



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

WESLEY ROBERTH LIMA VIANA

**GENOTIPAGEM DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* E  
AVALIAÇÃO QUANTO A PRESENÇA DA LINHAGEM BEIJING EM  
ISOLADOS EM MANAUS – AM**

---

Londrina  
2025

# WESLEY ROBERTH LIMA VIANA

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra Lucy Megumi Yamauchi Lioni

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio Morishi Ogusku

Londrina  
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

V614g Viana, Wesley Roberth Lima .  
GENOTIPAGEM DE CEPAS DE Mycobacterium tuberculosis E AVALIAÇÃO QUANTO A PRESENÇA DA LINHAGEM BEIJING EM ISOLADOS EM MANAUS – AM / Wesley Roberth Lima Viana. - Londrina, 2025.  
65 f. : il.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi Lioni.  
Coorientador: Mauricio Morishi Ogusku.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2025.  
Inclui bibliografia.

1. Tuberculose. - Tese. 2. Mycobacterium tuberculosis - Tese. 3. MIRU-VNTR. - Tese. 4. Linhagem Beijing. - Tese. I. Lioni, Lucy Megumi Yamauchi . II. Ogusku, Mauricio Morishi . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579

WESLEY ROBERTH LIMA VIANA

**GENOTIPAGEM DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*  
E AVALIAÇÃO QUANTO A PRESENÇA DA LINHAGEM  
BEIJING EM ISOLADOS EM MANAUS – AM**

Trabalho de Dissertação apresentado à ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Coorientador: Dr. Mauricio Morishi Ogusku  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

---

Dr. Philip Noel Suffys  
Instituto Oswaldo Cruz (RJ)

---

Dra. Clarice Maia Carvalho  
Universidade Federal do Acre

Londrina, 30 de julho de 2025.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me proteger e me sustentar mesmos nos momentos mais difíceis e desafiadores.

Agradeço a minha mãe, minha melhor amiga, minha maior incentivadora. Agradeço também ao meu pai, meu irmão e minha cachorra Belinha, que me receberam de braços abertos quando precisei voltar.

À Profa Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni por ter me recebido em seu laboratório, por toda a paciência durante esses anos. Agradeço pela orientação. A Profa Dra Sueli Fumie Yamada Ogatta também pelo acolhimento e paciência.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (NIP 5) por terem sido minha casa durante o início do mestrado. Especialmente a minha família londrinense: Thiago Ferreira de Lima, Paulo Henrique Guilherme Borges, Gislaine da Silva Rodrigues. Muito obrigado mesmo por toda ajuda e paciência! Não teria conseguido sem vocês.

Dedico este trabalho de forma especial ao Prof. Dr. Mauricio Morsihi Ogusku, por me receber de volta no momento mais difícil da minha vida. Por me fazer acreditar que eu seria capaz de realizar tal feito. Por ter aberto as portas do laboratório em 2020. Em muitos momentos você confiava mais em mim do que eu mesmo. Você é sem dúvidas uma das minhas maiores inspirações de vida! Você foi uma luz de esperança no momento que mais precisei. Serei eternamente grato por sua parceria por toda minha vida! Obrigado! Foi um privilégio aprender tanto com você durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Daniel Barros de Castro por todas as conversas, dicas, conselhos, parceria. Você também é certamente uma grande inspiração para mim.

A toda equipe do Laboratório de Micobacteriologia (Maísa, Tânia, Rogério, Raimundo). Por todo suporte, ajuda, por todas dicas, por me aguentar durante todos esses anos! Muito obrigado por tudo! Não teria conseguido sem vocês!

A todo grupo “Micobactérias e Fungos da Amazônia”, por toda companhia e cumplicidade durante todos esses anos. Os dias ficavam mais leves com vocês.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias

do IOC/Fiocruz (RJ) especialmente Dr. Philip Noel Suffys, Dr. Harrison Magdnier Gomes, Dra. Lia Lima Gomes, e com certeza também à Emanuelle Macedo por toda ajuda.

À CAPES pela bolsa concedida durante os 2 anos vigentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia por todo conhecimento e experiência adquirido. Foi muito especial para mim participar de algo que há pouco tempo atrás era só um sonho.

**MUITO OBRIGADO!**

“Se o bacilo da tuberculose pudesse falar,  
contaria a história da humanidade.”  
— Inspirado em Robert Koch

..

VIANA, Wesley Roberth Lima. **GENOTIPAGEM DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* E AVALIAÇÃO QUANTO A PRESENÇA DA LINHAGEM BEIJING EM ISOLADOS EM MANAUS – AM.** 2025. 65 páginas. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

## RESUMO

A tuberculose permanece como um grave problema de saúde pública na região amazônica, sendo marcada por elevados índices de incidência e desafios estruturais para seu controle. A compreensão da diversidade genética de *Mycobacterium tuberculosis* é fundamental para apoiar estratégias de vigilância epidemiológica e controle da doença. Este estudo teve como principal objetivo caracterizar geneticamente 40 isolados clínicos provenientes da região amazônica por meio da técnica de MIRU-VNTR 12 *loci* e PCR específica para detecção da família Beijing. A análise revelou a formação de três *clusters*, sendo dois da sublinhagem Haarlem e outro da sublinhagem EAI resultando numa taxa de agrupamento de 0,09. Além dessas sublinhagens já mencionadas, outras identificadas foram LAM e X. Nenhum isolado foi identificado como pertencente à linhagem Beijing, nem pela metodologia de MIRU-VNTR 12 *loci* assim como não foi encontrado nos sistemas de detecção utilizando reações de triagem pela técnica de PCR Este trabalho contribui com dados inéditos sobre a diversidade genética do *M. tuberculosis* na Amazônia e reforça a importância da vigilância molecular para aprimorar as estratégias de controle da tuberculose na região.

**Palavras-chave:** Tuberculose. Epidemiologia molecular. *Mycobacterium tuberculosis*. MIRU- VNTR. Linhagem Beijing.

VIANA, Wesley Roberth Lima. **Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains and evaluation of the presence of the Beijing lineage in isolates from Manaus, Amazonas, Brazil.** 2025. 65 páginas. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

## ABSTRACT

Tuberculosis remains a serious public health problem in the Amazon region, marked by high incidence rates and structural challenges to its control. Understanding the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* is fundamental to supporting epidemiological surveillance and disease control strategies. This study aimed to genetically characterize 40 clinical isolates from the Amazon region using the MIRU-VNTR 12-locus technique and specific PCR for the detection of the Beijing family. The analysis revealed the formation of three clusters, two from the Haarlem sublineage and one from the EAI sublineage, resulting in a clustering rate of 0.09. In addition to the sublineages already mentioned, others identified were LAM and X. No isolate was identified as belonging to the Beijing lineage, neither by the MIRU-VNTR 12 *loci* methodology nor was it found in detection systems using screening reactions by the PCR technique. This work contributes with unprecedented data on the genetic diversity of *M. tuberculosis* in the Amazon and reinforces the importance of molecular surveillance to improve tuberculosis control strategies in the region.

**Key-words:** Tuberculosis. Molecular epidemiology. *Mycobacterium tuberculosis*. MIRU- VNTR. Beijing lineage.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Número estimado de casos incidentes de TB em 2023, para países com pelo menos 100 000 casos incidentes .....	17
<b>Figura 2</b> – Coeficiente de incidência de tuberculose (casos por 100 mil habitantes) por Unidade da Federação. Brasil, 2024a. ....	18
<b>Figura 3</b> – Coeficiente de incidência (casos por 100 mil habitantes) e números de casos novos de tuberculose. Brasil, 2013 a 2024 .....	18
<b>Figura 4</b> – Taxa de incidência em tuberculose por 100 mil habitantes, conforme os dados da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas. ....	20
<b>Figura 5</b> – Ilustração do agente etiológico da tuberculose de Robert Koch, 1882, retratando o bacilo da TB em tecidos pulmonares infectados.....	21
<b>Figura 6</b> – Micrografia Eletrônica de Varredura. Bactéria <i>Mtb</i> em forma de bastonete. Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas.....	22
<b>Figura 7</b> – Mapa circular do cromossomo <i>Mtb</i> Cepa de Referência H37Rv.....	23
<b>Figura 8</b> – Filogeografia global do CMTb adaptado a humanos.....	24
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática de um dendrograma.....	26
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática de diferentes tipos de marcadores de <i>Mtb</i> e métodos de tipagem.....	27
<b>Figura 11</b> – Princípio da genotipagem por MIRU-VNTR.....	28
<b>Figura 12</b> –Árvore radial para visualização de <i>clusters</i> utilizando o método NJ.....	46
<b>Figura 13</b> –Dendrograma de similaridade NJ MIRU-VNTR 12 <i>loci</i> .....	47
<b>Figura 14</b> –Diagrama esquemático da região que flanqueia a região DR nas cepas H37Rv, não Beijing e Beijing .....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Amostras que foram utilizadas no estudo.....	32
<b>Tabela 2</b> – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores referentes aos 12 <i>loci</i> de MIRU. ....	34
<b>Tabela 3</b> – Correlação entre os tamanhos dos amplificadores e os alelos de MIRU .....	35
<b>Tabela 4</b> – Protocolo de PCR para verificação da melhor temperatura de hibridação os <i>loci</i> de MIRU .....	36
<b>Tabela 5</b> – Temperaturas de hibridação utilizada em cada locus de MIRU .....	36
<b>Tabela 6</b> – Conjunto de <i>iniciadores</i> utilizados para a detecção da linhagem Beijing de <i>M. tuberculosis</i> .....	37
<b>Tabela 7</b> – Variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com TB.....	40
<b>Tabela 8</b> – Variáveis clínicas associadas à TB.....	42
<b>Tabela 9</b> – Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados de <i>Mtb</i> submetidos a técnica de MIRU .....	43
<b>Tabela 10</b> – Resultado da diversidade alélica e poder discriminatório dos locus de MIRU. .....	44
<b>Tabela 11</b> – Amostras que foram identificadas e suas respectivas linhagens .....	45
<b>Tabela 12</b> – Regiões e sequencias analisadas na PCR multiplex de Plikatys, 1994	55
<b>Tabela 13</b> – Resumo da avaliação de 125 isolados da cidade de Nova York pelo ensaio de PCR multiplex para a cepa W.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

CMtb – Complexo \**Mycobacterium tuberculosis*\*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico DR – Direct Repeat (Repetição Direta)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IS6110 – Elemento de Inserção

LAM – Latin American Mediterranean

MIRU – Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit

MLVA – Multilocus Variable Number Tandem Repeats Analysis

MNT – Micobactérias Não Tuberculosas

*Mtb* – \**Mycobacterium tuberculosis*\*

NJ – Neighbor Joining (Junção de Vizinhos)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição RNA – Ácido Ribonucleico

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SUS – Sistema Único de Saúde

TB – Tuberculose

UEL – Universidade Estadual de Londrina

UPGMA – Agrupamento por Pares Não Ponderado com Média Aritmética VNTR – Variable Number Tandem Repeat

WGS - Whole Genome Sequencing

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1	Epidemiologia da Tuberculose em aspecto mundial .....	16
2.2	Epidemiologia da Tuberculose no Brasil .....	17
2.3	Epidemiologia da Tuberculose no Estado do Amazonas .....	19
2.4	Agente etiológico <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	21
2.5	Genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
2.6	Diversidade genética e distribuição geográfica .....	23
2.7	Família Beijing.....	24
2.8	Epidemiologia molecular .....	25
2.9	MIRU-VNTR 12 <i>loci</i> .....	27
2.10	PCR Multiplex .....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS .....</b>	<b>30</b>
3.1	Objetivo Geral .....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1	Desenho de estudo .....	31
4.2	Critério de inclusão e exclusão .....	32
4.3	Coleta e análise de dados epidemiológicos .....	33
4.4	Extração do dna por termólise .....	33
4.5	Identificação de <i>M. tuberculosis</i> por PCR .....	33
4.6	Genotipagem dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> por MIRU- VNTR.....	33
4.7	Reações de genotipagem por MIRU- VNTR .....	35
4.8	Busca por similaridade de MIRU- VNTR.....	36
4.9	Cálculo da diversidade alélica.....	36
4.10	Seleção e caracterização dos <i>primers</i> que compõem as reações de triagem 37	
4.11	Reações de triagem para detecção da família beijing.....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
5.1	Análise dos dados clínicos e sociodemográficos das amostras.....	40
5.2	Confirmação de <i>M. tuberculosis</i> por PCR (Teste <i>IS6110</i> ) .....	42
5.3	Genotipagem por MIRU-VNTR 12 <i>loci</i> .....	42
5.4	Perfil genotípico das amostras .....	44
5.5	Dendrograma .....	45
5.6	Análise de <i>Clusters</i> .....	46
5.7	Resultado das reações de triagem para detecção da família Beijing.....	47
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
6.1	Análise dos dados clínicos e sociodemográficos .....	49
6.2	Resultado da genotipagem por MIRU-VNTR 12 <i>loci</i> .....	50
6.3	Análise genotípica de MIRU-VNTR 12 <i>loci</i> .....	51
6.4	Poder discriminatório .....	52
6.5	Resultado das reações de triagem para família Beijing .....	53
<b>7</b>	<b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

<b>APÊNDICES .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, com alto impacto no mundo, pois mesmo com os avanços científicos disponíveis, ela ainda é considerada uma das principais causas de morte entre as doenças infecciosas (Fontes, 2024). Dados mais recentes indicam que, em 2023, foram registrados 10,8 milhões de novos casos, e estima-se que 1,25 milhão de indivíduos morreram devido à TB (WHO, 2024). A Organização Mundial da Saúde (OMS) visa eliminar a TB até 2035, e para atingir essa meta, foram selecionados três pilares, que são: prevenção e o cuidado integrado ao indivíduo doente, considerar a TB como um componente social, e o último, que enfatiza a necessidade de intensificar a pesquisa e a inovação do conhecimento, sendo este último, um dos objetivos desse trabalho.

No Brasil, a TB apresenta alta incidência, com taxas que superam 30 casos por 100 mil habitantes. Importante relacionar que essas variações ocorrem baseadas em desigualdades sociais e regionais (Ministério da Saúde, 2023). Muitos especialistas afirmam que a TB é uma doença que é estritamente ligada às desigualdades sociais. Paiva et al., (2023) afirma que a compreensão da TB como uma doença relacionada à determinação da possibilidade social amplia as estratégias para seu enfrentamento. Conforme o boletim epidemiológico (2025), o estado que teve maior coeficiente de incidência foi o Amazonas (94,7 casos por 100 mil habitantes), e isso é explicado por vários fatores, dentre eles estruturais, socioeconômicos e geográficos, que favorecem a persistência da transmissão (Ministério da Saúde, 2025).

Para melhor compreensão dessas características e também monitoramento deste cenário epidemiológico, a partir da década de 90 começaram a se introduzir métodos de genotipagem do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTb) criando assim estudos de epidemiologia molecular da TB. Estes estudos tinham diversos objetivos, dentre eles conhecer melhor a estrutura populacional genética de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), compreender padrões de transmissão. Para isso se utilizam algumas técnicas genotípicas, com destaque para as técnicas de IS6110-RFLP, *Spoligotyping*, MIRU-VNTR e, mais recentemente, análise do genoma completo através de WGS. Além de identificar a espécie do CMtb infectante, esses métodos também classificam isolados de Mtb a nível de linhagem e sublinhagem (também conhecidas como família) que possibilitam a identificação de grupos com

genótipos não idênticos (*clusters* ou conjuntos) (Coscolla & Gagneux, 2014; Merker et al., 2015). Uma destas linhagem 2 (L2), contendo a família Beijing está frequentemente associada à maior virulência e uma alta taxa de mutação, e, conseqüentemente, alta resistência antimicobacteriana (Ford et al., 2013).

