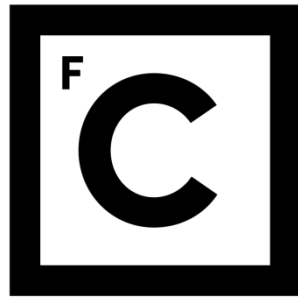


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO BIOLOGIA VEGETAL



Ciências
ULisboa

Análise Genotípica de Isolados Clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de Imigrantes provenientes da Comunidade de Países de Língua Portuguesa

Catarina Isabel Ventura Pereira

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Prof. Doutora Isabel Portugal
Prof. Doutora Lélia Chambel

2016



Análise Genotípica de Isolados Clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de Imigrantes provenientes da Comunidade de Países de Língua Portuguesa

Catarina Isabel Ventura Pereira

2016

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.UL), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa sob a orientação direta da Professora Doutora Isabel Portugal e co-orientação do Doutor João Perdigão, com orientação interna da Professora Doutora Lélia Chambel no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

*“We are biology.
We are reminded of this at the beginning and the end,
at birth and at death.
In between we do what we can to forget.”*

— Mary Roach

PUBLICAÇÕES NO ÂMBITO DESTE TRABALHO:

Apresentação do poster intitulado "Insights on the population structure of Mycobacterium tuberculosis across the immigrant population in Lisbon, Portugal: Implications at the Public Health Level" no iMed students meeting 2016.

OUTRAS PUBLICAÇÕES:

Perdigão J, Maltez F, Machado D, Silva H, Pereira C, Silva, Couto I, Viveiros M, Portugal I. Beyond Extensively Drug Resistant Tuberculosis in Lisbon, Portugal: a case of Linezolid resistance acquisition presenting as an ilio-psoas abscess. *In press*

Machado D, Coelho T, Perdigão J, Pereira C, Couto I, Portugal I, Maschmann R, Ramos D, Von Groll A, Rossetti ML, Da Silva P, Viveiros M. Interplay between mutations and efflux in drug resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. Artigo submetido

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Doutora Isabel Portugal por me ter acolhido e providenciado todas as condições para a realização deste projeto.

Quero agradecer ao Doutor João Perdigão por toda a disponibilidade, apoio, paciência e orientação ao longo de todo o trabalho.

À Professora Lélia Chambel por partilhar todo o seu conhecimento e competência que contribuiu para a concretização deste estudo.

À Mestre Carla Silva por todo o auxílio e amizade.

A todos os meus colegas do laboratório pelo excelente ambiente de trabalho, apoio, motivação e amizade sempre demonstrada.

Aos meus colegas de casa por toda a paciência e sempre bom humor durante este último ano.

A todos os meus amigos de longa data e principalmente aos da licenciatura e de mestrado por me ajudarem e acompanharem ao longo desta etapa com muita paciência e companheirismo.

À minha família principalmente, sem todo o seu apoio, paciência e motivação nada disto seria possível.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada por me terem acompanhado nesta jornada.

RESUMO

A região africana possui uma das maiores taxas de incidência e mortalidade de tuberculose a nível global, representando 28% dos casos mundialmente, representando os Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP) igualmente uma elevada incidência desta doença. Portugal, por outro lado, apresentou em 2014 uma taxa de incidência moderada de 20 casos por 100 000 habitantes, com a capital Lisboa a assumir-se como uma das regiões mais afetadas e a única com casos de resistência TB-XDR. A caracterização das estirpes *Mycobacterium tuberculosis* mais predominantes na região de Lisboa foi realizada, desconhecendo-se a estrutura populacional destas estirpes nas diferentes comunidades de imigrantes, nomeadamente nos PALOP.

Com o objetivo de estabelecer uma possível associação entre a estrutura populacional de *M. tuberculosis* de imigrantes provenientes dos PALOP e as estirpes em circulação em Lisboa, caracterizou-se por *spoligotyping* 133 isolados clínicos recuperados entre 2008 e 2010, de imigrantes provenientes da Guiné-Bissau, Cabo Verde, Moçambique, Angola e São Tomé e Príncipe. Para além deste, foi ainda realizada a genotipagem de nove estirpes com resistência a um ou mais antibióticos pela técnica MIRU-VNTR 24loci.

Na observação da distribuição populacional destes isolados através da construção de árvores de extensão mínima para cada sub-população foi demonstrada a existência de um complexo clonal comum em todos os sub-grupos, pertencendo à linhagem LAM, e mais especificamente, aos SITs 20 e 42. Esta linhagem é igualmente prevalente nos dados existentes para Portugal na base de dados internacional SITVITWEB.

A análise por MIRU-VNTR 24loci das estirpes resistentes permitiu a deteção de três *clusters* distintos, compostos por seis das nove estirpes, associados a diferentes perfis de resistência. Dois dos *clusters* detetados foram identificados como *clusters* genéticos Lisboa3-A e Lisboa3-B, que estão associados a estirpes de tuberculose multirresistente (TB-MR) e tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR) em Portugal.

Estes resultados demonstram uma estrutura populacional de *M. tuberculosis* similar entre os sub-grupos estudados, sugerindo que a tuberculose se tem vindo a disseminar nestas sub-populações de imigrantes e que a importação de estirpes para Portugal desempenha um papel menor do que inicialmente se pensava, reforçando a noção de um elevado grau de endemicidade da tuberculose em Portugal.

Palavras-chave: *M. tuberculosis*; Portugal; imigrantes; *Spoligotyping*; MIRU-VNTR 24loci; Lisboa3

ABSTRACT

Africa has one of the highest tuberculosis (TB) incidence and mortality rates in the world, accounting for 28% of the cases worldwide, with Portuguese-speaking African Countries equally affected by this disease. On the other hand, Portugal presents a moderate incidence rate of 20 cases per 100 000 inhabitants, with its capital city's region, Lisbon, as one of the most affected regions and the only one with the presence of MDR-TB strains. The prevailing strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Lisbon were identified but still with no success in discovering its phylogeographic origin.

Thus, in an attempt to establish a possible link between the *M. tuberculosis* strains infecting immigrants from African countries and the strains circulating in Lisbon, we characterized by spoligotyping 133 *M. tuberculosis* clinical isolates, recovered between 2008 and 2010, from immigrants from Guinea-Bissau, Cabo Verde, Mozambique, Angola and São Tomé e Príncipe. Additionally, nine isolates resistant to one or more antibacillary drugs were further genotyped by 24-loci MIRU-VNTR.

Minimum spanning trees constructed for each sub-population in order to study the structure of each sub-population showed a common cluster belonging to the LAM lineage, specifically, SITs 20 and 42. Besides being the most represented lineage in each group of strains analysed it was the most represented in the SITVITWEB data for Portugal.

24-loci MIRU-VNTR data enabled the detection of three distinct genetic clusters associated with drug resistance encompassing 6 of the 9 drug resistant strains analysed. Two of the detected clusters were identified as the Lisboa3-B and Lisboa3-A genetic clusters which are associated with multidrug/extensively drug resistance in Lisbon.

These results denote a partially similar *M. tuberculosis* population structure across the sub-populations studied, suggesting that TB has spread to these immigrant sub-populations in Portugal and that strain importation to the Portuguese territory plays a minor role than what was previously thought, reinforcing the notion of a high degree of endemicity of tuberculosis in Portugal.

Keywords: *M. tuberculosis*; Portugal; immigrants; Spoligotyping; 24-loci MIRU-VNTR; Lisboa3

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE.....	1
1.1.1 Tuberculose no Mundo.....	1
1.1.2 TB em Portugal	2
1.1.3 TB nos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP).....	3
1.2 MICOBACTÉRIAS	4
1.2.1 Género <i>Mycobacterium</i> : Características gerais	4
1.2.2 Taxonomia.....	5
1.2.3 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC).....	6
1.2.4 Transmissão, Infecção e Patogénese	8
1.2.5 Tratamento e resistência a antibacilares	9
1.3 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	10
1.3.1 RFLP-IS6110.....	11
1.3.2 <i>Spoligotyping</i>	12
1.3.3 MIRU-VNTR (<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats</i>).....	14
1.3.4 <i>Whole Genome Sequencing</i> (WGS).....	15
1.3.5 Epidemiologia molecular em Portugal	15
1.4 OBJETIVOS	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1 ISOLADOS CLÍNICOS	18
2.2 <i>SPOLIGOTYPING</i>	18
2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
2.2.2 Preparação da membrana.....	18
2.2.3 Hibridação	19
2.2.4 Detecção Quimioluminiscência.....	19
2.2.5 Regeneração da membrana.....	19
2.2.6 Interpretação dos resultados	19

2.2.7 Árvores de Extensão mínima (<i>minimum spanning tree</i>)	19
2.3 GENOTIPAGEM POR MIRU-VNTR	19
2.3.1 Misturas de reação.....	20
2.3.2 Amplificação	20
2.3.3 Análise do produto por eletroforese em gel de agarose.....	21
2.3.4 Análise do produto por eletroforese capilar	21
2.3.5 Interpretação dos resultados	21
2.3.6 Dendrograma	21
3. RESULTADOS	22
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POR SEXO E FAIXA ETÁRIA.....	22
3.2 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA POR <i>SPOLIGOTYPING</i>	23
3.3 ESTRUTURA POPULACIONAL E COMPLEXOS CLONAIIS.....	32
3.4 GENOTIPAGEM POR MIRU-VNTR	35
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS.....	43
7. ANEXOS	47
7.1 ANEXO 1 – DILUIÇÃO DOS OLIGONUCLEÓTIDOS	47
7.2 ANEXO 2 – PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA <i>SPOLIGOTYPING</i>	48
7.3 ANEXO 3 – SEQUÊNCIAS DE <i>PRIMERS</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG – Bacilo *Calmette-Guérin* (estirpe vacinal)

CAS – Central-Asian

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DR – Região *Direct Repeat*

EAI – East African Indian

H – Haarlem

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

LAM – Latin-American-Mediterranean

Lam – lipoarabinomananos

MIRU-VNTR – *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats*

MTBC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

NTM – Micobactérias Não-Tuberculosas

OMS – Organização Mundial da Saúde

PALOP – Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNAr – Ácido Ribonucleico ribossomal

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SIT – *Spoligotyping International Types*

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

TB – Tuberculose

TB-MR – Tuberculose multiresistente

TB-XDR – Tuberculose extensivamente resistente

WGS – *Whole Genome Sequencing*

WHO – *World Health Organization*

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1.1 – Distribuição geográfica da taxa de incidência por 100 000 habitantes, por distritos, em 2014.	2
Figura 1.2 – Representação do invólucro celular de <i>M. tuberculosis</i>	4
Figura 1.3 – Árvore filogenética da classe <i>Actinobacteria</i> baseada em 1500 nucleótidos de rRNA 16S..	6
Figura 1.4 – Filogenia do MTBC detalhando diferentes regiões de diferença relevantes e diferenças SNP.	7
Figura 1.5 – Genoma hipotético de estirpe X <i>M. tuberculosis</i> , com sequências repetitivas polimórficas IS6110, MIRUs e DR, com genotipagem de <i>M. bovis</i> Calmette–Guérin (BCG) e a estirpe de laboratório H37Rv.....	11
Figura 1.6 – Representação de regiões DR e resultados obtidos por <i>spoligotyping</i> em <i>M. bovis</i> BCG, H37Rv e estirpe hipotética <i>M. tuberculosis</i>	12
Figura 1.7 – Distribuição global das diferentes linhagens em 2012.....	13

3. RESULTADOS

Figura 3.1 – Número de isolados oriundos da Angola (A), Cabo Verde (B) e Guiné-Bissau (C), por faixa etária e género.....	22
Figura 3.2 – Clades das estirpes em estudo dos sub-grupos de Angola (A), Guiné-Bissau (B) e Cabo Verde (C) analisados neste estudo juntamente com os dados de Portugal.	30
Figura 3.3 – SITs das estirpes em estudo dos sub-grupos de Angola (A), Guiné-Bissau (B) e Cabo Verde (C) juntamente com os dados de Portugal	31
Figura 3.4 – Representação das (A) Linhagens com base na consulta da base de dados de Portugal (SITVITWEB); (B) SITs com base na base de dados de Portugal (SITVITWEB).....	32
Figura 3.5 – Árvores de extensão mínima formadas pelas estirpes do sub-grupo de (A) Angola, (B) Cabo Verde e (C) Guiné-Bissau.....	34
Figura 3.6 – Dendrograma da análise genotípica por MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> das 9 estirpes resistentes de várias nacionalidades.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1.1 – Incidência, prevalência e mortalidade nas diferentes regiões, estimadas pela OMS em 2014. 1

Tabela 1.2 – Casos notificados e mortalidade estimados pela OMS nos diferentes países PALOP..... 3

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2.1 – Volume de cada componente para a preparação das misturas PCR *multiplex*..... 20

Tabela 2.2 – Volume de cada componente para preparação das misturas de reação de PCR *simplex*. 20

3. RESULTADOS

Tabela 3.1 – Nacionalidade, perfil de *Spoligotyping*, clade, SIT e resistências de 1ª linha e de 2ª linha e classificação TB multiresistente das estirpes com resistência e com diagnóstico em Portugal em 2008, 2009 e 2010. 23

Tabela 3.2 – Nacionalidade, perfil de *Spoligotyping*, clade, SIT e resistências de 1ª linha e de 2ª linha das estirpes em estudo com diagnóstico em Portugal em 2008, 2009 e 2010. 25

7. ANEXOS

Tabela 7.1 – Diluição dos oligonucleótidos utilizados no *Spoligotyping*..... 47

Tabela 7.2 – Sequência de *Primers* utilizados para realização do PCR por MIRU-VNTR. 49

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

1.1.1 Tuberculose no Mundo

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa provocada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) que se manifesta principalmente a nível pulmonar, embora possa também afetar outros órgãos. Esta infeção tem vindo a acompanhar o Homem ao longo da sua história e causou mais mortes do que qualquer outro agente patogénico.

Apesar das várias tentativas de controlo e prevenção desta doença através da vacinação em massa com a vacina BCG e o desenvolvimento de tratamentos recorrendo a diferentes antibacilares desde o séc. XX, em 2014 estima-se que tenham ocorrido cerca de 9,6 milhões de novos casos de TB em todo o mundo, o equivalente a uma taxa de incidência de 133 casos por 100 000 habitantes, segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) [7].

Ocorreram neste mesmo ano 1,5 milhões de mortes por TB, com uma taxa de mortalidade global de 16 casos por 100 000 habitantes. Esta taxa apresenta uma enorme variabilidade geográfica, sendo os valores mais baixos encontrados na América com aproximadamente duas mortes em 100 000 habitantes e pertencendo a taxa mais alta à região Africana (Tabela 1.1). Trata-se portanto de uma das doenças que mais preocupação suscita a nível mundial, devido principalmente à sua fácil transmissão e difícil tratamento [8]. O número mais elevado de casos de TB em 2014 foi registado em África e no Sudeste asiático, sendo que este último juntamente com a região Oeste do Pacífico conta com 58% dos casos de TB.

Tabela 1.1- Incidência, prevalência e mortalidade nas diferentes regiões, estimadas pela OMS em 2014 (valores incluem os casos HIV positivos) (adaptado de OMS, 2015 [7]).

Região OMS	População (milhares)	Mortalidade (em milhares)	Taxa mortalidade (por 100 000 H)	Notificação (milhares)	Taxa notificação (por 100 000 H)	Incidência (milhares)	Taxa Incidência (por 100 000 H)
África	963 361	750	46	1 300 852	135	2700	281
América	981 613	23	1,7	215 226	22	280	28
Este Mediterrânico	635 745	91	14	453 393	71	740	117
Europa	907 279	37	3,7	273 381	30	340	37
Sudeste Asiático	1 906 087	520	24	2 482 074	130	4000	211
Oeste do Pacífico	1 845 184	93	4,8	1 335 816	72	1600	85
Global	7 239 269	1500	16	6 060 742	84	9600	133

Na Europa, as taxas de notificação e de mortalidade são das mais baixas mundialmente, de aproximadamente 36,7 e 3,7 casos por 100 000 habitantes, respetivamente [7]. Estes resultados devem-se muito possivelmente à contínua melhoria das práticas de saúde pública nestes países, resultando numa descida da incidência de TB de 5,2% por ano desde 2005, sendo esta a maior taxa de redução de incidência de todas as regiões [9, 10]. Apesar desta diminuição, vários países a possuir uma taxa de incidência bastante elevada, principalmente na região este da Europa.

Em relação à região Africana a taxa de incidência é de 281 casos por 100 000 habitantes, um número alarmante que é superior em mais do dobro da taxa de incidência global e que representa 28% dos casos em todo o mundo [7]. A nível da mortalidade por TB, esta mesma região apresenta uma taxa de mortalidade por TB de 46 mortes por 100 000 habitantes. Apesar destes valores terem vindo a diminuir nos últimos anos, no entanto tem descido de forma muito lenta, sendo sem dúvida preocupante os valores calculados para esta região [7].

A nível mundial, os países em desenvolvimento são os que apresentam maior número de casos de prevalência de TB, com uma maior incidência nas regiões na África subsariana e no sudeste asiático. Nestes países, devido à pobreza presente nestas regiões, como a falta de água potável e baixas condições de higiene e habitabilidade acrescido a uma maior incidência de outras doenças, principalmente o Vírus da imunodeficiência humana (HIV), levam a que um maior número de indivíduos possua o sistema imunitário enfraquecido levando a que seja mais provável que *M. tuberculosis* acelere a progressão da doença, aumentando assim e aumentando a mortalidade.

Juntamente com o HIV, a TB é a maior causadora de mortes dentro das doenças infecciosas, com cerca de 80% das mortes a nível global em África e no Sudeste Asiático [7]

1.1.2 TB em Portugal

Em Portugal, a taxa de casos notificados de TB diminuiu cerca de 5% entre 2013 e 2014. No último ano deste período foram notificados 2264 casos de TB, dos quais 2080 eram casos novos, com uma taxa de incidência de 20 casos por 100 000 habitantes e uma taxa de notificação de 21,8 casos por 100 000 habitantes [1].

Segundo dados provisórios, no ano de 2015 foram notificados 2089 casos, sendo 1925 novos casos, com uma taxa de incidência de 18,6 casos por 100 000 habitantes e de notificação de 20,2 casos por 100 000 habitantes, revelando-se mais baixa que os dois anos anteriores [11].

Os distritos com maior incidência em 2014 foram Lisboa, Setúbal, Porto e Algarve, com taxas de incidência que variam entre 20-50 casos por 100 000 habitantes, classificado como incidência intermédia (>20 casos por 100 000 habitantes e <50 casos por 100 000 habitantes). Cerca de 63,4% dos casos registados ocorreram em indivíduos do sexo masculino e a faixa etária mais representada foi a dos 35-54 com 39,8% dos doentes, revelando um deslocamento da incidência para faixas etárias mais avançadas [1]. Neste mesmo ano foram notificados 224 casos na cidade de Lisboa e 101 casos na cidade do Porto (Figura 1.1).

Portugal continua a possuir valores de incidência superiores à maioria dos países da Europa ocidental. Para além disso, a resistência aos fármacos utilizados no tratamento da TB tem-se revelado o principal problema no controlo desta doença.

Cerca de 4% dos casos apresentava-se em 2014 como multirresistente (TB-MR, *i.e.*, resistente à isoniazida e rifampicina), sendo Portugal um dos países com maior proporção de casos extensamente resistentes (TB-XDR, *i.e.*, TB-MR acrescida de resistência a uma fluoroquinolona e um antibacilar injetável de segunda-linha, como a amicacina, capreomicina ou canamicina).

De acordo com o relatório da Direção Geral de Saúde (DGS) de Lisboa e Vale do Tejo, em 2015 a região de Lisboa apresentou uma enorme discrepância no número de casos multirresistentes em relação a todas as outras regiões, representando 73% dos casos totais, seguida pela região Norte com apenas 14% dos casos. A grande maioria destes casos é TB-MR sendo apenas em Lisboa reportados casos TB-XDR [11].

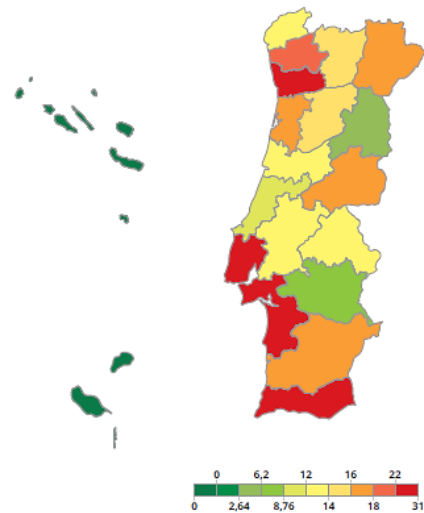


Figura 1.1– Distribuição geográfica da taxa de incidência por 100 000 habitantes, por distritos, em 2014 (extraído de DGS, 2015 [1]).

