21/11/2003	Presídio	Campo Grande
MS10*	11/1714	35	18/02/2011	UBS	Ponta Porã
MS10~	344	34	09/08/2001	Jaguapiru	Dourados
MS10~	02/513	42	09/07/2003	UBS	Itaquirai
MS10~	03/529i	37	19/11/2003	Jaguapiru	Dourados
MS10~	03/471	73	25/04/2003	UBS	Campo Grande
MS11	446	47	05/11/2001	Miranda	Miranda
MS11	451	47	06/01/2001	Passarinho	Miranda
MS12	03/1093	58	18/05/2004	Santa Casa	Campo Grande
MS12	03/1341	41	24/09/2003	UBS	G. L. da Laguna
MS12*	03/1629	63	13/11/2003	UBS	Aquidauana
2 BANDAS	02/871	18	07/10/ 2002	UBS	Água Clara
4 BANDAS	555	39	07/10/1999	Porto Lindo	Japorã
4 BANDAS	576	43	13/10/1999	Taquaperi	Cel. Sapucaia