Diante deste cenário, e pela escassez de dados a respeito dos genótipos circulantes no estrado do Amazonas, este trabalho tem como objetivos principais analisar os dados epidemiológicos de pacientes com TB e avaliação da estrutura populacional genética das *Mtbs* circulantes na região amazônica utilizando a técnica de MIRU-VNTR. Além disto, buscamos possíveis relações entre genótipos ou isolados agrupados e características dos isolados e pacientes. Utilizamos também sistemas para detecção e diferenciação da família Beijing (conjunto de reações de triagem) para detecção da presença ou ausência desta família e analisar sua frequência. Essas contribuições buscam identificar quais linhagens de *Mtb* ocorrem na região amazônica para o enfrentamento da TB em nossa região.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

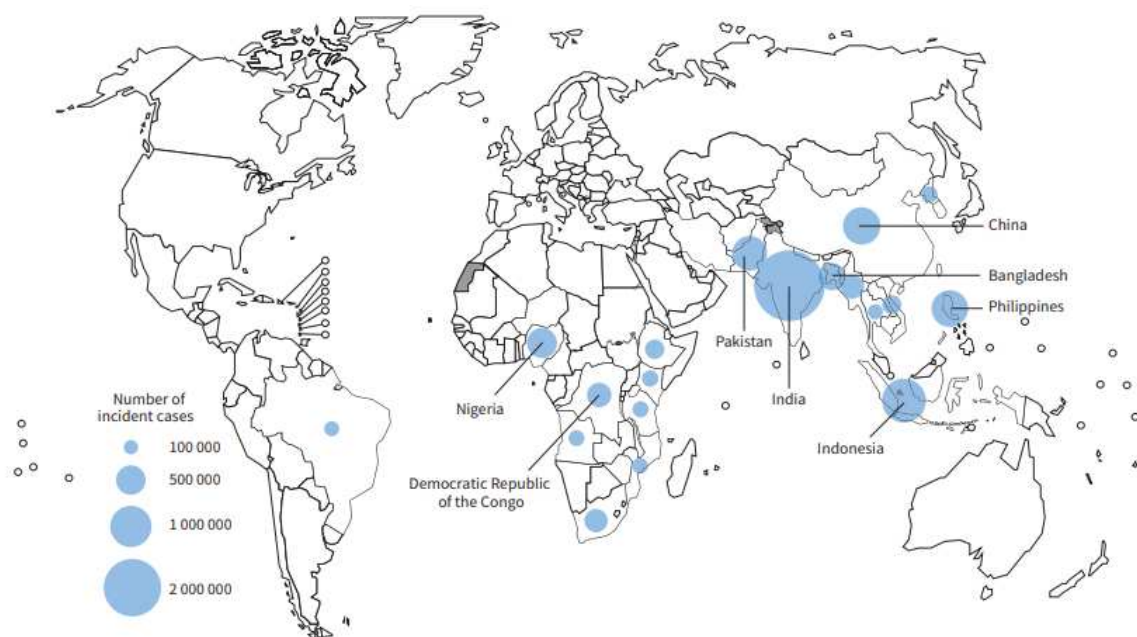
### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE EM ASPECTO MUNDIAL

A TB é uma doença infectocontagiosa, considerada de alta importância epidemiológica, sendo ela uma das principais causas de morte entre as doenças infecciosas. Apesar de sua prevenção e cura serem possíveis, a TB continua amplamente disseminada, contribuindo significativamente para os índices globais de morbidade e mortalidade (Fontes, 2024).

Em países de baixa e média renda, a baciloscopia de escarro continua sendo a abordagem diagnóstica predominante, exibindo uma taxa de detecção que varia de 50% a 60% para casos positivos. Essa restrição, juntamente com a prevalência da coinfeção TB/HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), dificulta ações associadas ao manejo da doença (Zhang et al., 2024).

Dados mais recentes indicam que, em 2023, foram registrados 10,8 milhões de novos casos de TB globalmente, com uma incidência de 134 por 100.000 habitantes, além de 1,25 milhão de óbitos conforme o "Global Tuberculosis Report 2024" (WHO, 2024). Em 2023, a maioria das pessoas que adquiriram TB estavam na região do Sudeste Asiático (45%). Oito países representam 2/3 do número global de casos estimados de TB em 2023. Os países com maior incidência em todo o mundo foram: Índia (26%), Indonésia (10%), China (6,8%), Filipinas (6,8%), Paquistão (6,3%), Nigéria (4,6%), Bangladesh (3,5%), e República Democrática do Congo (3,1%) conforme demonstrado na Figura 1. (WHO, 2024).

Figura 1 - Número estimado de casos incidentes de TB em 2023, para países com pelo menos 100 000 casos incidentes

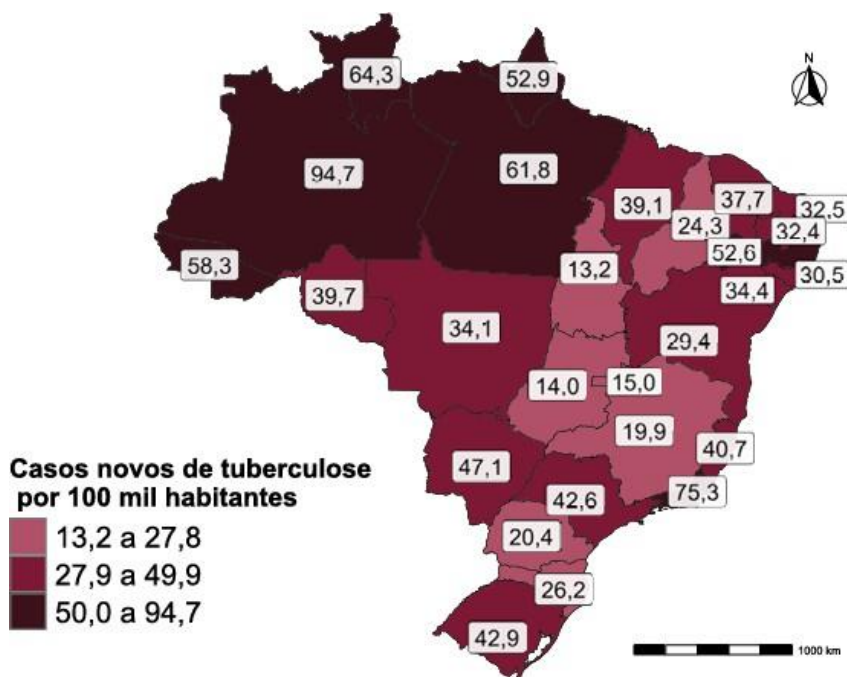


Fonte: Adaptado de WHO (2024).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE NO BRASIL

Em 2024, no Brasil foram notificados 84.308 novos casos e registrado coeficiente de incidência de 39,7 casos por 100 mil habitantes. Em 2023, foram notificados 6025 óbitos por TB. No contexto nacional, existe um predomínio de altas incidências de casos na região norte com destaque para o estado do Amazonas conforme ilustrado na Figura 2.

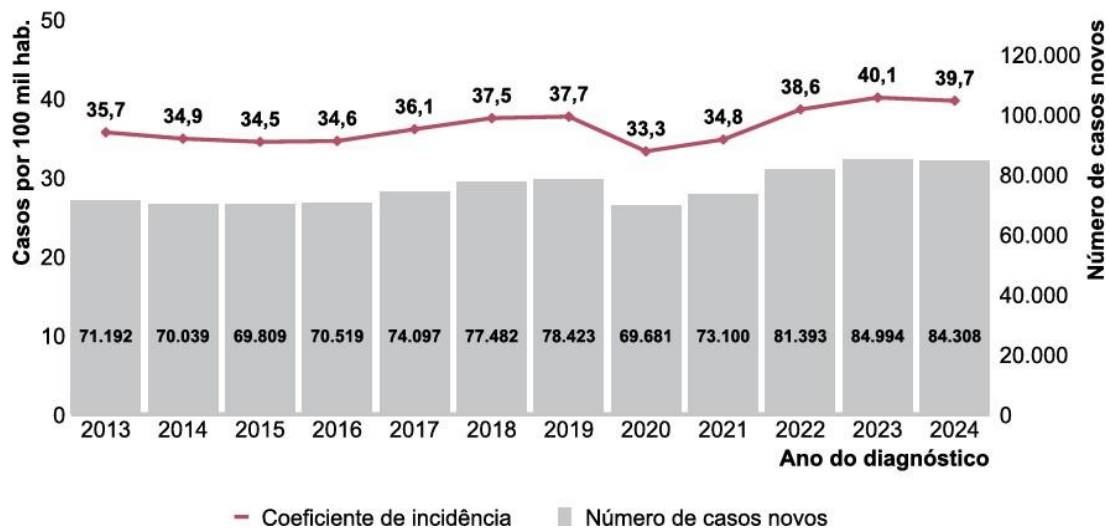
Figura 2 - Coeficiente de incidência de tuberculose (casos por 100 mil habitantes) por Unidade da Federação. Brasil, 2024a.



Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2025.

Conforme o boletim epidemiológico de 2025, do Ministério da Saúde e da Fundação de Vigilância em Saúde, dados epidemiológicos registrados nos anos de 2013 a 2024, representa o coeficiente de incidência (casos por 100 mil habitantes) e casos novos (prevalência) no Brasil, conforme demonstra a Figura 3.

Figura 3 - Coeficiente de incidência (casos por 100 mil habitantes) e números de casos novos de tuberculose. Brasil, 2013 a 2024



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretarias Estaduais de Saúde/Ministério

da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Avaliando o contexto de 2013 a 2024, foi observado um aumento geral nos últimos anos, com quedas nos anos de 2020 e 2021 no número de casos correspondendo ao ano de diagnóstico (Ministério da Saúde, 2025). Neste período pandêmico, houve queda nas notificações de casos de TB, assim como na taxa de cura e nos níveis de adesão ao tratamento, caracterizando assim a subnotificação de casos da doença (Conceição et al., 2024).

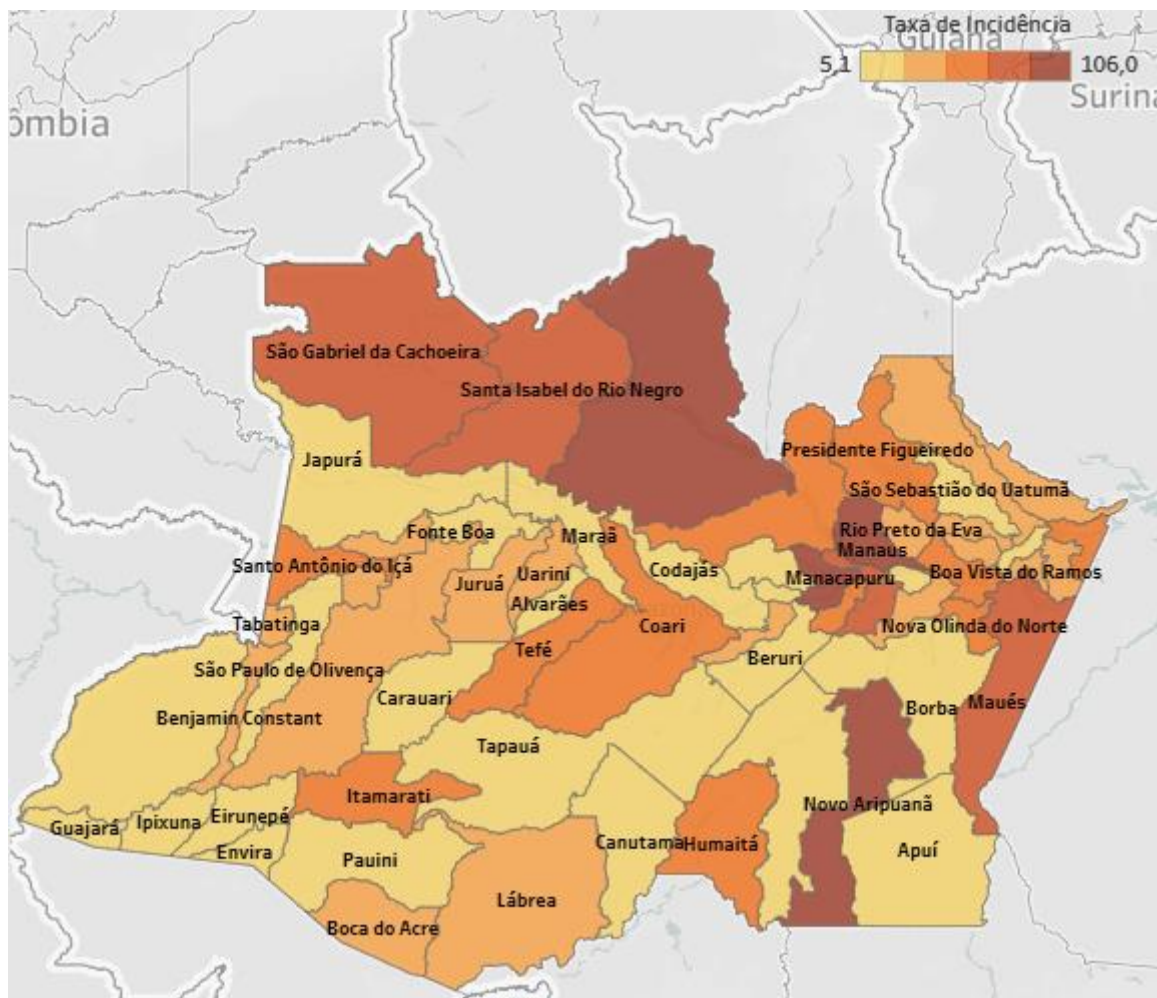
Uma projeção recente feita por Silva & Galvão para o ano 2030 indicam um aumento para 124.245 casos de TB, reforçando a necessidade de ações sistemáticas e equitativas para combater a TB. Esse aumento é considerado uma questão multifatorial, que inclui desde a crise econômica, além de cortes em programas sociais que diminuem a assistência social promovidas por um modelo neoliberal de saúde pelo governo (Doniec, Dall’Alba, King ., 2018).

Para combater esse aumento são necessárias algumas medidas como melhoria do acesso aos serviços de saúde, especificamente no que consiste esse acesso a populações mais vulneráveis, além de grupos específicos como povos indígenas e pessoas privadas de liberdade. É necessário o aprimoramento de análises por regiões, estados e municípios (Silva & Galvão., 2024).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE NO ESTADO DO AMAZONAS

Em 2025, houve até o momento, 3.074 casos novos de TB, conforme dados da Fundação de Vigilância em Saúde (FVS), assim como 179 óbitos. Os perfis mais acometidos na categoria de casos novos foram homens na faixa etária entre 20 a 39 anos (29.2%). Além disso, a capital Manaus apresenta maior taxa de incidência 106,0 por 100.000 habitantes, seguida dos municípios de Barcelos (103,5) e Manacapuru (94,6) Esses números revelam disparidades na carga da doença entre diferentes regiões do estado, indicando a necessidade de estratégias regionais direcionadas para controle e prevenção (FVS, 2025).

Figura 4 - Taxa de incidência em tuberculose por 100 mil habitantes, conforme os dados da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas.



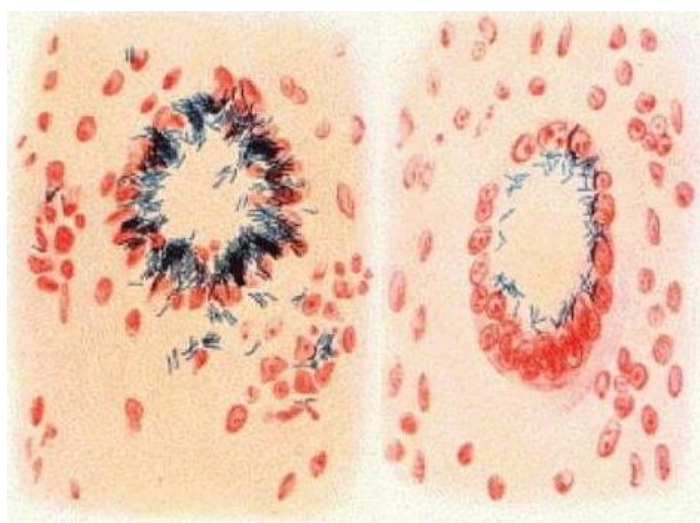
Fonte: Adaptado de FVS, 2025.