Para além das resistências aos antibacilares, em 2014 cerca de 15,9% do total de casos de TB foram associados à população estrangeira em Portugal, com uma taxa de incidência calculada pela DGS de 95,4 casos por 100 000 habitantes, um valor muito superior à presente em Portugal (20 casos por 100 000 habitantes). Cerca de 79,2% destes casos foram diagnosticados após a permanência de mais de dois anos em Portugal [1].

Lisboa apresenta uma elevada densidade populacional, contendo uma população de imigrantes bastante pronunciada que representa cerca de 8,8% a 8,4% em 2015 [11]. Não tendo sido descoberto o ancestral das estirpes portuguesas e com base nos laços históricos que unem Portugal aos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP), pondera-se sobre uma possível ancestralidade em África das estirpes presentes em Portugal e sobre a possível importação de estirpes através dos imigrantes.

A taxa de incidência e mortalidade de TB entre estes países africanos é bastante mais elevada do que em Portugal, sendo que os imigrantes que provêm dos vários PALOPs possuem maior probabilidade de contraírem esta doença, e a partir daí de a transmitirem. Cabo Verde é um dos mais presentes com 38 674 imigrantes, seguido de Angola com 18 247 imigrantes, Guiné-Bissau com 17 091 imigrantes e São Tomé e Príncipe com 9 564 imigrantes [12].

1.1.3 TB nos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP)

No ano 2000 a região africana apresentava uma taxa de incidência de TB de 314 casos por 100 000 habitantes e uma taxa de mortalidade de 53 casos por 100 000 habitantes sem incluir os casos de co-infecção com o HIV. Em 2009, a taxa de incidência aumentou para 345 casos por 100 000 habitantes tendo a taxa de mortalidade diminuído para 52 casos por 100 000 habitantes. Estes valores têm vindo a diminuir até 2015, continuando esta região, no entanto, a possuir a liderança na taxa de notificação, incidência e mortalidade quando comparada com outras regiões do mundo [7].

Um dos problemas nestas zonas consiste na deteção das estirpes que apresentam resistências aos fármacos normalmente administrados no tratamento, existindo várias dificuldades não só a nível de infraestruturas e recursos, mas também de transporte das amostras biológicas para o laboratório a fim de obter um diagnóstico. Para além disso, nestes países, a elevada taxa de mortalidade muitas vezes encontra-se associada ao HIV, que leva à progressão da infeção pela TB muito mais rápida e fatal [7, 13].

No contexto dos PALOP, a Guiné é um dos países com mais casos de TB, com uma taxa de incidência de 369 casos por 100 000 habitantes e uma taxa de mortalidade bastante alarmante de 144 casos por 100 000 habitantes. [7, 13] (Tabela 1.2).

Tabela 1.2- Casos notificados e mortalidade estimados pela OMS nos diferentes países PALOP (os valores incluem os casos HIV positivos) (adaptado OMS 2015 [7]).

Países	População (milhões)	Mortalidade (milhares)	Taxa Mortalidade (por 100 000 H)	Casos notificados	Taxa notificação (por 100 000 H)	Incidência (milhares)	Taxa de incidência (por 100 000H)
Cabo Verde	< 1	0,18	36	274	53	0,71	138
Guiné Bissau	2	2,6	144	2 282	127	6,6	369
Angola	24	16	67	53 552	221	90	370
Moçambique	27	55	201	57 773	212	150	551
São Tomé e Príncipe	< 1	0,019	10	158	85	0,18	97

Angola possui igualmente uma taxa de incidência bastante alarmante, de 370 casos por 100 000 habitantes, sendo uma das mais altas dos PALOP [14].

De todos os países PALOP, Moçambique apresenta o valor mais elevado de taxa de incidência e de mortalidade (Tabela 1.2). Este foi considerado um dos 22 países de elevado risco pela OMS em 2014, sendo que, no total, estes países contam com cerca de 80% dos casos de TB registados a nível mundial. Em 2015 foi um dos quatro países que, a nível mundial, apresentaram uma taxa de incidência superior a 500 casos por 100 000 habitantes.

A taxa de notificação de Cabo Verde é uma das mais baixas destes países, com uma taxa de incidência de 138 casos por 100 000 habitantes, sendo São Tomé e Príncipe o que apresenta os valores mais baixos de todos os países PALOP, seja a nível de taxa de mortalidade (Tabela 1.2), ou a nível de taxa de incidência com 97 casos por 100 000 habitantes.

Em muitos destes países, as condições de realização de testes de susceptibilidade aos antibacilares, seja de primeira ou de segunda linha, são precárias, o que pode justificar a elevada mortalidade em alguns dos PALOP (Tabela 1.2). O facto de não ser possível ter conhecimento das resistências que cada estirpe apresenta aos diferentes antibacilares torna bastante difícil a administração correcta do tratamento e maior a probabilidade de falha da terapêutica administrada, o que pode, consequentemente, levar a um aumento das estirpes de TB-MR e TB-XDR em circulação.

1.2 MICOBACTÉRIAS

1.2.1 Género *Mycobacterium*: Características gerais

O género *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*, classe *Actinobacteria*, filo *Actinobacteria* e reino *Bacteria*. Este é constituído por bactérias sem mobilidade, não formadoras de esporos e maioritariamente aeróbias obrigatórias, embora algumas espécies consigam sobreviver a baixas concentrações de oxigénio [15, 16]. Estas células possuem forma de bastonete, com dimensões 0,2 a 0,6 × 1,0 até 10,0 µm de tamanho, possuindo algumas crescimento bastante lento e a capacidade de formar filamentos ramificados facilmente fragmentados em bacilos e cocos. Dentro deste género as bactérias são classificadas segundo as suas características morfológicas, a composição do invólucro celular, que lhes confere a propriedade ácido-álcool resistente, e o elevado conteúdo de guanina e citosina (65,5%) no seu genoma [17, 18].

Este género é formado por três grupos, dois deles constituídos por espécies patogénicas obrigatórias, as bactérias do complexo *M. tuberculosis* (MTBC) e *Mycobacterium leprae*, e o terceiro contendo as espécies ambientais, designadas de micobactérias não-tuberculosas (NTM), que existem na natureza e são saprófitas, comensais ou simbiotes e que apesar de não serem patogénicas podem, no entanto, causar infeções oportunistas em humanos e animais [19].

A estrutura da parede celular destas células começa com uma membrana plasmática interna (IM) coberta por uma camada de peptidoglicanos espessa (PG), uma de arabinogalactanos (AG) e com uma membrana externa (OM) [6].

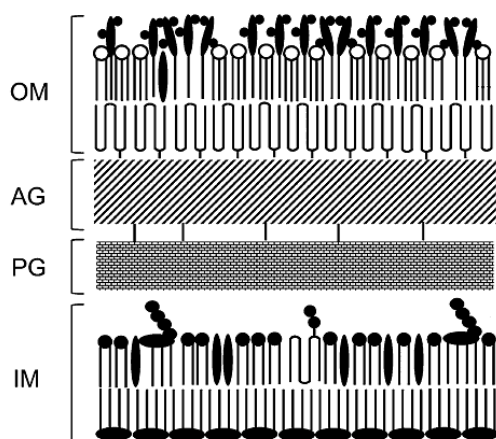


Figura 1.2 – Representação do invólucro celular de *M. tuberculosis*. IM: membrana plasmática interna; PG: camada de peptidoglicanos; AG: camada de arabinogalactanos; OM: membrana externa. Adaptado de Bansal-Mutalik *et al.*[6].

Ligado covalentemente à camada de peptidoglicanos existem os arabinogalactanos, polissacáridos complexos compostos por D-galactofuranoses e D-arabinofuranoses, que se ligam por sua vez aos ácidos

micólicos e à membrana externa. Esta membrana é constituída por essencialmente lípidos, com um número de cadeias de hidrocarbonetos semelhante à membrana interna e composta por ácidos micólicos ligados covalentemente aos arabinogalactanos da parede celular [6].

Os ácidos micólicos são constituídos por ácidos gordos de cadeia longa que formam uma barreira hidrofóbica na superfície da célula, sendo esta camada fundamental para a sobrevivência destas células em várias condições de stress [20].

Tanto a camada de peptidoglicanos como a de arabinogalactanos são altamente hidrofílicas, estando covalentemente ligadas aos ácidos micólicos, dificultando a penetração de moléculas hidrofóbicas e possuindo um papel importante na resistência intrínseca por parte das micobactérias [21].

A estrutura da parede celular em *M. tuberculosis* fornece uma barreira excepcionalmente impermeável à passagem de compostos e fármacos, conferindo fatores de virulência que alteram o funcionamento normal das células hospedeiras e lhes permitem resistir no hospedeiro, desempenhando assim um papel fundamental na sobrevivência no hospedeiro [21].

Devido ao invólucro celular, o diagnóstico dos bacilos por método direto com recurso à microscopia não pode ser realizado por coloração de Gram, recorrendo-se à coloração de Ziehl-Neelsen, em que as bactérias álcool-ácido resistentes permanecem coradas de vermelho e geram uma confirmação visual da presença de micobactérias.

Outros géneros possuem igualmente bactérias com a presença de ácidos micólicos na estrutura celular da parede e são ácido-resistentes, apesar de terem algumas diferenças, tal como os géneros *Nocardia* e *Corynebacterium* que, juntamente com o género *Mycobacterium*, formam um grupo monofilético dentro da classe *Actinobacteria*.

1.2.2 Taxonomia

O filo *Actinobacteria* representa uma das maiores unidades taxonómicas dentro do domínio *Bacteria*, possuindo a classe *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae*, onde se encontra o género *Mycobacterium*. As bactérias pertencentes aos géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia*, designado por grupo CMN, partilham o mesmo invólucro celular, constituído por ácidos micólicos e conferindo-lhes propriedades únicas e diferentes de todas as bactérias [3].

A família *Mycobacteriaceae* apenas possui um único género, *Mycobacterium*, onde se encontram descritas mais de 150 espécies, sendo as principais espécies patogénicas para o Homem as pertencentes ao MTBC [22, 23].

Com base na taxa de crescimento das bactérias deste grupo formaram-se dois grupos taxonómicos. Um dos grupos é constituído por espécies de crescimento lento, como os patogénicos mais conhecidos *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*, que requerem sete ou mais dias de incubação a temperatura ótima (30°C) para obter colónias visíveis. O outro grupo consiste em espécies de crescimento rápido, normalmente bactérias oportunistas e não patogénicas que se encontram no solo, onde se obtêm colónias em menos de sete dias em condições ótimas. As espécies relevantes a nível clínico são normalmente de crescimento lento, apesar de não ser exclusivo.

Uma das primeiras classificações taxonómicas foi criada por Runyon e colegas, consistindo na distinção de bactérias do género *Mycobacterium* em grupos artificiais distintos, com base na taxa de crescimento e pigmentação. Esta classificação, no entanto, exclui bactérias do MTBC e bactérias pertencentes a este género que não são cultiváveis [24, 25].

Com o desenvolvimento da biologia molecular outras técnicas foram surgindo e complementando a informação fenotípica na reconstrução da filogenia das micobactérias através da comparação de sequências genéticas conservadas nos genomas, como o rRNA 16S. Através destas técnicas constatou-se que existe uma associação entre o número de operões ribossomais e a taxa de crescimento das estirpes deste género [23]. A descoberta de que as estirpes de crescimento rápido têm dois operões, o *rrnA* e *rrnB*, e as estirpes de crescimento lento possuem apenas um, levou à proposta de que as espécies de crescimento lento se separaram da linha filogenética e perderam o segundo operão, que seria semelhante ao *rrnB*, fazendo com que o *rrnA* seja a única fonte de rRNA [23].

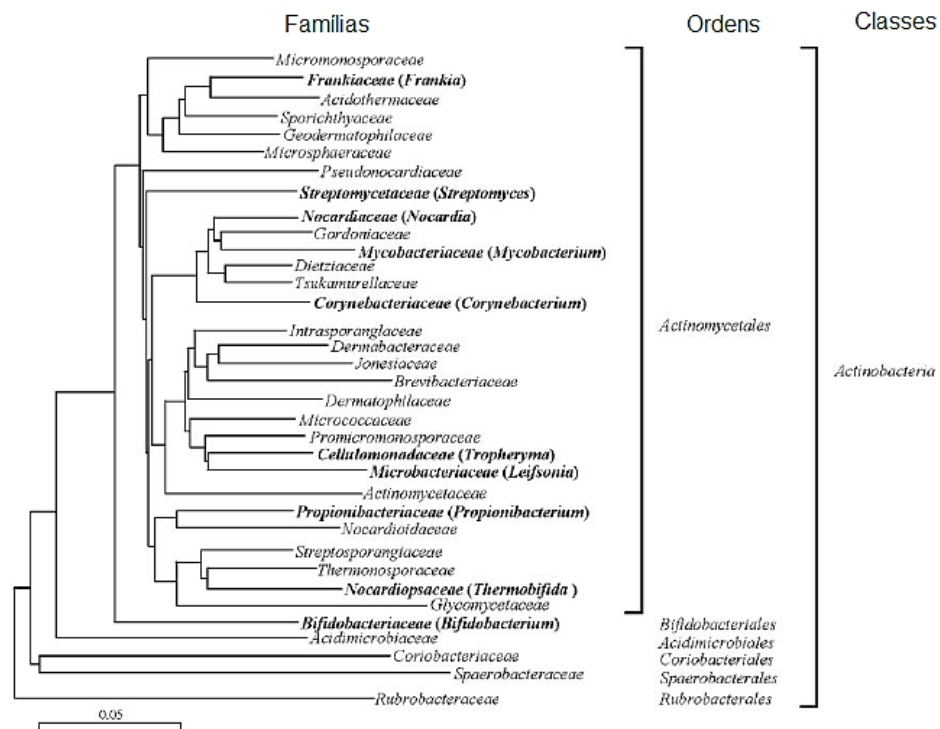


Figura 1.3– Árvore filogenética da classe *Actinobacteria* baseada em 1500 nucleótidos de rRNA 16S. A escala corresponde a 5 nucleótidos (adaptado de Ventura *et al.* [3]).

1.2.3 Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

As diversas espécies causadoras de TB em humanos e outros mamíferos encontram-se agrupadas num grupo designado de Complexo *M. tuberculosis* (MTBC). Este grupo é constituído por espécies patogénicas geneticamente muito semelhantes, pertencendo atualmente a este as espécies *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygis* e *M. suricattae*, que diferem entre si no tropismo para o hospedeiro, na patogenicidade e na distribuição geográfica.

Um método utilizado para classificar filogeneticamente estas espécies baseia-se na análise da presença ou ausência de regiões genómicas informativas designadas regiões de diferença (RD) no genoma das estirpes do MTBC. Dada a baixa variabilidade genética entre as espécies MTBC, as RD permitem diferenciar entre os vários membros, permitindo classificá-los e identificá-los [26].

Todas as espécies do MTBC são capazes de infetar humanos, sendo, no entanto, *M. tuberculosis* a mais predominante afetando milhões de pessoas a nível mundial e podendo infetar em menor grau outros animais que estejam em contacto com o hospedeiro [7, 27].

Deste grupo, o que apresenta o maior espectro de hospedeiros é *M. bovis*, conseguindo infectar para além do ser humano, bovinos domésticos ou selvagens e cabras, sendo este último também infectado por *M. caprae* [28].

A espécie *M. canettii* e *M. africanum* são das principais estirpes presentes em África, apresentando esta última características bioquímicas muito semelhantes a *M. tuberculosis* e *M. bovis*, tal como *M. microti*, podendo ser estas diferenciadas a partir da análise genética das RD [29-31].

M. microti difere das outras micobactérias deste grupo devido à sua morfologia celular em forma de S e devido ao seu tropismo muito específico pelos animais de laboratório, principalmente roedores, infectando também humanos imunocomprometidos [32].

Em 2010 *M. mungi* foi descrito a partir de uma epidemia em mangustos de África e foi adicionado ao MTBC devido à sua semelhança de 99 % com o genoma de *M. tuberculosis*. Existe no meio ambiente, onde é responsável por causar lesões granulomatosas ao nível do nariz nestes mamíferos [30]. No caso de *M. orygis*, estão presentes 17 a 20 cópias da região IS6110, apresentando um padrão RFLP-IS6110 totalmente diferente do de outras espécies. É indistinguível de *M. tuberculosis* do ponto de vista clínico quando afeta humanos e consegue ser transmitido de humanos para bovinos [30].

M. pinnipedii caracteriza-se pelo tropismo para pinípedes, podendo no entanto infectar outros animais que entrem em contacto com os infectados [27, 33].

No caso de *M. suricattae*, o seu tropismo é para suricatas selvagens, possuindo uma enorme deleção no locus DR pelo que não é reconhecido pela técnica *spoligotyping* [34]. Do ponto de vista filogenético, apresenta um ancestral comum com *M. africanum* e o seu rRNA 16S, em que difere por um SNP (*Single-nucleotide polymorphism*) dos outros membros do MTBC [30].

Através da análise genética das RD destas espécies, considera-se que os membros do MTBC possam ter evoluído a partir do mesmo ancestral, mas que através de eventos, como inserções e deleções no DNA tenham resultado na especiação de *M. tuberculosis* com os diferentes níveis de patogenicidade característicos [35].

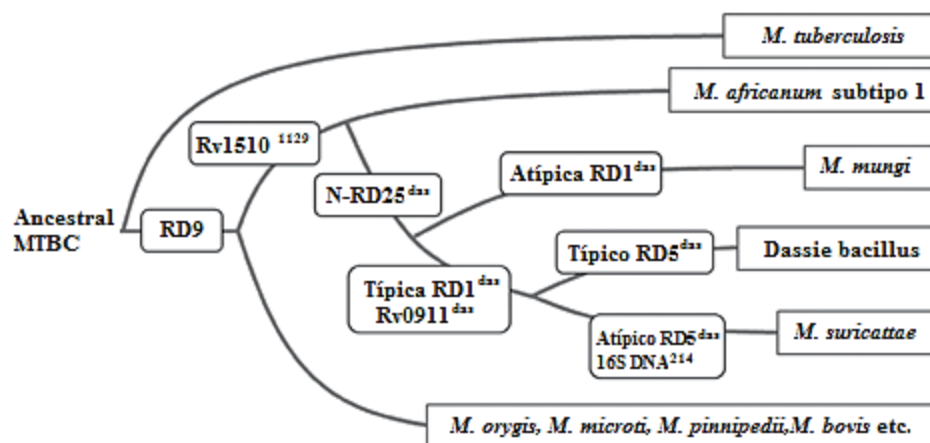


Figura 1.4– Filogenia do MTBC detalhando diferentes regiões de diferença relevantes e diferenças SNP (adaptado de Parsons *et al.* [2]).

O genoma de *M. tuberculosis* é relativamente pequeno, no entanto, bastante versátil, codificando para a maioria das vias anabólicas e catabólicas de síntese ou degradação de aminoácidos e apresentando apenas 4 000 genes. A maioria destes genes codifica para enzimas envolvidas na lipólise, ou seja a

sobrevivência da bactéria dentro do hospedeiro, e para a lipogénese, ou seja para síntese do invólucro celular [17].

1.2.4 Transmissão, Infecção e Patogénese

A TB é transmitida por via aérea principalmente através de indivíduos infetados, sendo estes a mais importante fonte de infecção. A transmissão de *M. tuberculosis* para o hospedeiro humano começa no momento em que ocorre a inalação de aerossóis contendo bactérias libertadas por doentes infetados quando estes tosse, espirram ou falam.

Estes aerossóis permanecem em suspensão no ar por vários minutos ou até horas devido ao seu tamanho reduzido, sendo que a maioria dos bacilos quando são inalados pelo Homem são expelidos, em que apenas uma parte destes, de tamanho mais reduzido (1-3 μm), conseguem ultrapassar esta barreira e atingir os alvéolos [36].

O risco de infecção aquando a inalação destes aerossóis depende de vários fatores como a capacidade de infecção de *M. tuberculosis* ao ser inalado, a proximidade do hospedeiro com a fonte de aerossóis contaminados com bacilos, a quantidade de aerossóis inalados e a capacidade de resposta do sistema imunitário do hospedeiro.

