

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Epidemiologia molecular e perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* em regiões de fronteira do Brasil

MARIANA BENTO TATARA

**Dourados - MS
2019**

MARIANA BENTO TATARA

Epidemiologia molecular e perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* em regiões de fronteira do Brasil

Área do CNPq: 40101096

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Julio Henrique Rosa Croda
Co-orientadora: Dra. Flávia Patussi Correia Sacchi

**Dourados - MS
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

T216e Tatara, Mariana Bento

Epidemiologia molecular e perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* em regiões de fronteira do Brasil [recurso eletrônico] / Mariana Bento Tatara. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Julio Henrique Rosa Croda.

Coorientadora: Flávia Patussi Correia Sacchi.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Tuberculose. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Genotipagem. 4. Transmissão recente. 5. Prisão. I. Croda, Julio Henrique Rosa. II. Sacchi, Flávia Patussi Correia. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



UFPGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR MARIANA BENTO TATARA, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO “DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO-PARASITÁRIAS”.

Aos três dias de maio de dois mil e dezenove, às oito horas, em sessão pública, realizou-se na Sala de Videoconferência da Biblioteca da Unidade II - Térreo da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada “Epidemiologia molecular e perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* em regiões de fronteira do Brasil” apresentada pela doutoranda **MARIANA BENTO TATARA**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof. Dr. Júlio Henrique Rosa Croda/UFPGD/UFMS (presidente/orientador), Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão/(UFPGD) (membro titular), Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli/(IAL/SP)(membro titular), Dra. Eunice Atsuko Totumi Cunha/(LACEN/MS) (membro titular), Dra. Marli Marques/(Ministério da Saúde) (membro titular) e Dra. Suzana Meira Ribeiro/(UFPGD) (membro suplente). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer a candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata ter apresentado a sua Tese, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada APROVADA, fazendo jus ao título de DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os membros da banca abaixo assinado atestam que a Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli participou de forma remota desta defesa de tese, considerando a candidata APROVADA, conforme declaração anexa. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados, 03 de maio de 2019.

Prof. Dr. Júlio Henrique Rosa Croda _____
 Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão _____
 Dra. Eunice Atsuko Totumi Cunha _____
 Dra. Marli Marques _____
 Profa. Dra. Lucilaine Ferrazoli _____ - Participação Remota

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PROPP/ UFPGD.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

UFGD
Universidade Federal
da Grande Dourados

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM: CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO-PARASITÁRIAS

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA - SÍNCRONA - EM BANCA DE DEFESA DE
DOUTORADO/ UFGD**

Às 08h do dia três de maio de dois mil e dezenove (03/05/2019), participei de forma síncrona com os demais membros que assinam a ata física deste ato público, da Defesa de Tese de Doutorado intitulado **"Epidemiologia molecular e perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* em regiões de fronteira do Brasil"** da discente MARIANA BENTO TATARA, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Considerando o trabalho avaliado, as arguições de todos os membros da banca e as respostas dadas pela candidata, formalizo para fins de registro, por meio deste, minha decisão de que a candidata pode ser considerada: APROVADA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Lucilaine Ferrazoli

Instituição e Programa de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

Às pessoas que enfrentam a tuberculose e aos profissionais que se dedicam ao combate e erradicação da doença.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde e pessoas que me acompanharam nesse caminho.

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela estrutura e oportunidade como servidora e aluna.

Ao Prof. Dr. Julio Croda, orientador e parceiro, exemplo de dedicação, competência e entusiasmo no seu propósito, minha admiração e agradecimento pela confiança e incentivo, pelo conhecimento, correções e auxílio.

A minha co-orientadora Dr^a. Flávia Sacchi e aos membros da banca Dr^a. Eunice Cunha, Dr. Fábio Negrão, Dr^a. Lucilaine Ferrazoli e Dr^a. Marli Marques pela atenção e correções.

Aos colaboradores externos, parceiros da Fiocruz/RJ e UFRJ, Instituto Adolfo Lutz, equipe de Portugal (IHMT e Universidade de Lisboa), Universidade Stanford, FURG e LACENs. Especialmente a Vera Simonsen, Sidra Vasconcelos, João Perdigão, Juliana Zarate e Jaciara Diniz.

Aos meus pais, Sérgio Sovierzoski Tatara e Salete Aparecida Sovierzoski Tatara pelo amor incondicional, apoio e compreensão em todos os momentos dessa jornada, meu eterno amor, gratidão e admiração, exemplos de fé, sabedoria, caráter e doação.

Aos meus irmãos Marino Bento Tatara e Maura Bento Tatara, obrigada pelo amor, amizade, torcida e estímulos.

Pelo companheirismo e valiosa ajuda, agradeço aos funcionários, professores e amigos da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS) e Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS), em especial a Flora Moreira, Débora Brait, Cleide Tirloni, Sara Bernardes, Silvana Marchioro, Simone Simionatto, Kelly Brabes, aos parceiros de rotina Paulo Cesar Santos, Camila Camioli, Dândrea Ferrari, Bruna Silva, Rafaella Vezozzo, Andrea Carbone, Rafele Piveta, Marcelo Barbosa e a todos os alunos com quem convivo e convivi.

Agradeço a Kesia Esther da Silva pela amizade, parceria, apoio, ensinamentos e paciência. As minhas amigas de jornada internacional Angela Brandão e Amanda Ávila. As amigas de momentos de descontração Jacqueline Vieira, Renata Casaro e Patrícia Geromini.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

(Santa Madre Teresa de Calcutá)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. (A) Bacilos álcool-ácido resistentes, corados de vermelho pela técnica de Ziehl-Neelsen. (B) Crescimento de <i>M. tuberculosis</i> em meio sólido de Ogawa-Kudoh.	18
Figura 2 - Mecanismos de ação de drogas antiTB.	22
Figura 3 - Estimativa do coeficiente de incidência de TB no mundo em 2017.	27
Figura 4 - Coeficiente de incidência e óbitos por TB por unidade federada, Brasil, 2017.	28
Figura 5 - Tipagem por RFLP.	35
Figura 6 - Tipagem por MIRU-VNTR.	36
Figura 7 - Tipagem por <i>Spoligotyping</i> .	37
Figura 8 - Municípios brasileiros segundo prioridade para o controle da TB baseado nos indicadores socioeconômicos, epidemiológicos e operacionais.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema Básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes (≥ 10 anos)^a 24

Tabela 2 – Principais genes envolvidos com resistência a drogas de primeira linha antiTB. 26

Tabela 3 - Comparação de índices de TB no Brasil e seus países fronteiriços – 2017. 28

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AIDS - *acquired immunodeficiency syndrome*
BAAR - bacilo álcool-ácido resistentes
CMT - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
DOTS - *Directly Observed Treatment Strategy*
E - Etambutol
H – Isoniazida
HIV - *Human Immunodeficiency Virus*
MIRUs - *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*
MNT - micobactérias não causadoras de tuberculose
MS - Mato Grosso do Sul
MTB - *Mycobacterium tuberculosis*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PNCT - Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PVHIV - Pessoa vivendo com HIV
R – Rifampicina
RR - Roraima
RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*
SINAN - Sistema de Informação de Agravos e Notificação
TB - Tuberculose
TB-MDR - Tuberculose multirresistente
TB-RR - Tuberculose resistente a Rifampicina
TB-XDR - Tuberculose extensivamente resistente
TDO - Tratamento Diretamente Observado
TRM-TB - Teste rápido molecular para tuberculose
VNTRs - Variable Number of Repeats Tandem
Z - Pirazinamida

Epidemiologia molecular e perfil de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* em regiões de fronteira do Brasil

RESUMO

O Brasil é um dos países com maior incidência de tuberculose (TB) no mundo. Áreas de fronteira favorecem a disseminação de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) devido a presença de grupos vulneráveis e constante fluxo populacional, fatores que contribuem para a emergência de casos resistentes a drogas. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização epidemiológica-molecular de isolados de MTB de dois estados brasileiros em regiões de fronteira (Roraima e Mato Grosso do Sul) e identificar as variáveis associadas à transmissão recente da doença. O estudo também avaliou o perfil de resistência a drogas anti-TB e mecanismos moleculares envolvidos. De Janeiro/2014 a Abril/2017 foram isoladas 282 cepas. Dados epidemiológicos foram coletados através de questionário e do Sistema de Informação de Agravos e Notificação. Os perfis de susceptibilidade a drogas foram determinados usando métodos fenotípicos e GeneXpert®. Cepas resistentes foram submetidas à investigação de mutações nos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *rrs*, *rpsL* e *gidB*. A similaridade genética dos isolados e a transmissão recente foi avaliada através do RFLP-IS6110, *Spoligotyping*, MIRU-VNTR 24 *loci* e Sequenciamento Genômico. Os resultados foram organizados em dois artigos. Em Roraima, os isolados apresentaram alta diversidade genética com maior prevalência das linhagens LAM, H e T. MIRU-VNTR e RFLP-IS6110 apresentaram taxas de transmissão de 21,3% e 30%, respectivamente. A resistência a drogas foi detectada em 15,1% dos isolados, todos com resistência primária. Este foi o primeiro estudo sobre a epidemiologia molecular e o perfil de resistência a drogas nesse estado. Em Mato Grosso do Sul foi observada uma alta taxa de transmissão recente de cepas resistentes (30%), das quais 78% em novos casos - elevada taxa de resistência primária. O alcoolismo foi associado à resistência em cepas de perfis genômicos únicos. Encarceramento foi um dos principais responsáveis pela disseminação de TB resistente, onde 40% dos casos com perfis idênticos foram em prisioneiros ou ex-prisioneiros. Presos tiveram mais chances de adquirir TB resistente que a população em geral (OR=7,05). Conclui-se que regiões de fronteira são importantes na disseminação da TB e embora tenham características em comum possuem particularidades, sendo necessária a implementação de vigilância epidemiológica diferenciada nessas regiões.

Palavras-chave: Tuberculose, resistência antimicrobiana, genotipagem, transmissão recente, prisão.

Molecular epidemiology and resistance profile of *Mycobacterium tuberculosis* in border regions of Brazil

ABSTRACT

Brazil is one of the countries with the highest incidence rate of tuberculosis (TB) in the world. Border regions favor the dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) due to the presence of high-risk groups and constant population flow, these factors favor the emergence of TB drug-resistant cases. The objective of this study was to perform the molecular and epidemiological characterization of MTB isolated from two Brazilian states located in border regions (Roraima and Mato Grosso do Sul) to identify the variables associated with the disease transmission. In addition, the study evaluated the antimicrobial resistance profile and the molecular mechanisms involved. From January/2014 and April/2017 282 MTB strains were isolated. The epidemiological data were collected through a questionnaire and Sistema de Informação de Agravos e Notificação. Drug susceptibility profiles were performed using phenotypic methods and GeneXpert®. Resistant strains were submitted to the investigation of mutational events in *rpoB*, *katG*, *inhA*, *rrs*, *rpsL* and *gidB* genes. The genetic similarity of the isolates and the recent transmission was assessed using IS6110-RFLP, *Spoligotyping*, MIRU-VNTR 24 *loci* and Genome Sequencing. In Roraima, the isolates presented high genetic diversity and the most prevalent lineages were LAM, H and T. MIRU-VNTR and RFLP-IS6110 presented transmission rates of 21.3% and 30%, respectively. Drug resistance was detected in 15.1% isolates, all with primary resistance. This was the first study to describe the molecular epidemiology and drug resistance profile in this state. In Mato Grosso do Sul, a high rate of recent resistant transmission was observed (30%); in addition, 78% of TB resistant cases were new cases - high rate of primary resistance. Alcoholism was associated with strains drug-resistant in genomically unique profiles. Incarceration is a major contributor to the spread of TB drug-resistant, considering that 40% of cases with identical profiles were related to prisoners or ex-prisoners. Prisoners had more chances to acquiring TB drug-resistant than the general population (OR=7.05). In conclusion borders regions are important in the dissemination of TB and although have common characteristics, they also have particularities, requiring the implementation of distinct epidemiological surveillance in these regions.

Keywords: Tuberculosis, antimicrobial resistance, genotyping, recent transmission, prison.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Tuberculose: agente etiológico.....	17
2.1.1 Taxonomia.....	17
2.1.2 Características gerais	17
2.2 Tuberculose: doença.....	18
2.2.1 Sintomas, forma clínica e transmissão	18
2.2.2 Diagnóstico.....	19
2.2.3 Tratamento.....	21
2.2.4 Resistência a drogas antiTB	24
2.3 Tuberculose: epidemiologia	26
2.3.1 Panorama mundial, nacional e regional.....	26
2.3.2 Populações vulneráveis.....	29
2.3.2.1 População privada de liberdade.....	29
2.3.2.2 População indígena.....	31
2.3.2.3 População de fronteira e imigrantes	32
2.3.3 Epidemiologia molecular.....	33
2.4 Políticas Públicas para o controle da Tuberculose	38
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Geral	41
3.2 Específicos.....	41
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
5 APÊNDICES	51
Artigo 1: Genetic diversity and molecular epidemiology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in Roraima State, Brazil.....	52
Artigo 2: Molecular epidemiology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and drug resistance in Brazilian border with Bolivia and Paraguay.....	75
6 CONCLUSÕES	97
7 ANEXOS.....	98
Aprovação do Comitê de Ética.....	101

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Registros arqueológicos sugerem sua existência desde a Antiguidade (Rosemberg, 1999) e seu diagnóstico laboratorial foi possível com a descoberta de seu agente causal em 1882 (Poroca et al., 2009). Embora tenha tratamento e cura essa patologia está entre as 10 principais causas de morte no mundo (WHO, 2018).

Transmitida pelo ar, a propagação da TB está intimamente ligada às condições de vida, atingindo principalmente países subdesenvolvidos ou populações vulneráveis em países desenvolvidos (Hijjar et al., 2001). Apesar de passível de prevenção e controle, a doença tem se perpetuado em vista de condições socioeconômicas precárias, movimentos populacionais, baixo investimento nos programas de controle da TB, a epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), aumento da multirresistência, abandono de tratamento, entre outros (Kochi, 1994).

Em 2017, aproximadamente sete milhões de pessoas no mundo tiveram a doença. No mesmo ano, no Brasil foram registrados 86.858 casos e 7.000 mortes, sendo 27,1% em casos de coinfeção com HIV, e apesar do país seguir o padrão mundial de declínio em parâmetros como incidência e mortalidade, há populações/regiões com concentração acima da média, o que nos mantém entre os 20 países com alta carga de TB no mundo (BRASIL, 2018; WHO, 2018).

Áreas de fronteira representam lugares importantes na propagação da TB. Os estados de Mato Grosso do Sul (MS) e Roraima (RR) apresentam grande fluxo populacional e concentração de grupos vulneráveis, tais como indígenas, imigrantes com restrito acesso ao sistema de saúde e significativa população carcerária, tornando-os cenários favoráveis à disseminação da doença (Rendon et al., 2017).

O advento da resistência a drogas e a dificuldade de se estabelecer programas internacionais de controle aumentam a probabilidade de introdução de cepas multirresistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) entre países (Fitchett et al., 2011; Dara et al., 2012). Um monitoramento aprimorado nos estados de MS e RR torna-se particularmente importante já que o coeficiente de incidência e taxa de casos resistentes e multirresistentes dos países vizinhos (Bolívia, Paraguai, Guiana e Venezuela) são expressivamente mais altos (WHO, 2018).

As técnicas de biologia molecular como genotipagem e sequenciamento genômico de isolados permite a identificação de linhagens e combinada com dados epidemiológicos

possibilita que seja estabelecida a conexão entre os casos de TB, auxiliando na identificação de surtos, *clusters* e variáveis associadas à transmissão recente (Montoro et al., 1998; De Vries, G. et al., 2008) tornando-se uma ferramenta poderosa para monitorar tendências epidemiológicas (Ei et al., 2016). Além disso, a identificação de mecanismos de resistência a drogas antituberculose (antiTB) através da investigação de mutações gênicas contribui no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais simples e rápidas e ainda geram informações úteis para o desenvolvimentos de novos fármacos (Islam et al., 2017).

Objetivando compreender a dinâmica de transmissão da TB bem como investigar a circulação de cepas resistentes a drogas antiTB em dois estados da fronteira do Brasil, realizou-se um estudo epidemiológico-molecular com a finalidade de identificar variáveis associadas à transmissão recente da doença bem como fornecer informações que possam auxiliar na escolha de novas intervenções ou implementação de medidas de controle específicas, contribuindo para a redução da incidência nesses locais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tuberculose: agente etiológico

2.1.1 Taxonomia

O gênero *Mycobacterium* pertence à classe *Actinobacteria*, ordem *Actinomycelates*, família *Mycobacteriaceae*, a qual recentemente recebeu uma nova classificação se subdividindo em cinco gêneros e respectivos clados: *Mycobacterium* (*Tuberculosis-Simiae*), *Mycolicibacterium* (*Fortuitum-Vaccae*), *Mycolicibacter* (*Terrae*), *Mycolicibacillus* (*Triviale*) e *Mycobacteroides* (*Abscessus-Chelonae*) (Gupta et al., 2018).

O gênero *Mycobacterium* é muito diversificado e atualmente compreende 198 espécies e 14 subespécies validados (Parte, 2018) incluindo os patógenos humanos de maior impacto *M. leprae* (causador da Hanseníase) e *M. tuberculosis* (principal causador da TB). A esse gênero também pertencem as espécies *M. bovis*, que causa TB em bovinos, homem e outros mamíferos; *M. africanum*, encontrado frequentemente na África; *M. microti*, patogênica para roedores; *M. caprae*, causador de infecção em caprinos; *M. pinnipedii*, em leões marinhos e no homem e mais recentemente incluído o “*M. canettii*”, as quais, juntamente com *M. tuberculosis* até então foram denominados Complexo *M. tuberculosis* (CMT) (Brasil, 2013; Gupta et al., 2018).

2.1.2 Características gerais

As micobactérias têm como características serem bacilos finos medindo de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura, aeróbios, imóveis, que não formam esporos, flagelos ou cápsulas. Têm uma parede celular rica em lipídeos, como o ácido micólico, glicolipídeos, policetídeos e polissacarídeos, o que lhes confere a propriedade de serem álcool-ácido resistentes (BAAR) e têm papel importante na virulência por serem impermeáveis a alguns medicamentos (Cole, 2002; Delogu et al., 2013).

Quando corado (coloração de Ziehl-Nielsen), o MTB, apresenta-se isolado ou em pares, como bastonetes delgados, retos ou ligeiramente encurvados, de extremidades arredondadas, e o agrupamento dos bacilos em forma de ramos alongados e tortuosos é conhecido como corda ou fator corda (Coelho et al., 2007; Winn Jr et al., 2008) (Figura 1A).

Essas bactérias são parasitas intracelulares facultativos, de crescimento lento com um ciclo de geração de 16 a 20 horas. Sua temperatura ideal para crescimento é 37°C e as

colônias típicas de *M. tuberculosis* vistas em meio de cultura sólido são de cor creme e rugosas (Winn Jr et al., 2008) (Figura 1B).

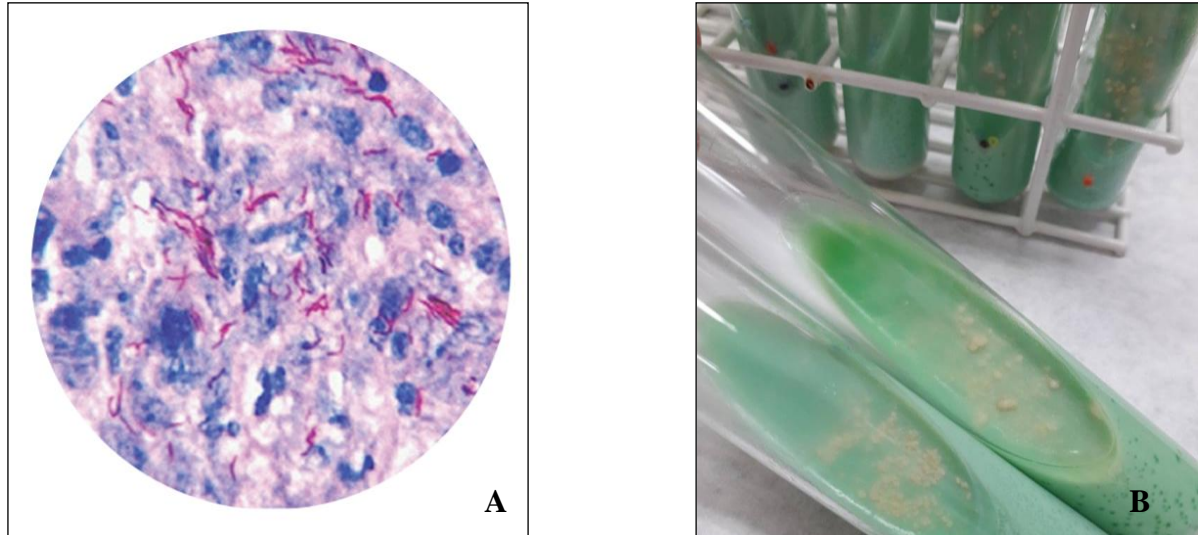


Figura 1. (A) Bacilos álcool-ácido resistentes, corados de vermelho pela técnica de Ziehl-Neelsen. Fonte: Manual de Baciloscopia da Tuberculose - República de Moçambique, 2012. Acessado em 22/01/2019. <https://www.fhi360.org>. (B) Crescimento de *M. tuberculosis* em meio sólido de Ogawa-Kudoh. Fonte: Imagem feita pela autora – Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (LPCS – UFGD).

2.2 Tuberculose: doença

2.2.1 Sintomas, forma clínica e transmissão

A TB é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica que afeta principalmente os pulmões e tem como sintomas clássicos tosse persistente (> 3 semanas), produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento (BRASIL, 2019). Além do sistema respiratório, a infecção pode acometer vários órgãos e/ou sistemas se manifestando sob diferentes apresentações clínicas. De forma geral, classifica-se em TB pulmonar ou extrapulmonar quando acomete outros locais como pleura, gânglios, meninge, pericárdio, ossos, rins, assim sua sintomatologia pode variar dependendo do indivíduo infectado ou o órgão afetado (Bethlem, 2012). Pode ainda apresentar-se de maneira disseminada (TB miliar), quando ocorre o comprometimento extensivo dos pulmões, fígado e medula óssea. Condições debilitantes como desnutrição, idade avançada, estresse, dependência de drogas, alcoolismo e doenças degenerativas e imunossupressoras, são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento da TB (Melo e Afiune, 1993).

A TB é, na maioria dos casos, transmitida pelo ar, no contágio de um indivíduo infectado com TB ativa, que ao tossir, espirrar, falar ou expirar expela aerossóis com bacilos capazes de infectar outro indivíduo suscetível (Shiloh, 2016). Raramente, gestantes também podem transmitir, através da artéria umbilical (via hematogênica) ou durante o parto quando o líquido amniótico é ingerido pelo recém-nascido (Gnehm et al., 2002).

A quantidade de bactérias expelida representa a extensão da doença, indivíduos que a eliminam numa quantidade superior a 5.000/ml de escarro são denominados bacilíferos, o que permite a detecção destes micro-organismos pela baciloscopia. A doença na forma pulmonar representa 90% dos casos, destes 60% são bacilíferos e realmente relevantes na transmissão. Indivíduos que não eliminam bacilos (não-bacilíferos) ou expõem poucas quantidades (paucibacilíferos) são dificilmente identificados na baciloscopia e pouco importantes na disseminação da doença assim como as formas exclusivamente extrapulmonares ou indivíduos com TB latente que não transmitem a infecção (Kim et al., 1984; BRASIL, 2011)

Após exposição e infecção, cerca de 90% das pessoas elimina o bacilo através das defesas do organismo ou permanece com infecção latente a qual pode reativar-se tardiamente em condições favoráveis (Ahmad, 2010). Os outros 5-10% dos indivíduos imunologicamente normais desenvolvem a TB durante a vida, mas 54% dos casos ativos se desenvolvem no primeiro ano infecção, e 78% desenvolvem doença ativa nos primeiros dois anos (Gordin e Masur, 2012). Portanto, a TB pode resultar de uma infecção exógena (infecção recente), causada pelo contágio com um paciente bacilífero, ou de uma infecção endógena (reativação), quando ocorre a recrudescência da infecção primária.

2.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico da TB é realizado através de critérios clínico-epidemiológicos e de exames auxiliares e confirmatórios, como: pesquisa radiológica, bacteriológica, histopatológica, prova tuberculínica, testes imunossorológicos, bioquímicos e fenotípicos, moleculares, entre outros. Em crianças e adolescentes há ainda um sistema de escore com contagem de pontos que auxilia no diagnóstico (Silva Jr., 2004; BRASIL, 2019).

A radiografia de tórax é um exame auxiliar muito importante, pois alterações radiológicas aumentam a suspeita da doença ao mostrar padrões característicos ou ainda auxiliam na diferenciação de formas de TB de apresentação atípica e no diagnóstico de outras pneumopatias no paciente portador de HIV/AIDS ou de outras situações de imunossupressão. Em adultos, é indispensável o diagnóstico com investigação do agente causal, dessa forma, o

exame radiológico deve ser realizado em conjunto com exame bacteriológico (baciloscopia de escarro) (BRASIL, 2019).

A pesquisa bacteriológica consiste em exame microscópico direto do escarro (baciloscopia) e cultura para micobactéria, as quais detectam a bactéria ou componentes de sua estrutura, ou ainda o teste rápido molecular (TRM-TB) GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA) disponível em alguns municípios brasileiros, que por sua vez detecta sequências específicas de ácidos nucleicos (Winn Jr et al., 2008; Ioannidis et al., 2011).

A baciloscopia de escarro ou pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente – BAAR (método de Ziehl-Nielsen) é o método mais utilizado no Brasil e permite detectar de 35 - 80% dos casos bacilíferos. Deve ser realizada em, no mínimo, duas amostras, uma na ocasião da primeira consulta e outra na manhã seguinte ao despertar. Podem ser solicitadas amostras adicionais quando as primeiras apresentarem resultado negativo e exista a suspeita com indícios clínicos e radiológicos (Silva Jr., 2004; Brodie e Schluger, 2005; BRASIL, 2019).