No que se refere às formas clínicas da doença, em 2025, a forma pulmonar predominou com 85,3% dos casos, seguida pela forma extrapulmonar (10,9%) e pela combinação pulmonar+extrapulmonar (3,8%). A testagem para coinfeção TB/HIV detectou 450 casos positivos em todo o estado, ressaltando o impacto significativo da coinfeção na morbimortalidade associada à TB. Embora os esforços para controle da TB no Amazonas tenham mostrado avanços, os índices elevados de incidência e mortalidade reforçam a importância de abordar os determinantes sociais da saúde, como acesso ao diagnóstico precoce, condições de vida e educação. Além disso, a vigilância epidemiológica deve ser aprimorada, utilizando abordagens inovadoras e integradas que considerem as especificidades das populações mais vulneráveis do estado (FVS, 2025).

## 2.4 AGENTE ETIOLÓGICO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

O bacilo *Mycobacterium tuberculosis* causador TB, foi isolado e cultivado pela primeira vez em 1882 por Robert Koch. A Figura 5 apresenta a observação do patógeno da TB através da técnica de coloração de tecidos realizada pelo Dr. Koch, apresentando o patógeno infectando tecidos pulmonares (Srvanathi et al., 2024).

Figura 5: Ilustração do agente etiológico da tuberculose de Robert Koch, 1882, retratando o bacilo da TB em tecidos pulmonares infectados.



Fonte: Adaptado de Srvanathi et al., 2024.

O gênero *Mycobacterium* abriga mais de 200 espécies, dentre elas *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), Micobactérias Não Causadoras de tuberculose (MNT) (Turenne, 2019). e *Mycobacterium leprae* e *lepromatosis* (Deps e Colin, 2026). A maioria dos membros são saprófitas de vida livre, com algumas características taxonômicas comuns como, por exemplo, a álcool-ácido resistência, quando coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen, que são coradas devido a presença de ácidos micólicos da parede celular e ácido desoxirribonucleico (DNA) com alto teor de Guanina e Citosina (G + C) (Malaspina, 2009). Em nível de descrição morfológica, as micobactérias são classificadas como bacilos (Figura 6) aeróbicos obrigatórios, apresentam parede celular rica em lipídeos (Warner et al., 2025).

Figura 6: Micrografia Eletrônica de Varredura. Bactéria *M.tuberculosis* em forma de bastonete. Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas.



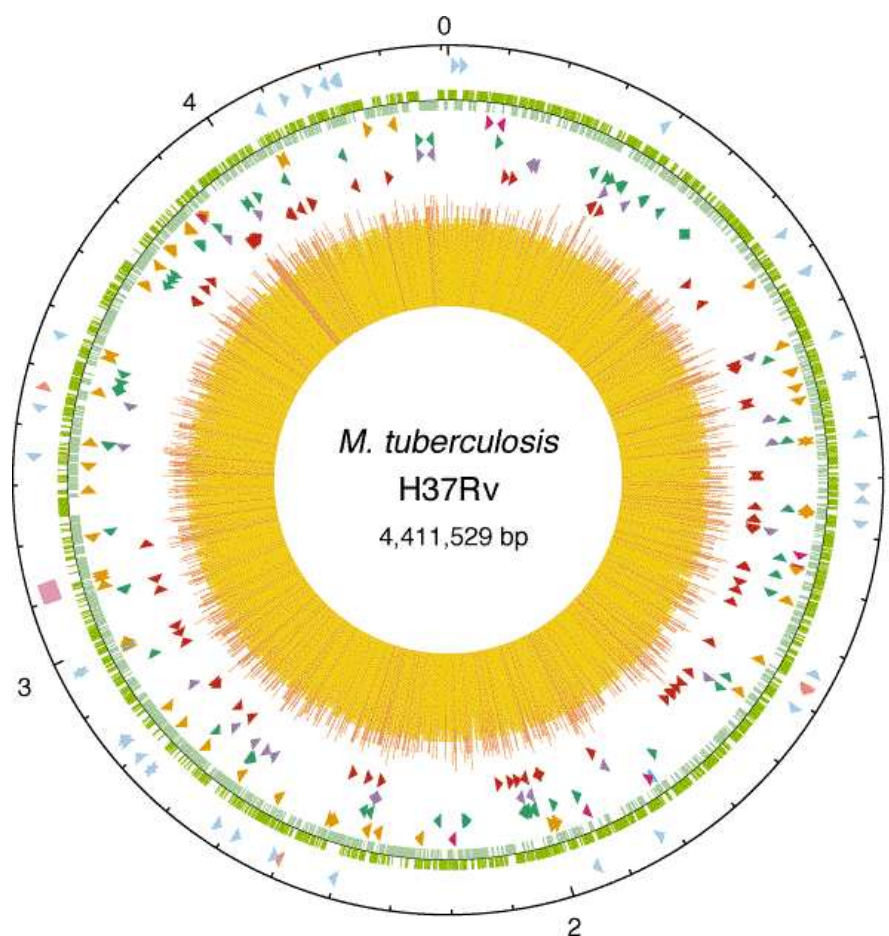
Fonte: Adaptado de Jilani, 2025

Além da *Mtb* o *Complexo Mycobacterium tuberculosis* (CMtb) abrange outras espécies, entre elas: *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis - BCG*, *M. caprae*, *M. Microti* e *M. pinnipedii* (Brasil 2008), recentemente, foram incluídas as espécies *M. mungi* (causa TB em mamífero da família *Herpestidae*) e *M. orygis* (causa TB em animais da família *Bovidae* e em humanos na África e sul da Ásia) (Bespiatykh, 2021). Os membros do CMtb são micobactérias estreitamente relacionadas, com homogeneidade em nível de DNA. Porém, variam em patogenicidade, distribuição geográfica, características fisiológicas (como morfologia de colônia, perfis de resistência a antibióticos), epidemiologia e preferência do hospedeiro (Huard *et al.*, 2003; Ueyama *et al.*, 2014; Simner *et al.*, 2016).

## 2.5 GENOMA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Para melhor compreensão da composição genética, em 1998, Cole *et al.* caracterizaram detalhadamente o genótipo de uma cepa de *Mtb* denominada H37Rv através do sequenciamento do genoma completo. O mesmo é composto por 4.411.529 pares de base (pb) e contém cerca de 4.000 genes e com alto conteúdo de guanina e citosina (65,6%). Além disso, o genoma possui algumas particularidades que estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7: Mapa circular do cromossomo *M. tuberculosis* Cepa de Referência H37Rv.

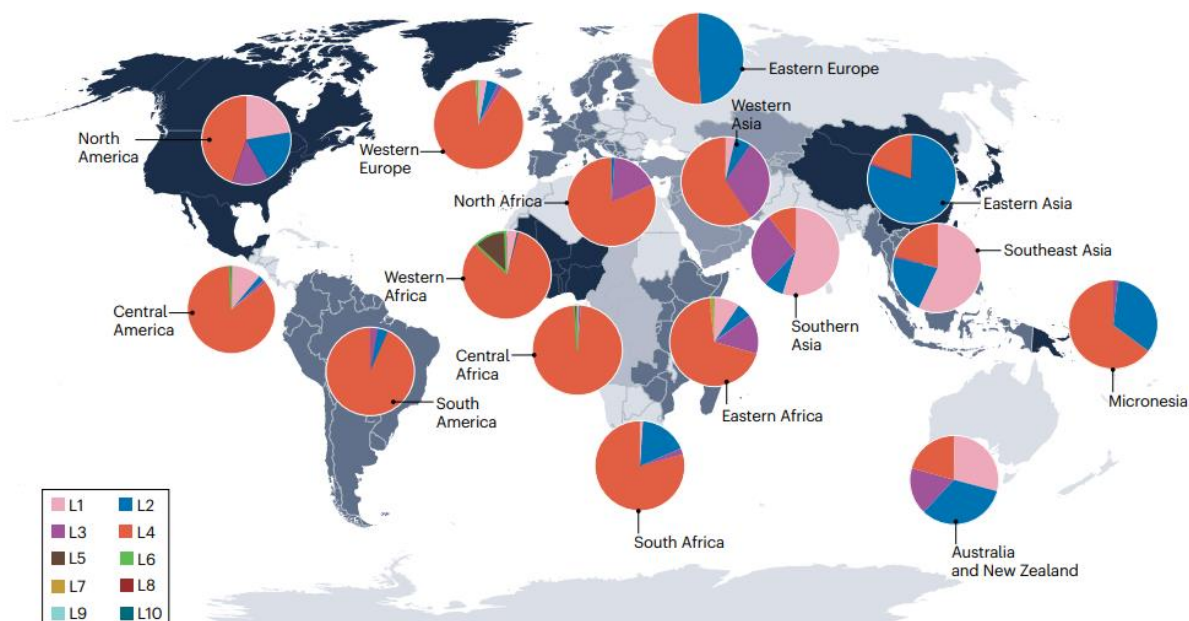


Fonte: Adaptado de Cole et al., 1998. O ponto 0 indica a origem de replicação, o primeiro anel do exterior denota as posições dos genes de RNA estáveis tRNAs são azuis, outros são rosa e a região de repetição direta (cubo rosa); o terceiro anel representa o DNA repetitivo (sequências de inserção, laranja;). O centro representa o conteúdo de G + C, com <65% de G + C em amarelo e >65% de G + C em vermelho. (Cole et al., 1998).

## 2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As bactérias que formam o CMTb possuem 99% de similaridade de sequência de nucleotídeos (Gagneux, 2018). Apesar dessas pequenas diferenças, elas são classificadas em linhagens, que possuem particularidades em relação a distribuição ao redor do mundo (Figura 8) e que diferem quanto à transmissibilidade, patogenicidade, resistência antimicrobiana, virulência e preferência de hospedeiro (Napier et al. 2020). Algumas são endêmicas em lugares específicos, sugerindo mecanismos evolutivos (coevolução) com populações humanas (Brites e Gagneux, 2015). A partir de estudos genéticos, os cientistas definiram que há dez grandes linhagens globais de CMtb (Goig et al., 2025).

Figura 8: Filogeografia global do CMTb adaptado a humanos.



Fonte: Adaptado de Goig et al., 2025

Legenda: Os gráficos de pizza referem-se à proporção das diferentes linhagens do CMTb nas respectivas regiões geográficas do mundo,

## 2.7 FAMÍLIA BEIJING

A família Beijing foi inicialmente identificada a partir da técnica de *Spoligotyping* na China (Van Soolingen, 1995). Porém, durante a década de 90, ocorreram nos EUA surtos de TB multidroga-resistente (TB-MDR), causada por uma cepa identificada na época como W (também reconhecida por IS6110-RFLP). Esta cepa foi então associada a família Beijing por conta do padrão de RFLP IS6110 (Kremer et al., 2004). O *IS6110* é um elemento de inserção encontrado exclusivamente dentro dos membros do *CMtb*, e em decorrência disso, tornou-se um importante marcador molecular que auxilia no diagnóstico na identificação de espécies (Coros, 2008).

Posteriormente, utilizando um marcador específico para a família Beijing conhecido como região NTF, que podem conter inserções *IS6110* (Plikaytis et al., 1994; Bifani et al., 2002), verificou-se que cepas Beijing são diferenciadas em 3 subfamílias a partir da presença ou ausência dessa região (Mokrusov et al., 2005). A cepa W Beijing apresenta duas inserções de *IS6110* (Kurepina et al., 1998). As cepas da família Beijing ancestral apresentam região NTF intacta (sem inserção *IS6110*) e a

família Beijing moderna apresenta uma inserção de IS6110 na região NTF (Mokrusov et al., 2006).

A família Beijing pertence a linhagem L2 e representa uma grande ameaça à saúde pública pois demonstra alta virulência, associação frequente a resistência de múltiplas drogas podendo causar tuberculose drogarresistente (TB-DR) e tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR), e elevada transmissibilidade (alta taxa de mutação). Além disso, estudos epidemiológicos relatam que a classificação precisa dos isolados representam um desafio para a compreender a estrutura filogenética complexa dessa família (Atavliyeva; Auganova e Tarlykov, 2024).

Em um estudo realizado na Geórgia, analisaram a população de 183 isolados de CMTb. A família mais predominante encontrada foi Beijing (26%) e os resultados demonstraram que a TB multirresistente (TB-MDR) foi quase completamente restrita às cepas da família Beijing e que as taxas mais elevadas entre pacientes com TB-MDR previamente tratados apontaram para um maior potencial da família Beijing de escapar da terapia e desenvolver TB-MDR (Niemann et al., 2010). No trabalho de Ford et al., 2013, cepas de *Mtb* Beijing (L2) adquiriram resistência medicamentosa à rifampicina e isoniazida in vitro de forma mais rápida que cepas da linhagem L4. Essa aquisição rápida de resistência está relacionada com uma maior taxa de mutação.

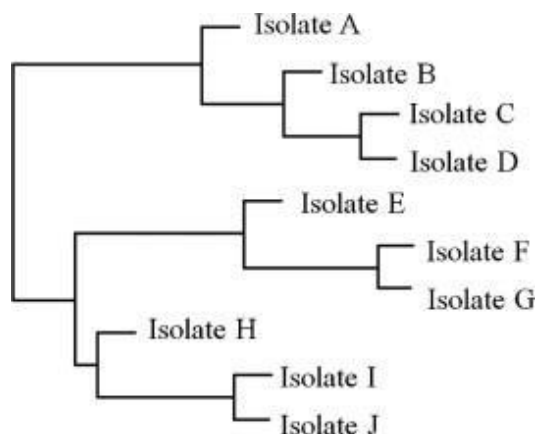
Por fim, um trabalho de revisão sistemática buscou compreender a associação entre a família Beijing e os resultados desfavoráveis ao tratamento concluíram que a família Beijing está associada a um risco aumentado de desfechos desfavoráveis incluindo falha terapêutica e recidiva (Liu et al., 2020). Essa família causa preocupação para as autoridades de saúde e é necessário avaliar e aprimorar estratégias para seu monitoramento. (Couvin e Rastogi 2015).

## 2.8 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia molecular consiste na aplicação da biologia molecular em estudos epidemiológicos, de preferência aplicáveis em grande número de amostras e idealmente diretamente em amostras clínicas (Haghdoost 2008). No contexto de doenças infecciosas, pode fornecer resultados sobre características tais como a causa, patogênese, circulação, transmissão e prevenção da enfermidade (Eyboosh et al., 2017). Para auxiliar nessas questões, é necessário compreender a distribuição de agrupamentos moleculares (que podem ser variantes, cepas, sorotipos)

denominados *clusters*. Para avaliar a relação epidemiológicas entre os isolados, são utilizados programas ou softwares que geram dendrogramas de similaridade baseados em suas homologias genéticas (Carroll et al., 2014) (Figura 9).

Figura 9: Representação esquemática de um dendrograma



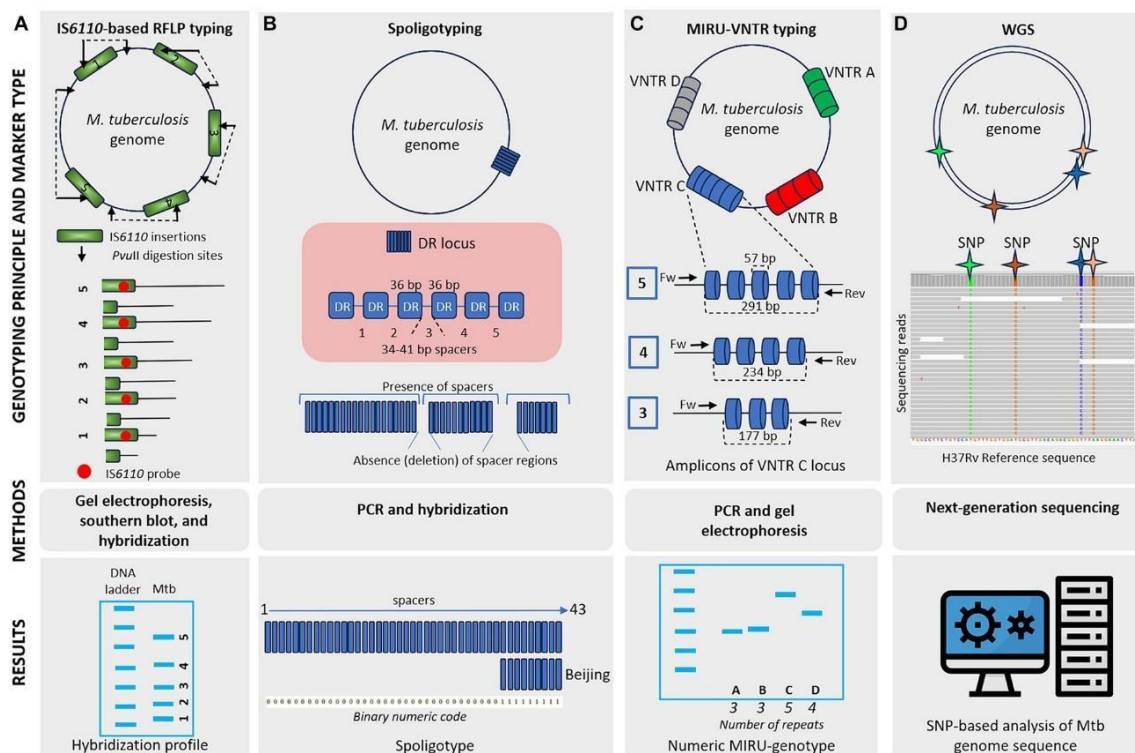
Fonte: Adaptado de Carroll et al., 2014

Legenda: O dendrograma é um tipo de árvore filogenética que representa a história evolutiva entre os organismos estudados com base nas suas características genéticas. A figura mostra um exemplo hipotético e a distância genética entre os isolados e um progenitor específico.