Quando no pulmão, as micobactérias são fagocitadas por macrófagos alveolares e células dendríticas, ficando retidas em vesículas endocíticas que maturam para fagossomas. Estes posteriormente fundem com os lisossomas que conferem às bactérias retidas um ambiente ácido provocado pela produção de hidrolases lisossomais, oxigénio reativo e espécies de azoto com o objetivo de destruir o agente patogénico [36, 37].

No entanto, *M. tuberculosis* desenvolveu mecanismos para ultrapassar este ambiente inóspito e para sobreviver dentro do macrófago, impedindo a fusão dos lisossomas com os fagossomas e evitando assim as defesas do hospedeiro. A infecção é posteriormente contida em estruturas designadas de granulomas, constituídas por macrófagos ativados e outras células imunitárias que migram ao local de infecção, rodeando-a de modo a limitar a disseminação das micobactérias para outros locais do corpo [37, 38]. Este apresenta às bactérias um ambiente com baixa concentração de oxigénio, pH e nutrientes, pelo que estas respondem ativando o estado de dormência [36].

As micobactérias podem persistir por tempo indefinido nestas estruturas chegando a atingir décadas sem qualquer sintoma clínico ou transmissão para outros hospedeiros. Uma diminuição na imunidade pode resultar no entanto na reativação das células bacterianas, e provocar a ativação da doença [39]. A imunidade desempenha um papel crítico na prevenção de uma reativação.

A reativação de *M. tuberculosis* pode acontecer devido a vários fatores relacionados principalmente com o sistema imunitário do hospedeiro ou por razões genéticas ou ambientais, ou até por uma alteração na normal produção de quimiocinas e citocinas implicadas na resposta inflamatória. Nestes casos, a estrutura do granuloma rompe e pode resultar na reativação do metabolismo principal por parte das micobactérias, provocando doença pulmonar, resultando o controlo desta infecção crónica num equilíbrio permanente do hospedeiro com a micobactéria [40].

Para detetar uma infecção de TB ativa o principal método utilizado é a observação de uma amostra (expetoração, urina, líquido pleural, líquido pericárdio) ou tecido suspeito ao microscópio com coloração Ziehl-Nielsen, um método direto e comum em todo o mundo. Em países desenvolvidos, procede-se depois à cultura do microrganismo, sendo este considerado o método de referência padrão. Posteriormente pode ser realizada a identificação das estirpes e a sua caracterização através de técnicas moleculares [7]. Em países em desenvolvimento, muitas vezes apenas é feito o diagnóstico através da

observação ao microscópio devido à falta de recursos e condições para uma melhor confirmação e caracterização das estirpes, até mesmo a nível de perfis de resistência.

Sem tratamento, a taxa de morte desta doença é bastante alta. Novos fármacos, principalmente de segunda linha, estão a ser desenvolvidos, devido ao número cada vez maior de casos de resistência aos antibacilares utilizados regularmente no tratamento [41].

1.2.5 Tratamento e resistência a antibacilares

M. tuberculosis é considerado um dos agentes patogénicos mais bem-sucedidos de sempre, possuindo para além da capacidade de sobreviver aos mecanismos de defesa do organismo do hospedeiro, a aptidão de desenvolver resistência à maioria dos fármacos disponíveis contra a TB [42].

O tratamento da TB assenta em fármacos, designados antibacilares. A terapia começa sempre com os antibacilares de primeira linha, seguindo-se em caso de resistência os antibacilares de segunda linha, atuando estes de maneira diferente sobre as células [43].

A primeira linha de fármacos é maioritariamente bactericida, e combina um elevado grau de eficácia com relativa toxicidade para o paciente durante o tratamento. Os fármacos que pertencem a esta linha são a isoniazida, a rifampicina, a estreptomina, o etambutol e a pirazinamida. Cada um destes fármacos tem um alvo específico de modo a ultrapassarem as defesas das micobactérias e as destruírem [44].

Os fármacos de segunda linha são maioritariamente bacteriostáticos, com uma eficiência mais baixa e usualmente mais tóxicos e por isso mesmo são mais utilizados para fortalecer os tratamentos quando existe a presença de resistências aos fármacos de primeira linha [43]. Alguns dos antibacilares que fazem parte deste grupo são a ofloxacina, capreomicina, amicacina, rifabutina, etionamida, ácido para-aminossalicílico (PAS), linezolid e moxifloxacina [43].

A terapia padrão estabelecida pela OMS utilizada atualmente começa com a combinação de agentes bactericidas potentes de primeira linha, como a isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol por dois meses, seguindo-se uma fase de quatro meses onde são administrados apenas isoniazida e rifampicina. Utiliza-se sempre a combinação de vários fármacos de modo a diminuir a probabilidade de as estirpes de *M. tuberculosis* adquirirem resistência aos antibacilares utilizados [45].

As estirpes resistentes à isoniazida e à rifampicina (os dois antibióticos mais eficazes contra a TB) são designadas por TB-MR [46]. Para curar doentes portadores de estirpes TB-MR, estes devem tomar uma combinação de antibacilares de segunda linha, possuindo maior probabilidade de causarem efeitos secundários que os fármacos de primeira linha e não sendo tão eficazes pelo que devem ser tomados durante períodos mais longos [47].

Ao contrário do tratamento de doentes com estirpes susceptíveis, cuja duração é de apenas seis meses, o tratamento no caso de estirpes TB-MR requer um mínimo de vinte meses sujeito a medicação com a adição de um agente injetável nos primeiros oito meses [43].

Para além das estirpes TB-MR, já foram identificadas estirpes extensivamente resistentes (TB-XDR) em vários países de todo o mundo. Estas estirpes são resistentes à isoniazida, à rifampicina e ainda a antibacilares de 2ª linha e das fluoroquinolonas (como a levofloxacina e a moxifloxacina). Estas estirpes são muito difíceis de erradicar e, por vezes, é necessário um tratamento cirúrgico para remover as porções afetadas dos pulmões [48].

A resistência fenotípica pode ser conferida naturalmente através de adaptações fisiológicas que levam a que a bactéria seja tolerante a certos antibióticos, designando-se por resistência intrínseca. As micobactérias desenvolveram mecanismos moleculares múltiplos que neutralizam a citotoxicidade da

maioria dos antibacilares, fornecendo resistências a alguns dos antibióticos utilizados contra a TB e tornando difícil o desenvolvimento de novos fármacos [45]. Uma das adaptações por parte destas células é a característica baixa permeabilidade da parede celular das micobactérias, que funciona como barreira para a entrada de fármacos na célula [42].

Apesar destas adaptações fisiológicas que permitem a *M. tuberculosis* progredir na infecção no hospedeiro, o fenótipo MR/XDR pode ser causado igualmente pela acumulação sequencial de mutações espontâneas em diferentes genes que envolvem resistência a um fármaco individual, tratando-se esta de uma resistência adquirida [45, 49]. Esta resistência é descrita como o resultado de mutações cromossômicas em bactérias sob pressão seletiva por contacto com os antibióticos, existindo uma série de genes cuja mutação pode conferir resistência aos antibacilares e uma vantagem seletiva [50]. A contínua exposição aos fármacos durante o tratamento junto com a não aderência de doentes levou à seleção de estirpes resistentes que de outra maneira poderiam não predominar numa população devido à sua baixa adaptação. Este processo ocorre durante a combinação de fármacos, criando assim uma evolução destas estirpes que gradualmente adquirem resistência aos vários fármacos existentes [50].

Em 2014 foram relatados casos de estirpes TB-XDR em mais de 105 países pelo mundo, sendo a Europa uma das regiões com mais casos [7].

1.3 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A compreensão da transmissão das doenças infecciosas é essencial para estabelecer um conjunto de diretrizes eficazes na prevenção contra estas, e neste caso, por *M. tuberculosis*.

Antes do surgimento das técnicas moleculares o estudo da epidemiologia era impreciso e possuía baixo poder discriminativo, afetando assim a abordagem a seguir quanto ao controlo das doenças infecciosas. Através da utilização de uma abordagem multidisciplinar, associando as características epidemiológicas às propriedades biológicas dos isolados clínicos ficou cada vez mais acessível o estudo da propagação da doença e a sua distribuição, determinando assim os fatores que levam ao surgir da doença. A epidemiologia molecular foi desenvolvida com o objetivo de compreender o modo de transmissão desta patologia, baseando-se em técnicas moleculares capazes de caracterizar as estirpes. A genotipagem é utilizada para estudar a escala de transmissão global da doença, a sua diversidade genética e os fatores ambientais envolvidos na formação das várias populações.

Nos microrganismos pertencentes ao MTBC existe, no geral, ausência de transferência horizontal de material genético, apresentando *M. tuberculosis* uma estrutura populacional clonal, representada por linhagens, famílias ou *clusters* monofiléticos, ou seja, grupo de estirpes descendentes de um ancestral comum [17].

O aumento do número de variações específicas nestas espécies permite diferenciar as várias estirpes do MTBC. Mudanças no genoma provocadas por mutações nucleotídicas aleatórias, como as deleções, inserções e duplicações, conhecidas como polimorfismos de longa sequência (LSP, do inglês *Large Sequence Polymorphisms*) ou regiões de diferença (RD, do inglês *Region of Difference*), e polimorfismos de um único nucleótido (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*), permitem classificar as diferentes estirpes do MTBC.

Para além destes, através da caracterização das cópias de elementos de repetição presentes no genoma de *M. tuberculosis*, da análise de espaçadores oligonucleotídicos, e da comparação de sequências genómicas consegue-se analisar os membros do MTBC relativamente à sua filogenia, distribuição geográfica, virulência, transmissibilidade e aquisição de resistências a antibacilares [26].

Estas diferenças têm sido usadas como marcadores para estudos epidemiológicos e/ou na identificação de estirpes do MTBC ao nível de espécie. Os diferentes genótipos encontram-se geograficamente representados de maneira diferente, podendo ser designados de acordo com a zona geográfica, histórica ou cultura da região onde foram isolados pela primeira vez. Devido ao baixo nível de variação nas sequências existe a necessidade de recorrer a uma análise *multilocus*, de modo a obter um maior poder discriminatório entre isolados clínicos filogeneticamente próximos [51]. Têm sido desenvolvidos vários métodos com o objetivo de compreender as redes de transmissão da TB baseados em polimorfismos presentes no DNA genómico das micobactérias [52].

1.3.1 RFLP-IS6110

Um dos métodos que foi mais utilizado para diferenciar as estirpes pertencentes ao MTBC é o RFLP (Restriction-Fragment-Length Polymorphism) – *IS6110*. Esta técnica que analisa a distribuição da *IS6110* nos genomas das diferentes estirpes requer o crescimento em cultura, a extração do DNA e a digestão deste com uma endonuclease de restrição, a *PvuII*. Esta enzima é utilizada para clivar a sequência *IS6110* apenas uma vez [53]. Os fragmentos de restrição são separados por electroforese em gel de agarose e analisados por *Southern blot* utilizando uma sonda que híbrida apenas num dos lados (Figura 1.5) [53, 54]. De modo a conseguir comparar os diferentes perfis obtidos, o tamanho de cada fragmento que híbrida com a *IS6110* deve ser determinado recorrendo a marcadores moleculares. Esta técnica foi largamente utilizada, devido à sua elevada reprodutibilidade, elevado poder de discriminação e baixo custo [51].

A *IS6110* é uma sequência que pode duplicar e inserir-se em locais não aleatórios ao longo do genoma, dando origem a milhares de diferentes padrões de bandas onde estirpes que não são relacionadas epidemiologicamente revelam diferentes padrões de RFLP, sendo e estirpes relacionadas apresentam um padrão bastante similar [53, 54]. A tipificação do DNA é baseada em polimorfismos gerados por variabilidade tanto no número de cópias como na posição cromossomal da *IS6110* nos isolados clínicos de *M. tuberculosis* [53].

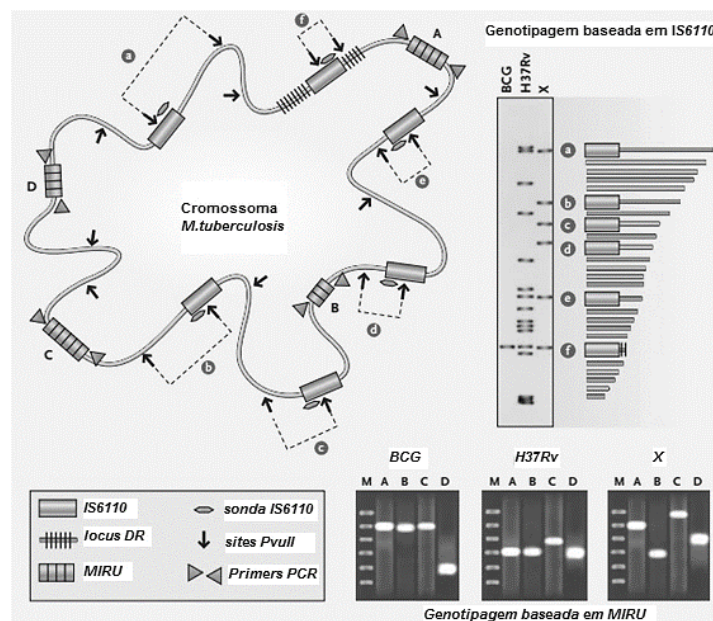


Figura 1.5 – Genoma hipotético de estirpe X *M. tuberculosis*, com sequências repetitivas polimórficas *IS6110*, MIRUs e DR, com genotipagem de *M. bovis* Calmette–Guérin (BCG) e a estirpe de laboratório H37Rv. Reparar que na técnica RFLP-*IS6110* a sonda apenas se insere à direita da zona onde ocorre o corte pela *PvuII* (adaptado de Barnes *et al.*[5]).

Este método apresenta, no entanto, algumas desvantagens como o facto de requerer crescimento em cultura para extrair o DNA a ser utilizado, o que pode levar semanas para que seja obtido em quantidade suficiente e posteriormente purificado. Para além disso, o seu poder de discriminação depende do número de cópias *IS6110* [53, 55]. Outra das desvantagens coloca-se a nível da comparação interlaboratorial que se torna mais difícil [34, 55].

No sentido de ultrapassar as desvantagens do RFLP-*IS6110*, foram desenvolvidas outras técnicas, nomeadamente técnicas baseadas em PCR recorrendo a outros *loci* polimórficos, como é o caso do MIRU-VNTR e o *spoligotyping*. Estes foram gradualmente substituindo o RFLP-*IS6110* ao longo do tempo, sendo as mais utilizadas atualmente.

1.3.2 *Spoligotyping*

O método *Spacer Oligonucleotide Typing (Spoligotyping)* é baseado na análise do locus *Direct-Repeat (DR)*, que consiste em sequências repetitivas de 36 pb separadas por sequências não repetitivas, as últimas designadas de espaçadores com 34-41 pb.

A região DR, presente apenas no cromossoma de estirpes do MTBC, pertence à família de sequências CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) e parece possuir uma evolução unidireccional com maior tendência a perder espaçadores em vez de ganhar. O número de cópias de sequências DR varia de genoma para genoma, no entanto os espaçadores entre dois DR específicos são conservados entre as estirpes. O *spoligotyping* deteta a presença ou ausência destes espaçadores, nomeadamente de 43 espaçadores específicos do genoma de *M. tuberculosis* [54]. O padrão de ausência/presença dos espaçadores de uma determinada estirpe é utilizado para diferenciar estirpes. De modo a simplificar a leitura, o padrão de 43 espaçadores é convertido num código octal, obtendo-se no final um conjunto de 15 números (Figura 1.6) [56].

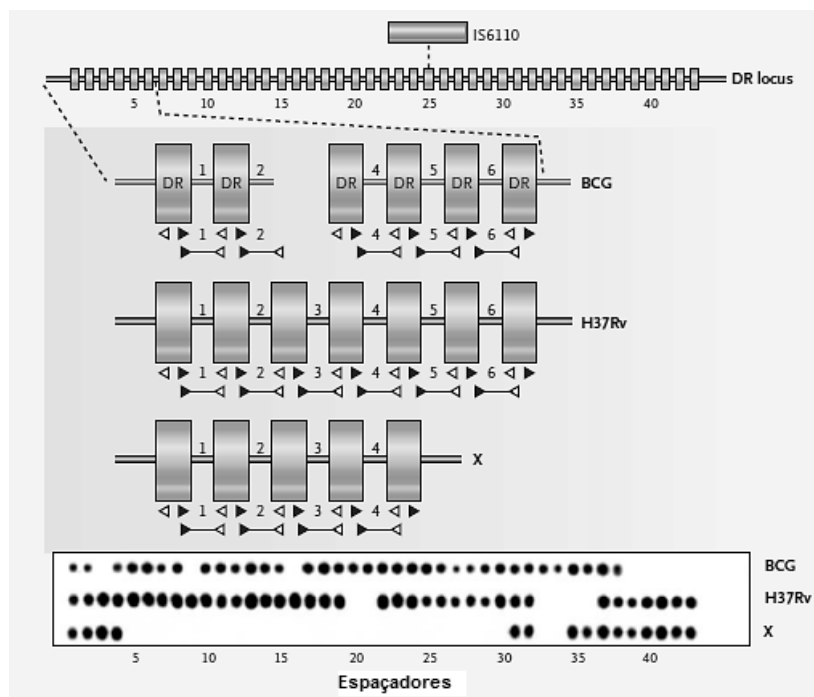


Figura 1.6 – Representação de regiões DR e resultados obtidos por *spoligotyping* em *M. bovis* BCG, H37Rv e estirpe hipotética *M. tuberculosis* X. *M. bovis* BCG é caracterizado pela ausência dos espaçadores 39 a 43, sendo assim distinguido das estirpes *M. tuberculosis* (adaptado de Barnes *et al.*[5]).

O *spoligotyping* apresenta várias vantagens. Este método, comparativamente ao RFLP-IS6110, é relativamente rápido, simples e robusto para a deteção e tipificação simultânea de *M. tuberculosis* apenas requerendo pequenas quantidades de DNA. Os resultados são expressos como positivo ou negativo para cada espaçador consoante há hibridação ou não com a membrana, podendo ser expressos em formato digital. Para além disso, a partir dos resultados, torna-se possível distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis* (Figura 1.6).

A técnica apresenta a desvantagem de possuir menor poder de discriminação que o RFLP-IS6110, apresentando maior poder de discriminação quando se tratam de estirpes com baixo número de sequências IS6110 [54].

Os resultados das várias análises *spoligotyping* a estirpes diferentes em várias regiões do mundo foram armazenados em bases de dados. Estas revelam a estrutura das populações e a distribuição geográfica local e global das micobactérias [57].

A cada octal adicionado à base de dados que não seja igual a nenhum perfil existente na base de dados é adicionado um número de identificação designado SIT (*Shared International Types*). Uma linhagem é composta por diferentes SITs e é determinada por regras específicas baseadas no padrão de hibridação específica de alguns espaçadores [56].

Dados globais obtidos a partir da base de dados internacional de *spoligotyping* SITVIT WEB, permitem observar a distribuição geográfica das linhagens de *M. tuberculosis* (Figura 1.7). Dada a evolução clonal do MTBC e o facto de afetar o Homem desde muito cedo, acompanhando-o desde a sua expansão a partir de África, a história migratória do Homem está diretamente relacionada com a filogeografia da população do MTBC, revelando diferentes linhagens predominantes consoante a área geográfica [57].

As linhagens existentes são Central-Asian (CAS), East-African-Índian (EAI), Haarlem (H), Latin-American-Mediterranean (LAM), S, T, X, Manu e Beijing. A genotipagem por *spoligotyping* permitiu já identificar um total de 62 sub-linhagens genéticas [57].