A cultura requer pouca quantidade de bacilos (10 a 100/mL), como resultado tem uma maior sensibilidade variando de 80% a 93% e especificidade de 98% (Dalovisio et al., 1996; Ceyhan et al., 2012; García-Elorriaga e Del Rey-Pineda, 2015). Realizar o cultivo *in vitro* pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico de casos novos quando associado à baciloscopia, além de permitir a identificação da bactéria, teste de sensibilidade a medicamentos e genotipagem para fins epidemiológicos. É indicada para os suspeitos de TB pulmonar constantemente negativos na baciloscopia e diagnóstico de formas extrapulmonares como meningoencefálica, renal, pleural, óssea ou ganglionar. Em casos de suspeita de infecção por micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT), geralmente pacientes com HIV/AIDS, deve ser realizada a tipificação do bacilo (Brodie e Schluger, 2005; BRASIL, 2019).

Os métodos clássicos de cultura utilizam meios sólidos ou líquidos, os sólidos (Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh) tem menor índice de contaminação e custo, mas necessitam de um período para detecção do crescimento que varia de 15 a 30 dias se estendendo para até 2 meses, já os meios líquidos tem a vantagem de crescimento mais rápido (5 a 13 dias). Esse método também está indicado em casos de suspeita de resistência bacteriana às drogas, seguida do teste de sensibilidade a antibióticos (BRASIL, 2019).

Para o teste de sensibilidade são utilizados o método das proporções em meio sólido (resultado após 42 dias), e os métodos que utilizam o meio líquido (resultados após cinco a 13 dias de incubação). Em geral, testam-se os antimicobacterianos: estreptomicina, isoniazida,

rifampicina e etambutol. A identificação da espécie é feita por testes bioquímicos e fenotípicos ou pode ser analisada por meio de técnicas moleculares (BRASIL, 2019).

O TRM-TB é um teste baseado na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real que detecta o DNA dos bacilos do complexo *M. tuberculosis* e resistência à rifampicina. A introdução deste teste mostrou-se uma revolução no diagnóstico de TB sendo um sistema totalmente automatizado com alta sensibilidade (93,8%) e especificidade (98,7%) (Cepheid, Sunnyvale, CA), apresentando a vantagem de ser realizado por pessoal com treinamento mínimo e execução de aproximadamente 2 horas (WHO, 2013; BRASIL, 2019).

O TRM-TB não deve ser utilizado para diagnóstico nos casos de retratamento (reingresso após abandono e recidivas) pois também detecta bacilos mortos ou inviáveis. Dessa forma, nesses casos, o diagnóstico deve ser feito com baciloscopia e cultura, seguida do teste de sensibilidade (TS); nesses casos e em pacientes com suspeita de falência ao esquema básico o TRM-TB poderá ser utilizado, mas apenas para triagem da resistência à rifampicina. Em suspeitas de TB extrapulmonar, o teste pode ser utilizado nas seguintes amostras: líquido, gânglios linfáticos e outros tecidos, entretanto o resultado negativo não exclui a TB visto que para esses tipos de amostras a sensibilidade é mais baixa (BRASIL, 2019).

É importante ressaltar que independentemente do resultado da baciloscopia indica-se a cultura com identificação e teste de sensibilidade nos contatos de casos de TB resistente, pacientes com antecedentes de tratamento prévio, em imunodeprimidos, principalmente portadores de HIV, paciente com baciloscopia positiva ao final do 2º mês de tratamento, falência ao tratamento antiTB, em investigação de populações com maior risco de TB resistente (profissionais de saúde, população de rua, privados de liberdade, pacientes internados em hospitais sem medidas de biossegurança e instituições de longa permanência) ou com difícil abordagem subsequente (indígenas) (BRASIL, 2019).

2.2.3 Tratamento

Desde que obedecidos os princípios do tratamento, a TB é uma doença curável em praticamente todos os casos novos e sem resistência aos fármacos antiTB. A associação medicamentosa apropriada, doses corretas e o uso por tempo adequado, somado a estratégia de supervisão da tomada dos medicamentos - Tratamento Diretamente Observado (TDO) são fundamentais para assegurar a cura do indivíduo e evitar a recidiva bacteriana e consequente surgimento de resistência a drogas (BRASIL, 2019).

O Ministério da Saúde padroniza um esquema terapêutico com vários medicamentos, os quais atuam de acordo com o estado metabólico do bacilo e o tipo de lesão na qual está

localizado (BRASIL, 2019). Em bacilos ativos os fármacos interferem no sistema enzimático ou bloqueiam a síntese de algum metabólito essencial para o seu crescimento (Shehzad *et al.*, 2013) (Figura 2). Lesões pulmonares cavitárias proporcionam condições para crescimento bacilar rápido (oferta de oxigênio, nutrientes e pH neutro) sendo fundamental o tratamento regular e doses adequadas afim de evitar a seleção de cepas resistentes e surgimento de resistência adquirida. Nos granulomas (lesões caseosas fechadas), onde a multiplicação dos bacilos é lenta ou intermitente devido a baixa concentração de oxigênio e pH geralmente ácido, a atuação prolongada dos medicamentos tem atuação importante na eliminação dos bacilos latentes ou persistentes (Coura, 2013).

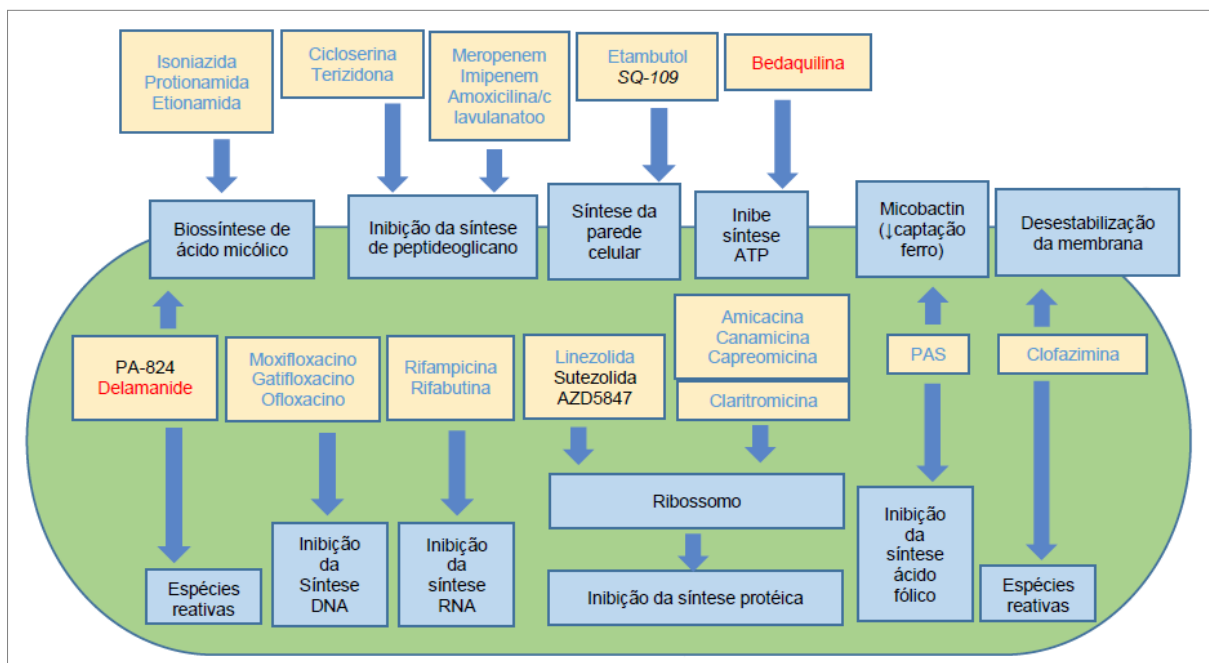


Figura 2. Mecanismos de ação de drogas anti-TB. Em azul: drogas já em uso; em vermelho: drogas recém-aprovadas; em preto: drogas submetidas a ensaios clínicos. Fonte: adaptado (Olaru *et al.*, 2015).

Além das propriedades relacionadas, a cura da doença depende da efetividade da terapêutica na **atividade bactericida precoce**, eliminando os bacilos de forma rápida e diminuindo imediatamente a transmissibilidade; na **capacidade de prevenir a emergência de bacilos resistentes**, por isso a importância da associação de diferentes fármacos e na **ação esterilizante** dos fármacos que devem ser capazes de extinguir todos os bacilos do organismo do indivíduo, prevenindo recidivas da doença. Assim, o Ministério da Saúde preconiza um esquema que compreende duas fases, uma **fase intensiva** (ou de ataque) que atende aos dois

primeiros objetivos e uma **fase de manutenção** que diminui a chance de recidiva da doença através da eliminação dos bacilos latentes ou persistentes (Coura, 2013).

A associação dos fármacos de primeira linha utilizada no Brasil atende a todos os atributos mencionados anteriormente, sendo isoniazida, estreptomicina e rifampicina os medicamentos com maior ação bactericida precoce. A isoniazida e a rifampicina atuam em nas populações bacilares sensíveis de qualquer localização, lesões intracavitárias, no interior dos granulomas ou macrófagos. A estreptomicina é mais ativa no interior das cavidades onde os bacilos multiplicam-se mais rápido. A pirazinamida age nas lesões caseosas fechadas e macrófagos, cujo meio é ácido. Rifampicina e pirazinamida possuem maior capacidade esterilizante. O etambutol é bacteriostático e em combinação com as demais drogas previne a emergência de resistência bacteriana (WHO, 2006).

No Brasil, para o tratamento da TB em adultos e adolescentes (>10 anos) nos casos novos, recidiva e reingresso após abandono, preconiza-se a utilização do “esquema básico” composto por rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) e etambutol (E) no período de dois meses (fase intensiva) e posteriormente rifampicina e isoniazida por quatro meses (fase de manutenção) com a apresentação farmacológica destes medicamentos em doses fixas combinadas tipo 4 em 1 (RHZE) e 2 em 1 (RH) (Tabela 1). Em crianças (< 10 anos) o esquema é composto por 3 fármacos (RHZ) na fase intensiva e 2 na fase de manutenção (RH) com apresentação em doses individualizadas. O “esquema básico” é indicado para todas as apresentações clínicas, pulmonares e extrapulmonares exceto a meningoencefálica e osteoarticular nas quais a fase de manutenção é prolongada por mais 6 meses de tratamento com RH, totalizando 12 meses de medicação (2RHZE/10RH) (BRASIL, 2019).

Gestantes e lactantes também têm indicações para uso de medicamentos do “esquema básico” com segurança e especial monitoramento de possíveis efeitos adversos. Existem também “esquemas especiais” utilizados para casos associados a hepatopatias, efeitos colaterais maiores, HIV/AIDS e uso de imunossupressores, ou falência por monorresistência, polirresistência e multirresistência (BRASIL, 2019).

Tabela 1 - Esquema Básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes (≥ 10 anos) ^a

Esquema	Faixas de peso	Unidade/dose	Duração
RHZE	20 a 35 Kg	2 comprimidos	
150/75/400/275 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	36 a 50 Kg	3 comprimidos	2 meses (fase intensiva)
	51 a 70 Kg	4 comprimidos	
	Acima de 70 Kg	5 comprimidos	
RH	20 a 35 Kg	1 comp 300/150mg ou 2 comp 150/75mg	
300/150 mg* ou 150/75 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	36 a 50 Kg	1comp 300/150mg + 1comp de 150/75mg ou 3 comp150/75mg	4 meses (fase de manutenção)
	51 a 70 Kg	comp 300/150mg ou 4 comp 150/75mg	
	Acima de 70 Kg	2 comp 300/150mg + 1comp de 150/75mg ou 5 comp 150/75mg	

^aTabela 1 adaptada do Manual de Recomendações para o Controle da TB no Brasil (BRASIL, 2019)

Fonte: (RATIONAL PHARMACEUTICAL MANAGEMENT PLUS, 2005; WHO, 2003).

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

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

2.2.4 Resistência a drogas antiTB

Regimes terapêuticos inadequados e o abandono de tratamento estão entre os principais fatores que levam a emergência da resistência e conseqüentemente o desenvolvimento de TB multirresistente (Pradipita et al., 2018). A TB multirresistente é uma importante ameaça à saúde humana aparecendo como um problema ainda mais grave, pelo fato de que alguns países não possuem uma política eficiente sobre o uso de antibióticos (Pezzella, 2019).

O tratamento da TB drogarresistente é um dos maiores desafios para o controle da doença no mundo, especialmente a que envolve resistência à rifampicina, isolada ou combinada a outros fármacos, pois trata-se do medicamento mais ativo contra o bacilo da TB. Esquemas sem a rifampicina na sua composição, quer por resistência ou intolerância, requerem o uso de fármacos de segunda linha, resultam em tratamento com duração mais prolongada, com maior potencial de toxicidade e de pior prognóstico (Luna, 2016; WHO, 2016).

Assim como para os casos de TB com sensibilidade aos fármacos, o desenho de esquema terapêutico para TB-DR deve contar com pelo menos quatro fármacos efetivos (nunca usados anteriormente ou com elevada probabilidade que sejam sensíveis), contendo pelo menos dois fármacos essenciais (com capacidade bactericida e esterilizante), mais dois fármacos acompanhantes (ação protetora aos essenciais contra a resistência adquirida) (Luna, 2016).

No Brasil, para o tratamento da TB drogarresistente, o Ministério da Saúde opta prioritariamente pela estratégia de esquema padronizado no sentido de facilitar o manejo dos casos e o uso racional de medicamentos, mas tratamentos individualizados podem ser utilizados em casos particulares (BRASIL, 2019).

Quanto aos níveis de resistência do bacilo a TB é classificada como: **monorresistente** - resistente a um fármaco antiTB; **polirresistente** - resistente a dois ou mais fármacos (exceto à associação R e I), **multirresistente** (TB-MDR) quando apresentam resistência simultânea a rifampicina e isoniazida e **resistência extensiva** (TB-XDR – do inglês, *extensively drug resistant*) quando apresenta resistência à rifampicina e isoniazida acrescida à resistência a uma fluoroquinolona e a um injetável de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) e **resistência à rifampicina** (TB-RR) identificada por meio do TRM-TB exclusivamente (ainda sem TS, portanto, sem outras resistências conhecidas) (Pablos-Méndez et al., 1998).

A resistência bacteriana a antimicrobianos pode ocorrer pela presença de mecanismos intrínsecos ou adquiridos. A associação desses mecanismos leva ao surgimento de alterações genéticas que são expressas bioquimicamente. A **resistência intrínseca ou natural** surge naturalmente no processo de replicação dos micro-organismos, na TB, esse processo é facilitado no interior das cavidades pulmonares devido à alta oxigenação local. Além disso, as micobactérias possuem uma parede celular espessa, que confere uma proteção adicional e impede a ação das drogas em concentrações inibitórias adequadas (Jeliňsk et al., 2018). A **resistência primária** ocorre em pacientes nunca tratados para TB, ou seja, infectados por bacilos previamente resistentes. A **resistência adquirida** ou **secundária** é aquela constatada em pacientes com TB inicialmente sensível, que se tornam resistentes após a exposição aos medicamentos (Pablos-Méndez et al., 1998).

As estratégias de resistência a antibióticos desenvolvidas pelas micobactérias envolvem mecanismos de defesa natural como a permeabilidade da membrana (parede espessa e bombas de efluxo), produção de enzimas que degradam ou inativam fármacos como β -lactamases, aminoglicosídeo acetil transferases e mecanismos genéticos associados

principalmente a mutações cromossômicas, em particular polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - *single nucleotide polymorphisms*) os quais causam alterações ou superexpressão do alvo do fármaco, interrupção da ativação do pró-fármaco, ativação da bomba de efluxo, entre outros (Tabela 2) (Kwon et al., 1995; Zhang e Yew, 2009; Sarathy et al., 2012; Hameed et al., 2018).

Tabela 2. Principais genes envolvidos com resistência a drogas de primeira linha antiTB.

Droga	Mecanismo da droga	Gene	Frequência de mutações (%)
Estreptomicina	Inibição da síntese proteica	<i>rpsL</i>	70 - 85
		<i>rrs</i>	70 - 85
		<i>gidB</i>	não avaliado
Isoniazida	Inibição da síntese de ácido micólico	<i>katG</i>	60 - 95
		<i>inhA</i>	8 - 43
Rifampicina	Inibição da síntese de RNA	<i>rpoB</i>	95 - 99
Etambutol	Inibição da síntese de arabinogalactana	<i>embB</i>	40 - 68
		<i>ubiA</i>	9,5 - 45,5
Pirazinamida	Codificação da pirazinamidase	<i>pncA</i>	44 - 97

Fonte: (Hameed et al., 2018; Miotto et al., 2018; Nguyen et al., 2018).

Considerando os variados padrões de resistência e fatores que favorecem a emergência e disseminação de cepas resistentes, faz-se necessárias intervenções para prevenir a TB drogarresistente com a elaboração de estratégias que assegurem o uso apropriado de antibióticos, além de investimentos na busca de novas abordagens terapêuticas e políticas públicas para o controle e vigilância epidemiológica dessas infecções.

2.3 Tuberculose: epidemiologia

2.3.1 Panorama mundial, nacional e regional

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo de Koch e dados da OMS mostram que em 2017, aproximadamente 6,7 milhões de pessoas desenvolveram TB no mundo e 1,57 milhão morreram com a doença, dentre as quais 300.000 entre pacientes HIV-positivos (WHO, 2018). África e Ásia são os continentes com maior coeficiente de incidência da doença e os países Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul juntos representaram 60% dos casos novos de TB registrados no mundo no ano de 2015 (BRASIL, 2017) (Figura 3).

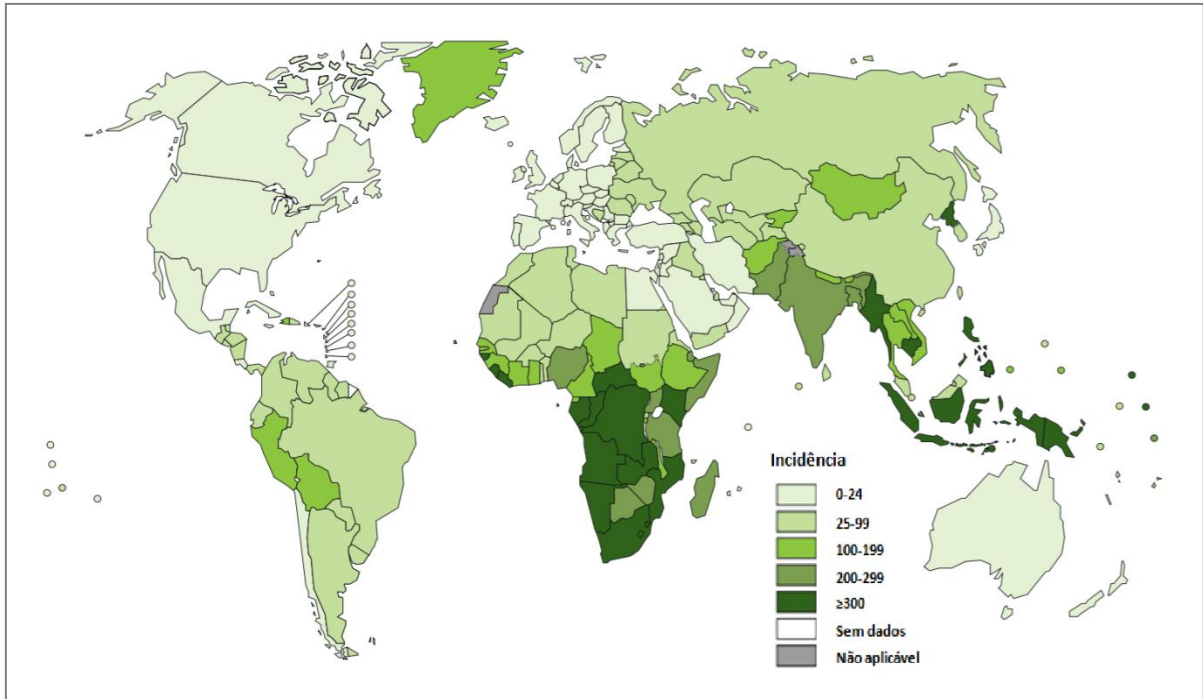


Figura 3. Estimativa do coeficiente de incidência de TB no mundo em 2017. Adaptado: (WHO, 2018).

As Américas contribuem com 3% na carga mundial da doença e o Brasil abriga 33% dos casos dessa região, seguido de Peru (14%), México (9%) e Haiti (8%). Nosso país aparece ainda entre os prioritários para o enfrentamento da TB com destaque no que se refere a coinfeção com HIV e, compõe o BRICS junto com Rússia, Índia, China e África do Sul, bloco de nações em desenvolvimento que detém 50% da TB no mundo (WHO, 2016).

Em 2017, no Brasil foram registrados 86.858 casos de TB dos quais em torno de 11.000 HIV-positivos. A taxa de incidência foi de 44 casos de TB/100 mil habitantes e a mortalidade de 2,4 casos/100 mil habitantes entre casos sem coinfeção com HIV e 0,91 entre casos de TB + HIV (WHO, 2018). Embora esses parâmetros tenham apresentado declínio, com uma queda média anual de 1,6% na incidência e 2,0% na mortalidade nos últimos dez anos, em um país com grande dimensão territorial o risco de adoecer por TB é heterogêneo (Figura 4), variando de 9,5/100 mil habitantes no Tocantins a 74,1/100 mil habitantes no Amazonas (BRASIL, 2018).

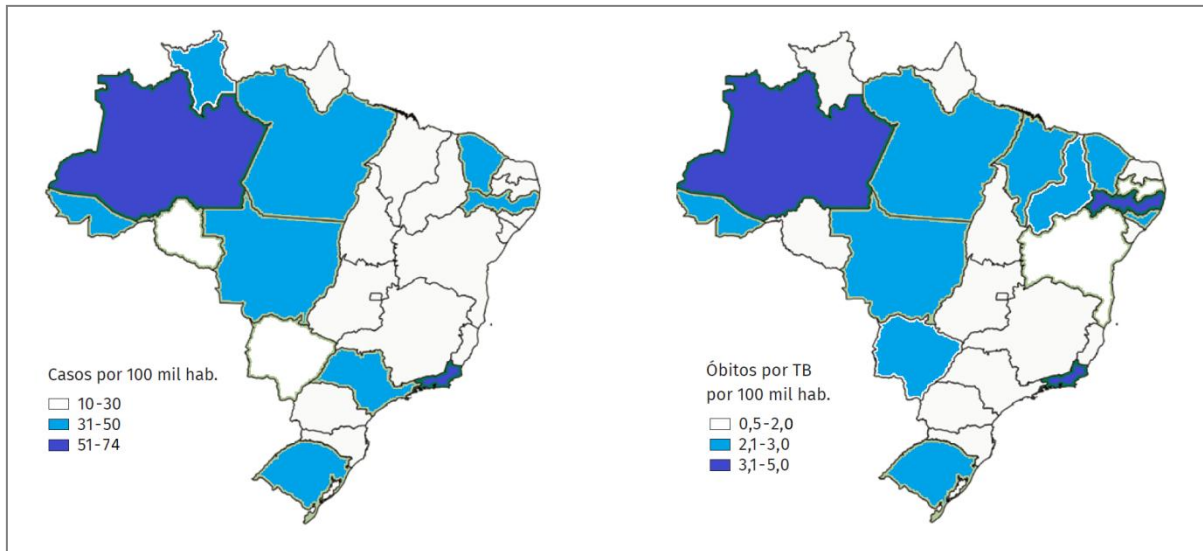


Figura 4. Coeficiente de incidência e óbitos por TB por unidade federada, Brasil, 2017. Adaptado: (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b).

Diferentes locais promovem condições particulares para a manifestação de doenças. Nesse contexto, regiões fronteiriças tornam-se de extrema relevância, especialmente porque ao comparar os índices brasileiros de incidência e TB resistente aos de seus países vizinhos observa-se, no ano de 2017, taxas de casos multirresistentes/resistentes a rifampicina (MDR/RR-TB) menores que em outros países latino-americanos (Tabela 2) (WHO, 2018).

Tabela 3. Comparação de índices de TB no Brasil e seus países fronteiriços – 2017.

Países	Incidência casos/100mil hab.	MDR/RR-TB casos novos	MDR/RR-TB tratados anteriormente
Brasil	44	1,5%	8%
Bolívia	111	2,3%	9,3%
Paraguai	44	0,9%	15%
Venezuela	42	2,3%	13%
Guiana	86	2,5%	12%

Na região centro-oeste brasileira, Mato Grosso do Sul tem uma área de 357.145,531 km², uma população estimada de 2.748.023 e densidade demográfica de 6,86 hab./km² (IBGE, 2018a). O estado faz fronteira com Paraguai e Bolívia e em 2017 apresentou uma incidência de 30,0 casos de TB/100.000 habitantes, uma mortalidade de 2,3/100.000 habitantes (BRASIL, 2018).

O estado de Roraima, situado na região amazônica, norte do Brasil, apresenta um território de 224.300,805 km², aproximadamente 576.568 habitantes e densidade demográfica

de 2,01 hab./km² (IBGE, 2018b). Faz fronteira com Guiana e Venezuela e em 2017 teve uma incidência de 36,0 casos de TB/100.000 habitantes e uma mortalidade de 1.6/100.000 habitantes (BRASIL, 2018).

Esses dois estados estão entre os 12 com maior taxa da doença no Brasil e apresentam coeficiente de incidência próximo a média do país (33,5/100mil hab.) considerando dados nacionais de 2017 divulgados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2018). Ambos também se destacam por estarem em região de fronteira, com grande fluxo populacional transfronteiriço e por abrigar as maiores populações indígenas do país e significativa população privada de liberdade, que são principais grupos de risco ao adoecimento por TB e apresentam condições de vida propícias à propagação dessa infecção.

2.3.2 Populações vulneráveis

A TB está fortemente ligada à pobreza, desnutrição e aglomeração, dessa forma há grupos populacionais com maior vulnerabilidade, entre eles indígenas, população privada de liberdade (PPL), pessoas que vivem com HIV/AIDS e em situação de rua (BRASIL, 2014). Determinantes sociais e ambientais, como analfabetismo, baixa renda, má nutrição, doenças associadas, uso de drogas, tabagismo, alcoolismo e condições de vida favorecem a alta transmissibilidade e incidência da doença nesses grupos (Lönnroth et al., 2009). Regiões de fronteira normalmente também concentram grupos de risco e sem acesso a cuidados rotineiros de saúde, podendo afetar o controle da TB especialmente em locais de grande fluxo populacional, com imigrantes provenientes de grupos minoritários e/ou oriundos de países com alta endemicidade da doença (Figuerola-Munoz e Ramon-Pardo, 2008).