Várias técnicas moleculares podem ser utilizadas para a detecção de cepas de *MTB* e de linhagens específicas do CMTb (Figura 10). A primeira a surgir foi a técnica de tipagem de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) sem hibridação, baseada na visualização do número de cópias e localização no genoma da sequência de inserção IS6110, método que foi o método padrão ouro para genotipagem de CMTb (Van Embden et al., 1993).

Nesta técnica, é necessário o uso de uma enzima de restrição para fazer a clivagem do DNA, seguida de uma eletroforese em agarose, transferência para um filtro de *nylon* e hibridização com um fragmento específico da *IS6110* e visualização. Esta técnica permitiu a construção de bancos de genótipos permitindo comparação Inter laboratorial e desenvolvimento de software para comparação semiautomática. Algumas desvantagens desse método são: necessidade de obter DNA de alta quantidade e qualidade, mão de obra de nível elevada para reprodução entre os laboratórios (Coscolla e Gagneux, 2014).

Figura 10: Representação esquemática de diferentes tipos de marcadores de *M. tuberculosis* e métodos de tipagem.



Fonte: Adaptado de Atavliyeva; Aугanova e Tarlykov· 2024.

Na técnica de *Spoligotyping*, a região de DR (*Direct Repeat*) é amplificada e hibridizada com oligonucleotídeos complementares às regiões espaçadoras variáveis entre as DRs, que ficam imobilizadas em uma membrana de *nylon*. A diferenciação entre as cepas se dá pela presença diferenciada de espaçadores. Essa técnica mostra-se mais eficiente em cepas com baixo número de cópias de IS6110, é mais simples, rápida, porém tem seu poder de diferenciação reduzido em cepas com alto número de cópias se comparado ao RFLP (PANDOLFI, 2006).

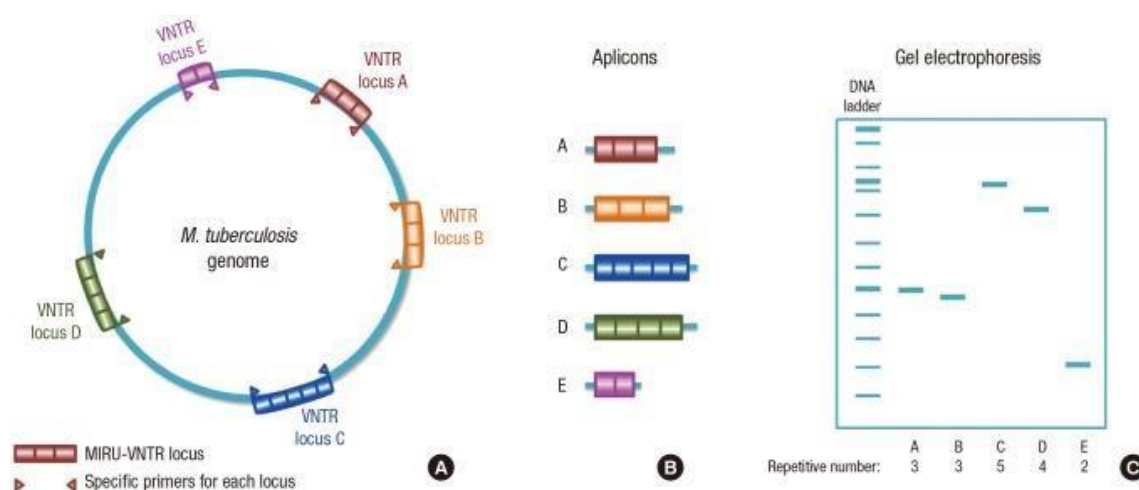
## 2.9 MIRU-VNTR 12 *LOCi*

Existem técnicas baseadas em minissatélites com números variáveis de repetições em sequência (variable numbers of tandem repeats - VNTRs), que consiste numa PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com os iniciadores específicos, seguidos de uma eletroforese. Esta metodologia apresenta excelentes resultados na tipagem de *M. tuberculosis*, por ser reprodutível. Um exemplo é a técnica baseada na caracterização de MIRUs (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit). Os MIRUs se caracterizam com sequências repetitivas que variam entre 40-100pb distribuídas em

41 locus do genoma de H37Rv (SUPPLY et al., 2000). Na primeira versão desta técnica, foram analisados 12 *loci* (MIRU02, MIRU04, MIRU10, MIRU16, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU26, MIRU27, MIRU31, MIRU39 e MIRU40). O MIRU-VNTR permite a comparação e o rastreamento geográfico de número elevado de cepas de *Mtb* (PANDOLFI, 2006). Na Figura 11 é descrito o funcionamento dessa técnica.

Em 2001, houve automatização do método MIRU-VNTR 12 *loci* (Supply et al., 2001). Se faz necessário avaliar o tamanho do amplicon, pois ele é convertido em código numérico onde cada dígito representa um número de cópias em um locus específico segundo uma tabela específica (Supply et al., 2001). Os autores também comentam sobre o método ser 100% reprodutível.

Figura 11: Princípio da genotipagem por MIRU-VNTR.



Fonte: Adaptado de Ei et al., 2016

Legenda: ( **A** ) Os loci MIRU-VNTR de diferentes números repetitivos espalhados no genoma de *M. tuberculosis* são amplificados por *primers* específicos para cada locus. ( **B** ) Diferentes tamanhos de amplicons após PCR. ( **C** ) Os amplicons podem ser vistos após eletroforese em gel com diferentes tamanhos que refletem o número repetitivo de cada locus VNTR.

Segundo o trabalho de Pitondo-Silva et al., 2013 a combinação de *Spoligotyping* e método MIRU-VNTR fornecem um maior nível de discriminação e, portanto, essa combinação é a ferramenta de genotipagem mais útil para ser aplicada a isolados de *Mtb*. Também se foi criado uma plataforma denominada MIRU-VNTR *plus* contendo genótipos definidos por 12-, 15- e 24 MIRUs e *Spoligotyping* (Supply et al., 2001). Esta plataforma se encontra num servidor web (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/>) que também dispõe de características das cepas de *Mtb* e informações epidemiológicas. A MIRU-VNTR *plus* também contém análises de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) além de ser possível realizar análises

filogenéticas baseadas na comparação de linhagens e famílias de referências depositadas, assim como é possível também a comparação de espécies.

Essas comparações podem ser feitas por apenas 1 método de genotipagem (como neste trabalho), ou ainda, pela combinação de vários métodos. (Weniger T et al., 2010; Allix-Béguet C et al., 2008). Dentre elas: busca por similaridade de linhagens, criação de dendrogramas nos modelos UPGMA (Método de Agrupamento por Pares não Ponderado com Média Aritmética) e NJ (método de junção de vizinhos), árvores de abrangência mínima e etc. (Weniger T et al., 2010).

## 2.10 PCR MULTIPLEX

Além dessas metodologias, foram sendo desenvolvidos novos métodos de detecção. Dentre essas novas abordagens, destacam-se as reações de triagem baseadas em PCR, que são conjuntos de iniciadores direcionadas à marcadores genômicos dessa linhagem, como por exemplo a região NTF e o gene Rv097c (Wada et al., 2009; Warren et al., 2004), que serão abordados nesse trabalho.

Outro trabalho que demonstra aplicabilidade na diferenciação de cepas Beijing e Não Beijing utilizando reações de triagem foi demonstrado no trabalho de Luo et al., 2015, onde desenvolveram uma PCR multiplex para avaliar as regiões RD105, RD207 do genoma de Mtb Beijing. A vantagem dessas reações é a identificação rápida e específica a partir do DNA genômico, sendo mais acessível para laboratórios de menor infraestrutura como o laboratório de Micobacteriologia do INPA.

### 3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Genotipagem de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e avaliação quanto a presença da linhagem Beijing em isolados em Manaus – AM.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o perfil clínico epidemiológico dos pacientes com tuberculose relacionados aos isolados clínicos provenientes da policlínica Cardoso Fontes
- Confirmar a identificação dos isolados de *M. tuberculosis* entre os isolados clínicos
- Caracterizar a diversidade genética dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* circulantes em Manaus – AM através da técnica MIRU-VNTR
- Analisar a frequência dos genótipos de *M. tuberculosis* circulantes em Manaus
- Detectar a presença ou ausência da linhagem Beijing dos isolados
- Conhecer a proporção da linhagem Beijing e não Beijing.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DE ESTUDO

Este estudo faz parte de projeto aprovado em Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEP/UFAM, CAAE: 57978916.3.0000.5020, com parecer de 17/08/2016, de acordo com a Resolução 466/2012. Esta pesquisa se trata de um estudo para avaliação da diversidade genética e detecção da linhagem Beijing de 40 isolados clínicos de paciente com tuberculose pulmonar e extrapulmonar que foram cedidos pela Policlínica de Referência em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes, integrante da Secretaria de Estado de Saúde (SES-AM) situada na cidade de Manaus.

Nesta mesma instituição foram feitos testes para a identificação bacteriológica (baciloscopia, cultura e/ou GeneXpert MTB/RIF® ou (TRM). Também foram realizados os testes para a identificação fenotípica da sensibilidade aos antimicrobianos isoniazida e rifampicina através do sistema BACTEC®-960-MGIT™ (BD – EUA), de acordo com o preconizado pelo Manual Nacional de Vigilância Laboratorial de Tuberculose.

Posteriormente, as amostras de escarro foram encaminhadas ao Laboratório de Micobacteriologia (INPA), onde atualmente pertencem à coleção de micobactérias do mesmo instituto sob a responsabilidade do curador e pesquisador Dr. Mauricio Morishi Ogusku e estavam preservadas em meio líquido de Sauton ou meio Middlebrook 7H9 contendo Tween 80 e glicerol, mantidas a -20°C. Desta coleção, foram selecionadas 40 cepas (Tabela 1) de *M. tuberculosis* depositadas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico, do INPA entre os anos de 2018, 2019 e 2020. A partir destas cepas, foram feitos:

Tabela 1: Amostras que foram utilizadas no estudo

Identificação	Nº de registro	Identificação	Nº de registro
1	06/18	21	124/18
2	16/18	22	128/18
3	18/18	23	130/18
4	21/18	24	140/18
5	36/18	25	149/18
6	43/18	26	150/18
7	45/18 (1)	27	151/18
8	45/18 (2)	28	156/18
9	68/18	29	12/19
10	73/18	30	20/19
11	79/18	31	22/19
12	92/18	32	35/19
13	94/18	33	42/19
14	105/18	34	63/19
15	106/18	35	69/19
16	111/18	36	72/19
17	113/18	37	98/19
18	116/18	38	99/19
19	121/18	39	103/19
20	122/18	40	26/20
		41	H37Rv

Fonte: própria (2025)

#### 4.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo isolados de Mtb provenientes de 39 pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar com diagnóstico bacteriológico confirmado pela cultura no período dos anos 2018-2020. Nesta amostragem, um paciente foi submetido a coleta duas vezes (45/18). As amostras de pacientes que apresentaram cultura bacteriana contaminada por fungos ou por outros microrganismos foram excluídas do estudo.

#### 4.3 COLETA E ANÁLISE DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os pacientes foram submetidos a um questionário (Anexo I) para coleta de dados clínicos e sociodemográficos para assim serem feitos os cadastros dos pacientes em nosso laboratório. Os pacientes preencheram um termo de consentimento para disponibilizar os dados em nosso estudo.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DO DNA POR TERMÓLISE

O DNA das micobactérias foi extraído de acordo com protocolo proposto por Leão et al. (2004). Uma alíquota de 100 µL da suspensão de bacilos preservada em meio de Sauton juntamente com 100 µL de água ultrapura, foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, e inativado por 60 minutos a 95°C. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 10min e armazenada a -20° C por um pernoite. A partir desta etapa as foram aliqotados os DNAs para serem usados nos seguintes ensaios.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE *M. TUBERCULOSIS* POR PCR

Para a confirmação do Complexo *M. tuberculosis*, as amostras foram submetidas a identificação por PCR de acordo com a metodologia descrita em Leão et.al. (2004). Para isso, o DNA extraído foi submetido à PCR com primers específicos (INS1: 5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC3'; INS2: 5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA3') para a sequência de inserção *IS6110* de *M. tuberculosis*. A PCR resultou em um fragmento de 245pb (pares de base) que foi visualizado em transiluminador de luz azul após a eletroforese em gel de agarose de 1,5% e corado com SYBERTM Safe (Invitrogen™).

#### 4.6 GENOTIPAGEM DOS ISOLADOS DE *M. TUBERCULOSIS* POR MIRU- VNTR

Para cada um dos 40 isolados de *M. tuberculosis*, ocorreu a genotipagem de acordo com o método padrão de 12 loci MIRU-VNTR (Supply et al., 2001). Utilizaram-se reações em cadeia da polimerase (PCR) individuais com 12 pares de oligonucleotídeos (Tabela 2). O controle positivo usado para a reação foi a cepa referência de *M. tuberculosis* H37Rv. Após amplificação, os produtos amplificados de tamanho variável foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3% após serem corados com SYBR Safe (Invitrogen™), e os tamanhos dos produtos de

cada locus foi determinado por comparação com um marcador de 100pb de DNA (Invitrogen™).

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores referentes aos 12 *loci* de MIRU.

<b>Locus de MIRU</b>	<b>Identificação</b>	<b>Sequência do oligonucleotídeo</b>
<b>02</b>	2F	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT
	2R	TACTCGGACGCCGGCTCAAAT
<b>04</b>	4F	GCGCGAGAGCCCGAACTGC
	4R	GCGCAGCAGAAACGTCAGC
<b>10</b>	10F	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC
	10R	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
<b>16</b>	16F	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA
	16R	CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
<b>20</b>	20F	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG
	20R	GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
<b>23</b>	23F	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG
	23R	AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC
<b>24</b>	24F	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT
	24R	GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
<b>26</b>	26R	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC
	26F	CATAGGCGACCAGGCGAATAG
<b>27</b>	27F	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA
	27R	GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
<b>31</b>	31F	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA
	31R	GTGCCGACGTGGTCTTGAT
<b>39</b>	39F	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC
	39R	CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
<b>40</b>	40F	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT
	40R	GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA

Fonte: Supply et al., (2000), com modificações.

Baseado no número de repetições, cada amostra recebeu um código numérico que foi utilizado para descrever o perfil genético. A Tabela 3 descrita por Supply (2000) é utilizada como referência para anotação dos resultados das reações de amplificação.

Tabela 3: Correlação entre os tamanhos dos amplificadores e os alelos de MIRU

Alelo	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110

Fonte: Supply et al. 2001.

#### 4.7 REAÇÕES DE GENOTIPAGEM POR MIRU- VNTR

Para a amplificação dos loci, foram empregados protocolos previamente descritos na literatura, com pequenas variações conforme etapas de padronização realizadas durante o estudo. Primeiramente, foram feitos ensaios para gradiente de temperatura de hibridização dos loci de MIRU-VNTR. Para isso, foi preparado um MIX para PCR de acordo com a Tabela 4, usando como controle de reação a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv para interpretação dos tamanhos de fragmentos. As temperaturas de hibridação utilizadas se encontram na Tabela 5. Basicamente, as únicas diferenças que houveram nos protocolos de amplificação foram concentração de MgCl<sub>2</sub>, quantidade de DNA (amostra) e a presença de aditivos de PCR como glicerol, DMSO e betaína.