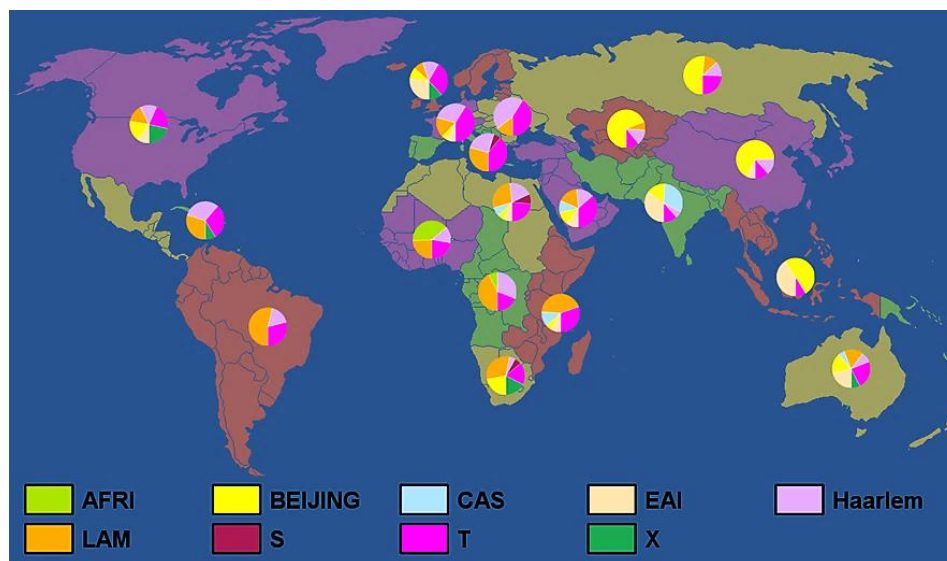


Figura 1.7 – Distribuição global das diferentes linhagens em 2012 representada pelos gráficos circulares. Regiões correspondentes a cada gráfico estão representadas por diferentes cores. (extraído do website SITVIT WEB em Junho de 2016).

Na América do Norte são encontradas a maioria das linhagens e em percentagens semelhantes, sendo que nas Caraíbas encontra-se principalmente H, LAM e T, com X em menor percentagem. Na América do Sul existe maior predominância da LAM em relação às outras, seguida pela T e pela H.

No caso da Europa a família T é a mais encontrada, seguida pela H com maior percentagem no leste da Europa, EAI no norte da Europa a linhagem S no sul.

Nas várias sub-regiões de África, LAM é o clade mais prevalente, com a exceção de a oeste de África o clade AFRI se revelar mais predominante, existindo o grupo T na mesma proporção em todas as regiões.

A linhagem Beijing tem-se propagado globalmente nos últimos anos e é visto como um indicador da transmissão recente de *M. tuberculosis* para uma certa região. O perfil de *spoligotyping* é muito característico com a presença de espaçadores apenas do 35 ao 43, sendo encontrado em três sub-regiões de África, a norte, este e sul, apesar de neste último ser mais prevalente. Esta linhagem é conhecida por estar presente em maior predominância na Ásia [58, 59]. Isolados CAS são também encontrados na região este e norte de África, com a linhagem S a revelar-se a norte e a sul, a X apenas a sul e EAI a norte e a este.

Na Rússia mais de 50 % dos isolados pertencem à linhagem Beijing, e a EAI encontra-se presente a sul e sudoeste da Ásia, sendo que CAS existe também em algumas regiões asiáticas.

T é uma linhagem mais frequente a oeste da Ásia, enquanto T juntamente com LAM são muito encontrados na região da Oceânia [57].

Este método permite portanto posicionar uma dada estirpe num contexto filogenético mais alargado e inferir acerca da estrutura populacional de *M. tuberculosis*. Esta varia consoante a área geográfica sendo a capacidade de diferenciar entre famílias de génotipos importante a nível epidemiológico, no sentido em que pode influenciar no desenvolvimento de tratamentos e/ou vacina contra esta doença. Aspectos como a distribuição no espaço e no tempo da doença, a sua patogenicidade e a respetiva distribuição filogeográfica no mundo são fatores importantes para o seu controlo. Nos países desenvolvidos os resultados têm sido utilizados para criar diretrizes de controlo da TB [60].

1.3.3 MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats*)

Outra das técnicas baseadas em PCR, designada por *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats* (MIRU-VNTR), baseia-se na amplificação por PCR de *variable numbers of tandem repeats* (VNTRs), diferentes classes de elementos genéticos que se encontram intercalados no genoma de *M. tuberculosis*, designados de *mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRUs) [61]. Nesta técnica são analisados *loci* constituídos por repetições nucleotídicas em *tandem* no genoma, variando estas regiões em sequência e comprimento, sendo estes marcadores extremamente úteis para a genotipagem de agentes patogénicos geneticamente homogéneos, como é o caso de *M. tuberculosis* [62].

Neste método é realizada a amplificação de múltiplos *loci* utilizando *primers* específicos de forma a determinar o tamanho dos produtos através de electroforese capilar, electroforese em gel de agarose ou por cromatografia líquida, e conseqüentemente o número de repetições existente em cada *loci* [61]. Existem conjuntos pré-definidos de 12, 15 ou 24 *loci* do genoma de *M. tuberculosis* que podem ser empregues dependendo do grau de diferenciação desejado.

Por se tratar de uma técnica baseada em PCR pode ser aplicada diretamente em culturas de *M. tuberculosis* sem ser necessária a purificação prévia do DNA ou mesmo diretamente em amostras clínicas, o que representa uma vantagem em relação à genotipagem por RFLP-IS6110 [62].

Com este tipo de análise o poder de discriminação pode ser bastante elevado, dependendo do número ou conjunto de *loci* a ser analisado. Esta técnica pode ser utilizada para caracterizar grande número de estirpes, fornecendo todos os resultados em modo digital como códigos numéricos, sendo por isso fácil a comparação de resultados entre laboratórios (Figura 1.6).

O facto de se caracterizar *loci* distintos, torna-a apropriada mesmo para estirpes com poucas cópias de IS6110, uma das desvantagens do RFLP-IS6110. Trata-se no entanto de um método mais dispendioso que o RFLP-IS6110 e possuindo por vezes um poder de discriminação menor ou igual a este, sendo que muitas vezes se combina com a técnica *spoligotyping* [55].

1.3.4 Whole Genome Sequencing (WGS)

As técnicas de tipificação, como o RFLP-IS6110, MIRU-VNTR e *Spoligotyping* caracterizam os genótipos de isolados de *M. tuberculosis*, estando no entanto restringidos ao número de *loci* analisados e apresentam limitações quando se trata de traçar redes de transmissão dado o reduzir do número de *loci* analisados. A sequenciação genómica total ou *Whole Genome Sequencing* (WGS) veio colmatar este problema pois permite caracterizar toda a variação no genoma bacteriano e tem por isso o poder mais alto de discriminação molecular [54]. Trata-se de uma técnica que consegue fornecer informação genética de todos os alvos genómicos possíveis e com informações adicionais sobre resistências a fármacos, determinantes de virulência e evolução do genoma [63].

O WGS permite pesquisar diferenças a nível nucleotídico em estirpes que são classificadas como idênticas por outras técnicas e pode ser uma ferramenta importante para delinear redes de transmissão impossíveis de rastrear através da investigação epidemiológica tradicional. A análise genómica dos padrões de diferentes SNPs permite inferir a relação filogenética precisa entre vários isolados. No entanto, a utilização de diferentes algoritmos para limpar, filtrar e analisar os dados WGS, leva a resultados difíceis de interpretar, tornando por vezes difícil a comparação entre laboratórios.

1.3.5 Epidemiologia molecular em Portugal

Em Portugal, estudos anteriores sobre a diversidade genética de estirpes de *M. tuberculosis* presentes na Região de Saúde de Lisboa revelaram a existência de uma família de *clusters* genéticos idênticos, designada de família Lisboa [64].

A análise de estirpes de Lisboa por RFLP-IS6110 permitiu a identificação de quatro *clusters* com um perfil idêntico de RFLP, partilhando três dos *clusters* um grau de similaridade de cerca de 75 %. Estes foram inicialmente designados de A, B e C, sendo o *cluster* A o mais predominante, designado mais tarde de família Lisboa com um perfil de RFLP de 90 % de similaridade entre as estirpes pertencentes a este grupo e um padrão de resistência característico. Estas estirpes, principalmente detetadas na região de Lisboa foram, contudo, detetadas em outras regiões do país [64].

A família Lisboa encontra-se muito associada a estirpes TB-MR, sendo neste momento bastante associada também a estirpes TB-XDR. Nos últimos anos, o número de isolados com resistência à etionamida aumentou, tal como a resistência às fluoroquinolonas [65].

Foi identificado também um segundo *cluster* endémico, designado de *cluster* Q1 (*cluster* B por RFLP-IS6110). As estirpes deste *cluster*, quando analisadas por MIRU-VNTR 12 *loci*, revelaram que existe um total de 11 alelos que são partilhados com a família Lisboa, revelando serem bastante próximas.

Esta família Lisboa é constituída por isolados que partilham um perfil de RFLP-IS6110 similar de nove bandas e uma taxa de similaridade de 95 % com a técnica MIRU-VNTR, pertencendo à linhagem LAM [66].

A estrutura filogenética da linhagem LAM está dividida em três sub-linhagens globais, onde o clade mais importante da família Lisboa, o Lisboa3, aparece num ramo muito recente da RD174. Pensa-se que o ancestral das estirpes SIT20 existiu na América do Sul, nomeadamente no Brasil, propondo-se a hipótese de durante as migrações entre Portugal, Brasil e os PALOP esta estirpe tenha sido transmitida para o resto do mundo, mas especialmente para Portugal onde sofreu alterações e se tornou predominante [67].

Já o clade Q1 tem origens mais complexas, encontrando-se filogeneticamente muito próximo do clade LAM_ZWE presente em países do sul de África. No entanto, nenhum dos países com o clade LAM_ZWE foi colónia portuguesa, pelo que se assume que estirpes LAM transportadas pelos portugueses podem ter sido transmitidas às colónias inglesas, tendo-se depois propagado e dado origem ao LAM-ZWE que afeta estes países. Esta teoria explica assim a semelhança entre o Q1 encontrado em Portugal e o LAM_ZWE mais prevalente em África [67].

1.4 OBJETIVOS

Em Portugal, a taxa de incidência de TB tem descido nos últimos anos, no entanto, continua a ser superior a muitos países da Europa. Lisboa possui um elevado número de casos de TB, existindo também a presença de casos TB-MR e TB-XDR. Esta é uma das principais regiões em Portugal onde se concentram imigrantes provenientes de vários países, nomeadamente dos PALOP, que apresentam uma taxa de incidência e mortalidade de TB bastante elevadas. Face a esta situação, é portanto da maior importância o conhecimento acerca da dinâmica de circulação de diferentes estirpes de *M. tuberculosis* associadas a imigrantes e a sua relação com a estrutura populacional em Portugal.

De forma a contribuir para este conhecimento pretendeu-se com este trabalho realizar os seguintes objetivos:

- Identificar e caracterizar genotipicamente, através da técnica de *spoligotyping* estirpes isoladas de imigrantes provenientes de PALOP com TB ativa em Lisboa;
- Analisar e comparar a estrutura populacional de *M. tuberculosis* ao nível das várias sub-populações de imigrantes;
- Investigar possíveis associações de genótipos específicos com fenótipos de resistência a antibióticos de primeira e segunda-linha;
- Discriminar e identificar *clusters* MIRU-VNTR associados à resistência a antibióticos;
- Avaliar a importância das estirpes associadas a populações de imigrantes no contexto epidemiológico da TB em Portugal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ISOLADOS CLÍNICOS

Neste estudo foram analisados 133 isolados, provenientes de indivíduos imigrantes de diferentes nacionalidades oriundos dos PALOP.

Os isolados clínicos em questão foram isolados e identificados, entre 2008 e 2010, como pertencentes ao MTBC pelo Laboratório de Saúde Pública da Administração Regional de Lisboa. Para efeitos de caracterização molecular, DNAs extraídos pelo mesmo laboratório foram enviados para o Laboratório de Micobacteriologia Molecular do Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), juntamente com os dados fenotípicos de suscetibilidade aos antibióticos de primeira e, quando aplicável, de segunda-linha. Os testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA) foram realizados com a metodologia BACTEC MGIT 960 (Becton-Dickinson, New Jersey, EUA).

2.2 SPOLIGOTYPING

2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

A genotipagem por *spoligotyping* foi realizada recorrendo à amplificação da região DR por PCR utilizando os primers DRa (5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC-3', biotilado na extremidade 5') e DRb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3'). Cerca de 2,5 ng de DNA foram utilizadas para a reação. Foram utilizados dois controlos positivos e um negativo, nomeadamente *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG como positivos e água bidestilada estéril para o negativo. Os controlos positivos permitem verificar se todas as sondas se encontram funcionais.

Foram utilizados 50 µL da seguinte mistura de reação para o PCR: 31,3 µL de água bidestilada estéril, 1,5 µL cloreto de magnésio a 50 mM, 4 µL de dNTPs a 2,5 mM, 4 µL de cada um dos *Primers* DRa e DRb a 5 pmol/ µL, 0,2 µL de NZYtaq DNA polimerase (NZYtech) a 5 U/µL. A amplificação foi realizada num termociclador T3 Thermocycler (Biometra® Goettingen, Germany), tendo o programa consistido em: um passo de desnaturação inicial a 96°C por 3 min; 40 ciclos de 1 min a 96°C, 1 min a 55°C e 30 s a 72°C; terminando com um último passo de extensão final de 10 min a 72°C.

2.2.2 Preparação da membrana

Na preparação da membrana de nitrocelulose Biodyne C (Pall Corporation, Port Washington, USA) iniciou-se o processo ao diluir os oligonucleótidos em 150 µL de NaHCO₃ a 500 mM e a pH 8,4 (Anexo 1) e ativou-se a membrana em 10 mL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDAC) a 16% (p/v, preparado no dia) durante 10 min à temperatura ambiente. Lavou-se a membrana com água destilada, retirou-se o excesso por aspiração e colocou-se 150 µL dos oligonucleótidos em cada poço recorrendo a um sistema miniblatter, adicionando ao primeiro e último poço tinta de caneta permanente diluída a 1:100 em 2x SSPE.

Após a incubação de 1 min, a membrana foi inativada através da incubação por 10 min em NaOH a 100 mM numa garrafa de hibridação. Procedeu-se às lavagens desta com agitação em 250 mL de 2x SSPE / 0.1% SDS por 5 min a 60°C, adicionando posteriormente EDTA a 20 mM e a pH 8 por 15 min e armazenou-se a membrana a 4°C na solução de EDTA a 20 mM até ser novamente utilizada. A composição de todas as soluções utilizadas encontra-se descrita no Anexo 2.

2.2.3 Hibridação

Para a hibridação, diluiu-se 20 µL do produto PCR em 150 µL de 2x SSPE / 0,1% SDS e desnaturou-se durante 10 min a 100°C. Lavou-se a membrana em 250 mL 2x SSPE / 0,1% SDS por 5 min a 60°C e colocou-se a membrana no miniblottter, tendo-se posteriormente adicionado os produtos de PCR amplificados diluídos. A hibridação ocorreu por 60 min a 60°C e lavou-se duas vezes a membrana em 2x SSPE / 0,5% SDS durante 10 min a 60°C, seguindo-se uma incubação com conjugado de estreptavidina-peroxidase diluída a 1:4000 em 10 mL de 2x SSPE / 0,5% SDS durante 60 min a 42°C.

A membrana foi lavada duas vezes com 250 mL de 2x SSPE / 0,5% SDS durante 10 min cada a 42°C e passada por 250 mL de 2x SSPE durante 5 min à temperatura ambiente.

2.2.4 Detecção Quimioluminescência

Para a deteção da quimioluminescência recorreu-se à incubação da membrana durante 1 min em 20 mL de reagente de deteção ECL (Amersham ECL Detection Reagent; GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) e expôs-se um filme Amersham Hyperfilm ECL durante 15 min (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

2.2.5 Regeneração da membrana

De forma a regenerar a membrana para nova utilização, lavou-se a membrana duas vezes em SDS 1% por 30 min a 80°C, seguida de uma última lavagem em EDTA a 20 mM durante 15 min à temperatura ambiente.

A membrana foi armazenada em EDTA a 20 mM a 4°C para evitar a desidratação.

2.2.6 Interpretação dos resultados

Os perfis de hibridação obtidos foram inicialmente codificados num código simétrico (um quando o espaçador apresenta sinal e o valor zero quando não existe sinal). Este código binário foi convertido para um código octal de 15 dígitos, em que: 000=0; 001=1; 010=2; 011=3; 100=4; 101=5; 110=6; 111=7. O código octal de cada estirpe foi pesquisado na base de dados online SITVIT WEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/), de forma a obter a linhagem e SIT para cada estirpe [56, 57].

Nas situações em que nas respetivas bases de dados não tenha sido, até à data, depositada qualquer estirpe com perfil idêntico ao obtido, designou-se o mesmo como sendo um perfil órfão.

2.2.7 Árvores de Extensão mínima (*minimum spanning tree*)

Com os resultados obtidos pelo *spoligotyping* realizou-se a construção de árvores *minimum spanning tree* recorrendo à base de dados online MIRU-VNTR *plus* (www.miru-vntrplus.org), tendo-se definido a delimitação de complexos clonais envolvendo estirpes com perfis com apenas um *locus* de diferença (www.miru-vntrplus.org).

2.3 GENOTIPAGEM POR MIRU-VNTR

A genotipagem por MIRU-VNTR de 24 *loci* foi realizada através de amplificação por PCR multiplex usando a polimerase de DNA HotStarTaq (Qiagen®, US), como já descrito por Supply *et al.* (2001) [62]. A convenção para nomenclatura dos *loci* MIRU-VNTR encontra-se descrita no Anexo 3.

2.3.1 Misturas de reação

Preparam-se as misturas de reação anteriormente à adição de DNA genômico num volume final de 20 μL de acordo com a Tabela 2.1.

Tabela 2.1- Volume de cada componente para a preparação das misturas PCR *multiplex*.

Misturas de reação	1	2	3	4	5	6	7	8
	4	10	0424	2401	2163b	2	20	2347
<i>Loci</i>	26	16	0577	3690	1955	23	24	2461
	40	31	2165	4156	4052	39	27	3717
Água bidestilada estéril (μL)	7	8,3	8,7	7,5	8,7	7,9	8,7	8,3
Tampão 10x (μL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Solução Q 5x (μL)	4	4	4	4	4	4	4	4
MgCl ₂ 25 Mm (μL)	1,2	0,4	0	1,2	0	0,8	0	0,4
dNTP 5 mM (μL)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Primers* (cada, μL)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
DNA polimerase (μL)	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
DNA (μL) 5 ng/ μL	2	2	2	2	2	2	2	2
Total (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20

*Concentração inicial de cada *primer*: 20 pmol/ μL . Concentração inicial dos oligonucleótidos marcados: 2 pmol/ μL para o *locus* 0577, 3690 e 1955, 8 pmol/ μL para o *locus* 4052, 20 pmol/ μL para o *locus* 4156 e 4 pmol/ μL para os outros *loci*. A sequência dos *primers* e a marcação encontra-se no anexo 3.

2.3.2 Amplificação

A amplificação dos *loci* alvo foi realizada através de Multiplex-PCR, num termociclador T3 Thermocycler (Biometra® Goettingen, Germany). A reação de amplificação ocorreu segundo as condições: 15 min de desnaturação a 95°C, seguida de 1 min a 94°C, emparelhamento 1 min a 59°C, 90s a 72°C, com extensão final durante 10 min à temperatura de 72°C. O número de ciclos do programa de amplificação foi ajustado consoante a reação ou o método de eletroforese, sendo o número de ciclos para a análise automática foi de 30 ciclos para a mistura 1, 2, 4, 6, 7 e 8 de 35 ciclos para a mistura 3 e 5. Se a análise for manual devem ser executados 40 ciclos para todas as reações. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se no Anexo 3. O PCR *simplex* foi realizado quando para alguns locus VNTR o número de cópias a partir do PCR *multiplex* não foi possível determinar.

Tabela 2.2- Volume de cada componente para preparação das misturas de reação de PCR *simplex*.

Misturas de reação para PCR <i>simplex</i>	
Reagentes	Volume (μL)
Água bidestilada estéril	11,8
Tampão 10x (NZY tech)	2,5
DMSO	1
MgCl ₂ 25 mM (Quiagen)	1,5
dNTP 5 mM (NZY tech)	2
Primer Forward*	1
Primer Reverse*	1
NZYTap DNA polimerase 5 U/ μL (NZY tech)	0,2
DNA (2-5 ng/ μL)	2
Total	25

*Os *primers* não marcados têm concentração de 20 pmol/ μL . Nos *primers* marcados a concentração é de 2 pmol/ μL para o *locus* 0577, 3690 e 1955; 8 pmol/ μL para o *locus* 4052; 20 pmol/ μL para o *locus* 4156 e 4 pmol/ μL para os restantes *loci*.

2.3.3 Análise do produto por eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos de amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) com brometo de etídio (concentração final de 0,5 µg/mL). Foi utilizado como marcador de massas moleculares o NZYDNA Ladder VI (NZYTech, Lisboa, Portugal).