2.3.2.1 População privada de liberdade

No Brasil, a população privada de liberdade concentra 10,5% dos registros de casos novos de TB, apresentando um risco de adoecimento 25-28 vezes superior ao observado na população em geral, além de mostrar frequência significativa de formas resistentes e multirresistentes da doença (Macedo et al., 2017; BRASIL, 2018; BRASIL, 2019) com tendência a aumento, conforme observado em um estudo em 35 unidades penais do estado de Mato Grosso do Sul onde a taxa de resistência cresceu de 21,1% para 30% e de MDR-TB aumentou de 0,3% a 1,3% em oito anos de monitoramento (Cunha et al., 2018).

O Brasil ocupa o 3º lugar no *ranking* de países com a maior quantidade de pessoas encarceradas no mundo (719.998), vindo após EUA (2.121.600) e China (1.649.804) (WBP, 2019). A população carcerária brasileira, distribuída em 1460 estabelecimentos penais, vem

crecendo substancialmente nos últimos anos, o que representou em 2016 um déficit de 358.663 vagas e uma taxa de ocupação de 197,4% (Santos, 2017; CNJ, 2018).

Mato Grosso do Sul aparece liderando a taxa de encarceramento com 834,6 presos/100 mil habitantes e uma população de 22.644 presos em 45 unidades prisionais e uma taxa de ocupação de 241,7%. Em contraste, o estado de Roraima tem a menor população carcerária com 2.168 pessoas presas em seis estabelecimentos penais e uma ocupação de 195,2%, mas uma taxa de encarceramento de 414,8 custodiados/100 mil habitantes, o que leva o estado para 7º lugar nessa categoria (Santos, 2017; CNJ, 2018). Essas características de confinamento e superlotação, associadas a pouca ventilação nas celas, favorecem a transmissão da TB (Ferraz e Valente, 2009; Urrego et al., 2015).

Além do impacto dentro das prisões a TB também contribui para o aumento da doença na sociedade como um todo. Por meio das visitas, dos funcionários do sistema prisional, do cumprimento da pena em regime semiaberto, dos indultos, fugas ou no retorno à liberdade há uma conexão que pode levar a doença para fora dos muros. O caminho contrário também pode acontecer com a infecção contraída na comunidade iniciando uma epidemia dentro do presídio (Ferreira Júnior et al., 2013). Tal fato foi evidenciado em trabalhos realizados no Mato Grosso do Sul com a análise molecular de cepas isoladas da população livre e carcerária. Ficou demonstrado que o encarceramento anterior esteve fortemente associado com TB na população em geral, além da confirmação de mesmos genótipos circulando na comunidade e nos indivíduos presos (Sacchi et al., 2015; Marques et al., 2017). Outro dado relevante, obtido no estudo em Dourados/MS, foi a incidência 40 vezes maior na PPL, com 1.044 casos/100.000 habitantes contra 26/100.000 habitantes constatado na população livre (Sacchi et al., 2015).

A grande mobilidade dos presos entre unidades prisionais favorece a contínua transmissão da TB e a vulnerabilidade dos indivíduos encarcerados advinda de condições sociais e individuais (comorbidades, uso de drogas, álcool, tabagismo) facilitam o adoecimento. Em um ambiente onde a saúde não é priorizada pela administração carcerária, nem pelo próprio detento, a detecção tardia e o tratamento irregular tornam-se comuns favorecendo o surgimento de TB resistente e emergência da TB-MDR. Além disso, as condições precárias de acompanhamento dentro das prisões e o seguimento inadequado do tratamento após a libertação prejudicam o controle e a prevenção da doença na sociedade, tornando-se importante o controle da doença neste grupo durante o encarceramento e após o retorno a liberdade (Lemiszewska e Lhuilier, 2001; Dara et al., 2009).

2.3.2.2 População indígena

A população indígena brasileira, também considerada um grupo de risco para desenvolver TB permanece em situação vulnerável e com índices elevados de adoecimento e morte por TB desde a colonização europeia que além de trazer a doença, causou mudanças sociais, econômicas e demográficas catastróficas para a sobrevivência física e cultural do índio (Costa, 1987; Campos e Pianta, 2001).

Na América do Sul, o Brasil apresenta um significativo contingente de indígenas com 817.000 pessoas que se autodeclararam índios e cerca de 305 povos, o que corresponde a 0,4% da população total do país. O Censo Demográfico 2010 mostrou um crescimento populacional indígena em relação aos censos 1991/2000, especialmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, diferente dos números no Sul e Sudeste, os quais diminuíram (IBGE, 2012).

Os estados de Roraima, do Amazonas, Mato Grosso do Sul, Acre e Mato Grosso são os que mais concentram indígenas nos países e se destacam por estarem em região de fronteira com grande fluxo populacional. Mato Grosso do Sul com cerca de 73.295 indígenas abriga a 2ª maior população indígena do país (3% da população do estado) e Roraima em 5º lugar com uma população de 49.637 indígenas que representa 11% dos habitantes do estado - maior percentual entre as demais unidades federativas do país (IBGE, 2012).

Ao longo do tempo o contato entre índios e europeus limitou-os a reservas demarcadas, o que levou a condições de vida e habitação precárias. Determinantes sociais como pobreza, aglomeração domiciliar, oportunidades de trabalho insuficientes, preconceito étnico e falta de acesso à educação e cuidados de saúde, associados ao uso de álcool, tabaco e elevados índices de desnutrição e parasitismo intestinal, aumentam o risco de adoecimento e propagação da TB nessas populações (BRASIL, 2011; Croda et al., 2012; Basta e De Sousa Viana, 2019). Aliado a esses fatores, o intenso intercâmbio entre as cidades e aldeias, migração de indígenas que vão para áreas urbanas em busca de melhores condições de vida e ainda, populações que transitam livremente nas regiões de fronteira transformam a TB em uma doença de difícil controle (Amarante e Costa, 2000; Staevie, 2013).

Dessa maneira, atualmente os povos indígenas apresentam coeficientes de incidência 6 a 10 vezes maiores aos observados na população em geral (Escobar et al., 2001; Coimbra Jr e Basta, 2007; Basta et al., 2013), alta proporção de adoecimento entre crianças e adolescentes e maior prevalência de tuberculose latente (Sousa et al., 1997; Marques e Da Cunha, 2003; Marques et al., 2010; Rios et al., 2013; Tollefson et al., 2013).

No estado de Roraima, a capital Boa Vista concentra o maior número de casos de TB e uma parcela significativa de indígenas ocupando a periferia da cidade. Apesar de representar apenas 3,07% da população os índios respondem por mais de 20% dos casos da doença (Rodrigues, 2015). Um estudo na região amazônica revelou um predomínio ainda maior, com 51,9% de casos de TB em indígenas sendo 13,8% em crianças e adolescentes de 0 a 14 anos, um percentual de 7,1% de abandono de tratamento, 2,8% de óbito por TB e quase a totalidade dos casos de TB-MDR registrados nessa população (80,6%) (Belo et al., 2013).

Em estudo sobre a magnitude da TB pulmonar em Mato Grosso do Sul a população indígena foi responsável por 22,5% dos casos e 4,1% abandonaram o tratamento, a incidência (184,9/100 mil habitantes) e a mortalidade (11,1/100 mil habitantes) foram, respectivamente, 6,7 vezes e 5,2 vezes maior que na população não indígena (Marques et al., 2014). A TB em crianças e adolescentes com menos de 15 anos de idade atingiu uma taxa de 40% na etnia Guarani-Kaiwá (Marques e Da Cunha, 2003) e embora a taxa de MDR-TB seja menor que comunidade em geral, vem aumentando entre os índios nos últimos anos, indo de 1,9% para 4,0% num período de nove anos (Basta et al., 2013).

2.3.2.3 População de fronteira e imigrantes

Regiões de fronteiras representam grande risco na disseminação de casos de TB entre países. O grande fluxo populacional e provavelmente dificuldade de se estabelecer programas internacionais de controle da doença contribuem para maiores taxas de incidência nesses locais (Di Perri et al., 1998; Cdc, 2002; Schneider et al., 2004; Fitchett et al., 2011; Dara et al., 2012). Somado a isso, geralmente concentram populações mais vulneráveis a doença e com dificuldade de acesso ao sistema de saúde (Bachour et al., 1991; Di Perri et al., 1998; Minetti et al., 2010).

Estudos em regiões de fronteira apontam maior ocorrência de AIDS/HIV e elevada incidência de TB nesses locais relacionada ao diagnóstico tardio e dificuldade de implementação do DOTS, associado a isso o fluxo migratório eleva risco de surgimento de cepas MDR e XDR pela introdução de novas cepas ou tratamento irregular (Peiter, 2005; Simpson, 2011; Silva-Sobrinho et al., 2012). No Brasil, nos últimos anos, a taxa de estrangeiros vem aumentando (Martinez et al., 2012), esses imigrantes normalmente são de grupos minoritários ou ainda tornam-se mais vulneráveis após a chegada ao se deparar com uma realidade de diferenças culturais, fragilidades com relação a ilegalidade e situações precárias de trabalho e habitação, fatores que despontam como cenário de disseminação da TB (Carballo e Nerukar, 2001; Figueroa-Munoz e Ramon-Pardo, 2008).

Entre 1998 a 2008 um estudo realizado na capital de São Paulo observou que 67,5% dos casos de TB era de nacionalidade brasileira, 30,4% boliviana e 2,1% outras. Nesse período a doença aumentou na comunidade boliviana de 15,0% para 53,0% dos casos representando um incremento de 250% e, redução de 43,5% em número absoluto de casos em brasileiros (Martinez et al., 2012).

Em Mato Grosso do Sul a resistência a drogas antiTB mostrou-se associada ao tratamento prévio, morar na fronteira e ter as comorbidades alcoolismo e diabetes. Morar na fronteira representou chance 2,1 vezes maior de desenvolver resistência e 1,9 vezes maior de monorresistência especialmente em casos novos (monorresistência primária), maior risco de abandonar o tratamento e morrer em decorrência da doença (Marques et al., 2014; Marques et al., 2017).

Considerando essas particulares, regiões de fronteira requerem medidas promotoras de acesso aos direitos sociais e de saúde com intervenções que priorizem a prevenção e controle da TB, bem como o monitoramento da resistência a medicamentos. Promover a detecção precoce e tratamento correto da TB, manter uma vigilância epidemiologia avaliando a situação da TB nesse locais e identificando as ocasiões em que ocorre a transmissão oferece informações que permitem maior efetividade na implantação de medidas contra a doença.

2.3.3 Epidemiologia molecular

As técnicas moleculares aliadas à investigação epidemiológica clássica ajudam a compreender melhor a dinâmica de transmissão da TB, fornecendo medições mais específicas que facilitam atividades epidemiológicas como a vigilância da doença, investigações de surtos, identificação de padrões de transmissão e fatores de risco. Possibilitam a caracterização genética de linhagens e avaliação da disseminação global de estirpes, contribuem para estudos de filogenia/taxonomia e podem ser utilizados para detectar precocemente a multirresistência ou ainda determinar as alterações genéticas que conduzem a resistência a antibióticos (Van Embden et al., 1993; Foxman e Riley, 2001; Van Der Zanden et al., 2003; De Vries, Gerard et al., 2008).

Técnicas têm sido desenvolvidas para a diferenciação de isolados baseando-se no polimorfismo genético de DNA do MTB (DNA *fingerprint*), o que tem permitido a distinção de linhagens e facilitado estudos epidemiológicos. Quando dois ou mais isolados compartilham o mesmo perfil ou um padrão muito similar, infere-se que pertençam a um mesmo grupo ou *cluster* e tem elevada probabilidade de estarem epidemiologicamente associados refletindo transmissão recente entre os pacientes, enquanto perfis genéticos únicos

representariam casos de reativação endógena da doença (Nava-Aguilera et al., 2009; Peres et al., 2018). Entre as principais técnicas moleculares utilizadas para genotipagem de micobactérias estão o RFLP-IS6110, MIRU-VNTR e o *Spoligotyping* (Ei et al., 2016).

A análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição baseados na sequência de inserção IS6110 (IS6110 - *Restriction Fragment length polymorphism* - RFLP) foi desenvolvida nos anos 90, amplamente aplicada em muitos países e é considerada padrão-ouro. A sequência de inserção IS6110 pertence à família IS3 de elementos móveis e tem 1.355 pb de comprimento, é encontrada apenas no CMT e apresenta de 0 a 25 cópias no genoma das micobactérias. Diferenças no número de cópias e locais dentro do genoma são responsáveis pelo alto grau de polimorfismo do IS6110, possibilitando a discriminação de cepas, além disso, sua alta estabilidade permite que seja usado como marcador para comprovar ligações epidemiológicas (Thierry et al., 1990; Santos et al., 2007; Augusto et al., 2017).

Em média, metade das cepas de MTB apresentam mudança de uma banda em seus perfis genéticos em um período de 3-4 anos, período rápido o suficiente para que isolados sem nenhuma relação epidemiológica apresentem perfis genéticos distintos e, lento o suficiente para que casos epidemiologicamente relacionados apresentem perfis idênticos (De Boer et al., 1999). Embora o RFLP-IS6110 seja uma metodologia muito útil na genotipagem de MTB por ser altamente discriminatório e reprodutível, é uma técnica que apresenta limitações em isolados com menos que 5 cópias de IS6110, requer DNA com altas concentrações e pureza, é trabalhoso e de alto custo, além de possuir uma metodologia de análise que não facilita comparações entre laboratórios (Behr et al., 1999).

Em resumo, a metodologia consiste na digestão de DNA genômico com a enzima de restrição PvuII que cliva a sequência IS6110 em fragmentos, os quais são separados por eletroforese em gel. Em seguida, eles são transferidos para uma membrana de náilon positivamente carregada e realizada hibridização com uma sonda marcada complementar à extremidade 3' da sequência IS6110. Após revelação colorimétrica, como resultado, são visualizadas bandas em diferentes posições que representam cada fragmento de IS6110 com diferentes comprimentos de sequências de DNA flanqueadoras (Figura 5). As membranas são então digitalizadas e os padrões de RFLP analisados através de um programa computacional que compara e determina similaridades (Ei et al., 2016).

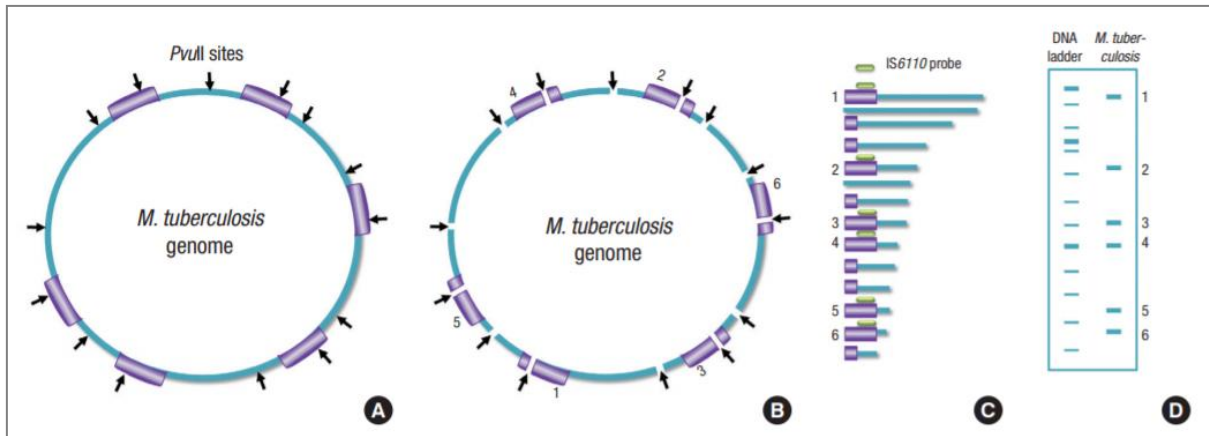


Figura 5. Tipagem por RFLP. (A) Genoma de MTB representando IS6110 e locais de clivagem da PvuII. (B) Digestão do genoma com PvuII. (C) Fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. (D) Após corrida em gel, transferência para membrana seguida por hibridação e revelação, os fragmentos são visualizados. Adaptado: (Ei et al., 2016).

Destacam-se dois métodos de tipagem molecular baseados em PCR que podem ajudar a contornar as limitações associadas com o RFLP-IS6110, que são as metodologias baseadas nos *Clustered Regulatory Short Palindromic Repeats* (CRISPR) e *Variable Number of Repeats Tandem* (VNTR) (Comas et al., 2009).

Mais recentemente a tipagem baseada no número variável de repetições em tandem (VNTRs - *Variable Number of Repeats Tandem*) de unidades repetitivas intercaladas de micobactérias (MIRUs - *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) têm representado alternativas para análises de isolados geneticamente relacionados e propostos como o novo método padrão para análise de *M. tuberculosis* (Supply et al., 2006).

A técnica não precisa de grandes quantidades de DNA, é reprodutível e altamente discriminatória. Os MIRU-VNTRs tem taxa de evolução ligeiramente mais lenta do que a do IS6110-RFLP tornando um método apropriado em análises epidemiológicas de longo prazo (Mazars et al., 2001) entretanto, instabilidades genéticas devido às mutações silenciosas podem mudar rapidamente o perfil genético das bactérias (Augusto et al., 2017). Sua ferramenta de análise está facilmente disponível na internet (<https://www.miru-vntrplus.org>), o software livre MIRU-VNTRplus permite a criação de árvores para análises filogenéticas e de similaridade, facilita a comparação de dados interlaboratoriais e construção de banco de dados global (Weniger et al., 2010).

Os MIRUs estão localizados principalmente em regiões intergênicas e dispersos por todo o genoma de micobactérias do CMT em sequências repetitivas de 40 a 100 pb.

Diferentes de outras seqüências repetitivas, não há seqüências palindrômicas óbvias, ao contrário, são repetições diretas em série (Ei et al., 2016).

O princípio da tipagem VNTR-MIRU é baseada em PCR, realizado com *primers* específicos para amplificar o locus de repetição em tandem selecionado e revelar seu número de repetições. A presença e o tamanho do produto de PCR são determinados por eletroforese em gel de agarose. O tamanho do amplicon (pb) reflete o número de cópias, o qual é calculado de acordo com dados publicados (Cowan et al., 2002; Santos et al., 2007) (Figura 6).

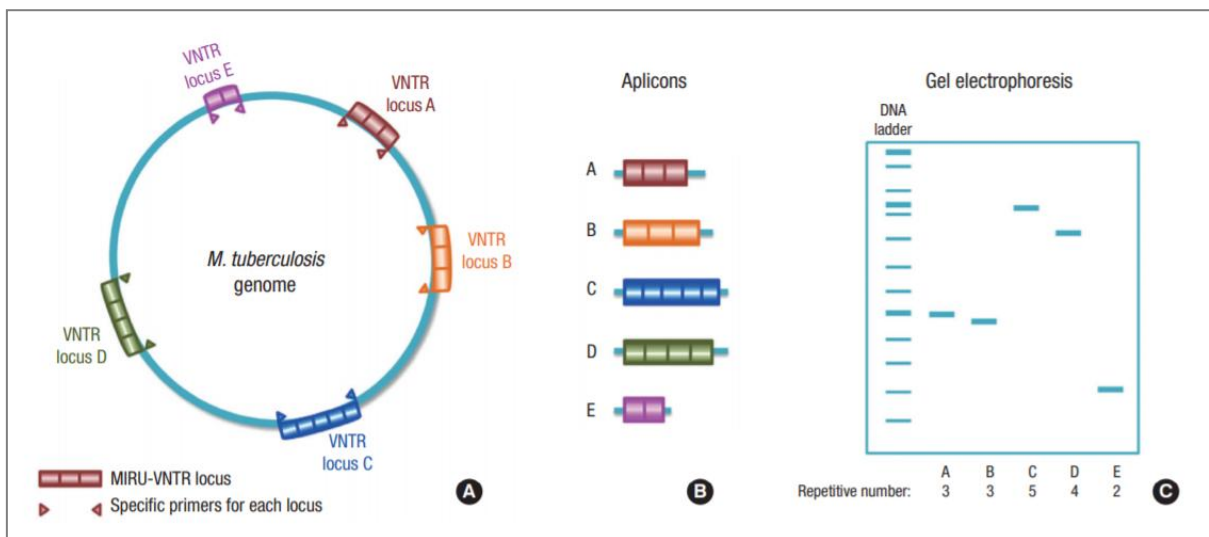


Figura 6. Tipagem por MIRU-VNTR. (A) Locus MIRU-VNTR de diferentes números repetitivos espalhados no genoma de MTB. (B) Tamanhos diferentes de amplicons após PCR. (C) Amplicons vistos após eletroforese em gel com diferentes tamanhos que refletem o número repetitivo de cada locus VNTR. Adaptado: (Ei et al., 2016).

O *Spoligotyping* (*Spacer Oligonucleotide Typing*) é realizado com base na variabilidade do DNA na região de repetição direta (DR), presentes exclusivamente em micobactérias do CMT. O *locus* de DR possui repetições idênticas com 36 pb, intercaladas por seqüências espaçadoras, diferentes e não repetitivas de DNA, de tamanho variável, entre 35 e 41 pb, as quais, definem os perfis genéticos baseados no número e presença ou ausência dessas regiões espaçadoras (Kamerbeek et al., 1997; Brudey et al., 2006).

A metodologia dessa técnica baseia-se na amplificação de todo o *locus* DR através de PCR. Os produtos de PCR são hibridados em uma membrana com 43 oligonucleotídeos espaçadores e posteriormente revelados. Cada um dos espaçadores produz uma banda escura (indicando a presença do espaçador) ou nenhuma banda (indicando a ausência do espaçador), gerando um padrão com uma série de bandas para cada isolado de MTB. O padrão é

convertido em um sistema de código binário de 43 dígitos onde 1 significa presença do espaçador e 0 significa que está ausente. Na sequência, convertidos em padrão de 15 dígitos designado octal (ou seja, base 8, com os dígitos de 0 a 7), que pode recriar o padrão binário novamente através de uma simples aplicação de planilha eletrônica (Figura 7) (Ei et al., 2016).

Essa técnica tem representado uma das alternativas para análises de isolados geneticamente relacionados, sobretudo em casos em que a análise de IS6110-RFLP não é aplicável, por exemplo, amostras com menos de cinco cópias de IS6110. É uma técnica rápida e menos trabalhosa, podendo ser utilizado como método secundário de genotipagem para *screening* de um grande número de isolados (Kremer et al., 2005; Brudey et al., 2006; Santos et al., 2007), além de possuir um Banco de Dados Internacional SITVITWEB (SpolDB4) disponível on-line (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/) que torna possível fazer comparações de distribuição global com os diferentes perfis registrados no Banco. É um método de baixo poder discriminatório e para estudos epidemiológicos de alta resolução deve ser idealmente usado em conjunto com um segundo método de tipagem, como MIRU-VNTRs (Demay et al., 2012).

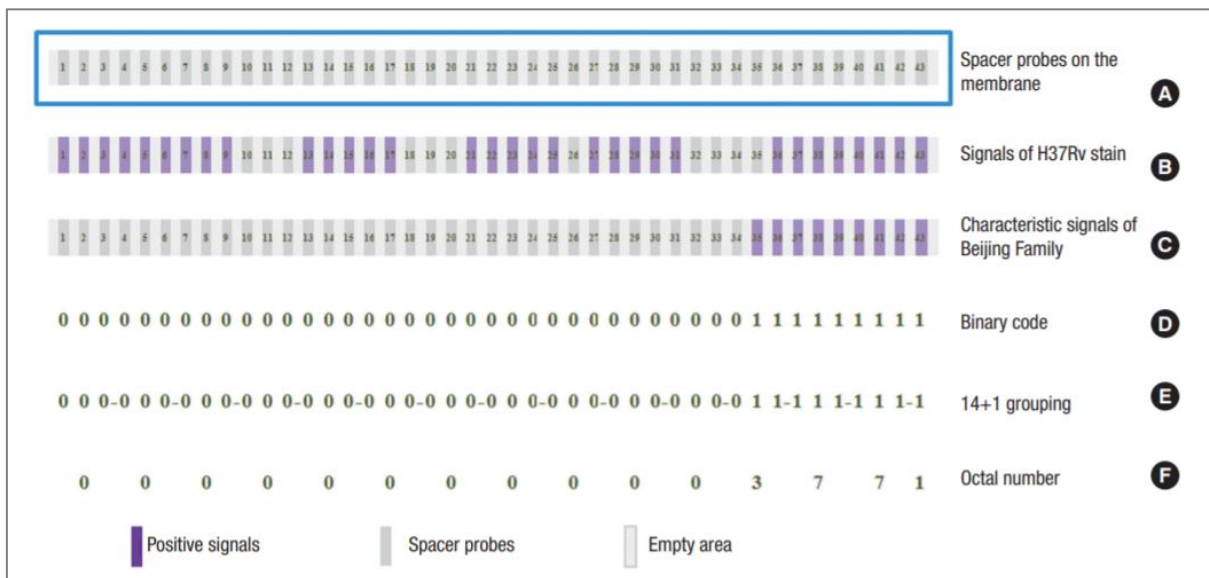


Figura 7. Tipagem por *Spoligotyping*. (A) Representação do genoma de MTB com repetições diretas (DRs). (B) Padrão da estirpe de referência H37Rv. (C) Padrão típico de MTB da família Beijing. (D) Representação do padrão convertido em código binário. (E/F) Processo de conversão do código binário para Octal. (E) O código binário é dividido em 14 conjuntos de três dígitos (espaçadores de 1 a 42) mais um dígito adicional (espaçador 43). (F) Cada conjunto binário de 3 dígitos é convertido para o seu equivalente octal, com o dígito adicional final permanecendo como 1 ou 0. A tradução de números binários para números octal é feita da seguinte forma: 000 = 0; 001 = 1; 010 = 2; 011 = 3; 100 = 4; 101 = 5; 110 = 6; e 111 = 7. Adaptado: (Ei et al., 2016)

2.4 Políticas Públicas para o controle da Tuberculose

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB como emergência de saúde pública global e lançou a estratégia *Directly Observed Treatment Strategy* (DOTS) com a meta de atingir 85% de cura dos doentes. A partir disso, o Brasil iniciou uma série de planos e medidas para controlar a doença no país e contribuir para a diminuição da doença no contexto mundial. Desde o lançamento do Plano Emergencial para o Controle da TB em 1996 o Ministério da Saúde recomenda a implantação do tratamento supervisionado (TS-DOTS), o qual foi formalmente oficializado em 1999 por intermédio do Programa Nacional de Controle da TB (PNCT), além disso, a testagem para HIV em todos os doentes com TB, recomendada desde 1997 (Hijjar et al., 2007; BRASIL, 2017a).