Tabela 4: Protocolo de PCR para verificação da melhor temperatura de hibridação os *loci* de MIRU.

Reagentes	Estoque	Reação	1 Reação Vol (µL)	Termociclador: Veriti		
				Programa: MIRU FLEX		
H <sub>2</sub> O	--	--		Temp.	Tempo	Ciclos
10X Buffer PCR	10X	1X	2,5	95°C	5'	1
dNTP	2000µM	200µM	2,5	94°C	1'	35
MgCl <sub>2</sub>	50mM	5mM	2,5	°C	1'	
Primer F	10µM	0,4µM	1,0	72°C	1:30'	
Primer R	10µM	0,4µM	1,0	72°C	10'	1
Taq DNA	5 U/µL	2U	0,4			
DNA			5,0	Obs: temperatura de hibridação varia entre os <i>loci</i> de MIRU.		
Volume final:			25,0			
Volume do mix por Reação:			20,0			

Fonte: própria (2025)

Tabela 5: Temperaturas de hibridação utilizada em cada locus de MIRU

MIRU – Temperaturas de Hibridação											
2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
61°C	60°C	55°C	60°C	54°C	53°C	54°C	59°C	50°C	55°C	55°C	55°C

Fonte: própria (2025)

#### 4.8 BUSCA POR SIMILARIDADE DE MIRU- VNTR

Após a determinação dos alelos de cada cepa, os perfis de MIRUs foram submetidos à plataforma, <http://www.miru-vntrplus.org/>, para análise de similaridade e definição das linhagens das cepas de *M. tuberculosis*.

#### 4.9 CÁLCULO DA DIVERSIDADE ALÉLICA

A diversidade alélica (h) no contexto MIRU-VNTR é calculada usando a fórmula de Selander (1986), que é:  $h = 1 - \sum xi^2$ , onde xi é a frequência do alelo i num determinado locus e n é o número total de isolados analisados. A diversidade alélica é um indicador da capacidade discriminatória do locus MIRU-VNTR. Este índice é considerado com um alto poder discriminatório  $h > 0,6$ , moderadamente discriminatória se  $0,3 \geq h \geq 0,6$  e com baixo poder discriminatório se  $h < 0,3$  (SOLA et al. 2003). A diversidade alélica (h) foi calculada automaticamente pela plataforma MIRU-VNTR plus quando lhe foi solicitado análises por similaridades do painel de isolados analisados.

#### 4.10 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS *PRIMERS* QUE COMPÕEM AS REAÇÕES DE TRIAGEM

Para a detecção da linhagem Beijing de *M. tuberculosis*, foram utilizados 3 conjuntos de iniciadores específicos, previamente descritos na literatura. Os iniciadores foram desenhados com base em sequências genômicas conservadas e características da linhagem Beijing, visando alta especificidade e sensibilidade na amplificação por PCR. Os pares de iniciadores utilizados estão listados na Tabela 6, contendo as sequências, tamanho esperado dos amplicons e a referência de onde foram obtidos ou adaptados.

Tabela 6. Conjunto de *iniciadores* utilizados para a detecção da linhagem Beijing de *M. tuberculosis*

Identificação	Sequência (5' – 3')	Referência	Amplicon (pb)
Bjn-F	ATG GCA CGG CCG ACC TGA ATG AAC C	Yu et al (2023) Warren et al (2004)	239pb
Bjn-R	ACC GAG CTG ATC AAA CCC G		
nBjn-F	GGT GCG AGA TTG AGG TTC CC	Yu et al (2023) Warren et al (2004)	308pb
nBjn-R	TCT ACC TGC AGT CGC TTG TGC		
MDR-6	CCA GAT ATC GGG TGT GTC GAC	Plikatys et al (1994) Wada (2008)	1500pb - classificado como Beijing 302pb – considerado um padrão atípico mas não necessariamente Beijing
MDR-6r	TGC CGT TGT CGA AAT CTA AAC CC		
ON-1002 (Fw)	GTC ACTGAACGTGGCCGGCTC	Nakajima et al (2013)	163pb – Beijing 261pb – Não Beijing 163 e 261pb – Beijing (nesse caso depende da concentração do primer)
ON-1258 (R1) <sup>a</sup>	TCGGTCACCGTTTTTGTAGGTGACCGTC		
ON-1127 (R2)	AGCAACCTCGCAATCTGACC		

Fonte: própria (2025)

#### 4.11 REAÇÕES DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DA FAMÍLIA BEIJING

Foi sintetizado um conjunto de iniciadores desenhados com base em sequências genéticas características da linhagem Beijing, permitindo sua detecção por meio da técnica de PCR convencional. Esse painel de iniciadores, possibilita a discriminação eficiente desta família. Para validação dessas metodologias, foi-se utilizado controles positivos, cepas: ZT272 (Ancestral), 1471 (Moderna), 5351 (Moderna), todas isoladas no Brasil, caracterizadas como Beijing no trabalho de Gomes et al 2015, além da cepa 109 (Ancestral) isolada em Moçambique que também era descrita como Beijing. Estas cepas controles Beijing foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias (LABMAM) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) - RJ pelos pesquisadores Dr. Philip Noel Suffys e Dra. Lia

Lima Gomes. As reações de triagem detecção da linhagem Beijing consistem em 3 reações que serão descritas a seguir.

1) 1° Reação: Iniciadores Bjn-F e Bjn-R; nBjn-F e nBjn-R

Esse conjunto de iniciadores teve como objetivo a amplificação do gene *Rv2820* por PCR multiplex. Este gene acaba sendo frequentemente associado a elementos repetitivos como a *IS6110*, pois dependendo da sua orientação e a presença ou não nesse gene, é possível a diferenciação em cepas Beijings e não Beijings.

Bjn-F e Bjn-R: Conjuntos de primers complementares à extremidade 3' do elemento *IS6110* e *Rv2820*. Amplifica 239pb em cepas que apresentam genótipo Beijing.

nBjn-F e nBjn-R: Conjuntos de primers complementares a *Rv2819*. Amplificam 308pb em cepas que apresentam Genótipo não Beijing e H37Rv. A PCR multiplex foi realizada contendo volume final de 25µL, contendo Tampão de PCR 1X, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTP, 0,2µM de cada um dos primers descritos acima, 01U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), e 2,5µL de DNA.

2) 2° Reação: Iniciadores MDR6 e MDR6r

Esse par de iniciadores teve como objetivo detectar a inserção de *IS6110* em uma região específica do genoma conhecida como NTF do cromossomo bacteriano. Nessa região, normalmente há muitas cópias de *IS6110*, logo, essa região acaba sendo usada como um importante marcador molecular para cepas dessa linhagem. Além disso, essa cepa tem a capacidade de diferenciar cepas das linhagens Beijings ancestrais e modernas

MDR-6: descrito no trabalho Plikaytis et al.,1994. As cepas amplificam 1500pb na região NTF sendo consideradas Beijing modernas.

MDR-6r: descrita no trabalho de Wada et al 2008, que indica que as cepas que amplificarem 302pb estão intactas, ou seja, há ausência de inserções *IS6110* na região NTF inferindo que por conta dessa ausência, essas cepas seriam consideradas pertencentes à linhagem ancestral. A PCR foi realizada contendo volume final de 25µL, contendo Tampão de PCR 1X, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTP, 0,2µM de cada um dos primers descritos acima, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 2,5µL de DNA.

3) 3º Reação: Iniciadores ON-1002, ON-125 e ON-1127

Esse conjunto de iniciadores teve como objetivo detectar o gene *Rv0697c* que é um gene conhecido por abrigar várias mutações pontuais (SNPs), e esses SNPs são marcadores moleculares específicos para detecção da linhagem Beijing. Além disso, é sugerido que esse gene codifique uma proteína de superfície celular associada à lipoarabinomanana.

Fw e R1: descritos no trabalho de Nakajima 2013 amplificam 163pb, caracterizando cepas da linhagem Beijing. Além disso, uma banda adicional de 261pb pode também aparecer dependendo das condições dos reagentes na reação (principalmente pela baixa concentração do primer R2).

Fw e R2: descritos no trabalho de Nakajima 2013 amplificam 261pb, caracterizando cepas que não pertencem à linhagem Beijing. A PCR multiplex foi realizada contendo volume final de 25µL, contendo Tampão de PCR 1X, 2,2mM de MgCl<sub>2</sub>, 333µM de dNTP, 0,2µM de cada um dos primers descritos acima, 0,5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 0,5M de betaína e 2,5µL de DNA.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E SOCIODEMOGRÁFICOS DAS AMOSTRAS

Os dados sociodemográficos e clínicos dos pacientes diagnosticados com tuberculose foram analisados e estão apresentados na Tabela 7. A média de idade dos pacientes foi de 41,3 anos, com um desvio padrão (DP) de 19,92. Quanto ao gênero, a maioria dos pacientes era do sexo masculino (55%), seguida pelo sexo feminino (27,5%).

A naturalidade dos pacientes indicou que 35% eram de Manaus, 27,5% do interior do Amazonas, e 5% de outros estados, enquanto 32,5% não informaram a naturalidade. Em relação a comorbidades, 50% dos pacientes não apresentaram comorbidades, enquanto 12,5% tinham diabetes e 2,5% alergias e asma. No que diz respeito ao uso de álcool, 37,5% relataram uso, 32,5% não e 30% não responderam. O tabagismo foi observado em 20% dos pacientes; 50% não fumavam e 30% não informaram. Para a vacinação com BCG, 47,5% dos pacientes estavam vacinados, 10% não estavam e 42,5% não forneceram informação.

Tabela 7: Variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com TB.

Variável	Pacientes (n=40)
Idade, média ± DP	41,3 ± 19,92
S/R	12 (30%)
<b>Gênero, n (%)</b>	
Masculino	22 (55%)
Feminino	11 (27,5%)
S/R	7 (17,5%)
<b>Naturalidade, n (%)</b>	
Manaus	14 (35%)
Interior do Amazonas	11 (27,5%)
Outro estado	2 (5%)
S/R	13 (32,5%)
<b>Comorbidades, n (%)</b>	
Sem comorbidades	20 (50%)
Alergia	1 (2,5%)
Asma	1 (2,5%)
Diabetes	5 (12,5%)
S/R	13 (32,5%)
<b>Outras doenças infecciosas no momento, n (%)</b>	

Sem doenças infecciosas	37 (92,5%)
Dengue	1 (2,5%)
Malária	1 (2,5%)
HIV/AIDS	1 (2,5%)
<b>Uso de álcool, n (%)</b>	
Sim	15 (42,86%)
Não	15 (42,86%)
S/R	12 (14,28%)
<b>Tabagismo, n (%)</b>	
Sim	8 (22,86%)
Não	22 (68,86%)
S/R	10 (14,28%)
<b>BCG, n (%)</b>	
Sim	19 (47,5%)
Não	4 (10%)
S/R	17 (42,5%)

Legenda: S/R sem registro  
 Fonte: própria (2025)

A Tabela 8 apresenta as variáveis clínicas dos pacientes. Dos 40 pacientes, 35% foram classificados como indivíduos multibacilares, testando positivo para baciloscopia direta (B.D). A maioria (65%) dos pacientes apresentou a forma pulmonar da doença, enquanto apenas 5% apresentaram formas extrapulmonares. Em relação à resistência a antibióticos, 12,5% mostraram resistência à isoniazida, 15% à rifampicina, e 10% apresentaram resistência a ambas as drogas. Os antecedentes de tuberculose demonstraram que 20% dos pacientes tiveram reinfecção, enquanto 57,5% eram novos casos. Além disso, a presença de bacilos foi identificada em 20% dos pacientes, que apresentaram de 0 a 10 bacilos (paucibacilar).

Mesmo com poucas amostras neste estudo, esses dados refletem a complexidade e os desafios no tratamento da tuberculose, além de oferecer uma visão geral das características dos pacientes afetados pela doença. As informações obtidas na Tabela 8 e Tabela 9 destacam a predominância da tuberculose em indivíduos do sexo masculino e a frequência de comorbidades e resistência a antibióticos. A identificação de variáveis sociodemográficas e clínicas é essencial para desenvolver estratégias de controle e tratamento eficazes para a tuberculose na população analisada.

Tabela 8: Variáveis clínicas associadas à TB.

<b>Carga bacilífera B.D (%)</b>	
Bacilífero	6 (15%)
Paucibacilar	8 (20%)
Negativo	17 (42,5%)
S/R	9 (22,5%)
<b>Antecedentes de tuberculose n (%)</b>	
Sim (Recidiva)	8 (20%)
Não (Novo)	23 (57,5%)
S/R	9 (22,5%)
<b>Forma Clínica, n (%)</b>	
Pulmonar	26 (65%)
Extrapulmonar	2 (5%)
S/R	12 (30%)
<b>Resistência a antibióticos, n (%)</b>	
Isoniazida	5 (12,5%)
Rifampicina	6 (15%)
Os dois acima	4 (10%)
S/R Isoniazida/ Rifampicina	7 (17,5%) / 2 (5%)

Fonte: própria (2025)

Legenda: S/R – sem registro; B.D – baciloscopia direta.

## 5.2 CONFIRMAÇÃO DE *M. TUBERCULOSIS* POR PCR (TESTE *IS6110*)

Todos os isolados selecionados foram confirmados sendo CMTb, ou seja, houve amplificação de fragmentos de 245pb como esperado pela reação que analisa a sequência de inserção *IS6110*.

## 5.3 GENOTIPAGEM POR MIRU-VNTR 12 *LOC*

A técnica de genotipagem molecular MIRU-VNTR foi aplicada aos 40 isolados clínicos de *M. tuberculosis* (Tabela 9) obtidos entre 2018-2020 circulantes na região amazônica. Através da plataforma MIRU-VNTR plus, foi possível analisar a diversidade genética, criar um dendrograma, identificar *clusters* e avaliar o poder discriminatório dessa técnica. Perfis alélicos mistos foram considerados. Dados de sensibilidade aos antimicrobianos também não foram avaliados para essa análise inicial. Por fim, o resultado da diversidade alélica se encontra na Tabela 10.

Tabela 9: Alelo correspondente ao tamanho do fragmento de cada um dos isolados de *M. tuberculosis* submetidos a técnica de MIRU

Amostras	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
06/18	1	2	4	2	2	6	1	5	3	2	2	4
16/18	1	2	4	2	2	6	1	5	3	2	2	2
18/18	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1
21/18	2	4	4	3	1	6	2	2	3	5	4	3
36/18	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4
43/18	2	4	4	3	2	6	2	2	3	5	3	3
45/18 (23/2/18)	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	1
45/18 (16/8/18)	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	1
68/18	1	2	5	4	2	6	1	5	3	3	2	7
73/18	1	2	5	5	2	6	1	4	3	2	2	2
79/18	2	1	6	4	1	5	1	5	3	3	2	4
92/18	2	2	4	1	2	5	1	2	3	3	2	4
94/18	2	2	4	2	2	4	1	5	3	2	3	3
105/18	1	2	2	4	2	6	1	5	3	2	2	2
106/18	2	2	4	3	2	5	1	4	3	3	2	5
111/18	2	2	6	4	1	3	1	5	3	3	2	3
113/18	1	2	4	3	2	6	1	4	3	2	1	2
116/18	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	1	3
121/18	2	2	6	3	2	5	1	5	3	3	1	4
122/18	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	1	3
124/18	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	1	2
128/18	2	2	5	4	2	6	1	5	6	1	2	7
130/18	2	2	4	3	2	7	1	3	3	3	1	4
140/18	2	2	4	3	2	6 e 7	1	3	3	3	1	4
149/18	2	2	2	3	2	5	1	5	4	3	1	4
150/18	2	4	5	4	2	6	2	2	3	5	3	3
151/18	2	2	5	4	2	4	1	5	3	3	2	3
156/18	2	4	5	4	2	6	2	2	3	5	3	3
H37RV	2	3	3	2	2	6	1	3	3	3	2	1
12/19	2	2	4	3	2	6	1	5	2	3	2	1
20/19	1	2	4	4	2	6	1	5	2	2	2	2
22/19	2	2	5	4	1	3	1	5	2	3	2	4
35/19	2	3	3	4	2	5	1	1, 2 e 4	2	3	2	2
42/19	1	2	4	4	2	6	1	4	2	2	2	2
63/19	2	2	4	3	1 e 2	4	1	5	2	3	2	3
69/19	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	3
72/19	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	4
98/19	2	2	5	3	1	3	1	5	3	3	2	1
99/19	2	2	5	1 e 3	1	3	1	5	3	3	2	1

103/19	2	2	3	1	2	6	1	4	2	3	2	1
26/20	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	4

Fonte: própria (2025)

Tabela 10: Resultado da diversidade alélica e poder discriminatório dos locus de MIRU.