2.3.4 Análise do produto por eletroforese capilar

Para a realização da eletroforese capilar, foram preparadas amostras contendo 1,2 µL do produto, 15 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystem®, Foster City, USA) e 0,35 µL de marcador MapMarker 100-1200 ROX (Bioventures, USA). As amostras foram desnaturadas a 94°C durante 10 min e imediatamente refrigeradas. De seguida, a placa foi enviada para análise de fragmentos através de eletroforese capilar (Stab vida, Caparica, Portugal).

2.3.5 Interpretação dos resultados

Analisou-se os resultados da eletroforese capilar das reações de amplificação multiplex através do software Peak Scanner (Applied Biosystems®, Foster City, USA), distinguindo-se os diferentes picos correspondentes a produtos de amplificação consoante a sua marcação fluorescente. O tamanho do produto de PCR foi automaticamente calculado tendo em conta o marcador interno de massas moleculares utilizado através do método de *Local Southern*. O valor obtido é comparado com os valores tabelados para cada *locus* VNTR de forma a determinar o alelo correspondente [68]. Na maioria das vezes os picos individuais são acompanhados de picos de menor intensidade (picos *stutter*), que não foram considerados. Nos casos em que foram detetados picos com intensidade semelhante repetiu-se a amplificação por PCR *multiplex* ou *simplex* para os *loci* em causa.

2.3.6 Dendrograma

Um dendrograma foi construído utilizando o algoritmo de medida de distância genética D_{SW} para o cálculo de distâncias e o método de *clustering* UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages), recorrendo à base de dados online MIRU-VNTR *plus* (www.miru-vntrplus.org) [61]. Os isolados HPV115 e ARS2202 são estirpes de referência do clade Q1 e Lisboa3-B, respetivamente.

Considerou-se um *cluster* MIRU-VNTR um conjunto de dois ou mais isolados clínicos com perfil de MIRU-VNTR 24 *loci* idêntico.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POR SEXO E FAIXA ETÁRIA

No presente estudo foram analisados 133 isolados clínicos de *M. tuberculosis*, previamente isolados entre 2008 e 2010 no laboratório de Saúde Pública da Administração Regional de Lisboa de imigrantes provenientes de PALOP. Tendo em conta o número reduzido de isolados provenientes de Moçambique (n=10) e São Tomé e Príncipe (n=9), focou-se o estudo nas três sub-populações de imigrantes com maior representação na amostra, perfazendo um total de 114 isolados de doentes oriundos de Guiné-Bissau (n=30), Cabo Verde (n=33) e Angola (n=51).

Analisando a distribuição por sexo e faixa etária, verificou-se existir em todas as sub-populações uma maior predominância de casos de TB no sexo masculino. Por faixa etária a predominância de casos tem distribuição variável, tanto no sexo masculino como feminino na sub-população da Guiné-Bissau o maior número de casos ocorreu na faixa etária dos 15-24 anos; Cabo Verde, 45-54 anos; e Angola no sexo masculino 35-44 anos e no sexo feminino dos 25-34 anos (Figura 3.1). Nesta análise um isolado de Cabo Verde e um de Angola não foram contabilizados devido à falta de dados.

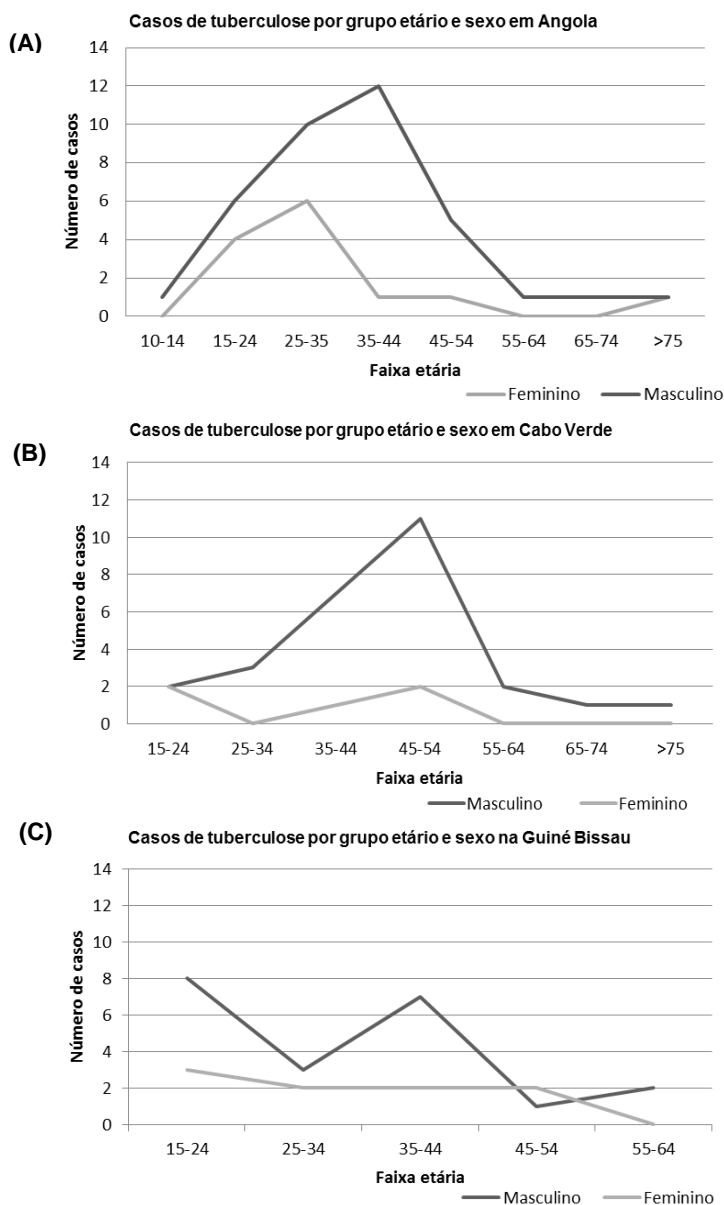


Figura 3.1 – Número de isolados oriundos da Angola (A), Cabo Verde (B) e Guiné-Bissau (C), por faixa etária e género.

Dos 133 isolados analisados, nove apresentaram resistência a um ou mais antibióticos. Quatro isolados foram considerados estirpes MR-TB (TB6938, TB8074, TB10348 e TB8868) e quatro apresentaram monoresistência à estreptomina (TB10301, TB2577, TB5578 e TB5460) e um isolado monoresistência à rifampicina (TB6619) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1– Nacionalidade, perfil de *Spoligotyping*, clade, SIT e resistências de 1ª linha e de 2ª linha e classificação TB multiresistente das estirpes com resistência e com diagnóstico em Portugal em 2008, 2009 e 2010.

ID	Nacionalidade	Octal	Clade	SIT	Suscetibilidade 1ª linha ^a					Suscetibilidade 2ª linha ^b	Tipo de Resistência
					S	I	R	E	P		
TB 6938	Angola	67777607760771	LAM1	20	R	R	R	R	R	OFLO; ETH	TB-MR
TB 8074	Angola	67777607760771	LAM1	20	R	R	R	S	S	ETH	TB-MR
TB 10348	Cabo Verde	67777607760771	LAM1	20	R	R	R	S	S	ETH	TB-MR
TB 8868	Guiné-Bissau	67777607763771	MANU2	órfão	R	R	R	S	S	CAP; ETH	TB-MR
TB 10301	Moçambique	67777607740771	LAM	1752	R	S	S	S	S	nd	Monoresistência
TB 2577	Angola	70007677760771	X	92	R	S	S	S	S	nd	Monoresistência
TB 5578	Angola	77777607760771	LAM	42	R	S	S	S	S	nd	Monoresistência
TB 5460	Moçambique	67777607740771	LAM	1752	R	S	S	S	S	nd	Monoresistência
TB 6619	Angola	70007677760771	X	92	S	S	R	S	S	nd	Monoresistência

^a resistência a antibióticos de primeira linha: S- Estreptomina; I- Isoniazida; R- Rifampicina; E- Etambutol; P- Pirazinamida.

^b resistência a antibióticos de segunda linha: OFX- Ofloxacina; CAP- Capreomicina; ETH- Etionamida; S- sensível; R- resistente; nd-Não foram encontradas estirpes com perfis de *Spoligotyping* idênticos na base de dados SITVIT WEB.

3.2 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA POR *SPOLIGOTYPING*

Dada a falta de informação epidemiológica e estrutura populacional de *M. tuberculosis* ao nível da sub-população de imigrantes provenientes de PALOP em Portugal afetados pela TB, procurou-se caracterizar por *spoligotyping* os isolados de *M. tuberculosis* obtidos de modo a conseguir posicioná-los num contexto macroepidemiológico e analisar a estrutura populacional. Devido principalmente à falta de recursos e infraestruturas nos PALOP as estirpes em circulação não são rotineiramente isoladas e/ou caracterizadas, não existindo na maior parte das situações dados acerca das linhagens com maior predominância.

Todas as estirpes foram genotipadas por *spoligotyping*, sendo divididas em sub-grupos correspondendo ao país de origem do doente. Com o objetivo de identificar possíveis associações com os países de origem, compararam-se os resultados obtidos para os sub-grupos oriundos de Angola, Guiné-Bissau e Cabo Verde com os dados existentes sobre a estrutura populacional de *M. tuberculosis* em Portugal e com os dados existentes para o respetivo país. Os perfis de *spoligotyping* obtidos foram analisados e classificados através da base de dados internacional SITVITWEB, permitindo obter a sub-linhagem, linhagem e o SIT para cada estirpe analisada (Tabela 3.2). O tratamento dos resultados foi realizado através do cálculo da percentagem de cada linhagem e SIT no total do sub-grupo.

A partir da amostra em estudo, no sub-grupo da Guiné-Bissau foram detetados os clades LAM (40%), Beijing, T (13,33%), MANU2 (6,7%), AFRI (3,3%), AFRI_1 (3,3%) e CAS (3,3%); na sub-população de Cabo Verde as linhagens LAM (54,54%), Beijing (21,21%), T (6,1%), H (6%) e X (6%); e na

sub-população de Angola principalmente LAM (68%), T (10%), H (4%), MANU2 (4%), X (4%), Beijing (2%) e S (2%) (Figura 3.2).

Em relação aos SITs encontrados nas estirpes da sub-população da Guiné encontram-se em maior frequência os SIT20/LAM1 e SIT1/Beijing (13,33%) seguido dos SIT33/LAM3 e do SIT42/LAM9 (10%); na sub-população de Cabo Verde, foram o SIT20/LAM1 (24,24%), SIT1/Beijing (18,18%), SIT42/LAM9 (12,12%), SIT33/LAM3 e SIT17/LAM2 (6%) os mais representados; e, a sub-população de Angola possui em maior frequência os SIT20/LAM1 (24%), SIT42/LAM9 (18%) (Figura 3.3).

Para 12 das 133 estirpes analisadas não foram encontrados na base de dados SITVITWEB-Portugal perfis semelhantes para uma classificação de linhagem ou SIT (perfil órfão) (Tabela 3.2). As estirpes de perfil órfão não foram consideradas no tratamento dos resultados.

A frequência relativa dos diferentes clades e SITs encontrados para os sub-grupos Angola e Guiné-Bissau foram comparados com os dados existentes sobre as estirpes que circulam em Angola [4] e Guiné-Bissau (origem SITVITWEB), respetivamente, e com a estrutura populacional existente em Portugal (Figura 3.4), sendo igualmente comparados os resultados dos três sub-grupos entre si. Em relação ao sub-grupo Cabo Verde, não existem dados sobre a estrutura populacional do país, pelo que este foi comparado unicamente com os dados existentes para Portugal (SITVITWEB).

Observa-se que existe uma clara predominância da linhagem SIT20/LAM nos resultados das sub-populações, com uma maior representatividade igualmente do SIT1 da linhagem Beijing por parte das sub-populações da Guiné-Bissau e de Cabo Verde. O sub-grupo de Angola apresenta a estrutura populacional mais semelhante com a de Portugal, enquanto o sub-grupo Guiné-Bissau apresenta a maior diversidade de resultados, possuindo apenas um isolado da linhagem AFRI_1. As sub-linhagens LAM1 e T1, bastante representadas nos dados de Portugal, foram detetadas em todas as sub-populações com frequências diferentes.

Tabela 3.2- Nacionalidade, perfil de *Spoligotyping*, clade, SIT e resistências de 1ª linha e de 2ª linha das estirpes em estudo com diagnóstico em Portugal em 2008, 2009 e 2010.

Nacionalidade	ID	Octal	Clade	Linhagem	SIT	Suscetibilidade 1ª linha ^a					Suscetibilidade 2ª linha ^b
						S	I	R	E	P	
Angola	TB 6938	677777607760771	LAM1	LAM	20	R	R	R	R	R	OFLO; ETH
Angola	TB 7581	777377607760771	LAM9	LAM	81	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 8074	677777607760771	LAM1	LAM	20	R	R	R	S	S	ETH
Angola	TB 9574	77777774020771	H1	Haarlem	47	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 1702	777777606060731	LAM11_ZWE	LAM	815	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 2063	777777607560771	LAM6	LAM	64	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 2087	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 2577	700076777760771	X3	X	92	R	S	S	S	S	nd
Angola	TB 2640	77777777760771	T1	T	53	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 2842	777737700000000	órfão	órfão	56	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 2895	777777607560771	LAM6	LAM	64	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 2926	772177606760771	LAM3	LAM	1759	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 3088	000000001560711	órfão	órfão	órfão	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 3106	577767607560771	órfão	órfão	órfão	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 3234	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 3342	77637777760771	S	S	34	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 3453	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 3696	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 3942	777777607560771	LAM6	LAM	64	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 3962	77777774060771	T1	T	1872	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 4061	777777607760731	LAM4	LAM	60	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 10788	677737607760771	LAM2	LAM	17	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 2822	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 4090	777777606060731	LAM11_ZWE	LAM	815	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 4505	777777557760771	T5_MADRID2	T	58	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 5079	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 5200	77777777760601	T1	T	244	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 5331	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 5578	777777607760771	LAM9	LAM	42	R	S	S	S	S	nd

Nacionalidade	ID	Octal	Sub-linhagem	Linhagem	SIT	Suscetibilidade 1ª					Suscetibilidade 2ª
						linha ^a					linha ^b
						S	I	R	E	P	
Angola	TB 6032	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 6313	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 6619	700076777760771	X3	X	92	S	S	R	S	S	nd
Angola	TB 6656	601775607760771	LAM1	LAM	1545	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 6657	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 6724	777777777763771	MANU2	MANU	54	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 7397	777777777763771	MANU2	MANU	54	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 7404	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 7557	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 7707	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 7978	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 8240	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 8465	00000004020771	H2	Haarlem	2	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 8698	777777777760771	T1	T	53	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 9151	677737607760771	LAM2	LAM	17	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 9324	776177607760771	LAM3	LAM	33	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 9512	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 10170	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 10395	77777740020771	H3	Haarlem	946	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 10432	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 10522	677737607760771	LAM2	LAM	17	S	S	S	S	S	nd
Angola	TB 1666	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 6192	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 6516	776177607760771	LAM3	LAM	33	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 6568	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 6602	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 6799	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 6804	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 7502	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 7538	700775007413771	órfão	órfão	órfão	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 8215	677737607760771	LAM2	LAM	17	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 8410	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd

Nacionalidade	ID	Octal	Sub-linhagem	Linhagem	SIT	Suscetibilidade 1ª linha ^a					Suscetibilidade 2ª linha ^b
						S	I	R	E	P	
Cabo Verde	TB 8629	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 9021	77777776020771	H3	Haarlem	1908	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 9351	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 9913	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 10348	677777607760771	LAM1	LAM	20	R	R	R	S	S	ETH
Cabo Verde	TB 10735	677737607760771	LAM2	LAM	17	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 2569	777760177760601	órfão	órfão	órfão	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 2719	77777774020771	H1	Haarlem	47	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 2981	776177607760771	LAM3	LAM	33	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 3435	757777600000000	órfão	órfão	1757	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 3475	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 3600	777777607760751	LAM9	LAM	1154	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 3813	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 3983	77777777760771	T1	T	53	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 10026	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 10761	00000000000371	Beijing	Beijing	250	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 3056	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 4089	677747607760771	LAM1	LAM	órfão	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 4184	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 4327	700076777760771	X3	X	92	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 5034	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 4192	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Cabo Verde	TB 6885	77777777760601	T1	T	244	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 9838	777767777760771	T1	T	118	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 9841	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 10109	776177607760771	LAM3	LAM	33	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 10090	67777776000371	órfão	órfão	90	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 1762	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 2305	777777607763771	MANU2	MANU	1247	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 2487	77777777760601	T1	T	244	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 2639	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 2662	777377607760771	LAM9	LAM	81	S	S	S	S	S	nd

Nacionalidade	ID	Octal	Sub-linhagem	Linhagem	SIT	Suscetibilidade 1ª					Suscetibilidade 2ª
						linha ^a					linha ^b
						S	I	R	E	P	
Guiné-Bissau	TB 3004	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 3166	77777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 3662	61777777403771	órfão	órfão	órfão	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 3760	70037777777671	órfão	órfão	órfão	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 4100	67777607760731	órfão	órfão	1321	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 4987	776177607760771	LAM3	LAM	33	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 5552	77777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 5957	772177606760771	LAM3	LAM	1759	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 6558	67777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 6649	77773777760731	T2-T3	T	73	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 6966	77777777760601	T1	T	244	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 7436	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 7484	770777404177671	Afri_1	Afri	órfão	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 7780	76037777743671	Afri	Afri	órfão	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 7782	67777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 7835	703777700000000	CAS	CAS	órfão	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 7962	77777777760771	T1	T	53	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 8044	77777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 8277	00000000003771	Beijing	Beijing	1	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 8659	776177607760771	LAM3	LAM	33	S	S	S	S	S	nd
Guiné-Bissau	TB 8868	67777607760771	LAM1	LAM	20	R	R	R	S	S	CAP:ETH
Moçambique	TB 3182	77777600000771	órfão	órfão	397	S	S	S	S	S	nd
Moçambique	TB 6339	70077747413771	EAI6-BGD1	EAI	129	S	S	S	S	S	nd
Moçambique	TB 8225	67777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
Moçambique	TB 9124	476000377414771	órfão	órfão	órfão	S	S	S	S	S	nd
Moçambique	TB 10301	67777607740771	LAM1	LAM	1752	R	S	S	S	S	nd
Moçambique	TB 2685	7777774020771	H1	Haarlem	47	S	S	S	S	S	nd
Moçambique	TB 3224	77777717413731	órfão	órfão	órfão	S	S	S	S	S	nd
Moçambique	TB 3386	7777777760771	T1	T	53	S	S	S	S	S	nd
Moçambique	TB 3623	77777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
Moçambique	TB 5460	67777607740771	LAM1	LAM	1752	R	S	S	S	S	nd
São Tomé e Príncipe	TB 6250	77773777760731	T2-T3	T	73	S	S	S	S	S	nd

Nacionalidade	ID	Octal	Sub-linhagem	Linhagem	SIT	Suscetibilidade 1ª linha ^a					Suscetibilidade 2ª linha ^b
						S	I	R	E	P	
São Tomé e Príncipe	TB 7420	77777743760771	LAM10_CAM	LAM	61	S	S	S	S	S	nd
São Tomé e Príncipe	TB 8576	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
São Tomé e Príncipe	TB 8806	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
São Tomé e Príncipe	TB 9426	677777607760771	LAM1	LAM	20	S	S	S	S	S	nd
São Tomé e Príncipe	TB 3365	677776777760601	X2	X	18	S	S	S	S	S	nd
São Tomé e Príncipe	TB 11123	777377607760771	LAM9	LAM	81	S	S	S	S	S	nd
São Tomé e Príncipe	TB 4677	777777607760771	LAM9	LAM	42	S	S	S	S	S	nd
São Tomé e Príncipe	TB 6487	77777777760731	T2	T	52	S	S	S	S	S	nd

^a resistente a antibióticos de primeira linha: S- Estreptomicina; I- Isoniazida; R- Rifampicina; E- Etambutol; P- Pirazinamida.

^b resistente a antibióticos de segunda linha: OFX- Ofloxacina; CAP- Capreomicina; ETH- Etonamida; nd - não determinado; S- sensível; R- resistente; órfão: Não foram encontradas estirpes com perfis de *Spoligotyping* idênticos na base de dados SITVIT WEB.