Nos anos subsequentes surgiram outras iniciativas e intensificação na luta contra a doença. Em 2000, todos os 189 Estados-Membros das Nações Unidas assumiram como meta para os “Objetivos de Desenvolvimento do Milênio” o combate ao HIV/AIDS, TB e outras doenças, com o compromisso de deter, até 2015, a prevalência e a mortalidade relacionada à TB. Conseqüentemente no Brasil, em 2003, foi lançado Plano Nacional de Mobilização e Intensificação das Ações para Eliminação da Hanseníase e Controle da TB em municípios prioritários por meio da Atenção Básica, culminando com a inclusão da TB na agenda de prioridades das políticas públicas do país (BRASIL, 2017a).

Ao longo dos anos, outras parcerias e estratégias foram criadas e implantadas. Em 2006, a OMS lançou a Estratégia *Stop TB*, enquanto no Brasil iniciou-se um Projeto de fundo global, criação de Cômities para acompanhamento das intervenções em 11 estados, ações de intersetoriais para o controle da doença e recomendação de tratamento antirretroviral para todos os pacientes HIV positivos. Em 2009, o país incluiu a droga etambutol no esquema, na fase intensiva de tratamento. Em 2014 houve a implantação da Rede de Teste Rápido Molecular para diagnóstico na rede pública e em 2016 estabeleceu-se a Frente Parlamentar das Américas de luta contra a TB (BRASIL, 2017a).

Baseado na visão de um mundo livre da TB, apresentado pela *The End TB Strategy* (2015), enquadrando a luta global com questões de direitos humanos e justiça social, saúde pública, prevenção e fundamentos clínicos do tratamento da TB, foram estabelecidas metas de, até 2035, reduzir em 90% o coeficiente de incidência e em 95% os óbitos comparados a 2015. Dessa forma e com vistas no Plano Regional das Américas, que dá ênfase nas populações mais vulneráveis e grupos de risco, em 2017, o Brasil lançou o Plano Nacional com o documento Brasil Livre da TB - Plano Nacional pelo Fim da TB como Problema de Saúde Pública (Lönnroth e Raviglione, 2016; BRASIL, 2017a).

Para o desenvolvimento das estratégias do Plano Nacional foi necessário um diagnóstico situacional dos estados e municípios brasileiros. Utilizando indicadores socioeconômicos, dados epidemiológicos e operacionais da TB foram definidos dois cenários e oito subcenários, representados em ordem numérica ascendente na Figura 8 de acordo com a prioridade para redução da incidência de TB. Essa medida possibilitou contemplar as diferenças de cada local e auxiliar na adoção de intervenções para o controle da doença no Brasil (BRASIL, 2017a).

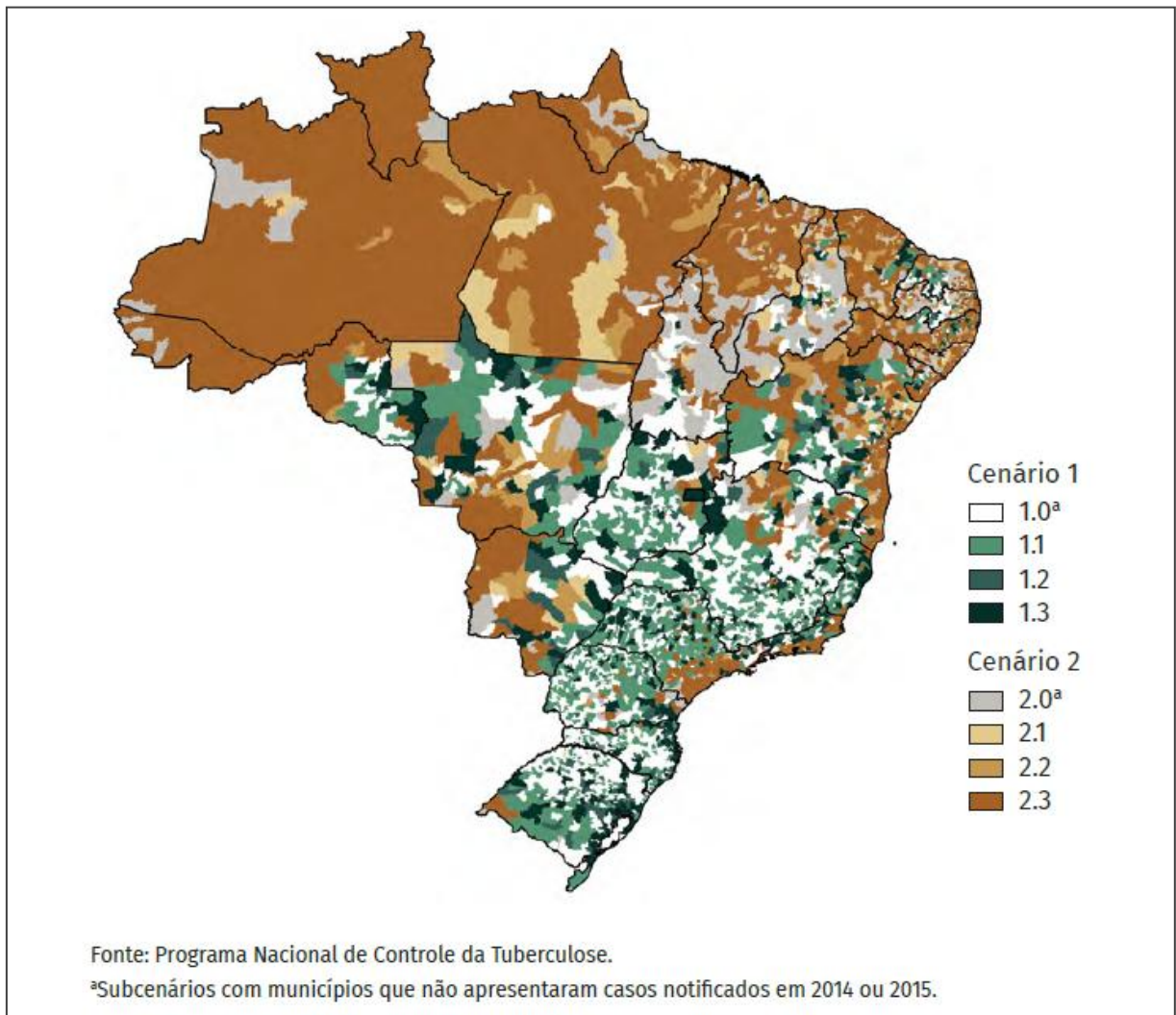


Figura 8. Municípios brasileiros segundo prioridade para o controle da TB baseado nos indicadores socioeconômicos, epidemiológicos e operacionais. Adaptado: (BRASIL, 2017a).

O Plano distribui competências para as esferas do governo considerando as respectivas responsabilidades estabelecidas no SUS, portanto, para o sucesso nas ações, as iniciativas políticas tornam-se altamente interdependentes, o que exige a construção e a integração de

parcerias entre os entes políticos federados (União, estados, Distrito Federal e municípios). Para contemplar os objetivos propostos até o ano de 2035, sua execução foi dividida em quatro fases: 2017-2020, 2021-2025, 2026-2030 e 2031-2035, as quais serão monitoradas e avaliadas de forma direta e indireta e seus resultados orientarão a tomada de decisão para as fases subsequentes em todas as esferas (BRASIL, 2017a).

Entre os desafios do Plano Nacional no enfrentamento da doença está a vigilância do óbito, da infecção e da TB resistente. Fortalecimento das ações de controle da doença nas populações mais vulneráveis, melhoria nos sistemas de informação para fins de vigilância e tomada de decisão e contribuição na participação de pesquisas para inovação de tecnologias para prevenção, diagnóstico e tratamento (BRASIL, 2017a).

O Plano está pautado nos três pilares estabelecidos pela OMS sendo o primeiro voltado para a Prevenção e Cuidado Integrado Centrados na Pessoa com TB; o segundo para Políticas Arrojadadas e Sistema de Apoio; e o terceiro, para Intensificação da Pesquisa e Inovação. Suas metas são reduzir o coeficiente de incidência para menos de 10 casos por 100 mil habitantes e de mortalidade por TB para menos de 1 óbito por 100 mil habitantes até o ano de 2035 (BRASIL, 2018).

Nesse sentido, visando atender e fortalecer as ações propostas pelo terceiro pilar, o presente estudo vai de encontro com o Plano e suas metas, uma vez que pode trazer novas informações acerca da TB, explorando as particularidades da doença e identificando as vulnerabilidades em que ocorre a transmissão em regiões de fronteiras, como um primeiro passo de uma cadeia de ações que são necessárias para conseguir controlar a doença nessas regiões.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a caracterização molecular de organismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* isolados em dois estados de fronteira brasileiros (Mato Grosso do Sul e Roraima) através do RFLP-IS6110, *Spoligotyping* e VNTR-MIRU e identificar agrupamentos genômicos e fatores de risco associados à transmissão recente, definindo a dinâmica de propagação e o perfil de resistência da TB nessas regiões.

3.2 Específicos

- Descrever os aspectos sociodemográficos e clínico-epidemiológicos dos casos do estudo.
- Agrupar isolados de MTB com mesmo padrão genotípico identificando possíveis surtos ou agrupamentos genômicos (*clusters*) buscando identificar vínculos epidemiológicos.
- Identificar fatores de risco associados à transmissão recente da TB.
- Identificar as principais linhagens de MTB circulantes.
- Identificar a circulação de MTB com resistência às drogas antiTB e suas mutações.
- Estimar as taxas de resistência às drogas antiTB.
- Definir o perfil de TB em Mato Grosso do Sul e Roraima com informações que poderão subsidiar futuras intervenções para prevenir e controlar a doença nessas regiões fronteiriças.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, Article ID 814943, 2010.

AMARANTE, J. M.; COSTA, V. L. D. A. A tuberculose nas comunidades indígenas brasileiras na virada do século. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 8, n. 2, p. 5-12, 2000.

AUGUSTO, C. J. et al. Comparative study of RFLP-IS6110 and MIRU-VNTR from Mycobacterium tuberculosis isolated in the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 49, n. 3, p. 641-646, 2017.

BACHOUR, E. et al. [Idiopathic giant cell granulomas of the pituitary gland. Apropos of 2 cases]. **Neurochirurgie**, v. 37, n. 4, p. 253-7, 1991.

BASTA, P. C.; DE SOUSA VIANA, P. V. Determinants of tuberculosis in Indigenous people worldwide. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 1, p. e6-e7, 2019.

BASTA, P. C. et al. Desigualdades sociais e tuberculose: análise segundo raça/cor, Mato Grosso do Sul. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 854-864, 2013.

BEHR, M. et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. **The Lancet**, v. 353, n. 9151, p. 444-449, 1999.

BELO, E. N. et al. [Tuberculosis in Amazonian municipalities of the Brazil-Colombia-Peru-Venezuela border: epidemiological situation and risk factors associated with treatment default]. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 34, n. 5, p. 321-9, 2013.

BETHLEM, E. P. Manifestações clínicas da tuberculose pleural, ganglionar, geniturinária e do sistema nervoso central. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 19-22, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 43p. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Brasil Livre da Tuberculose - Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: 52p. 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 8, 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: 364p. (2018) 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: 2011.

BRASIL. Portal da Saúde. 2014. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/743-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/12-tuberculose/11941-viajantes-tuberculose> >. Acesso em: 16 de maio de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 11, p. 1-18, 2018.

BRODIE, D.; SCHLUGER, N. W. The diagnosis of tuberculosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 26, n. 2, p. 247-271, 2005.

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

CAMPOS, R.; PIANTA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul–Brasil. **Boletim da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 61-71, 2001.

CARBALLO, M.; NERUKAR, A. Migration, refugees, and health risks. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3 Suppl, p. 556, 2001.

CDC. From the Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis morbidity among US-born and foreign-born populations--United States, 2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 51, n. 5, p. 101, 2002.

CEYHAN, I.; SIMSEK, H.; TARHAN, G. [Comparison and evaluation of Lowenstein-Jensen medium and 2% Ogawa medium for the diagnosis of tuberculosis]. **Mikrobiyol Bul**, v. 46, n. 1, p. 33-8, 2012.

CNJ. Ministério da Justiça. **Banco Nacional de Monitoramento de Prisões – BNMP 2.0: Cadastro Nacional de Presos, Conselho Nacional de Justiça**. Brasília, 2018.

COELHO, A. G. V. et al. Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 707-711, 2007.

COIMBRA JR, C. E.; BASTA, P. C. The burden of tuberculosis in indigenous peoples in Amazonia, Brazil. **Transactions of the Royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 101, n. 7, p. 635-636, 2007.

COLE, S. T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complexa. **Microbiology**, v. 148, n. 10, p. 2919-2928, 2002.

COMAS, I. et al. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7815, 2009.

COSTA, D. C. Política indigenista e assistência à saúde Noel Nutels e o serviço de unidades sanitárias aéreas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 3, p. 388-401, 1987.

COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. In: (Ed.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, 2013.

COWAN, L. S. et al. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1592-1602, 2002.

CRODA, M. G. et al. Tuberculosis control in a highly endemic indigenous community in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 4, p. 223-229, 2012.

CUNHA, E. A. T. et al. A diagnosis of pulmonary tuberculosis and drug resistance among inmates in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 324-330, 2018.

DALOVISIO, J. R. et al. Comparison of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR, and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 1099-1106, 1996.

DARA, M. et al. The minimum package for cross-border TB control and care in the WHO European region: a Wolfheze consensus statement. **European Respiratory Journal**, p. erj00530-2012, 2012.

DARA, M. et al. **Guidelines for control of tuberculosis in prisons. Washington (DC): USAID; TBCTA; ICRC; 2009**, 2009.

DE BOER, A. S. et al. Analysis of rate of change of IS 6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1238-1244, 1999.

DE VRIES, G. et al. Transmission classification model to determine place and time of infection of tuberculosis cases in an urban area. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3924-3930, 2008.

DE VRIES, G. et al. Transmission classification model to determine place and time of infection of tuberculosis cases in an urban area. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3924-30, 2008.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, 2013.

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

DI PERRI, G. et al. Tuberculosis among refugees and displaced people at the Burundi-Rwanda border. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 2, p. 500-1, 1998.

EI, P. W. et al. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a review of frequently used methods. **Journal of Korean Medical Science**, v. 31, n. 11, p. 1673-1683, 2016.

ESCOBAR, A. L. et al. Tuberculose em populações indígenas de Rondônia, Amazônia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 285-298, 2001.

FERRAZ, A. F.; VALENTE, J. G. **A tuberculose pulmonar na população privada de liberdade de Mato Grosso do Sul, 2007-2009**. Brasil: Portal do Ministério da Justiça, 2009.

FERREIRA JÚNIOR, S.; OLIVEIRA, H. B.; MARIN-LÉON, L. [Knowledge, attitudes and practices on tuberculosis in prisons and public health services]. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 1, p. 100-13, 2013.

FIGUEROA-MUNOZ, J. I.; RAMON-PARDO, P. Tuberculosis control in vulnerable groups. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, p. 733-735, 2008.

FITCHETT, J. R.; VALLECILLO, A. J.; ESPITIA, C. Tuberculosis transmission across the United States-Mexico border. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 29, p. 57-60, 2011.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **American Journal of Epidemiology**, v. 153, n. 12, p. 1135-1141, 2001.

GARCÍA-ELORRIAGA, G.; DEL REY-PINEDA, G. **Practical and Laboratory Diagnosis of Tuberculosis: From Sputum Smear to Molecular Biology**. Springer, 2015.

GNEHM, H.; STÄHELIN-MASSIK, J.; ZEILINGER, G. Congenital tuberculosis in a premature infant. **Swiss Medical Weekly**, v. 132, n. 4142, 2002.

GORDIN, F. M.; MASUR, H. Tuberculosis in the United States in 2012: Current approaches. **JAMA**, v. 308, n. 3, p. 283, 2012.

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 67, 2018.

HAMEED, H. M. A. et al. Molecular Targets Related Drug Resistance Mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* Strains. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 114-114, 2018.

HIJJAR, M. A. et al. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, p. 50-57, 2007.

HIJJAR, M. A.; OLIVEIRA, M. J. P. R. D.; TEIXEIRA, G. M. A tuberculose no Brasil e no mundo. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 2, p. 9-16, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Os indígenas no Censo Demográfico 2010: primeiras considerações com base no quesito cor ou raça**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro: 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Características sociodemográficas de Mato Grosso do Sul**. 2018a. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/panorama> >. Acesso em: 20/12/2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Características sociodemográficas de Roraima**. 2018b. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rr/panorama> >. Acesso em: 20/12/2018.

IOANNIDIS, P. et al. Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indications of tuberculosis and smear-negative microscopy results. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3068-3070, 2011.

ISLAM, M. M. et al. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 44, n. 1, p. 21-37, 2017.

JELIŇSK, A. et al. Tuberculosis-present medication and therapeutic prospects. **Current Medicinal Chemistry**, 2018.

KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 907-14, 1997.

KIM, T. C. et al. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post-treatment. **American Review of Respiratory Disease**, v. 129, n. 2, p. 264-8, 1984.

KOCHI, A. Tuberculosis: distribution, risk factors, mortality. **Immunobiology**, v. 191, n. 4-5, p. 325-336, 1994.

KREMER, K. et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5628-5638, 2005.

KWON, H.; TOMIOKA, H.; SAITO, H. Distribution and characterization of β -lactamases of mycobacteria and related organisms. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, n. 2, p. 141-148, 1995.

LEMISZEWSKA, A.; LHUILIER, D. **Le choc carcéral: survivre en prison**: Paris: Bayard 2001.

LÖNNROTH, K. et al. Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. **Social Science & Medicine**, v. 68, n. 12, p. 2240-2246, 2009.

LÖNNROTH, K.; RAVIGLIONE, M. The WHO's new End TB Strategy in the post-2015 era of the Sustainable Development Goals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 3, p. 148-150, 2016.

LUNA, J. C. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. **Revista Clínica Española**, v. 216, n. 2, p. 76-84, 2016.

MACEDO, L. R.; MACIEL, E. L. N.; STRUCHINER, C. J. Tuberculose na população privada de liberdade do Brasil, 2007-2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, p. 783-794, 2017.

MARQUES, A. M.; DA CUNHA, R. V. [Assisted treatment and tuberculosis cure and treatment dropout rates in the Guarani-Kaiwa Indian nation in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil]. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1405-11, 2003.

MARQUES, A. M. C. et al. Tuberculose em indígenas menores de 15 anos, no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 700-704, 2010.

MARQUES, M. et al. Resistência às drogas antituberculose na fronteira do Brasil com Paraguai e Bolívia. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 41, p. e9-e9, 2017.

MARQUES, M. et al. Magnitude da tuberculose pulmonar na população fronteiriça de Mato Grosso do Sul (Brasil), Paraguai e Bolívia. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 2631-2642, 2014.

MARTINEZ, V. N. et al. Equity in health: tuberculosis in the Bolivian immigrant community of Sao Paulo, Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v.17, n.2, p.1417-1424, 2012.

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

MELO, F. A. F. D.; AFIUNE, J. B. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. **Jornal de Pneumologia**, v. 19, n. 1, p. 19-24, 1993.

MINETTI, A. et al. Tuberculosis treatment in a refugee and migrant population: 20 years of experience on the Thai-Burmese border. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 12, p. 1589-95, 2010.

MIOTTO, P. et al. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. **Respirology**, v. 23, n. 12, p. 1098-1113, 2018.

MONTORO, E.; VALDIVIA, J.; LEO, S. C. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Havana, Cuba, by IS6110 restriction fragment length

polymorphism analysis and by the double-repetitive-element PCR method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 3099-102, 1998.

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

NGUYEN, Q. H. et al. Insights into the processes that drive the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 9, p. 1498-1511, 2018.

OLARU, I. D. et al. Novel drugs against tuberculosis: a clinician's perspective. **European Respiratory Journal**, v. 45, n. 4, p. 1119-1131, 2015.

PABLOS-MÉNDEZ, A. et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994–1997. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 23, p. 1641-1649, 1998.

PARTE, A. C. LPSN-List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1825-1829, 2018.

PEITER, P. C. A geografia da saúde na faixa de fronteira continental do Brasil na passagem do milênio. **Rio de Janeiro: Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2005.

PERES, R. L. et al. Risk factors associated with cluster size of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) of different RFLP lineages in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 71-71, 2018.

PEZZELLA, A. T. History of Pulmonary Tuberculosis. **Thoracic Surgery Clinics**, v. 29, n. 1, p. 1-17, 2019.

POROCA, D. A. R. et al. Differentiation of micobacteria by multiplex PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 716-22, 2009 Nov-Dec 2009.

PRADIPTA, I. S. et al. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: A global systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, 2018.

RENDON, A. et al. Migration, TB control and elimination: whom to screen and treat. **Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)**, 2017.

RIOS, D. P. et al. [Tuberculosis in indigenous peoples in the Brazilian Amazon: an epidemiological study in the Upper Rio Negro region]. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 33, n. 1, p. 22-9, 2013.

RODRIGUES, H. A. D. N. **Doenças negligenciadas no estado de Roraima: uma análise a partir da geografia da saúde para o período de 2000 a 2013**. 2015. 157 Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado.

ROSEMBERG, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 7, p. 5-29, 1999.

- SACCHI, F. P. et al. Prisons as reservoir for community transmission of tuberculosis, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 3, p. 452, 2015.
- SANTOS, L. C.; KIPNIS, A. P. J.; KIPNIS, A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista de Patologia Tropical**, v.36, n.1, 2007.
- SANTOS, T. Levantamento Nacional de Informações Penitenciárias (INFOPEN) - Atualização - Junho de 2016. **Brasília, DF: Ministério da Justiça**, 2017.
- SARATHY, J.; DARTOIS, V.; LEE, E. The role of transport mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance and tolerance. **Pharmaceuticals**, v. 5, n. 11, p. 1210-1235, 2012.
- SCHNEIDER, E. et al. Tuberculosis along the United States-Mexico border, 1993-2001. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 16, n. 1, p. 23-34, 2004.
- SHEHZAD, A. et al. Challenges in the development of drugs for the treatment of tuberculosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 74-81, 2013.
- SHILOH, M. U. **Mechanisms of mycobacterial transmission: how does Mycobacterium tuberculosis enter and escape from the human host**: Future Medicine, 2016.
- SILVA-SOBRINHO, R. A. et al. Delays in the diagnosis of tuberculosis in a town at the triple border of Brazil, Paraguay, and Argentina. **Revista panamericana de salud publica= Pan American journal of public health**, v. 31, n. 6, p. 461-468, 2012.
- SILVA JR., J. B. D. Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. S57-S86, 2004.
- SIMPSON, G. Multidrug-resistant tuberculosis on Australia's northern border. **Internal medicine journal**, v. 41, n. 11, p. 759-761, 2011.
- SOUSA, A. O. et al. An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 24, p. 13227-32, 1997.
- STAEVIE, P. M. Expansão urbana e exclusão social em Boa Vista-Roraima. **Oculum Ensaios**, n. 13, p. 68-87, 2013.
- SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498-4510, 2006.
- THIERRY, D. et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2668-2673, 1990.
- TOLLEFSON, D. et al. Burden of tuberculosis in indigenous peoples globally: a systematic review. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 17, n. 9, p. 1139-1150, 2013.

URREGO, J. et al. The impact of ventilation and early diagnosis on tuberculosis transmission in Brazilian prisons. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 4, p. 739-746, 2015.

VAN DER ZANDEN, A. et al. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1101-1108, 2003.

VAN EMBDEN, J. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.

WENIGER, T. et al. MIRU-VNTR plus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_2, p. W326-W331, 2010.

WHO. **Treatment of tuberculosis: guidelines for national programs**. . World Health Organization. Geneva. 2006

WHO. **Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB**. World Health Organization, 2013.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2016**. Geneva: World Health Organization, 2016.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2018**. Geneva: World Health Organization, p.265, 2018

WINN JR, W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan: Koneman, 2008.

WPB. **Highest to Lowest - Prison Population Total**. London, 2019. Disponível em: <http://www.prisonstudies.org/highest-to-lowest/prison-population-total?field_region_taxonomy_tid=All>. Acesso em: 27/03/2019.

ZHANG, Y.; YEW, W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [State of the art series. Drug-resistant tuberculosis. Edited by CY. Chiang. Number 1 in the series]. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 11, p. 1320-1330, 2009.

5 APÊNDICES

1 **Artigo 1: Genetic diversity and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in**
2 **Roraima State, Brazil**

3

4

5 **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**

6 **Qualis: B1**

7 **FI: 2.5**

8

9 Link com as normas da revista: <https://www.ajtmh.org/author-instructions>

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34 **Genetic diversity and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Roraima**
35 **State, Brazil**

36

37 **Running title:** Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Roraima

38

39 Mariana Bento Tatará^a, João Perdigão^b, Miguel Viveiros^c, Afrânio Kritski^d, Kesia Esther da
40 Silva^a, Flávia Patussi Correia Sacchi^e, Camila Camioli de Lima^a, Paulo César Pereira dos
41 Santos^a, Jaciara de Lourdes do Carmo Guimarães Diniz^f, Pedro Eduardo Almeida Silva^f,
42 Pedro Duarte Gomes^b, Mônica Quirino Gomes^g, Eunice Atsuko Totumi Cunha^h, José Roberto
43 Lapa e Silva^d, Isabel Portugal^b, Julio Croda^{i,j}, Monica Kramer de N. Andrade^k

44

45 ^aLaboratory of Research in Health Science, Faculty of Health Science, Federal University of
46 Grande Dourados, Dourados, Brazil

47 ^bResearch Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), Faculty of Pharmacy, University of
48 Lisbon, Lisbon, Portugal

49 ^cInstitute of Hygiene and Tropical Medicine (IHMT), Global Health and Tropical Medicine
50 (GHTM), University NOVA of Lisbon, Lisbon, Portugal

51 ^dSchool of Medicine. Federal University of Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brazil

52 ^eReferent Center of Tuberculosis and Leprosy, Dourados Municipal Health Secretary,
53 Dourados, Brazil

54 ^fNucleus of Research in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Federal University of
55 Rio Grande, Rio Grande, Brazil

56 ^gCentral Laboratory of Public Health of Roraima, Boa Vista, Brazil

57 ^hCentral Laboratory of Public Health of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil

58 ⁱOswaldo Cruz Foundation, Campo Grande, Brazil

59 ^jSchool of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil

60 ^kOswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

61

62 ***Corresponding author:** Monica Kramer, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

63 Phone: +552125982848/Mobile: +552196193277 Email: monicakra@gmail.com

64

65 **Keywords:** Tuberculosis, border, genotyping, drug resistance.