Locus-alvo	Diversidade Alélica (h)	Quantidade de alelos	Poder discriminatório
MIRU 2	0,35	2	Moderado
MIRU 4	0,28	4	Baixo
MIRU 10	0,65	5	Alto
MIRU 16	0,65	5	Alto
MIRU 20	0,43	2	Moderado
MIRU 23	0,68	5	Alto
MIRU 24	0,16	2	Baixo
MIRU 26	0,52	5	Moderado
MIRU 27	0,34	4	Moderado
MIRU 31	0,52	4	Moderado
MIRU 39	0,47	4	Moderado
MIRU 40	0,77	6	Alto

Fonte: própria (2025)

#### 5.4 PERFIL GENOTÍPICO DAS AMOSTRAS

As árvores filogenéticas foram calculadas e desenhadas usando o algoritmo de NJ (Saitou, N. e M. Nei. 1987). Para melhor identificar as famílias de *Mtb* relacionadas aos isolados foi utilizada a distância máxima de <0.17. Os resultados desta análise se encontram no Apêndice A. Um resumo dele pode ser visualizado na Tabela 11. Observou-se que o percentual de famílias identificadas no conjunto de 12 *loci*, na distância <0.17 foi de 47,5%, enquanto cepas desconhecidas apresentaram percentual de 46.34%. Nesta análise algumas cepas foram caracterizadas como *multiple matches* e apresentaram percentual de 4.88% e H37Rv apresentou percentual de 2.44%

Tabela 11: Amostras que foram identificadas e suas respectivas linhagens

<b>Amostra</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Amostra</b>	<b>Linhagem</b>
06/18	LAM	128/18	NI
16/18	LAM	130/18	NI
18/18	LAM	140/18	NI
21/18	NI	149/18	NI
36/18	NI	150/18	EAI
43/18	EAI	151/18	Haarlem
45/18 (1)	Haarlem	156/18	EAI
45/18 (2)	Haarlem	12/19	NI
68/18	NI	20/19	NI
73/18	NI	22/19	NI
79/18	NI	35/19	NI
92/18	NI	42/19	NI
94/18	NI	63/19	NI
106/18	X	69/19	Haarlem
111/18	NI	72/19	Haarlem
113/18	NI	98/19	Haarlem
116/18	Haarlem	99/19	NI
121/18	Haarlem	103/19	LAM
122/18	Haarlem	26/20	LAM
124/18	LAM	H37Rv	NI

Fonte: própria (2025)

NI = Não identificado até o momento

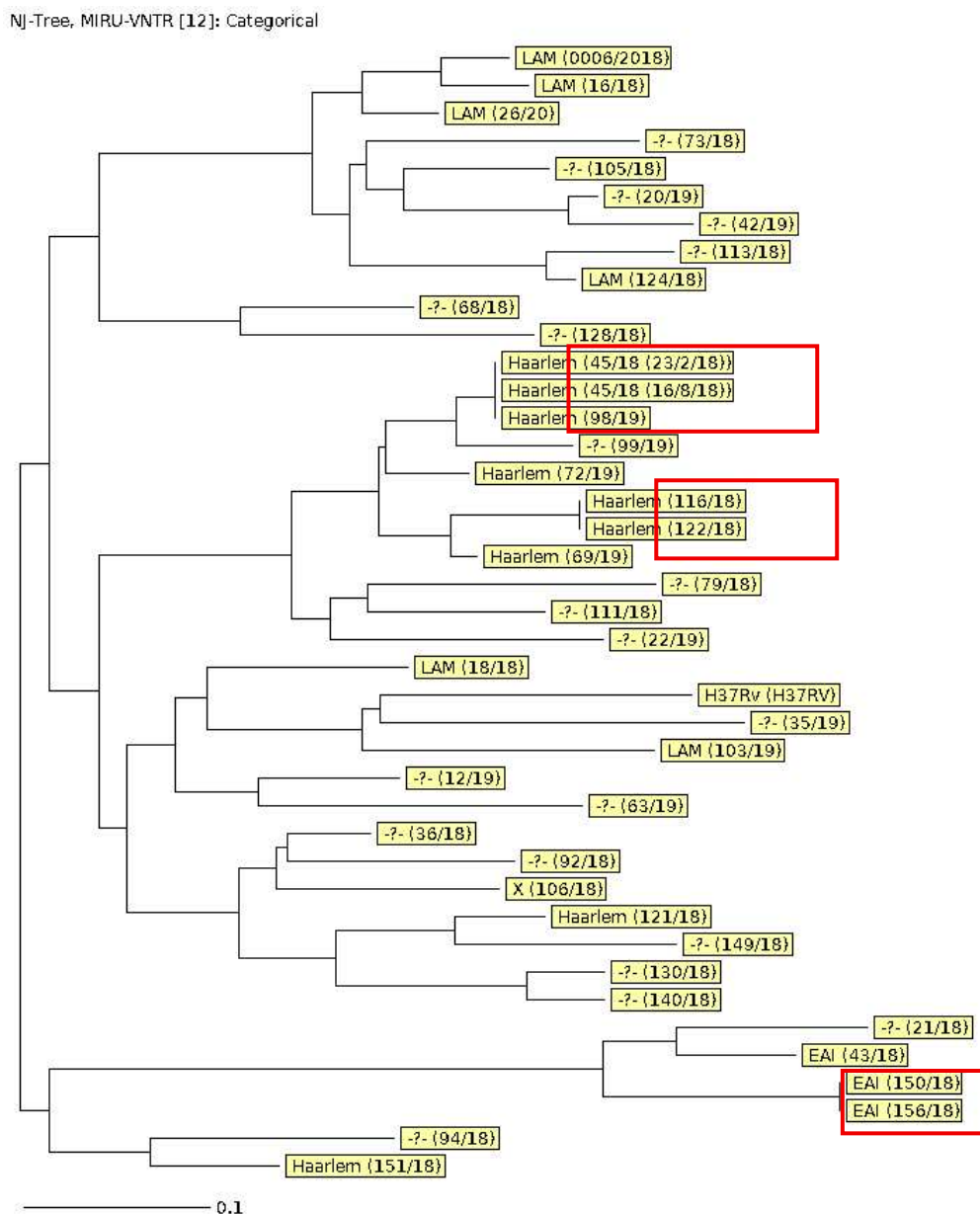
## 5.5 DENDROGRAMA

Foi criada uma árvore radial utilizando o método de NJ (Figura 12). Nessa árvore são mostradas as relações evolutivas entre diferentes isolados e linhagens do CMTb. No centro é exibido o hipotético ancestral comum e cada ramo representa um isolado ou linhagem do CMTb. Essa árvore foi criada a partir dos resultados da genotipagem utilizando 12 MIRU's na plataforma MIRU-VTNR *plus* (Tabela 11).



todas identificadas como Haarlem. *Cluster B*: 116/18 e 122/18, ambas identificadas como Haarlem. *Cluster C*: 150/18 e 156/18, ambas identificadas como EAI. A partir disso, é possível concluir que algumas cepas foram identificadas a nível de linhagem e é possível inferir hipóteses a respeito das cepas que não foram identificadas.

Figura 13: Dendrograma de similaridade NJ MIRU-VNTR 12 *loci*



Fonte: própria (2025) através da plataforma MIRU-VNTR plus

Legenda: A barra de distância indica que quanto maior o comprimento dos ramos, maior a diferença genética entre os isolados. Com isso é possível concluir que *clusters* próximos têm ramos curtos por apresentarem alta semelhança genética.

## 5.7 RESULTADO DAS REAÇÕES DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DA FAMÍLIA BEIJING

As reações de triagem foram aplicadas às 40 amostras incluídas no estudo,

com o objetivo de avaliar a frequência dessa linhagem na população analisada e sua possível associação com agrupamentos genéticos observados na análise por MIRU-VNTR. Para responder essa pergunta, é necessário considerar o resultado das 3 reações que foram feitas avaliando regiões gênicas distintas que caracterizam a presença da família Beijing e a diferenciação entre sublinhagem ancestral e moderna. É importante mencionar também que todas as amostras controles Beijings foram amplificadas nas reações individuais comprovando a eficiência das reações. Os resultados das amplificações das 3 reações selecionadas indicam ausência da linhagem Beijing em todos os isolados, e mais detalhes a respeito das regiões genômicas analisadas serão discutidas.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E SOCIODEMOGRÁFICOS

Os resultados obtidos neste estudo sobre o perfil dos pacientes com tuberculose revelam algumas tendências que são corroboradas pela literatura existente. A predominância de indivíduos do sexo masculino (55%) entre os pacientes diagnosticados está em consonância com a maioria dos estudos epidemiológicos que indicam uma maior vulnerabilidade dos homens à infecção por tuberculose. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com De Souza Filho, Brito e De Lima., (2025) que se propuseram a avaliar o período de janeiro de 2020 a dezembro de 2024 houve um total de 18.177 casos de tuberculose no Amazonas, destes, a maioria foi entre pessoas do gênero masculino (11.321=62,2%), sendo que a idade mais afetada foi entre 20 a 39 anos (7.593=41,7%).

Conforme evidenciado por Lönnroth et al. (2010), fatores sociais, comportamentais e de acesso ao sistema de saúde contribuem para essa discrepância entre os gêneros, evidenciando a necessidade de intervenções direcionadas. A análise transversal de pacientes com tuberculose revelou uma idade média de 41,3 anos com um desvio padrão de 19,92 anos. Esse perfil etário se alinha com achados na literatura científica, que frequentemente descrevem a tuberculose como uma doença que afeta predominantemente adultos em idade produtiva. Sobre a epidemiologia da tuberculose em países de alta carga, observou uma idade média de diagnóstico na casa dos 30 e 40 anos, sugerindo que as populações economicamente ativas são particularmente vulneráveis.

O amplo desvio padrão em nossos dados (19,92 anos) indica uma heterogeneidade considerável na idade dos pacientes, abrangendo desde adultos jovens até idosos, um padrão também reportado em revisões sistemáticas, que destaca a variabilidade da faixa etária afetada pela tuberculose, influenciada por fatores como a prevalência de HIV, condições socioeconômicas e o acesso a serviços de saúde (Lachi, 2015; Freitas, 2016).

A mediana de idade encontrada de 42 anos é relevante, uma vez que a tuberculose é mais prevalente em adultos jovens e de meia-idade. Estudos indicam que a faixa etária de 15 a 49 anos é a mais afetada, com implicações para a mortalidade e produtividade econômica do país (Rieder, 1989; Langer, 2019). A identificação de pacientes nessa faixa etária é fundamental para direcionar

campanhas de rastreamento e prevenção, já que a tuberculose afeta diretamente a força de trabalho e tem um impacto significativo na saúde pública.

Adicionalmente, a alta taxa de diabetes (12,5%) entre os pacientes corroborada por outros estudos destaca a interrelação entre essas comorbidades. A tuberculose e o diabetes mellitus representam um ciclo de retroalimentação, já que a hiperglicemia pode prejudicar a resposta imune, favorecendo a infecção tuberculosa. A presença de diabetes pode aumentar em até três vezes o risco de tuberculose, sublinhando a importância da triagem para diabetes em pacientes diagnosticados com tuberculose (Dye, 2005; Bekzod, 2025).

A resistência a antibióticos observada, com 12,5% dos pacientes mostrando resistência à isoniazida e 15% à rifampicina, reflete a preocupação crescente com a tuberculose resistente a medicamentos. Estudos indicam que a resistência medicamentosa é um desafio importante, particularmente em regiões de alta prevalência. O controle da tuberculose multirresistente requer intervenções imediatas e eficazes, como a melhoria da adesão ao tratamento e a implementação de novas terapias (Dye, 2005; Glaziou, 2019).

Além disso, a forma pulmonar da tuberculose que afetou 65% dos pacientes é consistente com a literatura que aponta para essa modalidade como a mais comum. O tratamento e a identificação precoces são críticos, pois a tuberculose pulmonar é altamente contagiosa. A detecção precoce de casos com sintomas respiratórios é essencial para prevenir surtos e reduzir o impacto da doença na comunidade (Langer, 2019). No trabalho de De Souza Filho, Brito e De Lima., (2025) que se propuseram a avaliar o período de janeiro de 2020 a dezembro de 2024 também foi constatada que a forma clínica pulmonar se mostrou predominante no período mencionado.

## 6.2 RESULTADO DA GENOTIPAGEM POR MIRU-VNTR 12 *LOCi*

Para a genotipagem dos isolados de *Mtb* foi realizada utilizando a técnica MIRU-VNTR 12 *loci*. No entanto, nem todas as regiões conseguiram ser amplificadas com o mesmo protocolo, portanto, se fez necessário algumas alterações que serão discutidas. Basicamente, as únicas diferenças que houveram nos protocolos foram as temperaturas de hibridação, concentração de  $MgCl_2$  e a presença de aditivos de PCR – Glicerol, DMSO e Betaína.

Essas variações na concentração de  $MgCl_2$  já foram descritas no trabalho de Supply et al (2001), quando naquela ocasião, se tinha como objetivo desenvolver uma

genotipagem automatizada de alto rendimento e reprodutibilidade. As variações que foram utilizadas em Supply et al (2001), foram as mesmas concentrações utilizadas nos protocolos deste trabalho (entre 1,5mM a 3mM). Devido a essas variáveis, quatro diferentes reações de PCR multiplex foram feitas para amplificar os 12 *loci* MIRU-VNTR, visando otimizar a eficiência, resolução e reprodutibilidade da genotipagem.

Além disso, outra variação que chama atenção é que em alguns protocolos foi necessário o uso de aditivos de PCR, moléculas que quando inseridas na reação possuem o objetivo aumentar a eficiência e a especificidade da reação. Dentre os aditivos usados, destaca-se o uso de DMSO, também usado conforme o trabalho de Alonso-Rodríguez et al (2008), onde se utilizou o solvente nas reações de MIRU-VNTR 15 *loci*. Por fim, também se foi utilizado as moléculas de betaína e glicerol, conforme demonstrado no trabalho de tese de Furlaneto, 2007, que tinha como objetivo propor avaliar diferentes procedimentos para obtenção de DNA de *M. tuberculosis* a partir de esfregaços corados pelo Ziehl Neelsen e avaliar a aplicabilidade do mesmo em estudos que envolvam amplificação de ácidos nucleicos. Dentre os procedimentos analisados neste trabalho se destaca-se o uso nessas dessas moléculas nos protocolos que envolvem a amplificação da região *IS6110*.

### 6.3 ANÁLISE GENOTÍPICA DE MIRU-VNTR 12 *LOCi*

Antes de adentrar nessa discussão, é importante mencionar que são raros os estudos na Região Norte, especificamente no estado do Amazonas. Provavelmente este estudo é inédito considerando que todas as etapas foram realizadas aqui. Um estudo de Tatara et al 2019, que tinha como objetivo avaliar as características moleculares de isolados de Mtb circulantes em Roraima, estado na fronteira da Venezuela com a Guiana pelas técnicas genotípicas *IS6110-RFLP*, *Spoligotyping* e MIRU-VNTR 24 *loci*. Neste estudo, ocorreu a avaliação de 80 isolados no período de abril 2015 a setembro de 2016 que detectou pela técnica de *Spoligotyping* a ocorrência das linhagens LAM (62,5%), H (16,25%) e T “mal definida” (10%) no estado de Roraima. Ainda por esta mesma técnica, um achado interessante foi a identificação de perfis de *Spoligotyping* atípicos no Brasil (EAI, Beijing e MANU) mais comuns no Extremo e Oriente Médio, Ásia, Oceania e Índia.