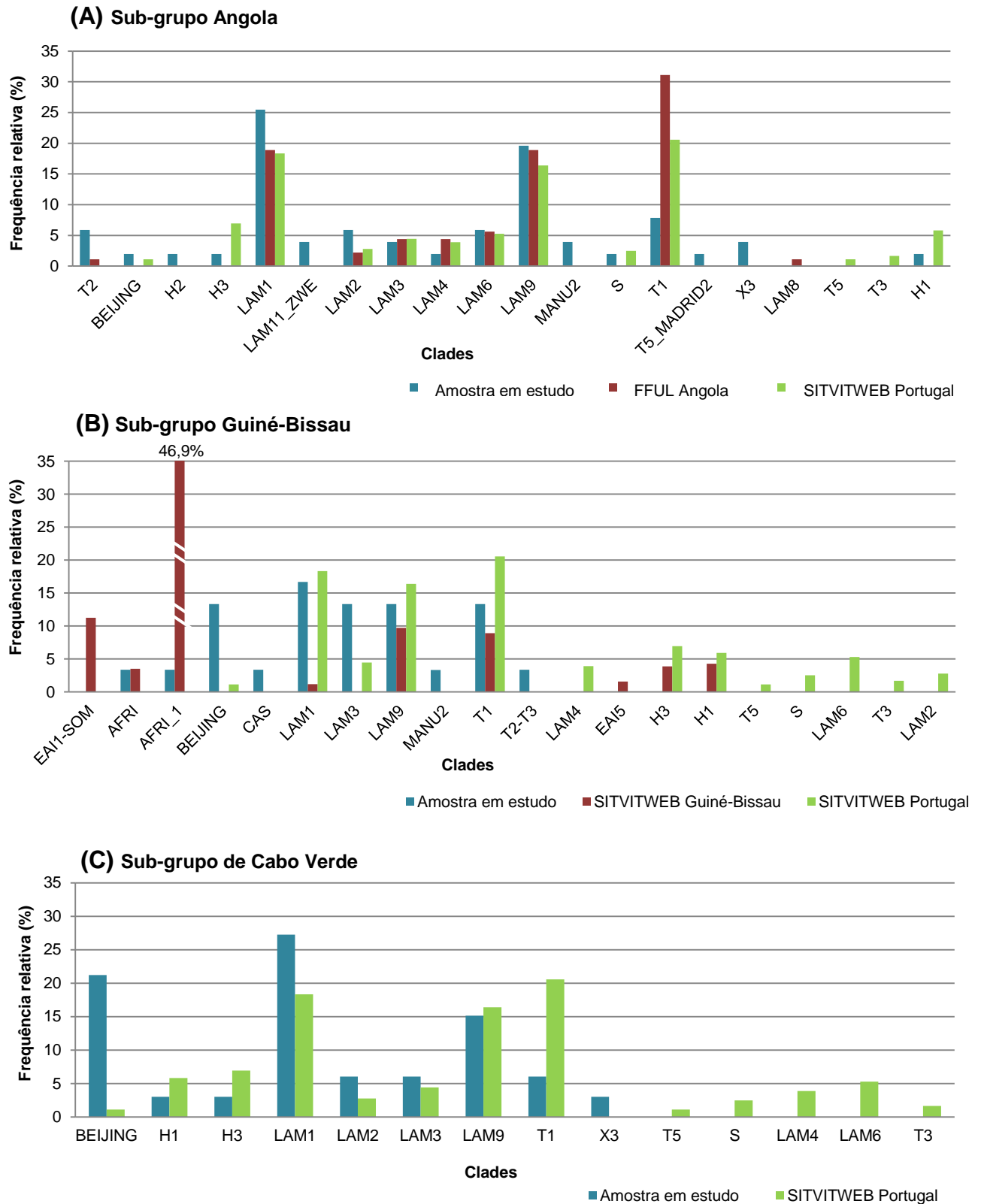


Figura 3.2 – Clades das estirpes em estudo dos sub-grupos de Angola (A), Guiné-Bissau (B) e Cabo Verde (C) analisados neste estudo juntamente com os dados de Portugal e (A) FFUL Angola; (B) SITVITWEB Guiné-Bissau (dados de Portugal e Guiné-Bissau retirados da base de dados SITVITWEB e dados de Angola obtidos em Perdigão *et al.*, 2016[4]).

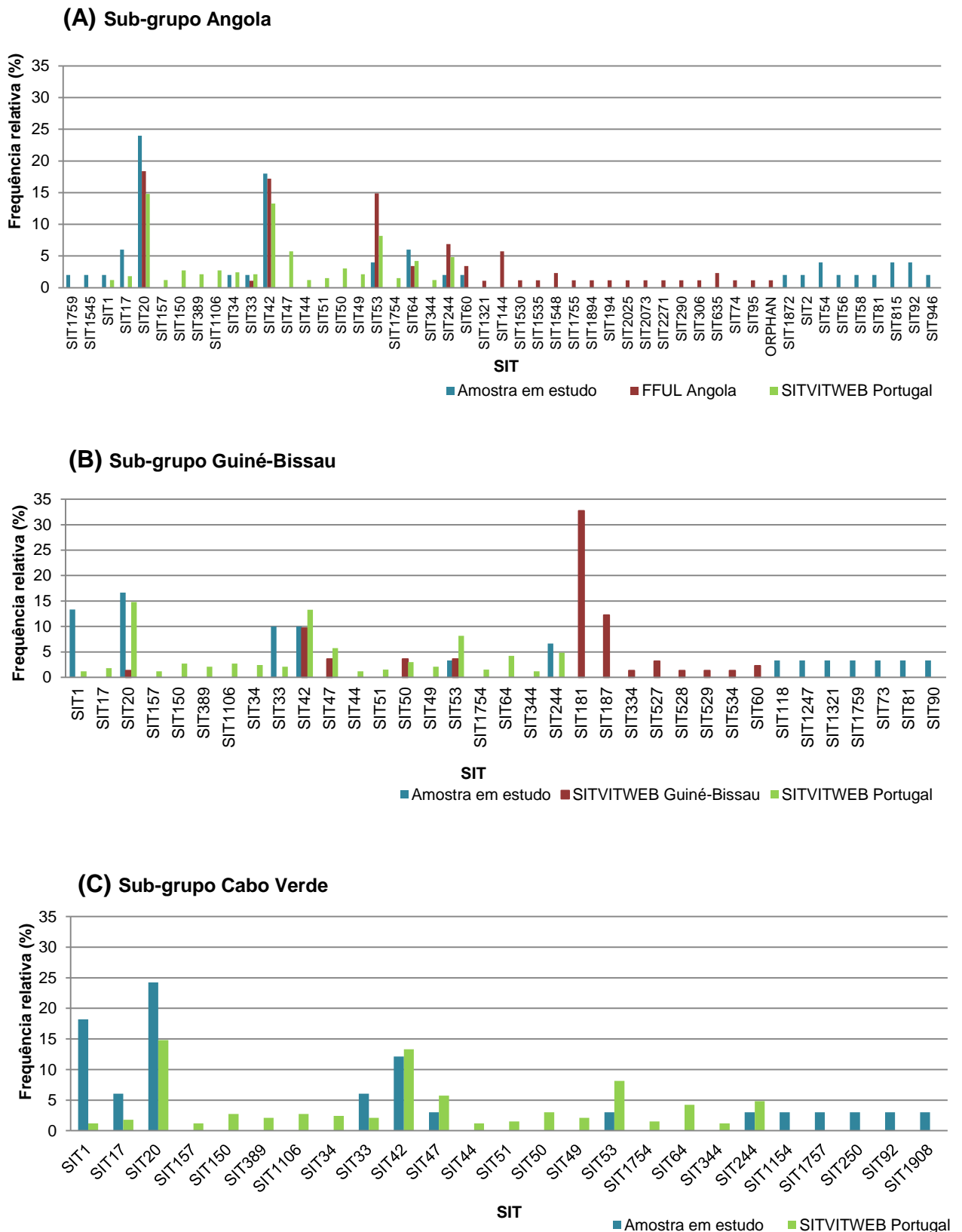


Figura 3.3 – SITs das estirpes em estudo dos sub-grupos de Angola (A), Guiné-Bissau (B) e Cabo Verde (C) juntamente com os dados de Portugal (dados de Portugal e Guiné-Bissau retirados da base de dados SITVITWEB e dados de Angola obtidos em Perdigão *et al.*, 2016 [4]).

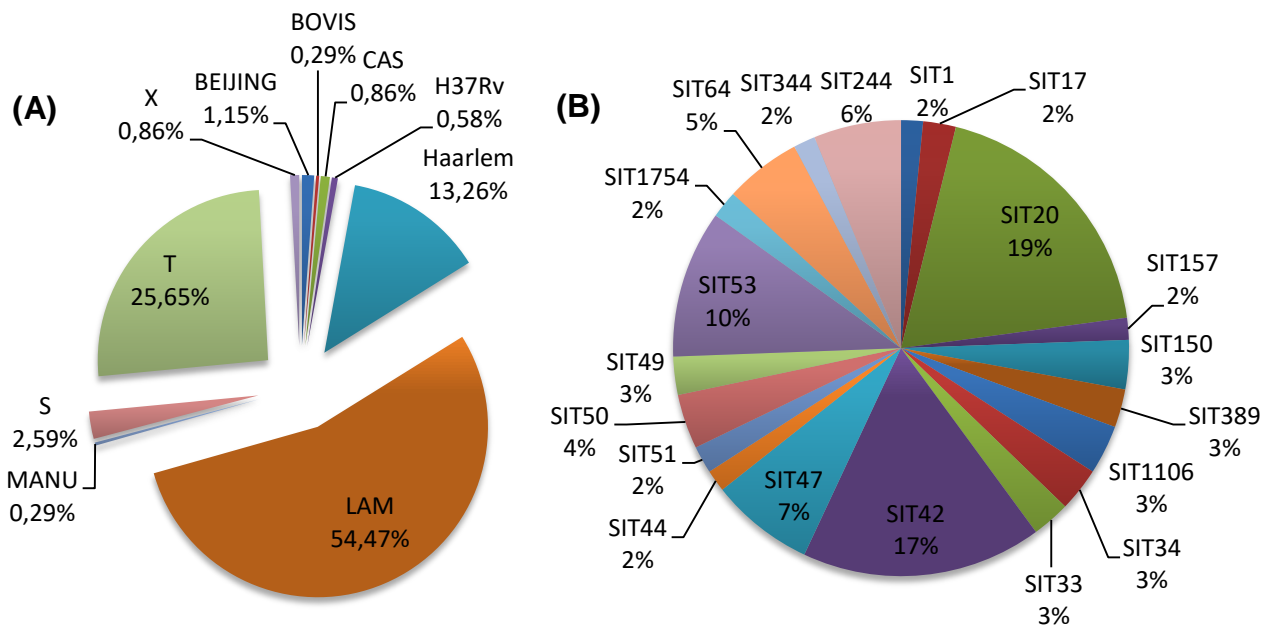


Figura 3.4 – Representação das (A) Linhagens com base na consulta da base de dados de Portugal (SITVITWEB); (B) SITs com base na base de dados de Portugal (SITVITWEB).

3.3 ESTRUTURA POPULACIONAL E COMPLEXOS CLONAIS

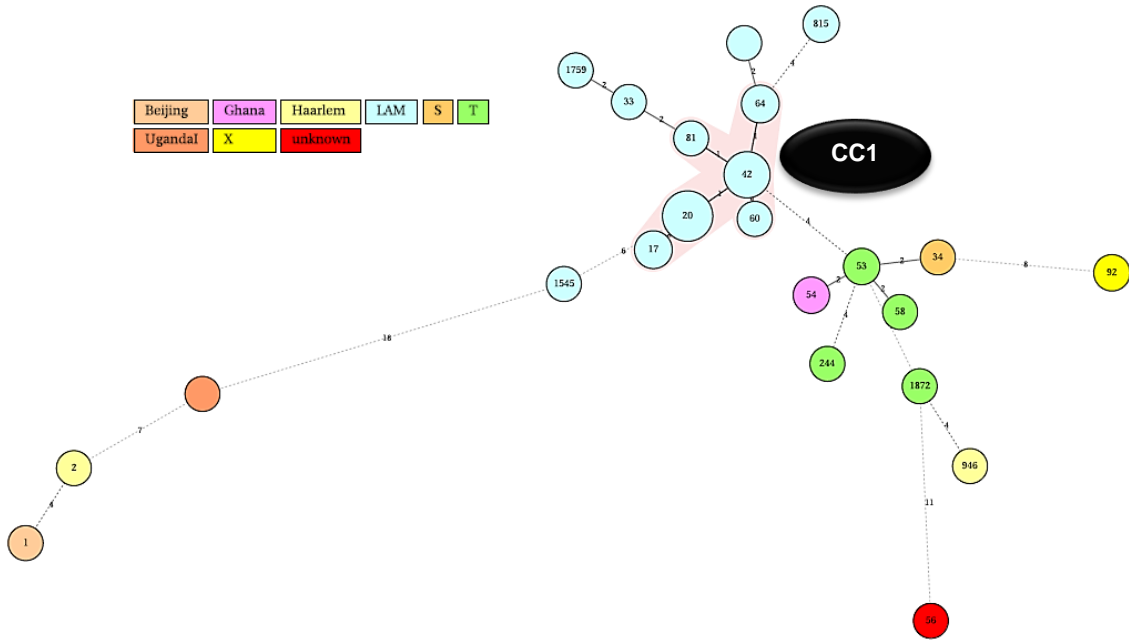
Os resultados das estirpes em análise foram utilizados para a formação de árvores de extensão mínima baseadas no perfil *spoligotyping*, tendo-se delineado complexos clonais com apenas um *locus* de diferença, no máximo, entre as estirpes (Figura 3.5).

Em ambos os três sub-grupos analisados existe a formação de complexos clonais, verificando-se nos sub-grupos um complexo clonal em comum constituído por estirpes LAM e compreendido na sua maioria por estirpes SIT20/LAM1 e SIT42/LAM9. Dado este ser o principal clade onde se detetam casos de resistência, poderá existir uma possível associação entre este e os casos de resistência na amostra em estudo.

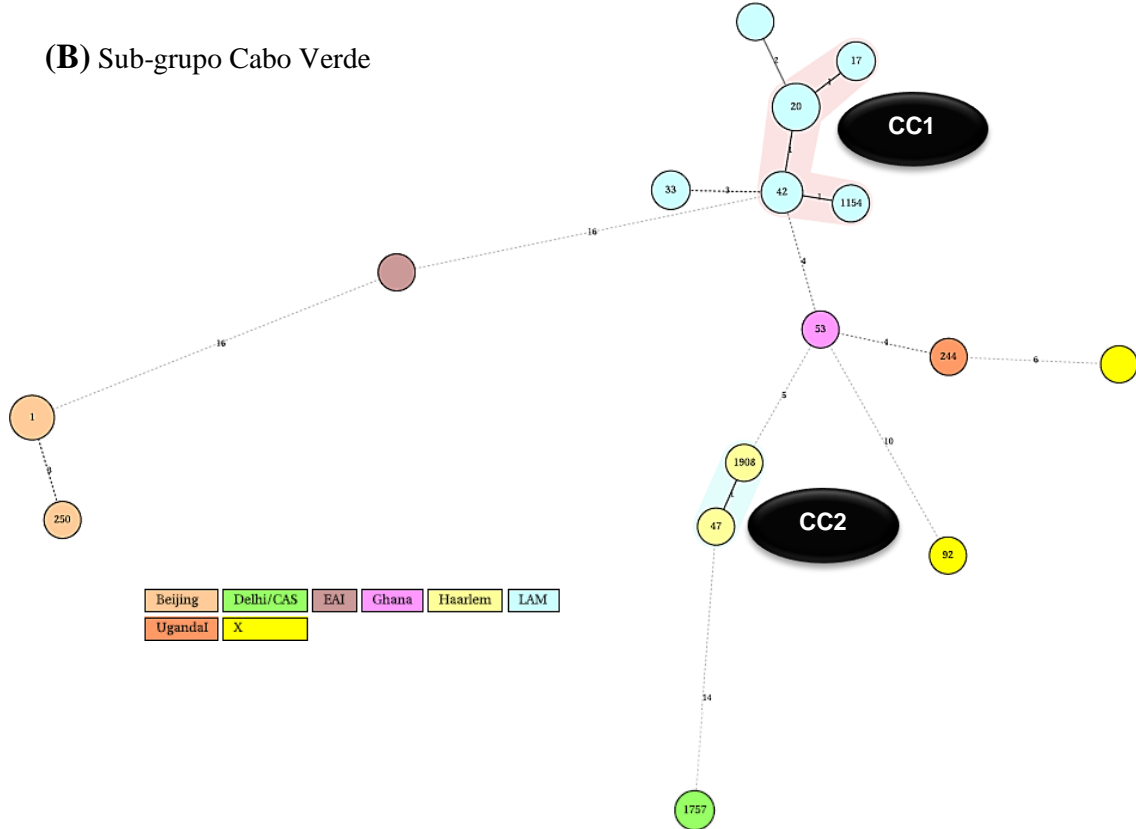
No caso das estirpes do sub-grupo de Angola apenas existe a formação de um complexo, sendo este formado pela linhagem LAM e pelos SITs 20, 42, 17, 60, 64 e 81, enquanto em Cabo Verde ocorreu a formação de dois complexos clonais, o 1 de linhagem LAM com os SITs 20, 42, 17 e 1154 e o 2 de linhagem Haarlem de SITs 47 e 1908.

As estirpes provenientes de imigrantes da Guiné-Bissau são as que apresentam maior diversidade ao nível das famílias encontradas, com a formação de dois complexos clonais de diferentes clades e SITs. O complexo clonal 1 é formado por estirpes pertencentes à linhagem LAM com SITs 20, 42, 81 e 1321 e o complexo clonal 2 é constituído pela linhagem T, sendo formado pelos SITs 53 e 118.

(A) Sub-grupo Angola



(B) Sub-grupo Cabo Verde



(C) Sub-grupo Guiné-Bissau

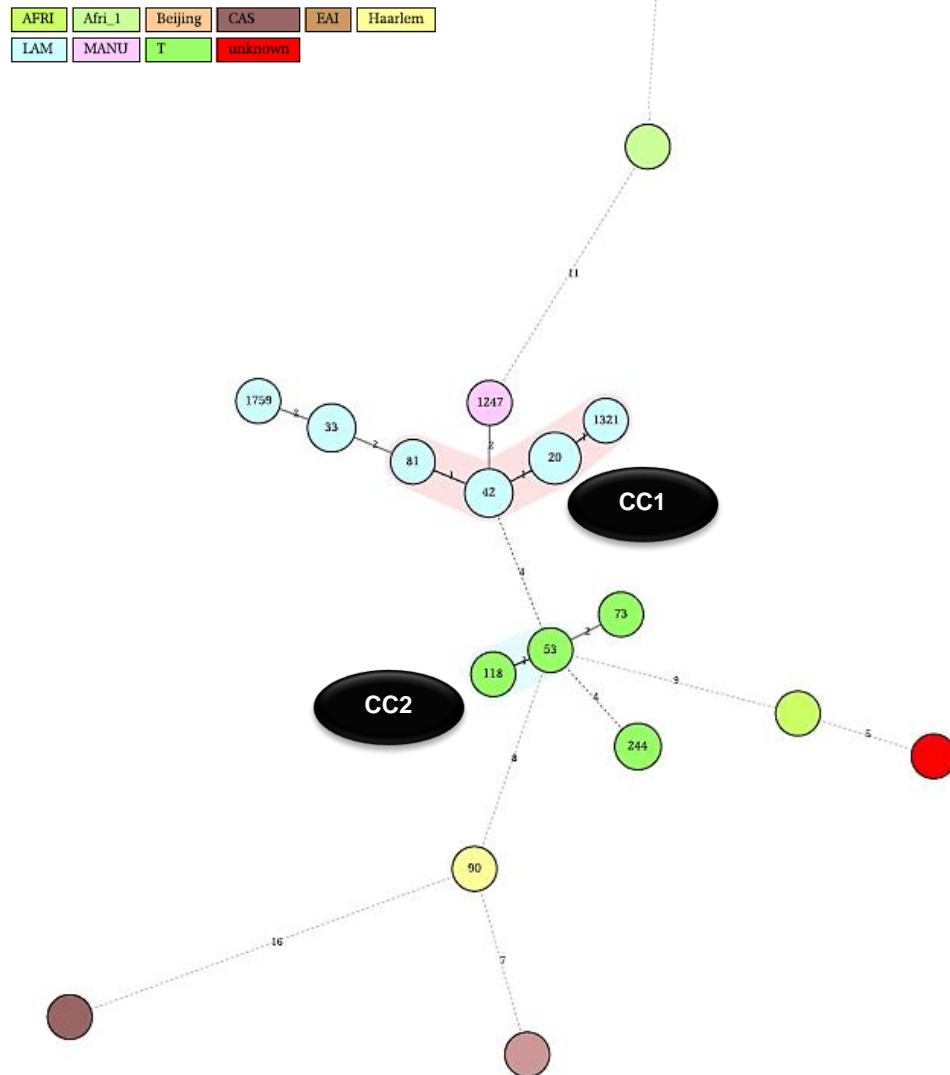


Figura 3.5 – Árvores de extensão mínima formadas pelas estirpes do sub-grupo de (A) Angola, (B) Cabo Verde e (C) Guiné-Bissau. Cada círculo é formado por um conjunto de estirpes, alterando de tamanho conforme o número de estirpes pertencente. Os círculos possuem uma cor correspondente à linhagem, com o número do SIT no interior ou caso não possuam número, representam estirpes órfão sem número SIT. A área a sombreado em cada árvore corresponde a um complexo clonal (CC), formado por estirpes com um máximo de um *locus* de diferença, identificado na árvore possuindo uma linha contínua a ligar os círculos. As linhas a tracejado relacionam círculos com mais de um locus de diferença, sendo o número inserido na linha o número de *loci* diferente. (imagem adaptada da base de dados online MIRU-VNTR *Plus*).