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84 Abstract

85 The border areas are special places for the spread of specific *Mycobacterium*
86 *tuberculosis* (MTB) genotypes among countries. These regions generally concentrate
87 vulnerable populations with restricted access to health care system. The northern Brazilian
88 Amazon has a high contingent of indigenous population and constant population movements.
89 Understanding the dynamics of the transmission of MTB is fundamental to propose control
90 measures as well as to monitor the dissemination of drug resistant isolates. We conducted a
91 population-based prospective study of Tuberculosis (TB) during 2015 and 2016 to evaluate
92 molecular characteristics of MTB isolates circulating in Roraima, state on the border of
93 Venezuela and Guyana. A total of 80 clinical isolates were genotyped by IS6110-RFLP,
94 Spoligotyping and MIRU-VNTR (24 loci). Drug susceptibility tests were performed by
95 proportion method (phenotypic) and MTB/RIF genotypic assays. Isolates showing phenotypic
96 resistance profile were submitted to PCR and sequencing. The typed isolates showed high
97 spoligotyping diversity (40 distinct patterns) with a high prevalence of LAM, H and the “ill-
98 defined” T clades. MIRU-VNTR and RFLP-IS6110 showed clustering rates of 21.3% and
99 30%, respectively. Drug resistance was detected in 11 (15.1%) isolates, all with primary
100 resistance, among these 6 (8.2%) isolates were streptomycin mono-resistant, 4 (5.4%)
101 isoniazid mono-resistant and 1 (1.3%) multidrug-resistant (MDR-TB). This is the first study
102 on the molecular epidemiology and drug resistance profile of MTB isolated from patients
103 resident in Roraima state. Herein, we describe a high diversity of genetic profiles circulating
104 in this region that may be driven by the introduction of new strain types due to large
105 population flow in this region. In summary our results showed that analyses of these
106 circulating strains can contribute to a better understanding of TB epidemiology in northern
107 Brazilian border and useful to establish public health policies on TB prevention.

108 **Keywords:** Tuberculosis, border, genotyping, drug resistance.

109 **1. Introduction**

110 The global increase in human migrations, especially in trans-national border regions
111 with high proportion of vulnerable indigenous population, favors the spread of tuberculosis
112 (TB) between countries (Rendon et al., 2017). The Roraima state, located in the northern
113 region of Brazil, has approximately 576,568 inhabitants (IBGE, 2018) and in 2016 had an
114 incidence of 27.6 TB cases/100,000 inhabitants and a mortality of 0.8/100,000 inhabitants
115 (Saúde, 2017). In this region, the indigenous segment represents 10% of general population
116 which is distributed to 35 Indigenous Territories. The Yanomami Territory is located at the
117 border with Venezuela and the Macuxi/Wapichana Territory at the border of with Guiana and
118 Venezuela (CIR, 2018). After the National Integration Plan implemented two decades ago,
119 local population increased 39%, where, 30.5% migrated from Northeastern and Northern
120 regions (IBGE, 2018).

121 Among few studies conducted in Brazil to assess the dynamics of TB transmission in
122 border regions, there was a higher incidence of TB in the indigenous ethnicity (Belo et al.,
123 2013; Correia Sacchi et al., 2018), significant molecular diversity in circulating isolates
124 (Machado et al., 2014b), and higher resistance rates in frontier regions (Marques et al.,
125 2017a). The rate of multidrug/rifampicin-resistant (MDR/RR-TB) in Brazil is lower than in
126 other Latin American countries (1.5% in new cases and 8% in previously treated patients).
127 However, an enhanced monitoring of these regions is particularly relevant, considering the
128 resistance rates in the two countries at the northern Brazilian border are significantly higher
129 corresponding to 2.9% in new cases and 17% in previously treated patients (Guyana) and
130 2.9% and 13% in Venezuela (WHO, 2017).

131 The contribution of an intensified migratory flow and consequent introduction of new
132 *M.tuberculosis* (MTB) strains requires a greater investment in integrated TB control programs
133 in the border regions, as well as the monitoring of drug resistance and recent transmission in

134 this region. In this sense, combining classical epidemiological data with molecular data
135 obtained from genotypic analysis can provide an additional layer of information that enables a
136 better understanding of local TB transmission dynamics while allowing a comparison against
137 macro epidemiological scenario. Presently, no genotypic data is available for this specific
138 region of Brazil, and molecular epidemiological data could help to identify cryptic
139 transmission clusters that are otherwise undetected by classical epidemiological investigation.
140 Moreover, being a border state, the identification of clustered *M. tuberculosis* clinical isolates
141 associated with migrants can help to identify risk factors for the dissemination of imported
142 cross-border strains.

143 Under this rationale, we conducted a cross-sectional study, consisting of a clinical-
144 epidemiological description of the TB cases and molecular characterization of *M. tuberculosis*
145 isolates circulating in the region to obtain a high-resolution snapshot of the TB transmission
146 in Roraima.

147

148 **2. Material and methods**

149 2.1 Study population and data collection

150 From April/2015 to September/2016, we established a surveillance network composed
151 of four laboratories: Casa de Saúde Indígena (CASAI), Hospital Geral de Roraima (HGR),
152 Laboratório Regional Municipal (LRM) and Laboratório Central do Estado Roraima
153 (LACEN/RR) located in the city of Boa Vista, capital of Roraima. The inclusion criteria was:
154 pulmonary and/or pulmonary plus extrapulmonary TB cases with positive culture, plus were
155 included only patients with age ≥ 13 years old that answered a standardized questionnaire and
156 signed a written informed consent. Patients with no culture were excluded. The variables
157 obtained during the interview included: birthplace, address, time duration in the actual city,
158 job activities in other municipality/countries, previous history of TB treatment, last TB

159 treatment outcome, contact with pulmonary TB, classification of current TB case (new case or
160 retreatment) and family relationship (city of residence, length of residence and frequency
161 meeting with relatives). Complementary sociodemographic data were obtained from the
162 National Reporting System on Notifiable Diseases (SINAN), which included, race/skin,
163 education level, TB treatment outcome, vulnerable population and comorbidities (diabetes,
164 mental disorder, drug addiction, smoking history and alcohol abuse). All collected data were
165 stored and analyzed by IBM SPSS Statistics 13.0 Program. The frequency and percentages
166 were analyzed to all categorical variables. In accordance with the Brazilian Guidelines, HIV
167 testing was offered to all TB patients included in the study. This study was conducted with the
168 approval of the Research Ethics Committee from the National. Public Health School/Oswaldo
169 Cruz Foundation (number CAE 32357114.4.00005240).

170

171 2.2 Clinical samples and susceptibility testing

172 All sputum specimens collected in the participating laboratories were examined by
173 microscopy and/or GeneXpert® MTB/RIF, processed with sodium hydroxide (NaOH)
174 method and inoculated in Ogawa-Kudoh culture medium. Cultures were incubated at 37°C for
175 up to eight weeks and checked weekly for visible colony. Detection of acid-fast bacilli was
176 performed in the LACEN/RR with evaluation of microscopic aspects (Zheel-Neelsen staining,
177 bacillus size, string factor (Coelho et al., 2007), colony aspect and growth time) and p-
178 nitrobenzoic acid (PNB) inhibition test (Giampaglia et al., 2007). *M. tuberculosis*
179 identification was performed with the MPT64 protein detection-based
180 immunochromatographic rapid test (SD Biotec Kit, Standard Diagnostics, Inc., Korea)
181 (Arora et al., 2015). Drug susceptibility tests (DST) were performed using proportion method
182 in Lowenstein-Jensen medium. The concentrations tested were: streptomycin (SM) - 4.0
183 µg/mL, isoniazid (INH) - 0.2 µg/mL, rifampicin (RIF) - 40 µg/mL and ethambutol (E) - 2.0

184 $\mu\text{g/mL}$ (Brasil, 2008). Isolates showing phenotypic resistance profile to rifampicin and
185 isoniazid were classified as multidrug-resistant (MDR) (Marques et al., 2017a).

186

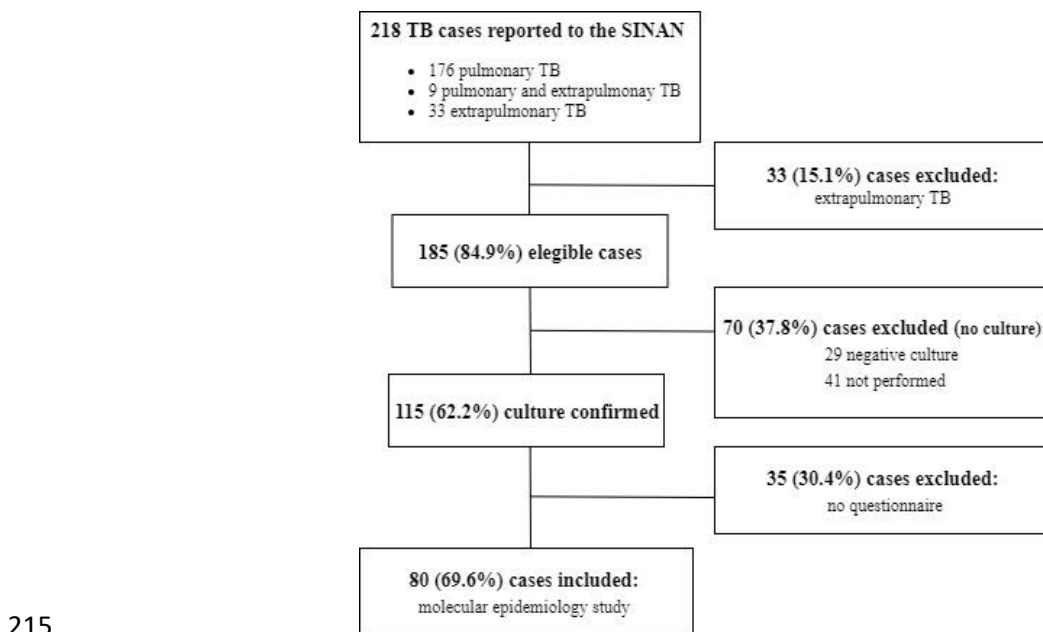
187 2.3 Molecular detection and phylogenetic analysis

188 Positive cultures with confirmed *M. tuberculosis* complex were sent to Laboratories of
189 Universidade Federal da Grande Dourados - Brazil and Universidade de Lisboa – Portugal for
190 molecular analysis. DNA was extracted from fresh culture to investigate chromosomal
191 resistance mechanisms and mutational events the nucleotide sequences of *rpoB*, *katG*, *inhA*,
192 *rrs*, *rpsL* and *gidB* genes were analyzed by PCR and sequencing (Maningi et al., 2018).
193 Rifampicin resistance was re-confirmed using GeneXpert® MTB/RIF assay (Boehme et al.,
194 2010). The genetic relationship of MTB isolates and the recent transmission was evaluated
195 using IS6110-RFLP (Van Embden et al., 1993), Spoligotyping (Kamerbeek et al., 1997) and
196 MIRU-VNTR typing 24 loci (Supply et al., 2000). RFLP patterns were analyzed using an
197 IS6110-RFLP database (RIVM–Bionumerics; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)
198 and a genotypic cluster was defined as a group of two or more isolates from different patients
199 whose RFLP patterns were identical with respect to the number and size of bands. Spoligo
200 patterns were further analyzed using SITVITWEB/SpolDB4 database (Brudey et al., 2006;
201 Demay et al., 2012) and SPOTCLUST (Vitol et al., 2006). Twenty-four loci MIRU-VNTR
202 typing was performed as previously described (Supply et al., 2006) and were considered
203 clusters strains with 100% of similarity. The patterns were analysed using the algorithms
204 available within the the BioNumerics software v.7.1 (Applied Maths). Percentage similarity
205 between fingerprints was scored by the Dice coefficient. The unweighted pair group method,
206 with arithmetic mean, with a 0.5% limit tolerance, was used to construct a dendrogram (Peres
207 et al., 2018).

208

209 3. Results

210 In the study period, 218 TB patients were notified in the SINAN, of which 176
 211 patients presented pulmonary TB (PTB), 9 pulmonary and extrapulmonary TB (PEPTB) and
 212 33 extrapulmonary TB (EPTB). Among the 185 PTB and PEPTB cases, 115 (62.2 %) were
 213 culture confirmed, and among them 80 (69.6 %) were included in the epidemiological and
 214 molecular study (Figure 1).



215

216 **Figure 1.** Flowchart of recruitment of patients with tuberculosis. SINAN = Sistema de
 217 Informação de Agravos de Notificação (National Notifiable Diseases Information System)

218

219 Among the patients included in study (n = 80), the majority were male (62.5%), non-
 220 white (81%) and age ranged between 21 and 60 years (76.3%). Most patients had an
 221 educational level below 8 years (32.3%) and a low proportion was registered in the Social
 222 Protection Government Programs, as Bolsa Família Program (17.7%). Patients had a history
 223 of smoking (24.6%), illicit drug use (20.8%) and alcoholism (20%). Most of these cases were
 224 reported by hospitals (60%) and among indigenous, 41.7% (n=5/12) were reported by CASAI
 225 (Table 1).

226 **Table 1.** Sociodemographic and clinical characteristics of TB patients from the state of
 227 Roraima – Brazil.

Characteristics	TB patients - n (%)
Gender	
male	50/80 (62.5)
female	30/80 (37.5)
Age	
mean/sdt	40.1/16.559
median	37.5
age range (years)	
>14 to 20	8/80 (10)
> 20 - 40	37/80 (46.3)
> 40 -60	24/80 (30)
> 60	11/80 (13.7)
Race	
white	3/79 (3.8)
non-white	64/79 (81)
indigenous	12/79 (15.2)
Schooling level	
illiterate	11/65 (16.9)
≤ 4 years	15/65 (23.1)
> 4 -8 years	18/65 (27.7)
> 8	21/65 (32.3)
Government social programme	
Vulnerable population:	
1. Inmates	7/80 (8.7)
2. Homeless	3/80 (3.7)
3. Immigrants	2/80 (2.5)
Tb clinical presentation	
pulmonary	77/80 (96.3)
pulmonary and extra pulmonary	3/80 (3.7)
Comorbidity	
1. Smoking history	18/73 (24.6)
2. Drug addiction	16/77 (20.8)
3. Alcoholism	16/80 (20)
3. Diabetes	10/80 (12.5)
4. Mental disorder	1/80 (1.3)
5. Aids	8/72 (11.1)
Health care	
primary health units	27/80 (33.8)
hospital	48/80 (60)
casai	5/80 (6.2)
Treatment outcome	
favorable	57/77 (74)
unfavorable**	20/77 (26)

**Death by other causes (n=9); failure (n=2); lost of follow-up (n=10); tbdr (n=6); changed treatment (n=1).

228 GeneXpert® MTB/RIF showed that 1/55 (1.8%) strain was resistant to rifampicin.
229 Conventional DST detected resistance to one or more drugs in 11/73 (15.1%) strains: 6
230 resistant to SM; 4 resistant to INH and 1 MDR-TB. Sequencing analysis of *rrs*, *rpsL*, *gidB*
231 (streptomycin resistance), showed that four strains presented a point mutation in the *gidB*
232 (C413T/A138V) whereas *rrs* and *rpsL* genes showed a WT sequence in all isolates analyzed.
233 Finally, no mutations in the above mentioned genes were found in two streptomycin-resistant
234 isolates. Analysis of *katG* and *inhA* promoter region (isoniazid resistance) genes showed that
235 three isolates carried a point mutation in the *inhA* (C-15T) gene while was detected in one
236 isolate a point mutation in the promoter region *katG* (G994C/S315T). Additionally, the MDR-
237 TB strain presented point mutations in the *katG* (G994C/S315T) and *rpoB* gene
238 (C1332T/H445Y), causing rifampicin resistance.

239 Next, to evaluate the genetic diversity and clonality underpinning local TB
240 transmission dynamics in the region, all 80 MTB isolates included in the study were typed by
241 IS6110-RFLP, spoligotyping and 24-loci MIRU-VNTR (Figure 2). IS6110-RFLP analysis
242 showed 67 distinct profiles, which 24 isolates were grouped in 11 different genetic clusters
243 composed of 2 isolates (n = 10 clusters) and 4 isolates (n = 1 cluster), yielding an estimated
244 recent transmission rate of 30% (24/80). Spoligotyping showed a high genetic diversity with
245 40 distinct patterns and higher frequency of SIT 64/LAM 6 (n = 16, 20.0%), SIT42/ LAM 9 (n
246 = 7, 8.75%) and SIT50/H3 (n = 5, 6.25%). Noteworthy, uncommon profiles in Brazil were
247 also detected: SIT1/Beijing (n = 2, 2.5%) and SIT100/MANU 1 (n = 1, 1.25%). The EAI6-
248 BGD1 family was represented by 3 isolates (3.75%) with sublineages SIT 129 (n = 1) and SIT
249 1340 (n = 2). In addition were found 3 non-sit (orphan patterns) and 9 unknown profiles
250 (Table 2).

251

252

253 **Table 2.** Genotypic characterization by Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates
 254 obtained from patients from the state of Roraima – Brazil (n = 80).

Octal	Clade	SIT	n (%)
777777607560771	LAM6	64	16 (20)
777737607560771	LAM6	176	2 (2.5)
777777607560731	LAM6	95	2 (2.5)
777777607760771	LAM9	42	7 (8.75)
777437607560771	LAM9 *	Unknown	3 (3.75)
757777601560771	LAM9 *	Unknown	3 (3.75)
777177607760771	LAM9	ORPHAN	1 (1.25)
777437607560771	LAM9 *	Unknown	1 (1.25)
777747607600371	LAM9 *	Unknown	1 (1.25)
777777607700771	LAM9 *	1241	1 (1.25)
577777607560731	LAM9 *	Unknown	1 (1.25)
677737607760711	LAM2	179	2 (2.5)
677737607760771	LAM2	17	2 (2.5)
677777607760771	LAM1	20	2 (2.5)
677777604760771	LAM1	ORPHAN	1 (1.25)
777700607760771	LAM5	1337	1 (1.25)
777737607700771	LAM5 *	443	1 (1.25)
777737607760771	LAM5	93	1 (1.25)
776177400060771	LAM8 *	Unknown	2 (2.5)
777777777720771	H3	50	5 (6.25)
000000007720771	H3	3	1 (1.25)
777777477720771	H3	ORPHAN	1 (1.25)
777777777700771	H3 *	124	1 (1.25)
777777677720671	H3 *	Unknown	1 (1.25)
777777774020771	H1	47	3 (3.75)
000000004020771	H2	2	1 (1.25)
777717777760771	T1	131	1 (1.25)
777777423560771	T1	1643	1 (1.25)
777763617560731	T1 *	Unknown	1 (1.25)
777737777760731	T1 *	73	1 (1.25)
777737777660471	T1 *	Unknown	1 (1.25)
777777600560731	T2	1664	1 (1.25)
777777777760731	T2	52	1 (1.25)
777777777700000	T2 *	237	1 (1.25)
777776777760601	X2	137	2 (2.5)
700036777560771	X3	546	1 (1.25)
777775757413371	EAI6-BGD1	1340	2 (2.5)
700777747413771	EAI6-BGD1	129	1 (1.25)
000000000003771	Beijing	1	2 (2.5)
777777777773771	MANU1	100	1 (1.25)

*Clade assignment by SPOTCLUST

255
 256
 257

258 The genotypic analysis by MIRU-VNTR (24 loci) showed 69 distinct profiles
259 including 17 isolates (21.3%) grouped into 6 clusters, of which 3 contained INH or SM-
260 resistant isolates. The largest cluster (Cluster D/n = 5) was composed only of non-indigenous
261 patients and non-drug resistant isolates. Two clusters (Clusters C and F) were composed of 3
262 isolates exclusively from non-indigenous patients presenting streptomycin and isoniazid-
263 resistant isolates. Cluster B presented two isolates with different IS6110-RFLP and
264 Spoligotyping profiles, which may occur in case of mixed bacterial populations. Two clusters
265 grouped isolates from indigenous patients of the Yanomami (n = 2) and Macuxi (n = 2)
266 ethnicity (Cluster A and E), where one of these isolates presented streptomycin resistance
267 (Figure 2).

268 Comparing clustered MTB isolates to those non clustered, no statistically significant
269 difference was observed with the following variables: gender, ethnicity, scholar level, length
270 residence in Boa Vista, previous contact with TB, HIV seropositivity and unfavorable TB
271 treatment (Table S1). Cluster D was the only one where evidence of possible epidemiologic
272 links was found with two patients living on the same street. In the remaining clusters no
273 epidemiological correlations were found. An interactive version of the global phylogeny, with
274 strains labeled by genotype, city of origin and year of isolation, is available at
275 <https://microreact.org/project/rJmSTBEMV>.

276

277

278

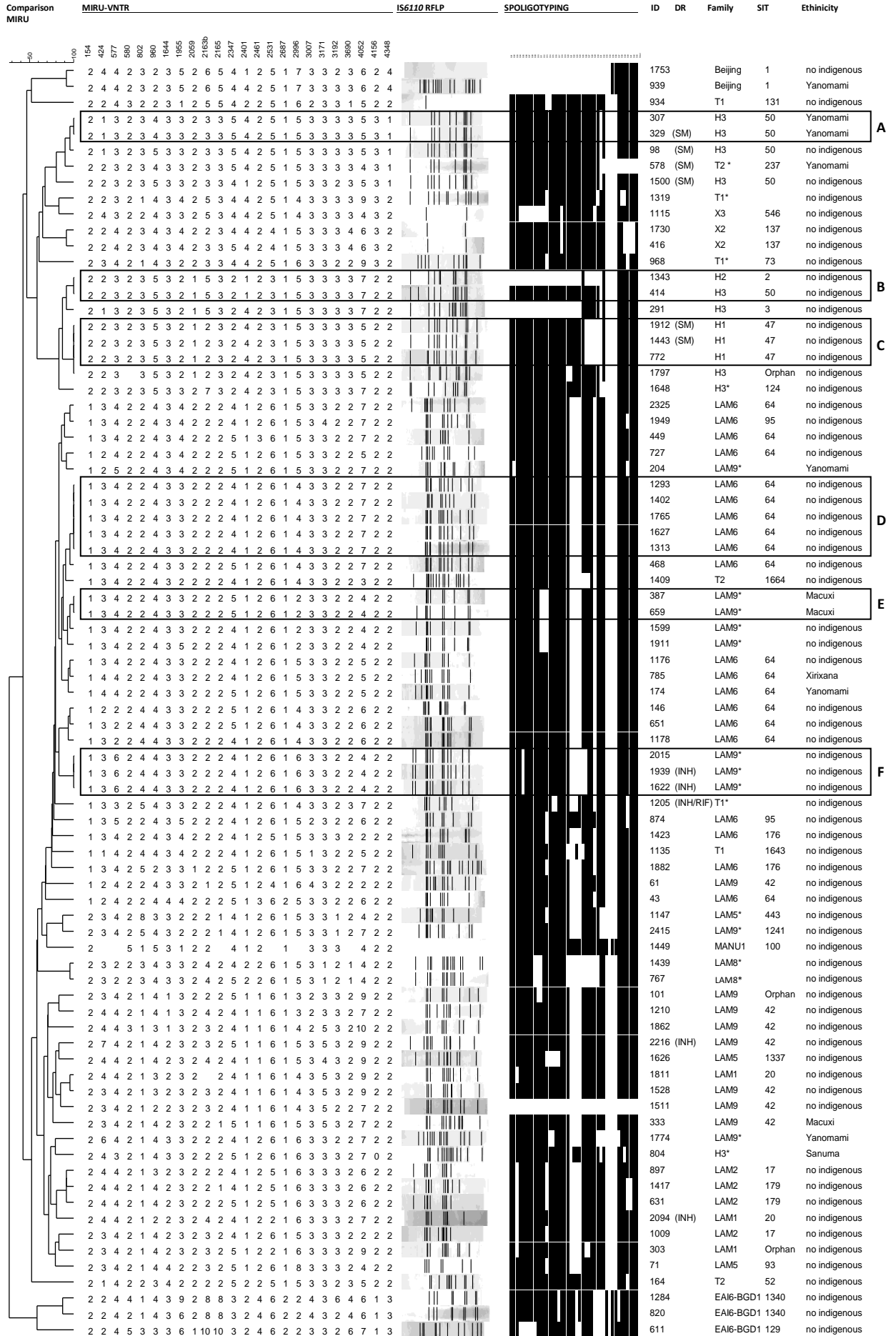
279

280

281

282

283



285 **Figure 2.** Dendrogram based on MIRU-VNTR (24 loci) and presentation of the IS6110-RFLP
286 and Spoligotyping profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains obtained from Roraima,
287 state - Brazil.

288

289 **4. Discussion**

290 In this study, the genotypic diversity and drug resistance of *M. tuberculosis* isolated
291 from a Brazilian State (Roraima) were characterized, comparing demographic, clinical and
292 epidemiologic characteristics of the patients. In order to investigate the transmission between
293 patients the RFLP technique - IS6110 and MIRU-VNTR analysis were performed. Our results
294 showed that the majority of the MTB strains had unique profiles, with a recent transmission
295 rate lower than those described in other studies carried out in Brazil (Dantas et al., 2015b;
296 Machado et al., 2014b; Ribeiro et al., 2015). This might be explained by several factors
297 including, period of sample collection and constant migration flow (legal and illegal crossing
298 of the border).

299 The capital Boa Vista gathered the majority of the cases. Since 2000, the region has
300 been experiencing an increasing accessibility, leading to a high population growth, industrial
301 and commercial development (de Mello and Silva, 2005). People from Venezuela e Guiana
302 cross the borders to Brazil due to a lack of Universal Health Care and/or economic and
303 political crisis in their countries (Fraser and Willer, 2016). In 2017, the incidence of TB in the
304 state increased 8.4 TB cases/100,000 inhabitants compared to 2016. Among the TB cases
305 notified, 90% were from patients residents in Roraima, 3.2% from Amazonas and 6.9% from
306 Guiana and Venezuela (BRASIL, 2018).

307 The exact transmission source between individuals could not be established in the
308 clusters with similar genotypes, however transmission insights can be addressed, given that
309 most of our samples are from the same city. Even without explicitly reconstructing

310 transmission events, some conclusions can be drawn, since the combination of spatial and
311 genotyping data suggested ongoing neighborhood transmission. In addition patient history
312 showed that 59% of the individuals grouped in clusters had a history of close contact with
313 family member or friend with tuberculosis.