Outro achado de grande destaque deste estudo é que a análise genotípica de MIRU- VNTR 24 *loci* demonstrou 69 perfis distintos, e a formação de 6 *clusters*, onde 3 *clusters* continham isolados resistentes à isoniazida ou estreptomicina, assim como

3 clusters apresentavam exclusivamente pacientes indígenas. Além disso, a taxa de agrupamento por MIRU-VNTR 24 loci foi de 21,3%. O estudo também menciona que a capital Boa Vista reuniu a maior parte dos casos e destaca que os venezuelanos e guianenses cruzam as fronteiras para o Brasil devido à falta de assistência médica universal e/ou econômica e crise política em seus países.

Um estudo (ainda não publicado) de dissertação de mestrado aconteceu aqui no estado do Amazonas, que tinha como um dos objetivos caracterizar os genótipos do CMTb isolados de amostras clínicas provenientes de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD – localizada em Manaus/AM), utilizando três ferramentas moleculares distintas: MIRU-VNTR 24 loci, *Spoligotyping* e WGS. Foram analisados 68 isolados que obtiveram com predominância da Linhagem 4 (97,05%) e Linhagem 1 em dois isolados. As famílias predominantes foram LAM (50%), Haarlem (19,11%) e X (11,76%) (Melo, 2022). Estes resultados corroboram com meus achados já que também identifiquei estas famílias. Portanto, esses resultados sugerem a presença dessas famílias circulando em Manaus-AM.

Outro trabalho realizado na Região Norte que dispões de achados genéticos interessantes sobre *Mtb* foi o trabalho de Conceição et al 2017 por meio de *Spoligotyping*, que avaliou 980 isolados no estado do Pará entre 1998 a 2010 que detectou a presença das linhagens L1 (família EAI), L4 (família LAM e Haarlem). Esse estudo sugere estreita relações com cepas de Moçambique. Conceição et al., 2019 avaliando tipagem de 12 SNPs específicos de L1 por meio da *Spoligotyping* conclui que a EAI foi introduzida durante o tráfico de escravos para o norte do Brasil (séculos XVI e XVIII).

#### 6.4 PODER DISCRIMINATÓRIO

No estudo de Supply et al., 2006 estudo é mencionado que as taxas de agrupamento foram reduzidas em quatro vezes (quando se utiliza MIRU 24 loci) e em três vezes (em combinação com *Spoligotyping*), quando comparado ao MIRU 12 loci. Também é afirmado que o MIRU 24 loci apresenta um poder discriminatório maior, mais uniforme e mais eficientes para as linhagens de *Mtb*. Nessa tipagem os resultados apresentam melhor poder de resolução epidemiológica. Neste mesmo estudo, os autores tentaram combinar a tipagem MIRU-VNTR 12 loci em combinação com *Spoligotyping*, no entanto, a combinação apresenta menor poder discriminatório quando comparado ao método padrão ouro tipagem de impressão

digital *IS6110*. Portanto, os autores viram a necessidade de otimizarem um conjunto com maior poder discriminatório MIRU-VNTR 15 *loci*. Este conjunto apresentou 96% da resolução quando comparada com o MIRU-VNTR 24 *loci* e concluíram que MIRU-VNTR 15 *loci* é o conjunto ideal para estudos epidemiológicos e MIRU-VNTR 24 *loci* é o ideal para estudos filogenéticos.

#### 6.5 RESULTADO DAS REAÇÕES DE TRIAGEM PARA FAMÍLIA BEIJING

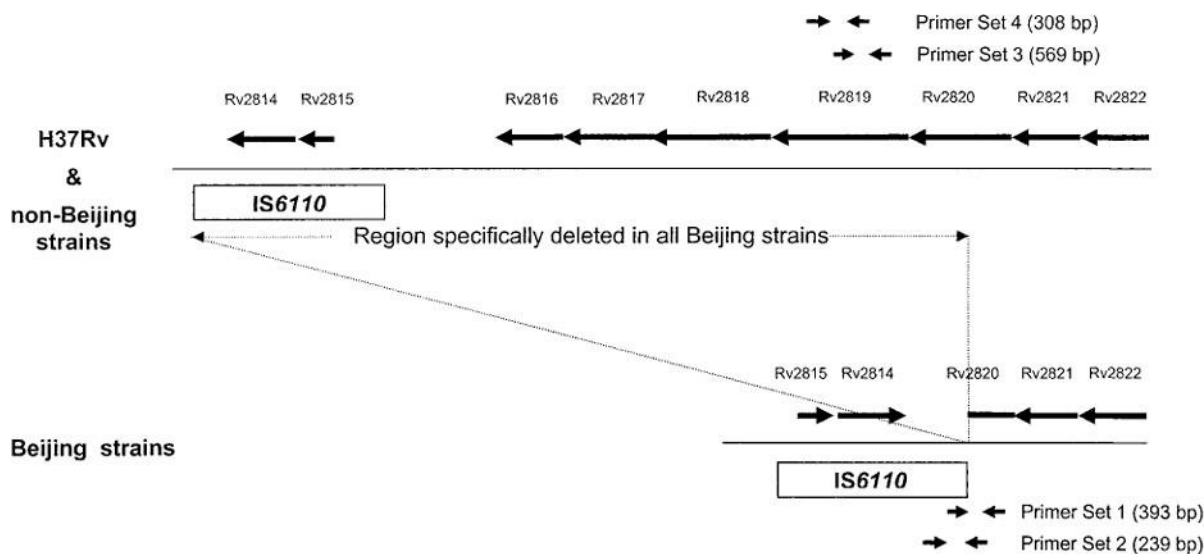
Neste trabalho, foram realizadas reações de triagem baseado em regiões genômicas já descritas na literatura para identificação de isolados Beijing. No início da pesquisa, foram selecionadas 6 *primers* a serem utilizados, no entanto, até o momento só obtivemos êxito no funcionamento de 3 *primers*. Os outros iniciadores (MtbK-F, MtbK-R, Ris1F, Ris2R, ctap9, ctap10) não obtiveram sucesso nas reações de amplificação mesmo após várias tentativas com modificações entre os ensaios. A seguir, discute-se a aplicabilidade do kit com as reações individuais.

##### 1) 1° Reação: *Primers* Bjn-F e Bjn-R; nBjn-F e nBjn-R

No estudo de Warren et al 2004, que teve como objetivo determinar a extensão da infecção múltipla por *M. tuberculosis* em amostras de escarro coletadas de casos novos e em retratamento de tuberculose, residentes na cidade de Cabo, na África do Sul. No período de março de 2000 a junho de 2002, 407 pacientes foram diagnosticados por baciloscopia, dentre eles, 200 amostras foram analisadas via PCR e 186 foram identificadas como Beijing pelos 2 conjuntos de *primers* descritos no artigo. As amplificações que indicam a presença de Beijing são baseadas em uma inserção de *IS6110* em Rv2820 que é exclusiva da família Beijing (Figura 14). Por fim 151 indivíduos (81%) possuíam infecção única e 35 indivíduos (19%) possuíam infecção mista.

Os autores também constataram que cepas Beijing apresentam *IS6110* invertido e deleções que abrangem os genes Rv2816 até partes do gene *Rv2820*. Por fim, os autores também concluem que a sensibilidade e a especificidade de cada primer conjunto foram de 100% (intervalo de confiança de 95%, 85–100%) quando comparado com o padrão ouro da *IS6110*-RFLP e *Spoligotyping*. Neste trabalho, apenas as cepas controles amplificam como Beijing.

Figura 14: Diagrama esquemático da região que flanqueia a região DR nas cepas H37Rv, não Beijing e Beijing.



Fonte: Adaptado de Warren et al 2004.

## 2) 2º Reação MDR e MDR6r

Essa reação teve uma amplificação um pouco diferente do esperado, mas que não alterou o resultado final, para isso, é necessário entender o artigo-base dos iniciadores utilizados. No estudo de Plikatys et al 1994, em Nova York - EUA, foram isolados 193 de *M. tuberculosis* e desta amostragem 48 isolados (24%) foram confirmadas cepas W. Beijings. O objetivo deste estudo foi desenvolver um ensaio de PCR multiplex que tem como alvo uma repetição direta de IS6110 com uma sequência interveniente de 556 pb (NTF-1). Neste mesmo trabalho, onde foi utilizado uma PCR multiplex com vários *primers* a serem analisados (Tabela 12).

Tabela 12: Regiões e sequencias analisadas na PCR multiplex de Plikatys, 1994

Primer	Target	Sequence (5'-3')
IS54	IS6110	TCGACTGGTTCAACCATCGCCG
IS56	IS6110	GCGACCTCACTGATCGCTGC
IS59	IS6110	GCGCCAGGCGCAGGTCGATGC
IS60	IS6110	GATCAGCGATCGTGGTCCTGC
IS61	IS6110	GACCGCGGATCTCTGCGACC
IS62	IS6110	ACCAGTACTGCGGCGACGTC
MDR-6	NTF-1	CCAGATATCGGGTGTGTCGAC
MDR-7	NTF-1	CGCGAGATCTCATCGACAACC

Fonte: Adaptado de PLIKAYTIS, 1994.

O resultado esperado: Amostras Beijing (ancestrais) precisariam amplificar 302pb enquanto que amostras Beijing (modernas) amplificariam 1500pb. Neste trabalho se viu que os produtos amplificados (aproximadamente 302pb) são produtos que apenas cepas Não Beijing amplificam, de acordo com Plikatys et al 1994. Esses fragmentos são considerados atípicos, mas não necessariamente Beijing.

O primer MDR-6 foi o único primer deste conjunto utilizado nesta pesquisa, e para a sequência complementar foi sintetizado o MDR6-r (TGCCGTTGTCGAAATCTAAACCC) – (Wada, Iwamoto e Maeda, 2009), para assim ocorrer a amplificação de maneira correta. Como os três conjuntos de primers foram usados na mesma mistura de PCR como uma PCR multiplex, esperava-se que um isolado da cepa W produzisse todos os três amplicons; os produtos de 175 pb e 223 pb, que indicavam a presença do fragmento NTF-1 na repetição direta do IS6110; e o produto de 523 pb, que era o controle interno da PCR como destacado abaixo (Tabela 13).

Tabela 13: Resumo da avaliação de 125 isolados da cidade de Nova York pelo ensaio de PCR multiplex para a cepa W

PCR products				Interpretation
523 bp <sup>a</sup>	223 bp	175 bp	Other	
+	+	+	-	Positive
+	+	-	-	Negative
+	-	-	+	Negative
+	-	-	-	Negative

Fonte: Adaptado de PLIKAYTIS, 1994.

Para detectar a inserção de *IS6110* na região NTF, foram preparados primers de PCR: MDR-6 (Plikaytis et al., 1994) e MDR-6r (Wada et al 2009). As linhagens Beijing modernas possuem pelo menos uma inserção *IS6110* na região NTF. Em seguida, foram identificadas por amplificação de fragmentos de DNA de 1,5 kb usando esses primers. Caso as inserções *IS6110* estivessem ausentes nessa região, característica das linhagens Beijing antigas, um amplicon de 302pb era obtido (segundo o artigo). Por conta disso os padrões amplificados nas amostras controles confirmam que elas são Beijing pois amplificam em torno de 1500pb enquanto as demais cepas amplificam 302pb demonstrando que as sequencias *IS6110* estão ausentes na região NTF.

### 3) 3° Reação: *Primers* ON-1002, ON-125 e ON-1127

No estudo realizado por Nakajima et al 2013 que tinha como objetivo desenvolver uma PCR multiplex confirmar a especificidade da linhagem Beijing a partir de um SNP específico no *Rv0679c*. Para este fim, foram avaliados um total de 619 isolados clínicos de cinco países asiáticos: Japão, Bangladesh, Nepal, Myanmar, e a China. A partir dessa metodologia, foram identificados 393 (cerca de 63%) de cepas Beijings. Os autores também comentam que este ensaio de PCR distinguiu com sucesso Cepas de genótipos Beijing de outras, incluindo as não Beijing cepas do leste asiático, com 100% de precisão. Na discussão do artigo é mencionado que a presença de SNPs são frequentemente encontradas em cepas do CMtb (Huard et al 2006; Fillol et al 2006).



## 7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Foi constatado que a abordagem por MIRU-VNTR 12 *loci* não obteve suficiente índice discriminatório para identificar as amostras a nível de linhagem, portanto, foi combinado que após a defesa da dissertação irei ampliar o painel de *primers* para realizar a técnica de MIRU-VNTR 24 *loci* para obter resultados mais específicos. Os *primers* restantes já chegaram ao laboratório e serão utilizados após a defesa da dissertação. Também se foi comentado sobre a possibilidade de utilizar a técnica de *Spoligotyping* para complementar essas análises no laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Micobactérias (LABMAM) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz – RJ) coordenado pelos pesquisadores Dr. Philip Noel Suffys e Dr. Harrison Magdinier Gomes. Estou avaliando essa possibilidade.

## 8 CONCLUSÃO

Este trabalho se apresenta como uma pioneira contribuição para o entendimento da diversidade genética de *M. tuberculosis* na região amazônica. Os resultados obtidos por MIRU-VNTR mostram a formação de 3 clusters à nível de similaridade genética, mas também mostram a presença de perfis genéticos diferentes circulando na região amazônica. Dentre esses resultados se destacam a presença da sublinhagem EAI, X, LAM e a Haarlem (a mais presente até então).

A utilização de MIRU-VNTR 12 *loci* permitiu a identificações de padrões de agrupamento mesmo diante das limitações que logo serão corrigidas. Assim, este trabalho fornece dados inéditos que poderão subsidiar estratégias mais direcionadas de controle e monitoramento da doença, além de estimular futuras pesquisas com métodos de maior resolução. Mesmo que a família Beijing se demonstre ausente no painel de amostras estudadas, é necessário vigilância molecular contínua pois já se foi visto a introdução dessa família na região de Roraima que fica próximo à região amazônica. Além disto, trata de uma área de fronteira é conhecida por constante mobilidade populacional.

## REFERÊNCIAS

ALLIX-BÉGUEC, C. et al. Evaluation and user strategy of MIRU-VNTR plus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 8, p. 2692-2699, 2008.

ALONSO-RODRÍGUEZ, N. et al. Evaluation of the advanced MIRU-VNTR genotyping tool of 15 loci in molecular epidemiology studies of *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 34, 2008.

ATAVLIYEVA, S.; AUGANOVA, D.; TARLYKOV, P. Genetic diversity, evolution and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 2. **Front. Microbiol**, v. 15, p. 1384791, 2024.

BEKZOD, Ergashev; SHAXZODBEK, Raxmonov. Transmission dynamics of tuberculosis: An epidemiological and biological perspective. **Kazakh Journal of Ecosystem Restoration and Biodiversity**, v. 1, n. 1, p. 28-35, 2025.

BESPIATYKH, E.; BESPATYKH, E.; MOKROUSOV, E.; SHITIKOV, E. A comprehensive map of difference regions of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **mSphere**, v. 6, 2021. DOI: 10.1128/msphere.00535-21. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msphere.00535-21>.

BIFANI, Pablo J. et al. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 45-52, 2002.

BLOUIN, Y. et al. Significance of the identification of an exceptional phylogenetic lineage of *M. tuberculosis*. **Plos One**, v. 7, n. 12, e52841, 2012.

BRASIL. 2008. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, Brasil. 458p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Doenças Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Coordenação Geral de Vigilância de Condições Crônicas de Transmissão Respiratória. **Boletim Epidemiológico da Tuberculose**. Março de 2021. Disponível em: [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br) > pt-br > pub (05/10/2021).

CARROLL, L. N. et al. Visualization and analytics tools for infectious disease epidemiology: a systematic review. **J Biomed Inform**, v. 51, p. 287-298, 2014.

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

COLL F, et al. A robust SNP barcode for typing *M. tuberculosis* complex strains. **Nat Commun**. 2014;5:4812.

COLL, F. et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains.