4. DISCUSSÃO

A migração em massa pela população humana desde que saiu de África para o resto do mundo parece ter sido o início do processo de disseminação de *M. tuberculosis*, adaptando-se e, dando origem a uma enorme quantidade de linhagens diferentes, estando atualmente distribuída geograficamente com diferentes clades predominantes [69].

A linhagem LAM foi também influenciada pelo Homem, sendo hoje em dia detetada em áreas e bastante diferentes da região onde foi primeiramente descrita, no Oeste do Mediterrâneo. Atualmente, existe a norte da Eurásia e na região mediterrânica de África, com exceção da Ásia [57].

Muitos países da Europa mostraram obter um aumento do número de casos de TB principalmente nas cidades devido ao maior aglomerado de pessoas, com maior prevalência de casos em imigrantes provenientes especialmente de países de África e Ásia [70]. Na Dinamarca, por exemplo, o número de casos de TB aumentou em 77 % entre 1986 e 1999, principalmente devido ao aumento do número de imigrantes provenientes de países de elevada prevalência de TB [71].

Portugal declarou em 2006 possuir problemas relacionados com a presença de imigrantes da América latina e de África, países com elevadas taxas de HIV e TB [72]. Atualmente o número de imigrantes em Portugal tem vindo a baixar, no entanto a taxa de incidência da TB neste grupo tem-se mantido nos mesmos valores, sendo em 2014 de 95,4 casos por 100 000 habitantes e com uma elevada taxa de coinfeção pelo HIV [1].

Nas 133 estirpes provenientes de imigrantes analisadas neste estudo, obteve-se um maior número de isolados provenientes de doentes do sexo masculino, o que está de acordo com os dados já existentes, tanto para Portugal como para os outros países [7, 73].

No que diz respeito à faixa etária dos doentes infetados pelas estirpes em análise são bastante diferentes consoante a sub-população em estudo, tendo-se verificado no sub-grupo da Guiné-Bissau que a faixa-etária com maior incidência de TB é dos 15-24 anos. No país da Guiné-Bissau, a faixa-etária com maior notificação de casos é dos 35-44 anos, igual à média obtida para toda a região Africana, sendo bastante mais alta que a obtida no sub-grupo que apresenta um intervalo de idades bastante abaixo, sendo um possível indicador, *a priori*, de um padrão de transmissão ativa da TB na população estudada. [7]

Dada a faixa etária detetada neste sub-grupo, possivelmente poderia ter ocorrido a migração devido à dificuldade dos doentes em obter tratamento na região africana, e especificamente nos países PALOP, deslocando-se até Portugal, onde a língua não é um obstáculo, para o tratamento e aumentando assim a diversidade cultural nos hospitais [74].

Na sub-população de Cabo Verde as idades mais representadas foram entre os 45-54 anos, mostrando uma maior incidência para grupos etários mais avançados [73].

No caso do sub-grupo de Angola, obteve-se uma maior frequência de casos de TB em idades diferentes para cada sexo, onde nas mulheres a faixa etária mais representada foi dos 25-34 anos e nos homens foi dos 35-44 anos.

Comparativamente, Portugal apresenta igualmente uma diferença na faixa etária da incidência da TB entre sexos, com o sexo masculino com um pico de incidência na faixa etária dos 35-44 anos até 45-54 anos e o sexo feminino nos 25-34 anos, semelhante aos dados obtidos para a sub-população de Angola [1].

O deslocamento de pessoas entre países não só pode potencialmente provocar um aumento da transmissão de doenças, como também uma alteração das próprias características associadas a esta,

como o sexo e a idade. A nível da Europa existe uma grande variabilidade da distribuição da TB por sexo e faixa etária, dependendo da prevalência de TB em cada país. Nos países com maior número de casos a TB é mais predominante na faixa etária dos 25-44 anos, em países com menos casos de TB as taxas de notificação vão aumentando com a idade ou mantêm-se constantes em grupos de idade [10]. Tal é explicado principalmente pela presença ou não de doenças como o HIV que torna os doentes imunodeprimidos e que associada à TB pode levar a que a infeção progrida mais rapidamente, de modo a incidir numa faixa etária mais jovem.

No entanto, para este tipo de análise de incidência por faixa-etária e sexo não podemos considerar representativas as amostras estudadas devido à sua pequena dimensão e pelo facto de se tratarem de amostras de conveniência, pelo que apesar de os dados obtidos fornecerem algumas indicações, devem ser interpretados com ponderação. Seria necessária uma amostra maior e mais representativa para confirmar este padrão de idades.

Torna-se no entanto, importante uma caracterização precisa das estirpes mais importantes epidemiologicamente, a sua distribuição geográfica e a dinâmica da sua disseminação. Desta forma, numa primeira fase, a análise da diversidade genotípica das estirpes foi realizada por *spoligotyping*, o que permitiu classificar e diferenciar as estirpes em diferentes clades e SITs, comparando os vários sub-grupos aqui analisados. O *spoligotyping* é importante para conseguir identificar não só as estirpes como também a distribuição da transmissão desta doença devido a eventos migratórios do ser humano [52].

Os isolados do sub-grupo de São Tomé e Príncipe foram analisados e apesar de o número ser reduzido, os dados obtidos mostraram uma grande diversidade de linhagens e de SITs diferentes. O clade LAM10_CAM é endémico do oeste de África, principalmente de Camarões e países na sua vizinhança, pelo que o aparecimento deste isolado pode ser justificado por um evento recente de transmissão. Devido ao facto de não existirem dados sobre as estirpes deste país não é possível realizar uma verificação dos dados [75].

Na análise dos 10 isolados clínicos provenientes de doentes de origem moçambicana obteve-se uma grande diversidade de clades, sendo o LAM1 e o SIT1752 os encontrados em maior número. Comparando os resultados obtidos com os dados existentes na SITVITWEB, os perfis SIT42/LAM9, SIT129/EAI6-BGD1, SIT20/LAM1 e SIT53/T1 encontram-se presentes na base de dados, e os clades LAM1e LAM9 foram também detetadas na análise de Viegas *et al.*[58] sobre as estirpes deste país. Moçambique foi considerado pela OMS um dos países com mais casos de TB a nível mundial, revelando a necessidade de caracterizar as estirpes em circulação a nível molecular no sentido de melhor compreender o contexto epidemiológico [7, 58].

No entanto, tanto nos dados de São Tomé e Príncipe como de Moçambique não se podem retirar conclusões devido ao número baixo de amostras a ser analisadas não ser representativo do país.

A nível dos sub-grupos Angola, com 51 isolados; Guiné-Bissau, com 33 isolados; e Cabo Verde com 30 isolados caracterizados, surgem em comum as estirpes SIT20/LAM1, apresentando uma elevada prevalência nos três sub-grupos.

Começando por analisar os dados existentes para Guiné-Bissau (SITVITWEB) revela-se uma enorme predominância do clade AFRI_1 (46,9%), seguida de EAI-SOM (11,24%), LAM9 (9,69%) e T1 (8,91%). Na amostra em estudo do sub-grupo da Guiné-Bissau observou-se que os clades de maior frequência (T1, LAM1, LAM9, LAM3, Beijing) encontram-se igualmente presentes na estrutura populacional de Portugal (T1 (20,56%), LAM1 (18,33%), LAM9 (16,39%), LAM3 (4,44%) e Beijing (1,11%)), mas em diferente predominância. Nos dados do país da Guiné-Bissau os clades LAM3, LAM1 e Beijing não são predominantes ao ponto de não existirem estirpes pertencentes a esta

linhagem no SITVITWEB para este país, revelando-se a estrutura populacional da amostra do sub-grupo obtida mais semelhante à de Portugal.

Nas estirpes da sub-população da Guiné-Bissau foram detetados um isolado AFRI_1 (3,3%) e um isolado AFRI (3,3%), mas que não estão classificados com SIT e encontram-se em percentagem muito inferior em comparação com a estrutura populacional já descrita para a Guiné-Bissau. Neste país foi identificado um grupo de estirpes único bastante relacionado geneticamente entre si, designado de família Guiné-Bissau, constituído por estirpes *M. africanum* e de linhagem AFRI [23, 69]. Estes clades encontram-se em maior prevalência na região oeste de África e principalmente na Guiné-Bissau [14]. Dado o baixo número de estirpes AFRI na amostra em estudo e o facto de a linhagem AFRI ter sido identificada em Portugal em estudos anteriores e igualmente em imigrantes, possivelmente estas estirpes poderão ter sido importados da Guiné-Bissau para Portugal [69, 74].

Os SITs do sub-grupo analisado da Guiné-Bissau encontram-se presentes na base de dados de Portugal (SITVITWEB) estando apenas dois presentes no país da Guiné-Bissau, o SIT42/LAM9 e o SIT20/LAM1.

Nas amostras em estudo ocorreu alguma prevalência do SIT1, correspondente à linhagem Beijing, estando este igualmente presente em Portugal, embora em menor frequência. Apesar da sua origem endémica na Ásia e em parte da antiga União Soviética, a rápida expansão destas estirpes pensa-se estar relacionada com vantagens adaptativas, como a resistência à vacinação BCG ou ao tratamento com os antibacilares [59]. No entanto, é raro encontrarem-se estirpes Beijing na região oeste de África onde se localizam a Guiné-Bissau e Cabo Verde, apenas se encontrando em maior frequência a norte, este e sul de África [57].

Tal representatividade pode ser explicada devido à elevada disseminação que esta linhagem tem sofrido pelo mundo nos últimos anos e principalmente na Europa. Em Portugal a sua frequência também aparenta ter subido [59, 74]. Algumas estirpes pertencentes ao SIT1 foram encontradas ao longo de África, tendo-se assumido serem resultado de migrações entre Portugal e Guiné-Bissau devido ao facto de partilharem alguns padrões RFLP com estirpes previamente caracterizadas na região portuguesa [69, 76].

Através da construção de árvores de extensão mínima para cada sub-população estudada, no sub-grupo da Guiné-Bissau verificou-se existirem dois complexos clonais, confirmando a proximidade genética das estirpes dentro da mesma linhagem, com um complexo clonal mais prevalente constituído pela linhagem LAM (SITs 20, 42, 81 e 1321) e um segundo constituído pela linhagem T (SITs 53 e 118). O clade LAM e T já tinham sido referidos como presentes na estrutura populacional do país da Guiné-Bissau e de Portugal juntamente com a sua predominância no sub-grupo [69].

No caso do sub-grupo de Angola, apesar de em diferentes percentagens, os principais clades identificados foram igualmente representados em Portugal, possuindo este as estirpes T1 (20,56%), LAM1 (18,3%) e LAM9 (16,39%) como as mais predominantes, e Angola as estirpes LAM9 (21,6%), LAM1 (18,2%) e T1 (31,8%). A estrutura populacional de Angola e Portugal parece ser bastante semelhante, com uma elevada predominância das linhagens LAM e T, sendo os resultados deste sub-grupo concordantes com a estrutura populacional recentemente descrita num estudo realizado em Luanda, Angola [4].

Existe, no entanto, o clade LAM11_ZWE (4%) no sub-grupo de Angola que não está presente nos dados nem de Angola nem de Portugal. Por terem sido detetados apenas duas estirpes, pode revelar uma potencial disseminação destas estirpes a partir dos países que fazem fronteira com Angola para este ou até mesmo para Portugal, dada a deteção deste clade por importação em estudos anteriores da população portuguesa [58, 66, 67]. Dado o facto de os restantes clades estarem presentes na estrutura

populacional de Portugal, muito provavelmente as estirpes LAM11_ZWE presentes neste sub-grupo foram importadas de Angola [77].

Verificou-se a evidência de um único complexo clonal na árvore obtida com as estirpes do sub-grupo de Angola, constituído apenas pela linhagem LAM e pelos SITs 20 e 42 em maior frequência e os SITs 17, 60, 64 e 81 em menor número. Tal resultado revela uma predominância do clade LAM sobre as outras nesta sub-população.

Em relação à sub-população de Cabo Verde, os clades obtidos são igualmente compatíveis com os dados de Portugal, com LAM1 (18,33%) e LAM9 (16,39%) em maior frequência, e Beijing (1,11%). O clade Beijing foi já previamente identificado em Portugal (SITVITWEB), não existindo, no entanto, dados para Cabo Verde.

Através da análise da árvore formada por este sub-grupo obtiveram-se dois complexos clonais, um formado pela linhagem LAM (SITs 20, 42, 17 e 1154) e outro pela linhagem Haarlem, com os SITs 1908 e 47, com LAM a possuir uma maior frequência. A linhagem Haarlem é uma das linhagens mais representadas na Europa, ocorrendo na região Africana apenas a sul.

Observaram-se as principais linhagens dos países mais próximos a Cabo Verde pertencentes à África ocidental, envolvendo a Guiné-Bissau, Senegal, Guiné e Gâmbia, no sentido de comparar a estrutura populacional destes países com os dados obtidos. Nesta região as estirpes de sub-linhagens AFRI_2, T1 e LAM9, são as mais predominantes, revelando-se bastante diferentes dos resultados obtidos do sub-grupo de Cabo Verde [78].

Analisando os principais imigrantes em Cabo Verde observa-se que estes são principalmente provenientes de Angola e Portugal, possuindo uma estrutura populacional bastante semelhante entre si e com o sub-grupo de Cabo Verde, excetuando o clade Beijing cuja origem no país se desconhece.

Uma das hipóteses que explica esta estrutura populacional baseia-se em possíveis eventos de transmissão em Portugal associados a deslocções geográficas que introduziram algumas mudanças a nível de prevalência dos génotipos. A elevada prevalência de estirpes SIT20/LAM1 e SIT42/LAM9 nas três sub-populações estudadas, que se traduz na existência de um complexo clonal comum a estas sub-populações, apoia esta hipótese. Os clades mais representados em todos os sub-grupos são igualmente representados na população de *M. tuberculosis* detetada em Portugal (SITVITWEB).

É, no entanto, necessário distinguir os complexos clonais aqui identificados do que poderão ser redes de transmissão ativa na comunidade. Os complexos clonais aqui delineados por *spoligotyping* encerram uma variabilidade genética considerável que vai para além do que pode ser considerado como estirpes epidemiologicamente relacionáveis. Apesar de se ter utilizado a diferença mínima de um *locus* para delinear complexos clonais, o facto de esta ser uma técnica com um poder discriminatório inferior impede o seu uso rotineiro na identificação de possíveis ligações epidemiológicas. Os complexos clonais assim identificados tornam-se, todavia, especialmente úteis a nível de comparação da estrutura populacional [79].

A grande maioria destas estirpes revelaram pertencer a linhagens relativamente recentes a nível filogenético, com clades como Beijing, CAS, Haarlem, LAM, S, T e X, que se acredita terem derivado de famílias ancestrais como a EAI e AFRI, e terem-se tornado atualmente nas mais dominantes, enquanto as ancestrais têm diminuído a sua frequência. Tal é explicado pelo facto de as estirpes mais recentes possuírem, possivelmente, uma maior facilidade de obter resistência aos antibióticos devido à recente evolução [80].

A região Europeia é a área com mais casos TB-MR no mundo, possuindo 15 dos 27 países com maior número de casos de TB multirresistente, e embora todos os doentes tenham acesso a tratamento a taxa de sucesso é apenas de 75% [10].

Grande parte das estirpes que circulam na Região de Saúde de Lisboa pertence a um grupo de estirpes geneticamente relacionadas designada família Lisboa, identificada na década de 90 e associada a TB-MR e TB-XDR [41, 64]. Outro clade endémico associado à TB-MR e TB-XDR em Lisboa é o clade Q1, composto por estirpes SIT1108/LAM4 [66].

A prevalência desta família na região de Lisboa tem vindo a aumentar, sendo que em 2014, 74% das estirpes TB-MR e 80% das TB-XDR detetadas faziam parte desta família, revelando a evolução desta família a nível de resistência [66].

Das nove estirpes resistentes (quatro TB-MR) genotipadas por MIRU-VNTR *24 loci* foram encontrados três *clusters* genéticos constituídos por duas estirpes cada.

Dois dos três *clusters* identificados pertencem ao clade Lisboa3 (Lisboa3-A e Lisboa3-B) e são provenientes de doentes de diferentes nacionalidades, revelando a presença desta família endémica em Portugal nesta população de imigrantes [66].

Na caracterização da amostra em estudo não se encontraram estirpes TB-MR pertencente ao clade Q1 entre os imigrantes, podendo revelar que este, apesar de também associado a TB-MR e TB-XDR na Região de Saúde de Lisboa, não aparenta ter ainda penetrado nestas comunidades com o sucesso do clade Lisboa3.

O facto de os resultados obtidos por MIRU-VNTR *24 loci* serem compatíveis com a família Lisboa3 característica de Portugal, e acrescido da similaridade de resultados entre as estirpes dos vários sub-grupos e de Portugal, nomeadamente a predominância da linhagem LAM e SITs 20 e 42 em todas as árvores obtidas, torna difícil ponderar a migração para a região portuguesa pelos doentes já portadores da doença. Pode afirmar-se que provavelmente a TB se propagou por entre as sub-populações analisadas de imigrantes em Portugal e não que os imigrantes teriam trazido consigo a doença.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, foram analisadas várias estirpes de imigrantes provenientes de diferentes países PALOP com o objetivo de determinar se estes foram infetados em Portugal ou nos seus países, e se as estirpes presentes atualmente em Portugal tiveram origem em ancestrais dos países analisados.

Primeiramente caracterizaram-se as estirpes analisando as características associadas aos doentes, nomeadamente a idade e o sexo, sendo o sexo masculino com mais casos em Portugal e nos dados analisados. A faixa etária nos imigrantes de Guiné-Bissau foram os jovens adultos (15-24 anos), sendo a faixa etária mais nova detetada neste estudo. A nível de Cabo Verde, ocorreu uma incidência em idades mais avançadas (45-54 anos), provocadas potencialmente por reinfeções de estirpes contraídas antes. Angola apresenta uma incidência de TB em faixas etárias diferentes consoante o sexo, com os Homens a contraírem infeção mais tarde (35-44 anos) do que as mulheres (25-34 anos). Sugere-se que seja realizado um estudo com maior número de isolados para que seja possível confirmar estes dados devido à amostra em estudo não ser representativa.

As estirpes provenientes de São Tomé e Príncipe e Moçambique foram apenas caracterizadas, não tendo sido os resultados analisados e discutidos devido ao baixo número de amostras. Os sub-grupos Guiné-Bissau, Angola e Cabo Verde foram examinados através da comparação dos resultados com Portugal e com os respetivos países de origem, complementando com a formação de árvores de extensão mínima de modo a ilustrar a estrutura populacional entre as estirpes.

A Guiné-Bissau revelou-se o sub-grupo com maior diversidade, possuindo vários clades com maior frequência e a formação de dois complexos clonais de linhagens diferentes (LAM, T) na árvore formada por estas estirpes. O sub-grupo de Angola obteve a estrutura populacional mais semelhante com a de Portugal, com LAM1, LAM9 e T1 como as mais predominantes e apenas a formação de um complexo clonal constituído por estirpes LAM. No caso da sub-população de Cabo Verde não foi possível a comparação com o próprio país por não possuir dados, no entanto apresentou uma frequência elevada em linhagens igualmente elevadas em Portugal. A importação de duas estirpes AFRI nas estirpes do sub-grupo da Guiné-Bissau e duas estirpes do clade LAM_ZWE nas estirpes do sub-grupo de Angola, foi comprovada dada a baixa frequência e a identificação destes clades em Portugal por importação em outros estudos [69, 74, 77].