314 Spoligotyping analysis showed that the LAM (62.5%), H (16.25%) and the “ill-
315 defined” T (10%) lineages presented the highest frequency in this study, similar to results
316 described in South American countries, including Venezuela (Abadia et al., 2009; Candia et
317 al., 2007; Lagos et al., 2016; Mokrousov et al., 2014). These findings are also similar to
318 reports of other Brazilian states, describing the predominance of the LAM (46%), T family
319 (18.6%) and H family (12.2%), in Minas Gerais, Belém and Paraná, a Brazilian state
320 bordering Paraguay and Argentina (Dantas et al., 2015a; Furlaneto et al., 2013; Gomes et al.,
321 2012; Machado et al., 2014a). An interesting finding was the identification untypical
322 spoligotype profiles in Brazil, (EAI, Beijing and MANU1), which are more common in the
323 Far and Middle East, Asia, Oceania and India (Banuls et al., 2015; Brudey et al., 2006).

324 Regarding the indigenous population, the most frequent patterns (SIT50/H3,
325 SIT64/LAM6, SIT42/LAM9 and LAM9*) were also identified in the non indigenous patients.
326 Surprisingly, unlike the other common spoligotypes found in indigenous communities, the
327 Beijing strains were identified in our study in two patients (indigenous and no indigenous)
328 who belonged to the same family, living in the same neighborhood. These findings supports
329 the introduction of new lineages in the indigenous population of this region, which may be a
330 result of social activities, as indigenous populations often go to urban areas (Malacarne et al.,
331 2018).

332 In contrast to previous studies (Dantas et al., 2015a; Marques et al., 2017b) we have
333 found a lower frequency of resistance cases, which could be related with the high rate of
334 favorable treatment outcomes (80.6%) observed in the Roraima state over a period of 13 years

335 (Rodrigues et al., 2016). Nucleotide sequences of *rpoB*, *katG*, *inhA*, *rrs*, *rpsL* and *gidB* genes
336 were analyzed and compared to sequences from a susceptible *M. tuberculosis* strain reference
337 strain. All mutations identified in the isolates were described in previous studies (Kandler et
338 al., 2018; Lempens et al., 2018; Molodtsov et al., 2017; Wang et al., 2014). No mutations
339 were found in the streptomycin-resistant related-genes in two isolates, indicating that other
340 mechanisms were responsible for the resistance of this isolates.

341 In conclusion, this is the first molecular characterization of MTB clinical isolates from
342 Roraima State, which borders other countries (Venezuela and Guiana). Our findings highlight
343 a great diversity of genetic profiles, with the identification of main clades (LAM, H and T)
344 circulating in this region. Although the lower recent transmission rate and decreased number
345 of resistant isolates identified in the study, the dissemination of these strains always remains a
346 public health problem. Implementation of prevention and infection control measures is
347 extremely important especially in a region with large population flow and the molecular
348 analysis of the different strains circulating can contribute enormously to tuberculosis control.

349

350 **Acknowledgements**

351 We would like to thank the Programa Estadual de Controle de Tuberculose and
352 Laboratório Central de Roraima (LACEN/RR).

353

354 **Funding**

355 This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
356 (Chamada MCTI/CNPq/MS-SCTIE grants 404237/2012-6) and by Coordenação de
357 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC/Brazil)
358 grant 88881.064961/2014-01. M.B.T received a scholarship from Coordenação de

359 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). JP was supported by a post doc
360 fellowship [SFRH/BPD/95406/2013] from Fundação para a Ciência e Tecnologia.

361

362 **Competing interests**

363 The authors have declared no competing interests.

364

365 **References**

366 Abadia, E., Sequera, M., Ortega, D., Mendez, M.V., Escalona, A., Da Mata, O., Izarra, E.,
367 Rojas, Y., Jaspe, R., Motiwala, A.S., Alland, D., de Waard, J., Takiff, H.E., 2009.
368 Mycobacterium tuberculosis ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common
369 spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. BMC Infect Dis 9, 122.

370 Arora, J., Kumar, G., Verma, A.K., Bhalla, M., Sarin, R., Myneedu, V.P., 2015. Utility of
371 MPT64 Antigen Detection for Rapid Confirmation of Mycobacterium tuberculosis Complex.
372 Journal of global infectious diseases 7, 66-69.

373 Banuls, A.L., Sanou, A., Anh, N.T., Godreuil, S., 2015. Mycobacterium tuberculosis: ecology
374 and evolution of a human bacterium. Journal of medical microbiology 64, 1261-1269.

375 Belo, E.N., Orellana, J.D., Levino, A., Basta, P.C., 2013. [Tuberculosis in Amazonian
376 municipalities of the Brazil-Colombia-Peru-Venezuela border: epidemiological situation and
377 risk factors associated with treatment default]. Revista panamericana de salud publica = Pan
378 American journal of public health 34, 321-329.

379 Boehme, C.C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M.P., Shenai, S., Krapp, F., Allen, J.,
380 Tahirli, R., Blakemore, R., Rustomjee, R., 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis
381 and rifampin resistance. New England Journal of Medicine 363, 1005-1015.

382 Brasil, 2008. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras
383 micobactérias. Brasília, DF, Brasil.: Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em
384 Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.

385 BRASIL, 2018. Relatório anual de epidemiologia de Roraima 2017, in: Epidemiológica,
386 D.d.V. (Ed.). Secretaria de Saúde do Estado de Roraima, Governo do Estado de Roraima, Boa
387 Vista.

388 Brudey, K., Driscoll, J.R., Rigouts, L., Prodinger, W.M., Gori, A., Al-Hajoj, S.A., Allix, C.,
389 Aristimuño, L., Arora, J., Baumanis, V., 2006. Mycobacterium tuberculosis complex genetic
390 diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification,
391 population genetics and epidemiology. BMC microbiology 6, 23.

392 Candia, N., Lopez, B., Zozio, T., Carrivale, M., Diaz, C., Russomando, G., de Romero, N.J.,
393 Jara, J.C., Barrera, L., Rastogi, N., 2007. First insight into Mycobacterium tuberculosis
394 genetic diversity in Paraguay. BMC microbiology 7, 75.

395 CIR, 2018. Atuação do Conselho Indígena de Roraima. Conselho Indígena de Roraima,
396 Roraima.

- 397 Coelho, A.G.V., Zamarioli, L.A., Reis, C.M.P.V., de Lima Duca, B.F., 2007. Avaliação do
398 crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.
399 *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 33, 707-711.
- 400 Correia Sacchi, F.P., Tatará, M.B., Camioli de Lima, C., Ferreira da Silva, L., Cunha, E.A.,
401 Simonsen, V., Ferrazoli, L., Gomes, H.M., Gonçalves Vasconcellos, S.E., Suffys, P.N.,
402 Andrews, J.R., Croda, J., 2018. Genetic Clustering of Tuberculosis in an Indigenous
403 Community of Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 98, 372-375.
- 404 Dantas, N.G.T., Suffys, P.N., Carvalho, W.d.S., Gomes, H.M., de Almeida, I.N., de Assis,
405 L.J., Augusto, C.J., Gomgnimbou, M.K., Refregier, G., Sola, C., de Miranda, S.S., 2015a.
406 Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium*
407 *tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. *BMC infectious diseases* 15, 306-306.
- 408 Dantas, N.G.T., Suffys, P.N., da Silva Carvalho, W., Gomes, H.M., De Almeida, I.N., De
409 Assis, L.J., Augusto, C.J., Gomgnimbou, M.K., Refregier, G., Sola, C., 2015b. Genetic
410 diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in
411 Minas Gerais State, Brazil. *BMC infectious diseases* 15, 306.
- 412 de Mello, S.B., Silva, B.-C.N., 2005. Roraima: problemas de desenvolvimento sustentável em
413 uma região de fronteira. *Redes* 10, 129-149.
- 414 Demay, C., Liens, B., Burguière, T., Hill, V., Couvin, D., Millet, J., Mokrousov, I., Sola, C.,
415 Zozio, T., Rastogi, N., 2012. SITVITWEB—a publicly available international multimarker
416 database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular
417 epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 755-766.
- 418 Fraser, B., Willer, H., 2016. Venezuela: aid needed to ease health crisis. *Lancet* 388, 947-949.
- 419 Furlaneto, I.P., Conceição, E.C., Brito, M.L.d., Costa, A.R.F.d., Monteiro, J.J.B., Gonçalves,
420 N.V., Gomes, H.M., Lima, K.V.B., 2013. Genotipagem por spoligotyping de *Mycobacterium*
421 *tuberculosis* obtidos de lâminas de Ziehl-Neelsen em Belém, Estado do Pará, Brasil. *Revista*
422 *Pan-Amazônica de Saúde* 4, 33-41.
- 423 Giampaglia, C.M.S., Martins, M.C., Chimara, E., Oliveira, R.S., Vieira, G.B.d.O., Marsico,
424 A.G., Mello, F.C.Q., Fonseca, L.d.S., Kritski, A., Telles, M.A.d.S., 2007. Diferenciação entre
425 *Mycobacterium tuberculosis* e outras *Micobactérias* com ácido ρ -nitrobenzóico utilizando o
426 sistema MGIT960 *INT J TUBERC LUNG DIS* 11, 803–807.
- 427 Gomes, H.M., Elias, A.R., Oelemann, M.A.C., Pereira, M.A.d.S., Montes, F.F.O., Marsico,
428 A.G., Kritski, A.L., Filho, L.d.A., Caldas, P.C., Possuelo, L.G., Cafrune, P., Rossetti, M.L.,
429 Lucena, N., Saad, M.H.F., Cavalcanti, H.R., Leite, C.Q.F., Brito, R.C.d., Lopes, M.L., Lima,
430 K., Souza, M., Trindade, R.d.C., Zozio, T., Sola, C., Rastogi, N., Suffys, P.N., 2012.
431 Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11
432 states of Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 649-656.
- 433 IBGE, 2018. Censo Demográfico 2018: características da população, Roraima.
- 434 Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S.,
435 Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., 1997. Simultaneous detection and strain
436 differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of*
437 *clinical microbiology* 35, 907-914.
- 438 Kandler, J.L., Mercante, A.D., Dalton, T.L., Ezewudo, M.N., Cowan, L.S., Burns, S.P.,
439 Metchock, B., Cegielski, P., Posey, J.E., 2018. Validation of Novel *Mycobacterium*
440 *tuberculosis* Isoniazid Resistance Mutations Not Detectable by Common Molecular Tests.
441 *Antimicrob Agents Chemother* 62.

- 442 Lagos, J., Couvin, D., Arata, L., Tognarelli, J., Aguayo, C., Leiva, T., Arias, F., Hormazabal,
443 J.C., Rastogi, N., Fernandez, J., 2016. Analysis of Mycobacterium tuberculosis Genotypic
444 Lineage Distribution in Chile and Neighboring Countries. PLoS One 11, e0160434.
- 445 Lempens, P., Meehan, C.J., Vandellannoote, K., Fissette, K., de Rijk, P., Van Deun, A.,
446 Rigouts, L., de Jong, B.C., 2018. Isoniazid resistance levels of Mycobacterium tuberculosis
447 can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations. Scientific
448 reports 8, 3246.
- 449 Machado, L.N., Marcondes, N.R., Leite, C.Q., Santos, A.C., Pavan, F.R., Baldin, V.P.,
450 Castilho, A.L., Siqueira, V.L., Baeza, L.C., Berghs, H., Cardoso, R.F., 2014a. First baseline
451 of circulating genotypic lineages of Mycobacterium tuberculosis in patients from the Brazilian
452 borders with Argentina and Paraguay. PLoS One 9, e107106.
- 453 Machado, L.N.C., Marcondes, N.R., Leite, C.Q.F., Santos, A.C.B., Pavan, F.R., Baldin, V.P.,
454 Castilho, A.L., Siqueira, V.L.D., Baeza, L.C., Berghs, H., 2014b. First baseline of circulating
455 genotypic lineages of Mycobacterium tuberculosis in patients from the Brazilian borders with
456 Argentina and Paraguay. PLoS one 9, e107106.
- 457 Malacarne, J., Kolte, I.V., Freitas, L.P., Orellana, J.D.Y., Souza, M.L.P., Souza-Santos, R.,
458 Basta, P.C., 2018. Factors associated with TB in an indigenous population in Brazil: the effect
459 of a cash transfer program. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 60, e63.
- 460 Maningi, N.E., Daum, L.T., Rodriguez, J.D., Said, H.M., Peters, R.P.H., Sekyere, J.O.,
461 Fischer, G.W., Chambers, J.P., Fourie, P.B., 2018. Multi- and Extensively Drug Resistant
462 Mycobacterium tuberculosis in South Africa: a Molecular Analysis of Historical Isolates. J
463 Clin Microbiol 56.
- 464 Marques, M., Cunha, E.A.T., Evangelista, M., Basta, P.C., Marques, A.M.C., Croda, J.,
465 2017a. Antituberculosis-drug resistance in the border of Brazil with Paraguay and Bolivia.
466 Revista panamericana de salud publica= Pan American journal of public health 41, e9-e9.
- 467 Marques, M., Cunha, E.A.T., Evangelista, M.d.S.N., Basta, P.C., Marques, A.M.C., Croda, J.,
468 de Andrade, S.M.O., 2017b. Resistência às drogas antituberculose na fronteira do Brasil com
469 Paraguai e Bolívia. Revista Panamericana de Salud Pública 41, e9.
- 470 Mokrousov, I., Vyazovaya, A., Narvskaya, O., 2014. Mycobacterium tuberculosis Latin
471 American-Mediterranean family and its sublineages in the light of robust evolutionary
472 markers. Journal of bacteriology 196, 1833-1841.
- 473 Molodtsov, V., Scharf, N.T., Stefan, M.A., Garcia, G.A., Murakami, K.S., 2017. Structural
474 basis for rifamycin resistance of bacterial RNA polymerase by the three most clinically
475 important RpoB mutations found in Mycobacterium tuberculosis. 103, 1034-1045.
- 476 Peres, R.L., Vinhas, S.A., Ribeiro, F.K.C., Palaci, M., do Prado, T.N., Reis-Santos, B.,
477 Zandonade, E., Suffys, P.N., Golub, J.E., Riley, L.W., Maciel, E.L., 2018. Risk factors
478 associated with cluster size of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) of different RFLP lineages
479 in Brazil. BMC Infect Dis 18, 71.
- 480 Rendon, A., Centis, R., Zellweger, J.-P., Solovic, I., Torres-Duque, C., Cordeiro, C.R., de
481 Queiroz Mello, F., Manissero, D., Sotgiu, G., 2017. Migration, TB control and elimination:
482 whom to screen and treat. Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition).
- 483 Ribeiro, F.K.C., Pan, W., Bertolde, A., Vinhas, S.A., Peres, R.L., Riley, L., Palaci, M.,
484 Maciel, E.L., 2015. Genotypic and spatial analysis of Mycobacterium tuberculosis
485 transmission in a high-incidence urban setting. Clinical Infectious Diseases 61, 758-766.

- 486 Rodrigues, H.A.d.N., Barden, J.E., da Silva Laroque, L.F., 2016. A GEOGRAFIA DA
487 TUBERCULOSE EM RORAIMA. *Hygeia* 12, 38-49.
- 488 Saúde, M.d., 2017. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim
489 da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. *Boletim Epidemiológico* 48.
- 490 Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsç-Gerdes, S., Willery, E.,
491 Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., 2006. Proposal for standardization of
492 optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of
493 *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 44, 4498-4510.
- 494 Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Loch, C., 2000. Variable human
495 minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular*
496 *microbiology* 36, 762-771.
- 497 Van Embden, J., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J., Eisenach, K., Gicquel, B., Hermans, P.,
498 Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T., 1993. Strain identification of *Mycobacterium*
499 *tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology.
500 *Journal of clinical microbiology* 31, 406-409.
- 501 Vitol, I., Driscoll, J., Kreiswirth, B., Kurepina, N., Bennett, K.P., 2006. Identifying
502 *Mycobacterium tuberculosis* complex strain families using spoligotypes. *Infection, Genetics*
503 *and Evolution* 6, 491-504.
- 504 Wang, Q., Lau, S.K.P., Liu, F., Zhao, Y., Li, H.M., Li, B.X., Hu, Y.L., Woo, P.C.Y., Liu,
505 C.H., 2014. Molecular epidemiology and clinical characteristics of drug-resistant
506 *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis referral hospital in China. *PloS one* 9, e110209-
507 e110209.
- 508 WHO, 2017. Global Tuberculosis Report 2017. World Health Organization, Geneva.
- 509
- 510
- 511
- 512
- 513
- 514
- 515
- 516
- 517
- 518
- 519
- 520
- 521
- 522
- 523

524 **Table S1.** TB patients according to clustering, using MIRU-VNTR (24-loci), evaluated in the
 525 study period from the state of Roraima – Brazil.

Characteristics	Cluster n=17 (%)	Unique profile n=63 (%)	p value
Gender			
Male	12 (70.6)	38 (60.3)	0.43
female	5 (29.4)	25 (39.7)	
Age			
media/std	35.5/11.619	41.4/17.266	0.096
median	33	39	
range			
> from 14 to 20 years	1 (5.8)	7 (11.1)	0.287
> 20 - 40 years old	11 (64.7)	26 (41.3)	
> 40 -60 years old	5 (29.4)	19 (30.2)	
> 60 years old	0	11 (17.5)	
Race			
white	1(5.8)	2 (3.2)	0.48
non white	12 (70.6)	52 (83.8)	
indigenous	4 (23.5)	8(12.9)	
Schooling level			
illiterate	3 (23.1)	8(15.4)	0.41
≤ 4 years	4 (30.7)	11(21.1)	
> 4 -8 years	2 (15.4)	16 (30.8)	
> 8 years	4 (30.7)	17(32.7)	
Vulnerable population:			
1. Inmates			
Yes	2 (11.7)	5 (7.9)	0.99
No	15 (88.3)	58 (92.1)	
2. Homeless			
Yes	0	3 (4.8)	0.84
No	17 (100)	60 (95.2)	
3. Immigrants			
Yes	0	2 (3.2)	1.000
No	17 (100)	61 (96.8)	
HIV			
positive	2 (11.8)	6 (10.7)	0.555
negative	15 (88.2)	50 (89.3)	
Birthplace (country/state)			
Brazil:			
Acre	1	0	
Amazonas	2	6	
Bahia	0	1	
Ceará	0	1	
Maranhão	2	11	
Minas Gerais	0	1	
Pará	2	9	
Rondonia	0	2	

Roraima	10	30	
Sergipe	0	1	
Peru	0	1	
Home municipality/State			
Alenquer (PA)	0	1	
Alto Alegre (RR)	2	2	
Amajari (RR)	0	1	
Barcelos (AM)	0	1	
Boa Vista (RR)	12	45	
Bonfim (RR)	1	0	
Cantá (RR)	1	2	
Caracarai (RR)	0	4	
Caroebe (RR)	0	1	
Manaus (AM)	0	2	
Mucajaí (RR)	0	2	
Normandia (RR)	0	1	
Santa Isabel do Rio Negro (AM)	0	1	
Uiramutã (RR)	1	0	
Length of residence at Boa Vista			
≤ 5 years	2 (18.2)	9 (17.7)	0.98
> 5 a 10 years	0	4 (7.8)	
> 10 years	9 (81.8)	38 (74.5)	
TB contact			
Yes	10 (66.6)	25 (43.8)	0.19
No	5 (33.4)	32 (56.2)	
TB disease period (contact)			
≤ 2 years	4 (57.2)	10 (52.6)	0.53
> 2 - 5 years	0	5 (26.3)	
> 5 years	3 (42.8)	4 (21.1)	
Previous TB treatment (case)			
Yes	5 (29.4)	2 (3.2)	0.37
No	12 (70.6)	61 (96.8)	
Type of entrance			
new case	11 (64.7)	57 (90.5)	0.06
retreatment (abandon/relapse)	5 (29.4)	6 (9.5)	
transference	1 (5.9)	0	
TB treatment outcome			
favorable	9 (56.3)	48 (77.1)	0.403
unfavorable***	7 (43.7)	13 (22.9)	
Spoligotyping family			
LAM	10 (12.5)	40 (50)	
H	7 (8.75)	6 (7.5)	
T	0	8 (10)	
X	0	3 (3.75)	
EAI6-BGD1	0	3 (3.75)	
Beijing	0	2 (2.5)	
MANU1	0	1 (1.25)	

1 **Artigo 2: Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance in**
2 **Brazilian border with Bolivia and Paraguay**

3

4

5 **Emerging Infectious Disease**

6 **Qualis: A1**

7 **FI: 7.4**

8

9 Link com as normas da revista: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/page/types-of-articles>

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 **Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance in Brazilian**
27 **border with Bolivia and Paraguay**

28

29 Mariana Bento Tatará¹, Kesia Esther da Silva¹, Katharine Walter², Dândrea Driely de Melo
30 Ferrari, Flávia Patussi Correia Sacchi¹, Paulo César Pereira dos Santos¹, Camila Camioli de
31 Lima¹, Rafaella Vezozzo¹, Bruna Oliveira da Silva¹, Flora Martinez Figueira Moreira¹, Thais
32 Gonçalves de Oliveira³, Crhistinne Cavalheiro Maymone Gonçalves⁴, Marli Marques³, Eunice
33 Atsuko Totumi Cunha³, Jason R. Andrews², Julio Croda^{4,5}

34

35 ¹*Federal University of Grande Dourados, Dourados, Brazil*

36 ²*Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Department of Medicine, Stanford*
37 *University, Stanford, California*

38 ³*Central Laboratory of Public Health of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil*

39 ⁴*School of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil*

40 ⁵*Oswaldo Cruz Foundation, Campo Grande, Brazil*

41

42 ***Corresponding author:** Mariana Bento Tatará, Federal University of Grande Dourados,
43 Mato Grosso do Sul, Brazil. Phone: +556734102339 - Mobile: +5567992868986. Email:
44 marianabtatará@gmail.com

45

46

47

48

49

50 Abstract

51 In this prospective study we describe the molecular characteristics and risk factors associated
52 with recent transmission of TB drug-resistant cases isolated from Mato Grosso do Sul, a
53 Brazilian state bordering Bolivia and Paraguay. During January/2014 to April/2017 400
54 tuberculosis cases were notified. Among TB resistant cases 78% were classified as new cases,
55 indicating a higher rate of primary resistance. Incarceration was identified as a major
56 contributor to the spread of TB, especially MDR-TB. In addition, 46.1% of clustered cases
57 comprised patients from community and prison settings evidencing the dissemination between
58 these populations. In addition our findings showed that the population movements might be
59 related with the introduction of new strains. These informations contribute to the development
60 of specific control measures to prevent future outbreaks of TB drug-resistant.

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75 **Introduction**

76 Tuberculosis (TB) is an infectious disease closely related to social factors that remain
77 a major problem of public health and often resulting in high mortality rates. In addition
78 presents specific economic challenges affecting mainly low- and middle-income countries (1).
79 Despite the declining numbers in the global incidence it is estimated that there a 10 million
80 new cases of TB each year, leading to about 1.3 million deaths (2). Brazil is one of the
81 countries with major number of TB cases in the world (3). In 2017, the number of TB cases
82 was 86,858 cases, and the incidence rate was 44 per 100,000 per year, with mortality rate of
83 2.4 per 100,000 per year (2). This may be related to a variety of factors including delay in
84 diagnosis, poor contact investigation strategies and the emergence and dissemination of
85 resistant and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (4, 5).

86 Transmission of tuberculosis is complex, involving various environmental,
87 bacteriological, and host factors. In this scenario the use of molecular tools for
88 epidemiological monitoring of *M. tuberculosis* improves case detection and becomes
89 indispensable for the understanding of transmission routes to development of control
90 strategies to minimize TB expansion locally and globally (6, 7). Increasing attention on
91 vulnerable populations, living in border regions where tuberculosis is endemic has provided
92 opportunities for identifying concentrated tuberculosis epidemics and, therefore, transmission
93 reservoirs (8).

94 A particular concern that poses a significant threat to the control and treatment
95 management of TB is the emergence and dissemination of resistant and multidrug-resistant *M.*
96 *tuberculosis* strains. The high incidence of drug-resistance phenotypes contribute to
97 unfavorable outcomes and is directly associated with inappropriate prescriptions or treatment
98 nonadherence (9, 10). Determine the association between prevalent genotypes and drug
99 resistance profiles is a key role to prevent outbreaks and demands accurate and reproducible

100 early detection combined with global efforts and public health interventions to contain this
101 potentially incurable disease (11).

102 Mato Grosso do Sul is a central-western Brazilian state presenting a unique
103 geographical location with 12 cities bordering Paraguay and Bolivia. This region has a great
104 sociocultural diversity favored by intense migratory movements (12). The resulting
105 population mobility increases the risk of the introduction and transmission of imported MDR
106 strains from patients who have not been identified by local TB-control measures (13). The
107 objective of the present study was to characterize TB cases in terms of epidemiological
108 variables, drug resistance profiles and clinical isolate genotypes. These informations are
109 essential to design more focused tuberculosis control strategies in areas of high endemicity.

110

111 **MATERIAL AND METHODS**

112 **Study population and data collection**

113 From January/2014 to April/2017, we enrolled in a prospective study all confirmed
114 diagnostic (positive culture results) of pulmonary and/or pulmonary plus extrapulmonary TB
115 cases. All patients answered a standardized questionnaire and signed a written informed
116 consent. Patients with non-tuberculous mycobacteria (NTM) or negative culture were
117 excluded. The variables obtained during the interview included: birthplace, address, time
118 duration in the actual city, job activities in other municipality/countries, previous history of
119 TB treatment, last TB treatment outcome, contact with pulmonary TB, classification of
120 current TB case (new case or retreatment) and family relationship (city of residence, length of
121 residence and frequency meeting with relatives). Complementary sociodemographic data
122 were obtained from the National Reporting System on Notifiable Diseases (SINAN), which
123 included, race/color, education level, TB treatment outcome, HIV status, vulnerable
124 population and comorbidities (diabetes, mental disorder, drug addiction, smoking history and

125 alcohol abuse). This study was conducted with the approval of the Research Ethics
126 Committee from the Federal University of Grande Dourados (number CAE
127 12676613.3.1001.5160)

128

129 **Clinical samples and susceptibility testing**

130 All sputum specimens collected in the participating laboratories were examined by
131 microscopy or GeneXpert® MTB/RIF and processed with sodium hydroxide (NaOH) method
132 and inoculated in Ogawa-Kudoh culture medium. Cultures were incubated at 37°C for up to
133 eight weeks and checked weekly for visible colony. The microbial identification was
134 performed in the Laboratório Central do Mato Grosso do Sul (LACEN/MS) with evaluation
135 of microscopic aspects (bacillus size, string factor (14), colony aspect and growth time), ρ -
136 nitrobenzoic acid (PNB) inhibition test (15). The bacterial identification was confirmed with
137 the MPT64 protein detection-based immunochromatographic rapid test (SD Bioline Kit,
138 Standard Diagnostics, Inc., Korea) (16). Drug susceptibility tests (DST) were performed using
139 BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA), the drugs
140 tested and their respective concentration ranges were: streptomycin (SM) - 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,
141 isoniazid (INH) - 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rifampicin (RIF) - 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and ethambutol (E) - 5.0
142 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (17). Isolates showing resistance profile to rifampicin and isoniazid were classified as
143 multidrug-resistant (MDR) (18).