**Nat Commun**, v. 5, p. 4812, 2014. DOI: 10.1038/ncomms5812.

CONCEIÇÃO, Emilyn Costa et al. Diversidade genética da linhagem 1 de *Mycobacterium tuberculosis* no Pará, Brasil, sugere ancestralidade comum com isolados do leste africano potencialmente ligados ao tráfico histórico de escravos. **Infection, Genetics and Evolution** , v. 73, p. 337-341, 2019.

CONCEICAO, Emilyn Costa et al. Diversidade genética de *Mycobacterium tuberculosis* do Pará, Brasil, revela uma frequência maior de cepas ancestrais do que a relatada anteriormente na América do Sul. **Infection, Genetics and Evolution** , v. 56, p. 62-72, 2017.

COROS, A.; DECONNO, E.; DERBYSHIRE, K. M. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. **J Bacteriol**, 2008.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Semin Immunol**, Dec 2014, v. 26, n. 6, p. 431-44. DOI: 10.1016/j.smim.2014.09.012.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Genomic epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Africa. **Nat Genet**, v. 53, p. 258–266, 2021.

COUVIN, D.; RASTOGI, N. Tuberculosis - A global emergency: Tools and methods to monitor, understand, and control the epidemic with specific example of the Beijing lineage. **Tuberculosis (Edinburgh)**, v. 95, Suppl 1, S177-189, 2015.

DE JONG, B. C.; ANTONIO, M.; GAGNEUX, S. *Mycobacterium africanum* — review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. **Plos Negl Trop Dis**, v. 4, n. 9, e744, 2010.

DE SOUZA FILHO, Rivaldo Pascoal; BRITO, Christian Dias; DE LIMA, Huxlan Beckmam. Distribuição temporal e espacial da tuberculose no Amazonas. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 7, n. 11, p. 1151-1167, 2025.

DEPS, Patrícia; COLLIN, Simon M. *Mycobacterium lepromatosis* as a second agent of Hansen's disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 698588, 2021.

DYE, Christopher et al. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing

tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. **Jama**, v. 293, n. 22, p. 2767-2775, 2005.

El, 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.

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA TUBERCULOSE EM PACIENTES ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. (Dissertação de Mestrado).

EYBPOOSH, S. et al. Molecular epidemiology of infectious diseases. **Electron Physician**, v. 9, n. 8, p. 5149-5158, 2017.

FIRDESSA, R. et al. Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 460, 2013.

FORD, C. et al. Estimates of the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* in different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. **Nat Genet**, v. 45, p. 784–790, 2013.

FREITAS, Wiviane Maria Torres de Matos et al. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes portadores de tuberculose atendidos em uma unidade municipal de saúde de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 7, n. 2, p. 45-50, jun. 2016. Disponível em [http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232016000200045&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232016000200045&lng=pt&nrm=iso). acessos em 19 jun. 2025. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232016000200005>.

FURLANETO, I. Evaluation of different procedures for DNA extraction from Ziehl-Neelsen stained smears. **Cad Saude Colet**.

GAGNEUX, S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 202-213, 2018.

GAGNEUX, S. et al. Variable host–pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*.

**Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 8, p. 2869–2873, 2006.

GOIG, Galo A. et al. Ecologia, diversidade global e mecanismos evolutivos no complexo *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 23, n. 9, p. 602-614, 2025.

GLAZIOU, Philippe; FLOYD, Katherine; RAVIGLIONE, Mario C. Global epidemiology of tuberculosis. In: Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. **Thieme Medical Publishers**, 2018. p. 271-285.

GOMES, L. L. (2016). Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* from the Beijing family of ancestral and modern types.

GROENHEIT, Ramona et al. Potentially involved *Mycobacterium tuberculosis* strains in the TB epidemic in Sweden a century ago. 2012.

HAGHDOUST, A. A. Molecular epidemiology, concepts and domains. 2008.

HUARD, Richard C. et al. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1637-1650, 2003.

JILANI A., et al. Tuberculose Ativa. [Atualizado em 26 de janeiro de 2023]. Em: StatPearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): StatPearls Publishing; 2025 jan-. [Figura, Micrografia Eletrônica de Varredura. Mycobacterium em forma de bastonete...]. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK513246/figure/article-17136.image.f4/?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK513246/figure/article-17136.image.f4/?utm_source=chatgpt.com)

JUSTEN, A. M. et al. Polysaccharide length affects mycobacterial cell shape and antibiotic susceptibility. **Sci Adv**, Sep 16, 2020, v. 6, n. 38. DOI: 10.1126/sciadv.aba4015.

KREMER, K. et al. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4040–4049, 2004.

LACHI, Tatiana; NAKAYAMA, Mauro. Aspectos radiológicos da tuberculose pulmonar em indígenas de Dourados, MS, Brasil. **Radiologia Brasileira**, v. 48, p. 275-281, 2015.

LANGER, Adam J. et al. Epidemiology of tuberculosis in the United States. **Clinics in Chest Medicine**, v. 40, n. 4, p. 693-702, 2019.

LEÃO, S. C. et al. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Brussels: European Commission International Co-operation for Developing countries (DEV) concerted Action (CA), 2004. 165 p.

LIU, Q. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains and unfavourable treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and infection**, v. 26, n. 2, p. 180-188, 2020.

LÖNNROTH, K. et al. Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 5, p. 630-645, 2010.

LUO, T. et al. Origin of the Southeast Asian and co-expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese. **Proc. Sci. USA**, v. 112, n. 26, p. 8136-8141, 2015.

MALASPINA, Ana Carolina. Genotipagem do *Mycobacterium tuberculosis* utilizando RFLP e *Spoligotyping* em associação com MIRU para avaliar a epidemiologia

molecular da tuberculose no município de Araraquara-SP. 2009.

MERKER, M. et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. **Nat Genet**, v. 47, n. 3, p. 242–249, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Boletim Epidemiológico - Tuberculose 2025*. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2025/boletim-epidemiologico-tuberculose-2025>

NAKAJIMA, C. et al. Simple multiplex PCR assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates with a lineage-specific mutation in Rv0679c. **J Clin Microbiol**, 2013. DOI: 10.1128/jcm.03404-12.

NAPIER, Gary et al. Robust barcoding and identification of *Mycobacterium tuberculosis* lineages for epidemiological and clinical studies. **Genome medicine**, v. 12, p. 1-10, 2020.

NIEMANN, Stefan et al. A linhagem Beijing de *Mycobacterium tuberculosis* favorece a disseminação da tuberculose multirresistente na República da Geórgia. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3544-3550, 2010.

NGABONZIZA, J. C. et al. A sister lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex discovered in the African Great Lakes region. **Nat Commun**, v. 11, n. 1, p. 2917, 2020.

PAIVA, João PS et al. Temporal trend of tuberculosis incidence in northeastern Brazilian municipalities according to Social Vulnerability Index parameters: an ecological study. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 49, n. 1, p. e20220353, 2023.

PANDOLFI, J. R. C. **Optimization of the MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) technique for the epidemiological study of tuberculosis patients**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2006. 81 p.

PITONDO-SILVA, A. et al. Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, n. 1, p. 42-48, 2013.

PLIKAYTIS, B. B. et al. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 6, p. 1542-1546, 1994.

PORTAL FVS-RCP/AM. Tuberculose no Estado do Amazonas. **FVS - Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas**. Disponível em: [https://www.fvs.am.gov.br/indicadorSalaSituacao\\_view/126/2](https://www.fvs.am.gov.br/indicadorSalaSituacao_view/126/2). Acesso em: 21 abril de. 2025.

RIEDER, Hans L. et al. Epidemiology of tuberculosis in the United States. **Epidemiologic Reviews**, v. 11, p. 79-98, 1989.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, n. 4, p. 406-425, Jul 1987.

Secretaria de Vigilância em Saúde; Ministério da Saúde. **2022. Tuberculose | 2022.**

SELANDER, R. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 5, p. 873-884, 1986.

SHABBEER, A. et al. TBLineage: an online tool for classification and analysis of strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 4, p. 789–797, 2012.

SHITIKOV, E. et al. Evolutionary pathway analysis and classification of *M. tuberculosis* Beijing isolates. **BMC Genomics**, v. 18, p. 1–14, 2017.

SILVA MT, GALVÃO TF. Tuberculosis incidence in Brazil: time series analysis between 2001 and 2021 and projection until 2030. **Rev Bras Epidemiol**. 2024; 27: e240027. <https://doi.org/10.1590/1980-549720240027>

SIMNER, P. J. et al. *Mycobacterium* and aerobic actinomycete culture: are two medium types and extended incubation times necessary? *J Clin Microbiol*, v. 54, 2016. DOI: 10.1128/JCM.02838-15. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.02838-15>.

SOLA, C. et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, p. 125–133, Feb 13, 2003.

SRAVANTHI, K., et al., S. V. Robert Koch: From Anthrax to Tuberculosis. **A Journey in Medical Science**. *Cureus*,16(11),e72955, 2024. DOI: <https://doi.org/10.7759/CUREUS.72955>.

STUCKI D. et al. Tracking transmission of *M. tuberculosis* in a low-incidence setting using whole-genome sequencing. **Clin Microbiol Infect**. 2016;22(10):874–880.

SUPPLY, P. et al. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 10, p. 3563-3571, 2001.

SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 12, p. 4498-4510, 2006.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Mol. Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

TATARA, M. B. et al. Genetic Diversity and Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Roraima State, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 101, n. 4, p. 774-779, 2019.

TURENNE, C.Y. Micobactérias não tuberculosas: Insights sobre taxonomia e evolução. **Infect. Genet. Evol.** **72** , 159–168.

UEYAMA, Masako et al. Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from tuberculosis patients in Japan. **Tuberculosis**, v. 94, n. 1, p. 15-19, 2014.

VAN EMBDEN, J. D. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J Clin Microbiol**, v. 31, p. 406-409, 1993.

VAN SOOLINGEN, D. et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 12, p. 3234-3238, 1995.

WADA, T.; IWAMOTO, T.; MAEDA, S. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 291, n. 1, p. 35-43, 2009.

Warner DF, Barczak AK, Gutierrez MG, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis* biology, pathogenicity and interaction with the host. *Nat Rev Microbiol*. 2025 Dec;23(12):788-804. doi: 10.1038/s41579-025-01201-x. Epub 2025 Jun 30. PMID: 40588584; PMCID: PMC7618155.

WARREN, R. M. et al. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, n. 5, p. 610-614, 2004.

WENIGER, T. et al. MIRU-VNTRplus: a web tool for phylotype genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **Nucleic Acids Res**, v. 38, p. W326-331, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *TB incidence*. Global Tuberculosis Report 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021/tb-disease-burden/incidence#fig--2-1-5>. Acesso em: 27 de abril de 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATON (WHO). *Global Tuberculosis Report2024*. <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>

YU, J. et al. Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in the VDR Gene with Tuberculosis and Infection of Beijing Genotype *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect**

**Drug Resist**, v. 16, p. 3157-3169, 2023.

ZHANG, S. *et al.* Global, regional, and national burden of HIV-negative tuberculosis, 1990– 2021: Findings from the Global Burden of Disease 2021 Study. [s. l.], 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4512809/v1>.

## APÊNDICES

### Apêndice A: Estatísticas da identificação por busca de similaridade MIRU-VNTR *plus*

27/07/25, 23:55

Identification by Similarity Search

#### MIRU-VNTR*plus*: Identification by Similarity Search

##### Settings

Distance Measure: MIRU-VNTR [12]: Categorical (1), Spoligo: Categorical (1), RD: Categorical (1)

Number of user strains per page: 10

For each user-strain, display the next 5 matches.

Do not show strains with distance greater than 0.17

##### Summary Statistics

**Number of user strains:** 41

##### Clustering Rate

Clustering rate MIRU: 0.09756097

Clustering rate Spoligo: NaN

##### Allelic Diversity

154 / MIRU02: 0.35    1644 / MIRU16: 0.65    2687 / MIRU24: 0.16    3192 / MIRU31: 0.52

580 / MIRU04: 0.28    2059 / MIRU20: 0.43    2996 / MIRU26: 0.52    4348 / MIRU39: 0.47

960 / MIRU10: 0.65    2531 / MIRU23: 0.68    3007 / MIRU27: 0.34    802 / MIRU40: 0.77

##### Distribution of Identified Lineages

*unknown*: 46.34%    LAM: 14.63%    *multiple matches*: 4.88%    X: 2.44%

Haarlem: 21.95%    EAI: 7.32%    H37Rv:            2.44%

## ANEXOS

## Anexo 1: Questionário para coleta de dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes.

CADASTRO DE PACIENTES			
Data:	_____ / _____ / _____	Nº REGISTRO:	_____ / _____
Já esteve em nosso Laboratório?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	Quando? _____
Natureza da Amostra:			
<input type="checkbox"/> Escarro	<input type="checkbox"/> Líq. Ascítico	<input type="checkbox"/> Genital	<input type="checkbox"/> Ósteo-articular
<input type="checkbox"/> Líquor	<input type="checkbox"/> Lav. Gástrico	<input type="checkbox"/> Pele	<input type="checkbox"/> Ganglionar
<input type="checkbox"/> Líq. Pleural	<input type="checkbox"/> Lav. Brônquico	<input type="checkbox"/> Outro: _____	
Identificação do Paciente:			
Nome:	_____		Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
Endereço:	_____		
	_____ Fone: _____		
Data de Nascimento:	____ / ____ / ____	Idade:	_____ Profissão: _____
Naturalidade:	_____	Procedência:	_____ Há quanto tempo: _____
Naturalidade (País):	_____	Naturalidade (Avós):	_____
Informações Clínicas:			
BCG:	<input type="checkbox"/> Não	PPD:	<input type="checkbox"/> Não
	<input type="checkbox"/> Sim Data: _____		<input type="checkbox"/> Não reator
	<input type="checkbox"/> Não sabe informar		<input type="checkbox"/> Reator _____ mm
		RX Tórax	<input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Normal
			<input type="checkbox"/> Alterado
Antecedente de Tuberculose:			
Pessoal:	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	Quando pela 1ª vez: _____	
Familiar:	<input type="checkbox"/> Pai	<input type="checkbox"/> Tios	<input type="checkbox"/> Sogros
	<input type="checkbox"/> Mãe	<input type="checkbox"/> Primos	<input type="checkbox"/> Cônjuge
	<input type="checkbox"/> Irmãos	<input type="checkbox"/> Filho	<input type="checkbox"/> Namorado
	<input type="checkbox"/> Avós	<input type="checkbox"/> Cunhado	<input type="checkbox"/> Vizinho
			<input type="checkbox"/> Colega de trabalho
			<input type="checkbox"/> Agregados
			<input type="checkbox"/> Outros
			<input type="checkbox"/> Não sabe informar
Atualmente realizou pesquisa de BAAR em outros Laboratórios?			
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim. Onde? _____		
Quantos? _____	Com resultados: _____		
Apresenta outras doenças?			
<input type="checkbox"/> Hanseníase	<input type="checkbox"/> Câncer	<input type="checkbox"/> Alergias cutâneas	<input type="checkbox"/> Doenças reumáticas
<input type="checkbox"/> Cardiopatia	<input type="checkbox"/> Bronquite	<input type="checkbox"/> Diabete	<input type="checkbox"/> Alcoolismo
<input type="checkbox"/> Tabagismo	<input type="checkbox"/> Malária	<input type="checkbox"/> Dengue	<input type="checkbox"/> Qual? _____
Quadro clínico atual:			
<input type="checkbox"/> Tosse	<input type="checkbox"/> Expectoração	<input type="checkbox"/> Hemoptise	<input type="checkbox"/> Dispnéia
<input type="checkbox"/> Dor torácica	<input type="checkbox"/> Dor de cabeça	<input type="checkbox"/> Emagrecimento	<input type="checkbox"/> Cansaço
<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Outros. Quais? _____		
Duração da doença: _____			
O paciente:			
<input type="checkbox"/> Não recebeu nenhum tratamento antes da coleta da amostra clínica atual			
<input type="checkbox"/> Está recebendo tratamento desde: _____ Medicação: _____			
<input type="checkbox"/> Foi tratado dos últimos acometimentos em: _____			
Resultados	Baciloscopia Direta: _____	Baciloscopia Concentrada: _____	Cultivo: _____