144

145 **Phylogenetic analysis**

146 The genetic relationship of MTB isolates was evaluated using IS6110-RFLP, briefly,
147 the genomic mycobacterial DNA was extracted, digested and separated by gel electrophoresis
148 (19, 20). RFLP patterns were analyzed using an IS6110-RFLP database (RIVM–Bionumerics;
149 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) and were considered clusters groups of two or

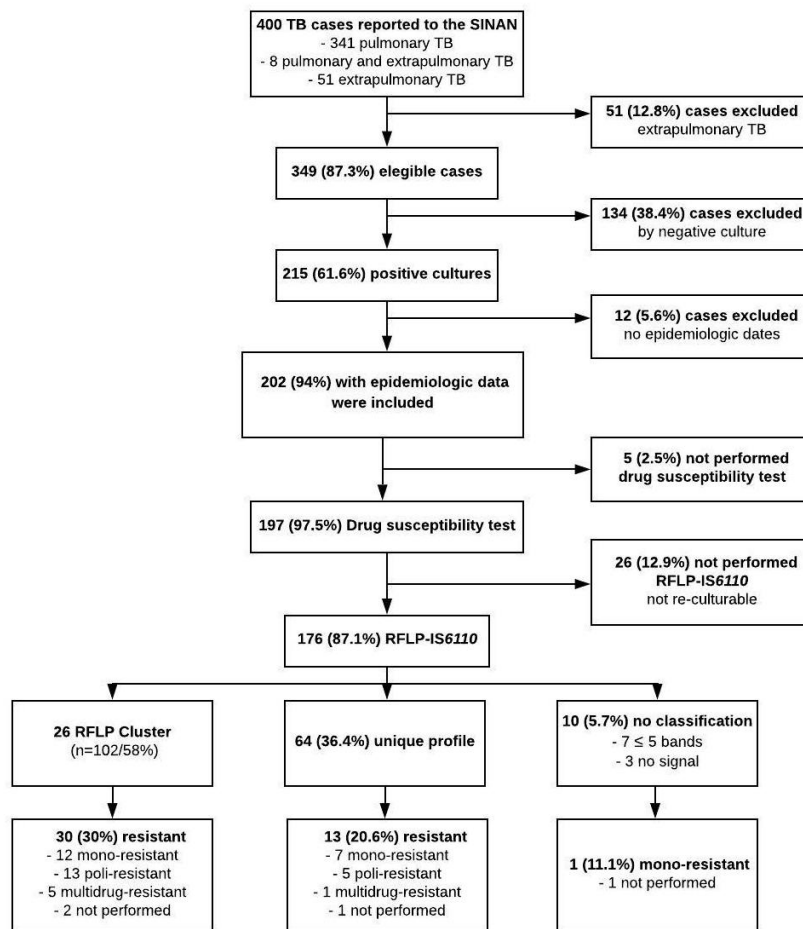
150 more strains with 95% of similarity considering the number and size of bands. Isolates
151 belonging to a cluster were considered to result from recent infections while isolates whose
152 RFLP patterns were different from any other pattern identified were considered unique
153 profiles. The patterns were analysed using the BioNumerics software v.7.1 (Applied Maths).
154 Percentage similarity between fingerprints was scored by the Dice coefficient. The
155 unweighted pair group method (UPGMA) with arithmetic mean was used to construct a
156 dendrogram. Dendrogram and cluster analyses were performed using the algorithms available
157 within the BioNumerics software package v.7.1 (Applied Maths) (3).

158

159 **RESULTS**

160 During the study period 400 tuberculosis cases were notified in the border region of
161 Mato Grosso do Sul state, and 215 were culture-positive (62%). Of those, 202 of cases
162 eligible for risk factor analysis (94%) and 176 were eligible for cluster analyses (87%) (Figure
163 1). Epidemiological investigations showed that among the patients, the majority were male
164 (68%), the median age was 39 years old (range from 09-80 years) and 26 (13%) were
165 prisoners. The majority of the patients had monthly individual income less than 100 dollars
166 (89%), had smoking history (57%) and reported previous contact with TB cases (53%). In our
167 study, the population mobility was observed, 38 patients reported international travel to
168 Bolivia, Paraguay, Guyana and Spain (Table 1).

169



170

171 **Figure 1.** Flowchart of recruitment of TB patients from the state of Mato Grosso do Sul –

172 Brazil.

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186 **Table 1.** Sociodemographic and clinical characteristics of TB patients from the state of Mato
 187 Grosso do Sul – Brazil.

Characteristics	TB patients n (%) (n = 202)
City	
Corumbá	147/202 (72.8)
Ladário	16/202 (7.9)
Ponta Porã	39/202 (19.3)
Gender, male	137/202 (67.8)
Age, mean (SD)	39.4 (14.9)
Race	
White	42/199 (21.1)
Mixed	100/199 (50.3)
Black	48/199 (24.1)
Indigenous	7/199 (3.5)
Asian	2/199 (1.0)
Schooling level	
Illiterate	11/163 (6.7)
1 - 4 years	53/163 (32.5)
5 - 8 years	63/163 (38.7)
9 - 11 years	34/163 (20.9)
>11years	2/163 (1.2)
Marital status (married)	75/165 (45.5)
Individual income < 100US\$	132 (89.2)
Cash transfer programs	53/174 (30.5)
International travel	37/168 (22)
Special population	
Prisoners	26/202 (12.9)
Ex-Prisoners	34/202 (16.8)
Contact with prisoner or ex-prisoner	15/202 (7.4)
Homeless	4/202 (2.0)
Immigrants	8/176 (4.5)
Healthcare professional	1/202 (0.5)
TB clinical presentation	
Pulmonary	195/202 (96.5)
Pulmonary and extra pulmonary	7/202 (3.5)
Comorbidity	
Diabetes	14/186 (7.5)
Mental disorder	2/183 (1.1)
Hypertension	42/169 (24.9)
Renal failure	39/163 (23.9)
Hepatic failure	36/163 (22.1)
Smoking history	105/183 (57.4)
HIV	11/202 (5.4)
STD	45/160 (28.1)
Alcoholism	42/182 (23.1)
Drugs use	42/165 (25.5)
TB history	
Previous TB	36/201 (17.9)
History of contact with TB case	86/162 (53.1)
BCG vaccine	131/164 (79.9)
Supervised treatment	59/186 (31.7)

188 STD – Sexually transmitted disease. BCG – Bacillus Calmett-Guérin.

189

190 Genotyping showed that 102 (58%) isolates were grouped into 26 clusters (cluster size
191 ranged from two to 17 cases), and 64 (36%) isolates had unique RFLP patterns (Figure 2).
192 Among the cluster, 6 types included 47 strains from community and prison settings, 19 types
193 included 53 strains exclusively from the community, and one type included two strains
194 exclusively from prison settings. Confirmed or probable epidemiological links were identified
195 in 12 clusters (43%). The most common links were found in prisoners and ex-prisoners
196 (47%). Household links were identified in 12 patients (38%). Additionally, we also identified
197 probable links in patients living in the same residential community, neighborhood street, or
198 using shared public facilities, such as schools (26%) (Table 2).

199 The largest cluster of 17 patients (cluster 1) had 12 patients with epidemiological links
200 confirmed, was predominantly found in prisoners and ex-prisoners (9/14), thus most patients
201 grouped in this cluster reported previous contact with TB case. DST showed that all strains in
202 this cluster, except one were TB-resistant cases (poli-resistant and MDR-TB). Fourteen
203 clusters had no epidemiological links identified, however the majority of patients within each
204 of these clusters reported previous contact with family member or friend with tuberculosis
205 (Table 2).

206

207

208

209

210

211

212

213

214 **Table 2.** Characteristics of genomic clusters of *M. tuberculosis* isolated from the state of Mato Grosso do Sul state (n = 100).

Cluster	Cases (n)	City	Risk factor	Epidemiological link	Transmission	Resistance profile	Travel
1	17	Corumbá	TB contact (8) Previous TB (4)	Yes	Household (2) Prisoner (4) Ex-prisoner (5) Social (same neighborhood) (3)	SRSS (1) RRSS (11) RRRS (4) SSSS (1)	Bolivia (3)
2	2	Corumbá	-	Yes	Prisoner (2)	RRSS (1) RRRS (1)	
3	3	Corumbá	TB contact (1) Ex-prisoner (1)	No	Unknow	SSSS (3)	
4	6	Corumbá	TB contact (1) Previous TB (2)	Yes	Prisoner (4)	RSSS (4) SSSS (2)	Bolivia (4)
5	2	Corumbá	TB contact (2)	No	Unknow	SSSS (2)	
6	3	Ponta Porã	TB contact (1) Previous TB (1) Ex-prisoner (1)	No	Unknow	SRSS (3)	
7	3	Corumbá	TB contact (2) Ex-prisoner (1)	No	Unknow	SSSS (3)	
8	2	Corumbá	TB contact (1)	No	Unknow	SSSS (2)	Paraguay (1)
9	2	Corumbá	TB contact (2)	No	Unknow	RSSS (1) SSSS (1)	
10	4	Corumbá	TB contact (2) Ex-prisoner (1)	No	Unknow	SSSS (4)	Bolivia (1)
11	2	Corumbá	TB contact (1)	No	Unknow	SSSS (2)	
12	14	Corumbá	TB contact (6) Previous TB (2) Ex-prisoner (2)	Yes	Household (2) Prisoner (2) Social (same neighborhood) (2)	SSSS (12) NA (2)	Bolivia (1)
13	2	Corumbá	-	No	Unknow	SSSS (2)	
14	3	Corumbá	Previous TB (1) Ex-prisoner (2)	Yes	Prisoner (1) Ex-prisoner (2)	SSSS (3)	
15	3	Corumbá	TB contact (1) Previous TB (1)	No	Unknow	SSSS (3)	Paraguay (1)

16	2	Corumbá	TB contact (1) Ex-prisoner (1)	No	Unknow	SSSS (2)	
17	3	Corumbá (2) Ponta Porã (1)	TB contact (2) Ex-prisoner (1)	No	Unknow	SSSS (3)	Bolivia (1)
18	2	Corumbá	TB contact (2)	Yes	Household (2)	RRSS (1) SSSS (1)	Bolivia (1)
19	2	Corumbá	TB contact (1)	Yes	Household (2)	SSSS (2)	Bolivia (2)
20	2	Ponta Porã	TB contact (1)	No	-	SSRS (1) SSSS (1)	
21	3	Corumbá	TB contact (1) Previous TB (1)	Yes	Social (same neighborhood) (2)	RSSS (2) SSSS (1)	Bolivia (1)
22	2	Corumbá	TB contact (3)	Yes	Social (same neighborhood) (2)	SSSS (2)	Bolivia (1)
23	3	Corumbá	TB contact (2) Previous TB (1)	Yes	Household (2)	SSSS (3)	
24	2	Ponta Porã	TB contact (1) Ex-prisoner (1)	Yes	Household (2)	SSSS (2)	Paraguay (1)
25	5	Ponta Porã	TB contact (2) Previous TB (1)	No	Unknow	SSSS (5)	
26	8	Corumbá (4) Ponta Porã (4)	TB contact (2) Ex-prisoner (1)	Yes	Social (same neighborhood) (2)	SSSS (8)	Bolivia (2)

215

216

217

218

219 Among TB-resistant cases (n=50), 84% of *M. tuberculosis* strains were streptomycin-
220 resistant, 64% isoniazid-resistant and 14% rifampicin-resistant. In contrast, all strains were
221 susceptible to ethambutol. Regarding the resistance level 50% of strains were mono-resistant,
222 38% poli-resistant and 12% were MDR-resistant. Drug-resistant cases (69.8%; 30/43) were
223 more likely to be clustered, compared to those sensitive (58.3%; 70/120) ($P = 0.19$).

224 We conducted univariate analysis to identify the factors associated with genotypic
225 clustering of resistant and susceptible TB cases. Among clustered profiles individual income
226 <100US\$ ($P = 0.04$), immigrants ($P = 0.01$) and incarceration ($P = 0.01$) were strongly
227 associated with the recent transmission of TB drug-resistant. However, multivariable analysis
228 revealed that only incarceration ($P = <0.01$; OR 7.05; 95CI 1.25–39.84) was a risk factor
229 independently associated with recent transmission of TB drug-resistant. Regarding strains
230 with unique profiles, univariate analysis showed that alcoholism ($P = <0.01$) was associated
231 with TB drug-resistant (Table 3).

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244 **Table 3.** Variables associated with the transmission of TB resistance in Mato Grosso do Sul- Brazil.

Variables	RFLP clustered (n=100)			Unique profile (n=63)		
	Resistance	Non-resistance	P-value	Resistance	Non-resistance	P-value
Male	23/30 (76.7)	51/70 (72.9)	0.69	10/13 (76.9)	28/50 (56)	0.16
Marital status, married	11/23 (47.8)	22/60 (36.7)	0.35	5/12 (41.6)	23/36 (36)	0.17
Individual income < 100US\$	22/22 (100)	42/50 (84)	0.04	10/12 (83.3)	29/34 (85.2)	0.87
Cash transfer programs	12/30 (40)	18/70 (25.7)	0.15	2/13 (15.4)	11/50 (22)	0.59
Domestic overcrowding*	7/21 (33.3)	21/52 (40.4)	0.57	6/12 (50)	15/33 (45.4)	0.78
Immigrants	2/25 (8)	0	0.02	1/12 (8.3)	4/39 (23.5)	0.84
International travel	5/24 (20.8)	15/61 (24.6)	0.71	1/12 (8.3)	12/36 (33.3)	0.09
Comorbidities						
Diabetes	1/30 (3.3)	3/69 (4.4)	0.77	0	6/49 (12.2)	0.26
Hypertension	4/23 (17.4)	17/58 (29.3)	0.26	3/12 (25)	12/34 (35.2)	0.64
Renal failure	5/23 (21.7)	13/59 (22)	0.97	2/12 (16.7)	11/36 (30.6)	0.34
Hepatic failure	6/23 (26.1)	18/59 (20.3)	0.57	4/12 (33.3)	8/36 (22.2)	0.44
Smoking history	14/26 (53.8)	39/65 (60)	0.59	6/12 (50)	26/45 (57.7)	0.62
HIV	0/30 (0)	5/70 (7.1)	0.13	1/13 (7.69)	4/50 (8)	0.97
STD	4/22 (18.2)	17/59 (28.8)	0.49	3/12 (25)	14/35 (40)	0.35
Alcoholism	7/30 (23.3)	11/61 (18)	0.55	7/11 (63.6)	10/44 (22.7)	<0.01
Drugs use	9/23 (39.1)	15/60 (25)	0.20	5/12 (41.6)	7/36 (19.4)	0.12
TB history						
Previous TB	5/30 (16.7)	17/69 (24.6)	0.30	4/13 (30.8)	7/50 (14)	0.52
History of contact with TB	13/23 (56.5)	31/58 (53.5)	0.80	8/12 (66.7)	19/36 (52.7)	0.40
BCG vaccine	18/23 (78.3)	45/59 (76.3)	0.84	8/12 (66.6)	29/36 (80.5)	0.32
Prison						
Prisoner	9/30 (30)	7/70 (10)	0.01	1/13 (7.69)	4/50 (8)	0.97
Ex-prisoner	5/30 (16.7)	12/70 (17.1)	0.95	4/13 (30.7)	8/50 (16)	0.22
Contact with prisoner or ex-prisoner	3/30 (10)	4/70(5.7)	0.44	1/13(7.7)	4/50 (8)	0.97
Supervised treatment	8/29 (27.6)	20/62 (32.3)	0.65	2/12 (16.6)	17/45 (37.7)	0.16

245 STD – Sexually transmitted disease. BCG – Bacillus Calmett-Guérin. *More than two individuals per room. Highlight variables with $P < 0.05$.

246 **DISCUSSION**

247 Mato Grosso do Sul has an open border with Paraguay and Bolivia, and citizens visit
248 the bordering area for different purposes including tourism, work, education and to access
249 better health conditions. This regular interaction and constant cross-border population
250 movements could provide an opportunity for direct transmission (21). In our study, 22% of
251 the patients reported travels to other countries, evidencing the constant population mobility in
252 this area. The majority of patients reported travel especially to Bolivia (79%), a high burden
253 country for TB and with higher rates of MDR/RR-TB compared to Brazil, 11.6% and 9.5%
254 respectively (2).

255 The high coverage of the DST observed in our study thus the identification of
256 resistance profile of isolates from the border region of Mato Grosso do Sul state was only
257 possible due to the re-cultivation of isolates and subsequent performance of these tests, which
258 increased the test coverage rate from 27.4% to 91.6%. The Ministry of Health recommends
259 the implementation and performance of DST of all positive TB cultures at the time of
260 diagnosis; however as a result of budgetary constraints some clinical laboratories are not able
261 to follow all the established national guidelines.

262 The proportion of resistant cases attributable to recent transmission, on the basis of
263 molecular data, was 30%, which is higher than those described in other studies carried out in
264 Brazil (22, 23). There are numerous factors involved with the transmission of resistance such
265 as the type of infections, treatment history and demographic profile of the population. In our
266 study, 78% of TB resistant cases were classified as new cases, indicating a higher rate of
267 primary resistance, different from previous studies carried out in the same region (51.9%)
268 (24). Regarding the source transmission of the clustered cases, even without reconstructing all
269 the exactly transmission events, some conclusions can be drawn. Substantial proportion of
270 household contacts was identified between clustered cases. In addition links through the

271 community, public facilities, and alcohol use suggested that spread to other patients was most
272 likely to have occurred by casual contact.

273 The current study highlighted that alcoholism was associated with acquisition of TB
274 drug-resistant in patients with genomically unique strains. This finding is much the same as
275 those described in previous studies where transmission of TB drug-resistant was associated
276 with drug or alcohol abuse (24-26). Noncompliance of the 6-month treatment regimen by
277 patients, leads to the emergence of drug-resistant and treatment default rates are highest
278 among alcohol users (26).

279 Molecular and epidemiological data strongly suggested that incarceration is one of the
280 major contributors to the spread of TB-drug resistant. From contact investigations, 47% of
281 clustered cases were related with prisons (prisoners and ex-prisoners), which suggested that
282 this setting is an important place of TB transmission. The multivariate analysis showed that
283 prisoners had 7.05% more chances to acquiring TB drug-resistant than the general population.
284 Previous studies have reported higher rates of TB cases in prisoners (27, 28). In addition a
285 recent study showed that this population plays a key role in the potential transmission of the
286 disease into community settings (29). Our study identified multiple clusters involving
287 prisoners and individuals of the general population, evidencing that TB can be easily
288 disseminated between these populations.

289 Genotypic clustering cases showed consistent geographic patterns, however cluster 26
290 consisted of eight strains isolated of individuals living in different cities. An analysis
291 performed in our database showed that this genotypic profile had been notified in other cities
292 circulating between prisoners, ex-prisoners and community residents over 10 years before the
293 stud period (29). Based on this finding, we hypothesize that this is a successful clone that
294 established itself as the dominant strain among the population in our state.

295 In conclusion, our findings highlight that frequent migratory flow contribute
 296 substantially to high rates of drug-resistance, indicating that cross-border tracing may be
 297 necessary to monitor and prevent future spread of MDR-TB strains. In addition there is an
 298 urgent need for effective control strategies to stop the MTB transmission chain, mainly
 299 between prisoners and community residents. A continuous surveillance program should be
 300 implemented to monitor the TB epidemiology in prisons, as providing better TB-screening,
 301 effective treatment strategies as well reducing overcrowding, especially in the border area to
 302 avoid possible outbreaks of TB drug-resistant.

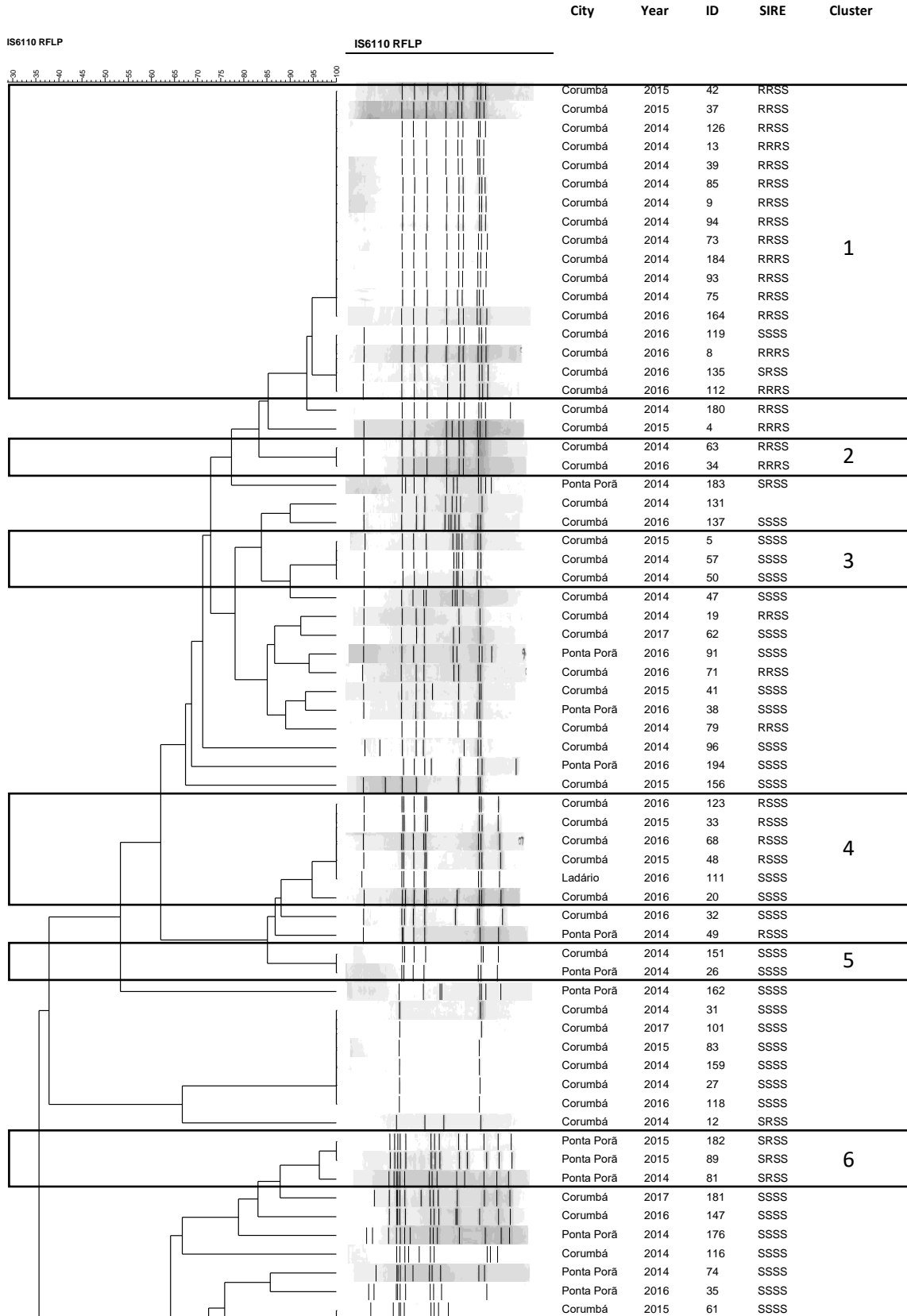
303

304 **References**

- 305 1. Harries AD, Lin Y, Kumar AMV, Satyanarayana S, Takarinda KC, Dlodlo RA, et al.
 306 What can National TB Control Programmes in low- and middle-income countries do to end
 307 tuberculosis by 2030? *F1000Research*. 2018;7:F1000 Faculty Rev-11.
- 308 2. WHO. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization 2018.
- 309 3. Peres RL, Vinhas SA, Ribeiro FKC, Palaci M, do Prado TN, Reis-Santos B, et al. Risk
 310 factors associated with cluster size of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) of different RFLP
 311 lineages in Brazil. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):71.
- 312 4. Brynildsrud OB, Pepperell CS, Suffys P, Grandjean L, Monteserin J, Debech N, et al.
 313 Global expansion of Mycobacterium tuberculosis lineage 4 shaped by colonial migration and
 314 local adaptation. *Science advances*. 2018;4(10):eaat5869.
- 315 5. Ribeiro FK, Pan W, Bertolde A, Vinhas SA, Peres RL, Riley L, et al. Genotypic and
 316 Spatial Analysis of Mycobacterium tuberculosis Transmission in a High-Incidence Urban
 317 Setting. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society
 318 of America*. 2015;61(5):758-66.
- 319 6. Augusto CJ, Carvalho WDS, Almeida IN, Figueiredo LJA, Dantas NGT, Suffys PN, et
 320 al. Comparative study of RFLP-IS6110 and MIRU-VNTR from Mycobacterium tuberculosis
 321 isolated in the state of Minas Gerais, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2018;49(3):641-6.
- 322 7. Ayabina D, Ronning JO, Alfsnes K, Debech N, Brynildsrud OB, Arnesen T, et al.
 323 Genome-based transmission modelling separates imported tuberculosis from recent
 324 transmission within an immigrant population. *Microb Genom*. 2018;4(10).
- 325 8. Heuvelings CC, de Vries SG, Grobusch MP. Tackling TB in low-incidence countries:
 326 improving diagnosis and management in vulnerable populations. *Int J Infect Dis*. 2017;56:77-
 327 80.
- 328 9. Hameed HMA, Islam MM, Chhotaray C, Wang C, Liu Y, Tan Y, et al. Molecular
 329 Targets Related Drug Resistance Mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-Mycobacterium
 330 tuberculosis Strains. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018;8:114-.

- 331 10. Maningi NE, Daum LT, Rodriguez JD, Said HM, Peters RPH, Sekyere JO, et al.
332 Multi- and Extensively Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis in South Africa: a
333 Molecular Analysis of Historical Isolates. *J Clin Microbiol.* 2018;56(5).
- 334 11. Manson AL, Cohen KA, Abeel T, Desjardins CA, Armstrong DT, Barry CE, 3rd, et al.
335 Genomic analysis of globally diverse Mycobacterium tuberculosis strains provides insights
336 into the emergence and spread of multidrug resistance. *Nature genetics.* 2017;49(3):395-402.
- 337 12. Marques M, Ruffino-Netto A, Marques AMC, Andrade SMOd, Silva BAKd, Pontes
338 ERJC. Magnitude da tuberculose pulmonar na população fronteiriça de Mato Grosso do Sul
339 (Brasil), Paraguai e Bolívia. *Cadernos de Saúde Pública.* 2014;30:2631-42.
- 340 13. Braga JU, Herrero MB, Cuellar CMd. Transmissão da tuberculose na tríplice fronteira
341 entre Brasil, Paraguai e Argentina. *Cadernos de saude publica.* 2011;27:1271-80.
- 342 14. Coelho AGV, Zamarioli LA, Reis CMPV, de Lima Duca BF. Avaliação do
343 crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo Mycobacterium tuberculosis.
344 *Jornal Brasileiro de Pneumologia.* 2007;33(6):707-11.
- 345 15. Giampaglia CMS, Martins MC, Chimara E, Oliveira RS, Vieira GBdO, Marsico AG,
346 et al. Diferenciação entre Mycobacterium tuberculosis e outras Micobactérias com ácido p-
347 nitrobenzóico utilizando o sistema MGIT960 INT J TUBERC LUNG DIS. 2007;11(7):803-7.
- 348 16. Arora J, Kumar G, Verma AK, Bhalla M, Sarin R, Myneedu VP. Utility of MPT64
349 Antigen Detection for Rapid Confirmation of Mycobacterium tuberculosis Complex. *Journal*
350 *of global infectious diseases.* 2015;7(2):66-9.
- 351 17. Gallo JF, Pinhata JMW, Saraceni CP, de Oliveira RS. Evaluation of the BACTEC
352 MGIT 960 system and the resazurin microtiter assay for susceptibility testing of
353 Mycobacterium tuberculosis to second-line drugs. *Journal of microbiological methods.*
354 2017;139:168-71.
- 355 18. WHO. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance
356 Surveillance. Antituberculosis drug resistance in the world Genebra: World Health
357 Organization, 2008 Contract No.: Report no. 4.
- 358 19. Gonzalo-Asensio J, Pérez I, Aguiló N, Uranga S, Picó A, Lampreave C, et al. New
359 insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between
360 Mycobacterium tuberculosis Complex lineages. *PLOS Genetics.* 2018;14(4):e1007282.
- 361 20. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al.
362 Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting:
363 recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):406-9.
- 364 21. Marques M, Cunha EA, Santos ACB, Leite CQF, Souza Filho AF, Andrade SM.
365 Circulating Genotypes and Drug Resistance Profiles of Mycobacterium tuberculosis in
366 Brazilian Counties Bordering Paraguay and Bolivia. *World Journal of Biochemistry and*
367 *Molecular Biology.* 2018;3(2):55-65.
- 368 22. Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho WdS, Gomes HM, de Almeida IN, de Assis LJ, et
369 al. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant Mycobacterium
370 tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. *BMC infectious diseases.* 2015;15:306-.
- 371 23. Reis AJ, David SM, Nunes LS, Valim AR, Possuelo LG. Recent transmission of drug-
372 resistant Mycobacterium tuberculosis in a prison population in southern Brazil. *Jornal*
373 *brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e*
374 *Tisilogia.* 2016;42(4):286-9.

- 375 24. Marques M, Cunha EAT, Evangelista MdSN, Basta PC, Marques AMC, Croda J, et al.
376 Resistência às drogas antituberculose na fronteira do Brasil com Paraguai e Bolívia. *Revista*
377 *Panamericana de Salud Pública*. 2017;41:e9.
- 378 25. Duraisamy K, Mrithyunjayan S, Ghosh S, Nair SA, Balakrishnan S, Subramoniapillai
379 J, et al. Does Alcohol consumption during multidrug-resistant tuberculosis treatment affect
380 outcome?. A population-based study in Kerala, India. *Annals of the American Thoracic*
381 *Society*. 2014;11(5):712-8.
- 382 26. Intiaz S, Shield KD, Roerecke M, Samokhvalov AV, Lönnroth K, Rehm J. Alcohol
383 consumption as a risk factor for tuberculosis: meta-analyses and burden of disease. *European*
384 *Respiratory Journal*. 2017;50(1):1700216.
- 385 27. Bourdillon PM, Gonçalves CCM, Pelissari DM, Arakaki-Sanchez D, Ko AI, Croda J,
386 et al. Increase in Tuberculosis Cases among Prisoners, Brazil, 2009-2014(1). *Emerging*
387 *infectious diseases*. 2017;23(3):496-9.
- 388 28. Cunha EAT, Marques M, Evangelista MdSN, Pompilio MA, Yassuda RTS, Souza
389 ASd. A diagnosis of pulmonary tuberculosis and drug resistance among inmates in Mato
390 Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018;51:324-
391 30.
- 392 29. Sacchi FPC, Renata MP, Mariana BT, Vera S, Lucilaine F, Mariana GC, et al. Prisons
393 as Reservoir for Community Transmission of Tuberculosis, Brazil. *Emerging Infectious*
394 *Disease journal*. 2015;21(3):452.
- 395
- 396
- 397
- 398
- 399
- 400
- 401
- 402
- 403
- 404
- 405



		Ponta Porã	2016	35	SSSS	
		Corumbá	2015	61	SSSS	7
		Corumbá	2015	92	SSSS	
		Corumbá	2017	40	SSSS	
		Corumbá	2014	113	SSSS	8
		Ladário	2015	36	SSSS	
		Ladário	2014	193	SSSS	
		Corumbá	2015	6	SSSS	
		Ponta Porã	2014	70	SSSS	
		Corumbá	2014	169	SSSS	
		Corumbá	2014	2	SSSS	
		Corumbá	2017	188	SSSS	9
		Corumbá	2017	95	RSSS	
		Corumbá	2017	134	SSSS	10
		Corumbá	2015	186	SSSS	
		Corumbá	2016	165	SSSS	
		Corumbá	2015	174	SSSS	
		Corumbá	2015	109	SSSS	
		Corumbá	2014	140	SSSS	
		Corumbá	2016	177	RSSS	
		Corumbá	2015	100	SSSS	
		Corumbá	2016	157	SSSS	
		Corumbá	2016	105	SSSS	11
		Corumbá	2016	127	SSSS	
		Corumbá	2014	168	RRSS	
		Corumbá	2014	11	SSSS	12
		Corumbá	2016	107		
		Corumbá	2016	158	SSSS	
		Corumbá	2014	142	SSSS	
		Corumbá	2014	114	SSSS	
		Corumbá	2015	76		
		Ladário	2017	206	SSSS	
		Corumbá	2017	185	SSSS	
		Corumbá	2015	14	SSSS	
		Corumbá	2015	115	SSSS	
		Corumbá	2016	179	SSSS	
		Corumbá	2015	45	SSSS	
		Corumbá	2015	102	SSSS	
		Corumbá	2014	64	SSSS	
		Corumbá	2016	66	SSSS	13
		Corumbá	2016	103	SSSS	
		Corumbá	2015	53	SSSS	14
		Corumbá	2014	16	SSSS	
		Corumbá	2014	143	SSSS	
		Corumbá	2015	99	SSSS	
		Corumbá	2016	78	SSSS	
		Corumbá	2015	146	SSSS	
		Corumbá	2015	17	SSSS	
		Ponta Porã	2015	125	SSSS	
		Corumbá	2015	121	SSSS	15
		Corumbá	2014	138	SSSS	
		Corumbá	2016	77	SSSS	
		Ponta Porã	2015	46	SSSS	
		Ponta Porã	2015	82	SSSS	
		Corumbá	2016	22	SSSS	
		Corumbá	2016	72	SSSS	
		Corumbá	2016	23	SSSS	16
		Corumbá	2014	130	SSSS	
		Ponta Porã	2014	30	SSSS	17
		Corumbá	2015	59	SSSS	
		Corumbá	2016	161	SSSS	
		Corumbá	2015	120	SSSS	18
		Corumbá	2015	172	RRSS	
		Corumbá	2015	154	SSSS	19
		Corumbá	2016	178	SSSS	
		Ponta Porã	2015	141	SSSS	20
		Ponta Porã	2014	117	SSRS	
		Corumbá	2014	86	RSSS	

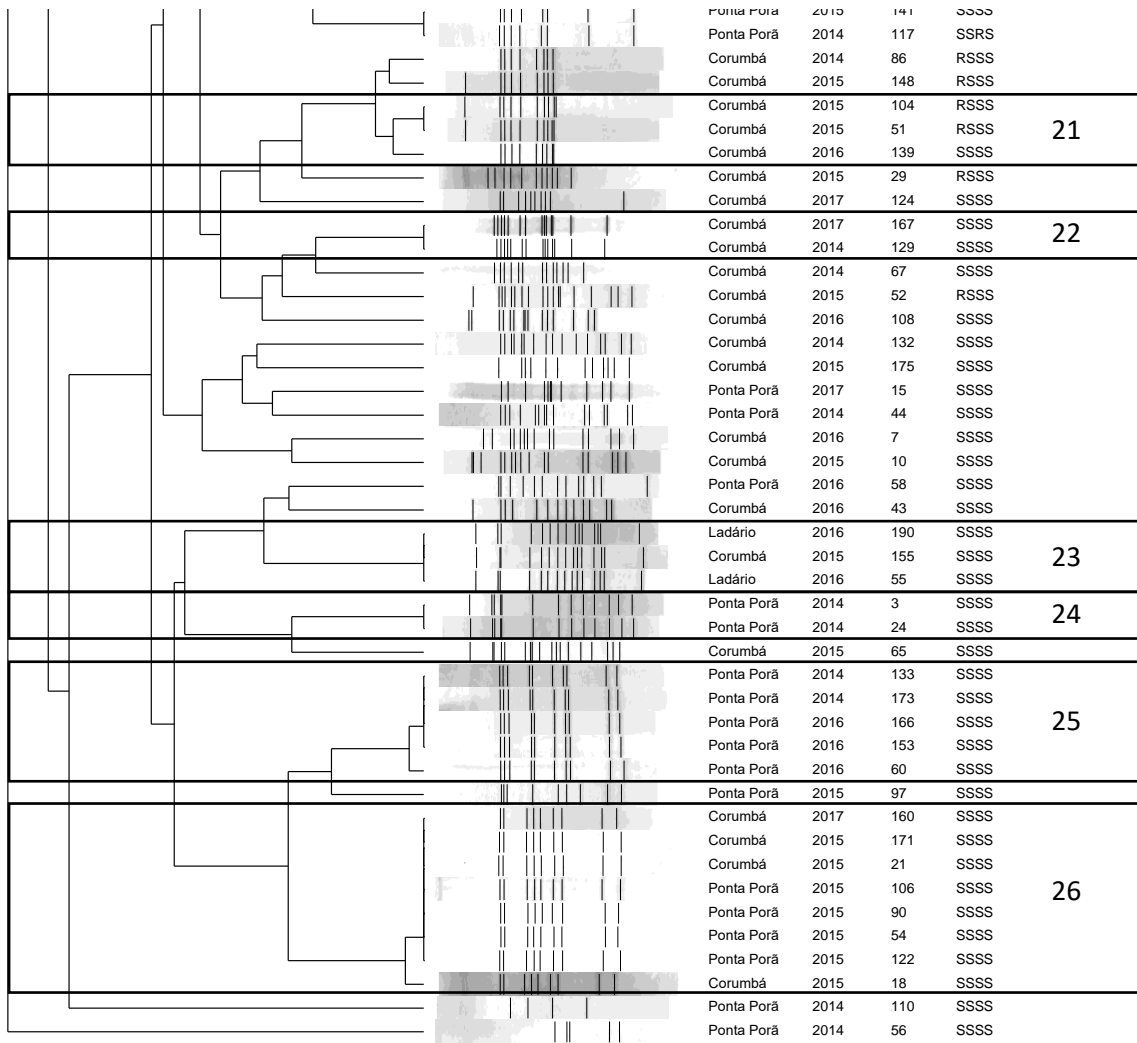


Figure 2. Dendrogram based on IS6110-RFLP profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains obtained from patients residing in the state of Mato Grosso do Sul - Brazil.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo indicam que vários fatores podem estar relacionados com a dinâmica da transmissão da TB em regiões de fronteira, dentre eles status sociodemográficos, fluxo populacional e presença de grupos de alto risco. Foi realizada a primeira caracterização molecular de isolados clínicos de MTB do Estado de Roraima, que faz fronteira com Venezuela e Guiana. Grande diversidade genética foi identificada circulando nesta região, sugerindo que o constante movimento populacional é um fator importante na transmissão do bacilo da TB. Neste estudo, ainda realizamos a descrição de uma alta taxa de transmissão recente de MTB resistente a antimicrobianos isolados em Mato Grosso do Sul (fronteira com Paraguai e Bolívia). Os resultados destacaram uma forte associação entre aquisição de TB droga-resistente com alcoolismo e principalmente encarceramento. Uma grande proporção dos casos de TB com perfis genéticos idênticos foram relacionados com prisões (prisoneiros e ex-prisoneiros), enfatizando que a implementação de medidas de prevenção e controle de infecção é extremamente importante para interromper a disseminação de MTB, principalmente entre prisoneiros e moradores da comunidade. Em conclusão, foi possível observar diferentes cenários no que diz respeito à dinâmica de transmissão de TB nas regiões de fronteira, enquanto em Roraima foi observada uma alta diversidade genética entre os isolados de MTB e baixa taxa de resistência a drogas antiTB, em Mato Grosso do Sul foi identificada uma alta taxa de resistência e transmissão recente de MDR-TB. Esses achados demonstram que embora essas regiões apresentem características em comum elas exibem particularidades que refletem na circulação e disseminação da doença, tornando assim importante uma vigilância epidemiológica contínua com medidas de controle específicas.

7 ANEXOS

The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

Qualis: B1

FI: 2.5

Am. J. Trop. Med. Hyg., 98(2), 2018, pp. 372–375
doi:10.4269/ajtmh.17-0480
Copyright © 2018 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Genetic Clustering of Tuberculosis in an Indigenous Community of Brazil

Flávia Patussi Correia Sacchi,¹ Mariana Bento Tatará,¹ Camila Camioli de Lima,¹ Liliã Ferreira da Silva,² Eunice Atsuko Cunha,³ Vera Simonsen,⁴ Lucilaine Ferrazoli,⁴ Harrison Magdinier Gomes,⁵ Sidra Ezidio Gonçalves Vasconcelos,⁵ Philip Noel Suffys,⁵ Jason R. Andrews,⁶ and Julio Croda^{1,7*}

¹Federal University of Grande Dourados, Dourados, Brazil; ²Indigenous Health Secretary, Dourados, Brazil; ³Mycobacteriology, Central Laboratory of Public Health, Campo Grande, Brazil; ⁴Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil; ⁵Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; ⁶Stanford University School of Medicine, Stanford, California; ⁷Oswaldo Cruz Foundation, Campo Grande, Brazil

Abstract. We conducted a population-based study of tuberculosis (TB) from 2009 to 2015 in an indigenous community of Brazil, the largest in the country, to investigate risk factors associated with recent TB transmission. The clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were genotyped by IS6110-RFLP (restriction fragment length polymorphism) and spoligotyping analysis. Among 67 isolates typed by RFLP, 69% fell into fifteen clusters, and 91% of TB cases with shared IS6110-RFLP pattern were diagnosed within 2 years of another case in the cluster. Individual risk factors associated with genetic clustering were domestic overcrowding (odds ratio [OR]: 6.10; 95% confidence interval [CI]: 1.50–24.88) and low social class (OR: 3.72; 95% CI: 1.00–13.98). Most reported contacts (76%) were identified within the household of the index TB case, but most of the genetic clustering of *M. tuberculosis* occurred outside of household (79%). Expanded contacts investigation and prophylaxis outside of household should be considered as a priority for TB control programs in this population.

INTRODUCTION

Despite an effective national program for the diagnosis and treatment of tuberculosis (TB) in Brazil, TB remains a leading cause of morbidity and mortality in indigenous populations.^{1,2} Recent studies have reported a high prevalence of latent TB^{2,3} and an incidence of active TB that is several fold higher in indigenous populations in Brazil compared with the national average.⁴ Similar disparities have been reported among indigenous populations throughout the world.

Despite these consistent findings of increased TB risk, there is limited understanding of transmission patterns within indigenous communities. In particular, the epidemiological drivers of TB, including individual and spatial risk within indigenous communities, have not been well characterized. Recent studies from high-burden, non-indigenous communities have suggested that most of the transmission occurs outside of households, but the geographic scale of transmission is poorly understood. This may have important implications for contact investigations. To address this knowledge gap, we conducted a population-based study, incorporating data from contact investigations and genotypic data, to investigate recent TB transmission in the largest indigenous community of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

We identified and recruited all indigenous TB patients residing in the Jaguapiru and Bororó reservations who were reported to the National Notifiable Diseases Information System (SINAN) for a TB diagnosis from September 2009 to August 2015. Brazil mandates reporting of all diagnosed TB cases, and reporting rates are believed to be high.

We administered a questionnaire to all patients concerning their demographics, clinical history, occupation, and various

social mixing behaviors. An index of domestic overcrowding was determined by dividing the number of individuals who were living in the household by the number of rooms, and domestic overcrowding was considered when there were more than two individuals per room. Social class was categorized according to the classifications set forth by the Brazilian Association of Research Institutes, which adopted the Brazilian Economic Classification Criterion. The study population was subsequently grouped according to the number of 10-point intervals (class D or E) that fell below the median.⁵ We asked participants to identify their close contacts, defined as persons who had shared indoor airspace with a person with pulmonary TB for at least 15 hours per week for one or more weeks, during a high-risk infectious period defined as the date of cough onset until 2 weeks after the initiation of appropriate anti-TB therapy.⁶ Data on contacts data, tuberculin skin test (TST) results, and chemoprophylaxis were collected from the clinical records using the forms used by the Indigenous Health Secretary according to the organization's instructions.

We obtained *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from cultures and genotyped them by using IS6110-RFLP (restriction fragment length polymorphism) and spoligotyping analysis.^{7,8} RFLP patterns were analyzed using an IS6110-RFLP database (RIVM-Bionumerics; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). A genotypic cluster was defined as a group of two or more isolates from different patients whose RFLP patterns were identical with respect to the number and size of bands. The "Spoligo-International-Type" identified were classified into spoligotype families and subfamilies with the help of the SpolDB4 database.⁹ We then performed bivariable logistic regression to identify significant risk factors for clustering, including demographic and clinical characteristics, as well as known TB contacts.

RESULTS

A total of 138 indigenous TB cases were reported to SINAN between September 2009 and August 2015 (Figure 1). Of these, 84% completed treatment, 2% failed, 12% died, and 2% transferred to other municipalities. During the study

* Address correspondence to Julio Croda, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados, Itaipú Km 12, Dourados, Mato Grosso do Sul 79804-970, Brazil. E-mail: julocroda@gmail.com

Emerging Infectious Disease

Qualis: A1

FI: 7.4

DISPATCHES

Prisons as Reservoir for Community Transmission of Tuberculosis, Brazil

Flávia P.C. Sacchi, Renata M. Praça,
Mariana B. Tatara, Vera Simonsen,
Lucilaine Ferrazoli, Mariana G. Croda,
Philip N. Suffys, Albert I. Ko,
Jason R. Andrews, Julio Croda

We conducted a population-based study of tuberculosis (TB) cases in Dourados, Brazil, to assess the relationship between incarceration and TB in the general population. Incarceration was associated with TB in an urban population; 54% of *Mycobacterium tuberculosis* strains were related to strains from persons in prisons. TB control in prisons is critical for reducing disease prevalence.

Brazil has the fourth largest incarcerated population in the world and a tuberculosis (TB) incidence that is 20 times higher among prisoners than among the general population (1,2). It has been hypothesized that prisons serve as institutional amplifiers for TB, wherein poorly controlled transmission among incarcerated persons is a driver of TB in the broader population (3,4). However, few data show for linkages between prison and community epidemics of TB. To address this issue, we conducted a population-based study of TB cases in Dourados, a medium-size city in west-central Brazil, and used case-control and molecular methods to assess the relationship between incarceration and TB in the general population.

The Study

Dourados has a population of $\approx 177,160$ persons, of which 1,500 are inmates of a prison for men. We identified and recruited TB patients reported to the Sistema de Informação de Agravos de Notificação Nacional (Notifiable Diseases Information System) and who resided in Dourados during June 2009–March 2013. We then conducted a case-control study in which 2 control persons without a TB diagnosis were identified and matched for each TB case-patient according to age group and place of residence.

We performed conditional logistic regression to identify significant ($p < 0.05$) risk factors for active TB. Variables

were included in a multivariable model if they reached a significance level of $p < 0.20$ in univariate analysis. *Mycobacterium tuberculosis* isolates were typed by IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis (5). RFLP patterns were analyzed by using an IS6110 RFLP database (RIVM-Biomumerics; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). A cluster was defined as a group of ≥ 2 isolates obtained from different patients for which the RFLP patterns were identical with respect to the number and size of bands.

A total of 240 TB cases were reported, of which 60 (25%) and 180 (75%) were in prisoners and community residents, respectively (Figure 1). The annual incidence of TB in the prisoner population was ≈ 40 times higher than in the community population (1,044 cases/100,000 persons [95% CI 797–1,344 cases/100,000 persons] vs. 26 cases/100,000 persons [95% CI 23–31 cases/100,000 persons]). All 60 prisoners had pulmonary TB and it was confirmed bacteriologically for 54 (90%) persons. Among 180 persons with TB cases in the community population, 133 (74%) had pulmonary TB, 34 (19%) had extrapulmonary TB, and 13 (7%) had both forms; 107 (59%) of the TB cases were confirmed bacteriologically. During the study, 49 (82%) prisoners with TB completed treatment, 2 (3%) were not cured, 3 (5%) died, and 6 (10%) were transferred to other prisons. Prisoners with cases were incarcerated for an average duration of 26 months before diagnosis.

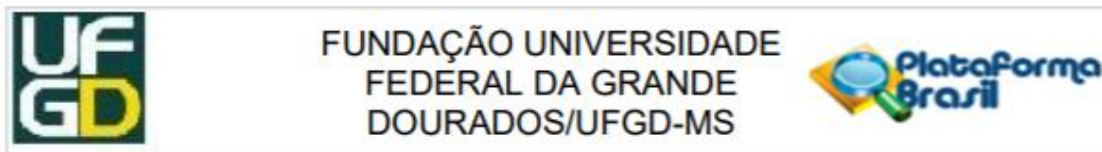
We recruited 61 persons with TB and 122 controls from the community to evaluate risk factors for TB acquisition (Figure 1). Multivariable analysis showed that male sex (adjusted odds ratio [AOR] 6.6, 95% CI 2.4–18.1), monthly income ≤ 100 US dollars (AOR 3.4, 95% CI 1.1–10.6), alcohol use (AOR 11.5, 95% CI 2.0–67.0), known history of contact with a TB patient (AOR 5.6, 95% CI 1.4–22.0), and prior incarceration (AOR 24.5, 95% CI 2.4–254.6) were independent risk factors for TB (Table). A total of 23% (14/61) of the community cases were in persons previously incarcerated in the Dourados Prison.

We genotyped 97 (86%) of 113 strains isolated from persons with culture-positive *M. tuberculosis* infection, of which 59 and 38 were isolated from community persons and prison patients, respectively (Figure 1). Of these, 79 (81%) isolates were grouped into 17 clusters, and 18 isolates had unique RFLP patterns. Among the 17 cluster types, 10 types included 65 strains from community and prison settings, 6 types included 12 strains exclusively from the community setting, and 1 type included 2 strains

Author affiliations: Federal University of Grande Dourados, Dourados, Brazil (F.P.C. Sacchi, R.M. Praça, M.B. Tatara, M.G. Croda, J. Croda); Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil (V. Simonsen, L. Ferrazoli); Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil (P.N. Suffys); Yale University School of Public Health, New Haven, Connecticut, USA (A.I. Ko); Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA (J.R. Andrews)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2103.140896>

Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Dinâmica da transmissão recente da tuberculose e multidroga resistência nas fronteiras do Brasil.

Pesquisador: JULIO HENRIQUE ROSA CRODA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 12676613.3.1001.5160

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD-MS

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 445.634

Data da Relatoria: 01/11/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto objetiva estudar os casos de transmissão do Mycobacterium tuberculosis (Mtb) em 4 regiões de fronteira (Centro-Oeste e Sul do Brasil), estabelecendo uma vigilância ativa da doença com a implementação de cultura universal nessas localidades. Propõe, ainda, um estudo transversal para determinar as variáveis associadas a transmissão recente no contexto das fronteiras. A análise será pautada a partir do cruzamento dos dados, ou seja, pelo viés comparativo. Após a conclusão da investigação, pretende propor medidas de vigilância epidemiológica para reduzir a incidência da doença nessas localidades.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar as variáveis associadas à transmissão recente determinadas pelo padrão da genotipagem por RFLP do IS6110 e MIRU-VNTR 12/ Identificar surtos ou clusters espaço-temporais de casos com isolado do mesmo padrão genotípico/ Estimar a prevalência de TB resistente nas fronteiras, bem como genótipos associados a esse padrão/ Comparar a identificação tradicional de contatos de paciente com TB pulmonar e análise de rede social na identificação de surtos geneticamente relacionados/ Estimar a prevalência de infecção múltipla e heterorresistência nos casos identificados de TB.

Endereço: UFGD - Unidade 2. Rodovia Dourados - Itahum, Km 12 - Cidade Universitária. Caixa Postal 533
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 79.804-970
UF: MS **Município:** DOURADOS
Telefone: (67)3410-2328 **E-mail:** cep@ufgd.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS/UF GD-MS



Continuação do Parecer: 445.634

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

ADEQUADA

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O texto está bem redigido, esclarece com pertinência tanto a função de cada colaborador quanto a escolha metodológica. Aborda um assunto de suma importância para a sociedade brasileira: transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e sugere que a partir dos dados será possível propor medidas de combate. Também é louvável a extensão geográfica da proposta: (Centro-Oeste e Sul do Brasil), que será possível a partir da cooperação de um conjunto de pesquisadores, representantes das diferentes regiões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado

Recomendações:

TCLE adequado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

DOURADOS, 04 de Novembro de 2013

Assinador por:
Rosilda Mara Mussury Franco Silva
(Coordenador)

Endereço: UFGD - Unidade 2. Rodovia Dourados - Itahum, Km 12 - Cidade Universitária. Caixa Postal 533
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 79.804-970
UF: MS **Município:** DOURADOS
Telefone: (67)3410-2328 **E-mail:** cep@ufgd.edu.br