Todos os sub-grupos analisados tiveram em comum na árvore resultante o grupo clonal LAM, constituído sempre pelo SITs 20 e 42 presentes em elevada frequência. As estirpes SIT20/LAM1 e a linhagem T mantiveram-se presentes em todos os sub-grupos. Estas linhagens são das mais representadas em Portugal nos dados do SITVITWEB, existindo uma semelhança entre a estrutura populacional das estirpes analisadas e a de Portugal.

A linhagem LAM apesar de ser bastante frequente em África, também é um dos principais clades detetados em Portugal e nas estirpes analisadas [57]. Na população portuguesa os clades LAM1 e LAM9 estão associados a dois clades filogenéticos designados família Lisboa3 e Q1, identificados por MIRU-VNTR e associados a estirpes TB-MR e TB-XDR [66].

Das nove estirpes identificadas com resistência, foram detetados dois *clusters* constituídos por estirpes TB-MR pertencentes à família Lisboa3-A e Lisboa3-B, provenientes de imigrantes de nacionalidades diferentes. O clade Lisboa3 possui uma deleção RD174 e RDRI0, apenas identificadas em Portugal e na América do Sul e encontrados muito poucos casos em África [67].

Os resultados deste estudo mostram que a estrutura populacional das estirpes analisadas é bastante similar à população presente em Portugal, com a família Lisboa3 presente em estirpes resistentes, indicando que muito provavelmente a maioria destes resultados são mais influenciados pela TB

endêmica da população portuguesa do que pelo seu país de origem, pelo que estes imigrantes possivelmente foram infetados em Portugal, com a importação de apenas alguns casos de estirpes africanas.

A família Lisboa continua a manter a sua predominância na estrutura populacional de Portugal, revelando-se preocupante pela sua associação com resistências a antibacilares de primeira e de segunda linha. Nesta análise verificou-se a presença deste clade num grupo de imigrantes provenientes de países PALOP, demonstrando não a transmissão de estirpes de África para Portugal, mas a disseminação desta família pelo país e por estes doentes.

A capacidade de obter resistências aos antibacilares tal como o perfil de transmissão de *M. tuberculosis* podem ser influenciados pelas características genéticas e a enorme capacidade de adaptação evolucionária das estirpes. É necessário compreender as relações e a dinâmica das linhagens de estirpes MTBC através da caracterização molecular dos genótipos, de maneira a desvendar a sua distribuição pelo mundo, o sucesso da sua disseminação e conseguir prevenir a sua transmissão e principalmente o desenvolvimento de resistências [59, 81].

6. REFERÊNCIAS

1. DGS: **Infeção por VIH, SIDA e Tuberculose em números – 2015**. In. Portugal: 44-58; 2015.
2. Parsons SDC, Drewe JA, Pittius NCGv, Warren RM, Helden PDv: **Novel Cause of Tuberculosis in Meerkats, South Africa**. *Emerging Infectious Diseases* 2013, **19**:2004-2007.
3. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Sinderen Dv: **Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum**. *Microbiology and molecular biology reviews* 2007, **71**:495-548.
4. João Perdigão, Sofia Clemente, Jorge Ramos, Pedro Masakidi, Diana Machado, Carla Silva, Isabel Couto, Miguel Viveiros, Nuno Taveira, Portugal I: **Genetic diversity, population structure and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in Luanda, Angola**. *Clinical Microbiology and Infection* 2016.
5. Barnes PF, Cave MD: **Molecular epidemiology of tuberculosis**. *The New England Journal of Medicine* 2003, **349**(12):1149-1156.
6. Bansal-Mutalik R, Nikaido H: **Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 2014, **111**(13):4958-4963.
7. WHO: **Global tuberculosis control**. In: *WHO Report*. 2015.
8. Kasule GW, Kateete DP, Joloba ML: **Mycobacterium tuberculosis Uganda II is more susceptible to rifampicin and isoniazid compared to Beijing and Delhi/CAS families**. *BMC Infectious Diseases* 2016, **16**.
9. Lange C, Abubakar I, Alffenaar J-WC, Bothamley G, Caminero JA, Carvalho ACC, Chang K-C, Codecasa L, Correia A, Crudu V *et al*: **Management of patients with multidrug-resistant/ extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement**. *European Respiratory Journal* 2013, **44**:23-63.
10. **Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe**. In. Edited by Europe WROf. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 2016.
11. Duarte R: **Programa Nacional para a infeção VIH/SIDA e Tuberculose**. In.: Raquel Duarte(Comunicação pessoal); 2015.
12. Fronteiras SdEe: **Relatório de Imigração, Fronteiras e Asilo 2015**. In. Edited by Fronteiras SdEe. Oeiras: Serviço de Estrangeiros e Fronteiras; 2016.
13. Rabna P, Ramos J, Ponce G, Sanca L, Mané M, Armada A, Machado D, Vieira F, Gomes VF, Martins E *et al*: **Direct Detection by the Xpert MTB/RIF Assay and Characterization of Multi and Poly DrugResistant Tuberculosis in Guinea-Bissau, West Africa**. *PLOS ONE* 2015.
14. Asante-Poku A, Otchere ID, Osei-Wusu S, Sarpong E, Baddoo A, Forson A, Laryea C, Borrell S, Bonsu F, Hattendorf J *et al*: **Molecular epidemiology of Mycobacterium africanum in Ghana**. *BMC Infectious Diseases* 2016, **16**:385.
15. Voskuila MI, Visconti KC, Schoolnik GK: **Mycobacterium tuberculosis gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy**. *Tuberculosis* 2004, **84**:218-227.
16. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC: **Towards a Phylogeny and Definition of Species at the Molecular Level within the Genus Mycobacterium** *International Journal of Systematic Bacteriology* 1990, **40**:323-330.
17. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, III CEB *et al*: **Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence**. *Nature* 1998, **393**:537-544.
18. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA: **Medical Microbiology**, 7 edn. Philadelphia: Elsevier; 2013.
19. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP: **Brock biology of microorganisms**, 13 edn. San Francisco: Pearson; 2012.
20. Markova N, Slavchev G, Michailova L: **Unique biological properties of Mycobacterium tuberculosis L-form variants: impact for survival under stress**. *International Microbiology* 2012, **15**:61-68.
21. Liu J, III CEB, Besra GS, Nikaido H: **Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall**. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**:29545-29551.
22. Kaiser F, Cook D, Papoutsopoulou S, Rajsbaum R, Wu X: *J Exp Med* 2009, **206**:1863.
23. Koivula T, Ekman M, Leitner T, Lofdahl S, Ghebremicahel S, Mostowy S, Behr MA, Svenson SB, Kallenius G: **Genetic characterization of the Guinea-Bissau family of Mycobacterium tuberculosis complex strains**. *Microbes Infect* 2004, **6**(3):272-278.
24. EH. R: **Anonymous mycobacteria in pulmonary disease**. *The Medical clinics of North America* 1959, **43**(1):273-290.
25. Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-i, Ludwig W, Whitman WB: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 5, 2 edn. Athens: Springer; 2012.
26. Silva CMCd: **Caracterização de estirpes Mycobacterium tuberculosis da família Lisboa-Análise de Regiões de Diferença e Single Nucleotide Polymorphisms**. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2009.
27. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N *et al*: **Tuberculosis in seals caused by a novel member of the**

- Mycobacterium tuberculosis complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, **53**:1305–1314.
28. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L: **Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003, **53**:1785–1789.
29. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K *et al*: **A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 2002, **99**:3684–3689.
30. Tortoli E: **Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*.** *Clinical Microbiology Reviews* 2014, **27**:727-752.
31. Niemann, E R, S. R-G: **Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*.** *Journal of Clinical Microbiology* 2000, **38**:152-157.
32. Soolingen DV, Zanden AGMVD, Haas PEWD, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraïne NA, Portaels F, Kolk AHJ, Kremer K, Embden JDAV: **Diagnosis of *Mycobacterium microti* Infections among Humans by Using Novel Genetic Markers.** *Journal of Clinical Microbiology* 1998, **36**:1840-1845.
33. Loeffler SH, Lisle GWd, Neill MA, Collins DM, Price-Carter M, Paterson B, Crews KB: **The seal tuberculosis agent, *Mycobacterium pinnipedii*, infects domestic cattle in New Zealand: Epidemic Factors and DNA strain typing.** *Journal of Wildlife Diseases* 2014, **50**:180-187.
34. Jonsson J, Hoffner S, Berggren I, Bruchfeld J, Ghebremichael S, Pennhag A, Groenheit R: **Comparison between RFLP and MIRU-VNTR Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Stockholm 2009 to 2011.** *PLOS ONE* 2014, **9**(4).
35. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, García JSy, Morbidoni HR, Santangelo MdP, Cataldi AA, Bigi F: **Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** *Virulence* 2013, **4**(1):3-66.
36. Knechel NA, RN, MSN, ACNP: **Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis.** *Critical Care Nurse* 2009, **29**.
37. LS M, Rajni.: **Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.** *The FEBS journal* 2010, **277**(11):2416-2427.
38. BM S, AA F, IM. O: **Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*.** *Immunology* 1999, **98**(3):324-328.
39. T L, A D, I B, B S, VØ. T, AB. A: **Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection.** *The Journal of infectious diseases* 2002, **185**(3):401-404.
40. Turner J: **Growing old and immunity to bacteria.** In: *The Immune Response to Infection*. Edited by Kaufman SHE, Rouse BT, Sacks DL. Washington: American Society for Microbiology; 2011: 413–423.
41. João Perdigão, Macedo R, João I, Fernandes E, Brum L, Portugal I: **Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective.** *Microbiology Drug Resistance* 2008, **14**(2):133-143.
42. Davies J, Davies D: **Origins and evolution of antibiotic resistance.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2010, **74**(3):417-433.
43. WHO: **Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis.** In: WHO. Edited by Rich M, Jaramillo E. Geneva; 2014.
44. Shim TS, Jo KW: **Medical treatment of pulmonary multidrug-resistant tuberculosis.** *Infect Chemother* 2013, **45**(4):367-374.
45. Zhang Y, Yew WW: **Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2009, **13**:1320–1330.
46. Perdigao J, Macedo R, Malaquias A, Ferreira A, Brum L, Portugal I: **Genetic analysis of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Lisbon, Portugal.** *J Antimicrob Chemother* 2010, **65**(2):224-227.
47. Telenti, M. I: **Drug-resistant tuberculosis: what do we do now?** *Drugs* 2000, **59**:171-179.
48. Perdigao J, Macedo R, Silva C, Machado D, Couto I, Viveiros M, Jordao L, Portugal I: **From multidrug-resistant to extensively drug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: the stepwise mode of resistance acquisition.** *J Antimicrob Chemother* 2013, **68**(1):27-33.
49. Perdigao J, Macedo R, Joao I, Fernandes E, Brum L, Portugal I: **Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective.** *Microb Drug Resist* 2008, **14**(2):133-143.
50. MA K, MA D, JJ. C: **Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis.** *Molecular Cell* 2010, **37**(3):311–320.
51. Viedmaa DGd, Mokrousovc I, Rastogid N: **Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2011, **29**.
52. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Agterveld Mv, Soolingen Dv, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M *et al*: **Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology.**

- Journal of Clinical Microbiology* 1997, **35**:907–914.
53. Embden JDAV, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM *et al*: **Strain Identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology**. *Journal of Clinical Microbiology* 1993, **31**:406–409.
 54. Schürch AC, Soolingen Dv: **DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis: From phage typing to whole-genome sequencing**. *Infection, Genetics and Evolution* 2012, **12**:602–609.
 55. Said HM, Kushner N, Omar SV, Dreyer AW, Koornhof H, Erasmus L, Gardee Y, Rukasha I, Shashkina E, Beylis N *et al*: **A Novel Molecular Strategy for Surveillance of Multidrug Resistant Tuberculosis in High Burden Settings**. *PLOS ONE* 2015, **11**(1).
 56. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V *et al*: **Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology**. *BMC Microbiology* 2006, **6**(23).
 57. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N: **SITVITWEB – A publicly available international multimer database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology**. *Infection, Genetics and Evolution* 2012, **12**:755–766.
 58. Sofia O Viegas, Adelina Machado, Ramona Groenheit, Solomon Ghebremichael, Alexandra Pennhag, Paula S Gudo, Zaina Cuna, Paolo Miotto, Véronique Hill, Tatiana Marrufo *et al*: **Molecular diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mozambique**. *BioMed Central* 2010, **10**.
 59. Kristin Kremer, Judith R. Glynn, Troels Lillebaek, Stefan Niemann, Natalia E. Kurepina, Barry N. Kreiswirth, Pablo J. Bifani, Soolingen. Dv: **Definition of the Beijing/W Lineage of Mycobacterium tuberculosis on the Basis of Genetic Markers**. *Journal Of Clinical Microbiology* 2004, **49**:4040–4049.
 60. Small PM: **Making Tuberculosis Care and Control Easy Again**. *Am J Respir Crit Care Med* 2016, **194**(5):537–538.
 61. Philip Supply, Caroline Allix, Sarah Lesjean, Mara Cardoso-Oelemann, Sabine Rüsch-Gerdes, Eve Willery, Evgueni Savine, Petra de Haas, Henk van Deutekom, Solvig Roring *et al*: **Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis**. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, **44**:4498–4510.
 62. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Soolingen DV, Locht C: **Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units**. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, **39**:3563–3571.
 63. Roetzer A, Diel R, Kohl TA, ckert CR, bel UN, Blom J, Wirth T, Jaenicke S, Schuback S, sch-Gerdes SR *et al*: **Whole Genome Sequencing versus Traditional Genotyping for Investigation of a Mycobacterium tuberculosis Outbreak: A Longitudinal Molecular Epidemiological Study**. *PLOS Medicine* 2013, **10**(2).
 64. Portugal I, Covas MJ, Brum L, Viveiros M, Ferrinho P, Moniz-Pereira J, David H: **Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis**. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 1999, **3**:207–213.
 65. João Perdigão, R. Macedo, C. Silva, C. Pinto, C. Furtado, L. Brum, Portugal. I: **Tuberculosis drug-resistance in Lisbon, Portugal: a 6-year overview**. *Clinical Microbiology and Infection* 2010, **17**:1397–1402.
 66. João Perdigão, Hugo Silva, Diana Machado, Rita Macedo, Fernando Maltez, Carla Silva, Luisa Jordao, Isabel Couto, Kim Mallard, Francesc Coll *et al*: **Unraveling Mycobacterium tuberculosis genomic diversity and evolution in Lisbon, Portugal, a highly drug resistant setting**. *BMC Genomics* 2014.
 67. Igor Mokrousov, Anna Vyazovaya, Tomotada Iwamoto, Yuriy Skiba, Ilva Pole, Svetlana Zhdanova, Kentaro Arikawa, Viacheslav Sinkov, Tatiana Umpeleva, Violeta Valcheva *et al*: **Latin-American-Mediterranean lineage of Mycobacterium tuberculosis: Human traces across pathogen’s phylogeography**. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2016, **99**(133–143).
 68. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C: **Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome**. *Mol Microbiol* 2000, **36**(3):762–771.
 69. Ramona Groenheit, Solomon Ghebremichael, Jenny Svensson, Paulo Rabna, Raffaella Colombatti, Fabio Riccardi, David Couvin, Véronique Hill, Nalin Rastogi, Tuija Koivula *et al*: **The Guinea-Bissau Family of Mycobacterium tuberculosis Complex Revisited**. *PLOS ONE* 2011, **6**(4).
 70. Vries Gd, Hest NAHV, Baars HWM, Šebek MMGG, Richardus JH: **Factors associated with the high tuberculosis case rate in an urban area**. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2010, **14**(7):859–865.
 71. Xinyu Zhang, Aase B. Andersen, Troels Lillebaek, Zaza Kamper-Jørgensen, Vibeke Østergaard Thomsen, Karin Ladefoged, Carl F. Marrs, Lixin Zhang, Yang. Z: **Effect of Sex,**

- Age, and Race on the Clinical Presentation of Tuberculosis: A 15-Year Population-Based Study.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011, **85**(Pathogenesis of Extrapulmonary Tuberculosis):285–290.
72. Meulen Vt, Fernandes A, Gottstein B, Krause G, Lichtner M, McLean A, Netea M, Perelman J, Russo G, Saroglou G *et al*: **Impact of migration on infectious diseases in Europe.** In. London; 2007.
73. Martien W. Borgdorff, Nico J. D. Nagelkerke, Petra E.W. de Haas, Soolingen. Dv: **Transmission of Mycobacterium tuberculosis Depending on the Age and Sex of Source Cases.** *American Journal of Epidemiology* 2001, **154**(Age and Tuberculosis Transmission):934-943.
74. Suzana David, Vanessa Barros, Clara Portugal, Abílio Antunes, Ângela Cardoso, Ana Calado, Luísa Sancho, Sousa. JGd: **Update on the Spoligotypes of Mycobacterium tuberculosis complex isolates from the Fernando Fonseca Hospital (Amadora-Sintra, Portugal).** *Revista Portuguesa de Pneumologia* 2005, **XI**:513-531.
75. Julie Millet, Shirematee Baboolal, Patrick Eberechi Akpaka, Dottin Ramoutar, Rastogi. N: **Phylogeographical and molecular characterization of an emerging Mycobacterium tuberculosis clone in Trinidad and Tobago.** *Infection, Genetics and Evolution* 2009, **9**:1336-1344.
76. Kallenius G, Koivula T, Ghebremichael S, Hoffner SE, Norberg R, Svensson E, Dias F, Marklund BI, Svenson SB: **Evolution and clonal traits of Mycobacterium tuberculosis complex in Guinea-Bissau.** *Journal of Clinical Microbiology* 1999, **37**(12):3872-3878.
77. Suzana David, Diana Raposo Ribeiro, Abílio Antunes, Clara Portugal, Luísa Sancho, Sousa. JGd: **Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of Mycobacterium tuberculosis isolates in Portugal.** *Infection, Genetics and Evolution* 2007, **7**:609-617.
78. Florian Gehre, Samrat Kumar, Lindsay Kendall, Mebrat Ejo, Oumie Secka, Boatema Ofori-Anyinam, Emmanuel Abatih, Martin Antonio, Dirk Berkvens, Jong. BCd: **A Mycobacterial Perspective on Tuberculosis in West Africa: Significant Geographical Variation of M. africanum and Other M. tuberculosis Complex Lineages.** *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016, **10**.
79. Bouklata N, Supply P, Jaouhari S, Charof R, Seghrouchni F, Sadki K, El Achhab Y, Nejjari C, Filali-Maltouf A, Lahlou O *et al*: **Molecular Typing of Mycobacterium Tuberculosis Complex by 24-Locus Based MIRU-VNTR Typing in Conjunction with Spoligotyping to Assess Genetic Diversity of Strains Circulating in Morocco.** *PLOS One* 2015, **10**(8):e0135695.
80. Florian Gehre, Mebrat Ejo, Kristina Fissette, Pim de Rijk, Cécile Uwizeye, Elie Nduwamahoro, Odin Goovaerts, Dissou Affolabi, Martin Gninafon, Fanny M. Lingoupou *et al*: **Shifts in Mycobacterial Populations and Emerging Drug-Resistance in West and Central Africa.** *PLOS ONE* 2014, **9**.
81. Thierry Wirth, Falk Hildebrand, Caroline Allix-Béguec, Florian Woßlbeling, Tanja Kubica, Kristin Kremer, Dick van Soolingen, Sabine Rußsch-Gerdes, Camille Locht, Sylvain Brisse *et al*: **Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium tuberculosis Complex.** *PLoS Pathogens* 2008, **4**(9).

7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1 – DILUIÇÃO DOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Tabela 7.1 – Diluição dos oligonucleótidos utilizados no *Spoligotyping* (Adaptado de Suplly *et al.*, 2006[61]).

	Diluição 1					Diluição 2				
	stock (pmoL/ μ L)	volume stock (μ L)	volume dH ₂ O (μ L)	diluição 1 (pmoL/ μ L)	volume diluição 1 (μ L)	volume diluição 1 (μ L)	volume de NaHCO ₃ (μ L)	volume final diluição 2 (μ L)	diluição 2 (pmoL/168 μ L)	diluição 2 (pmoL/150 μ L)
SP1	100	2,5	47,5	5,0	50	9,6	162,4	172	48,0	41,9
SP2	100	7,2	42,8	14,4	50	2,8	165,2	168	40,3	36,0
SP3	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP4	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP5	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP6	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP7	100	5	45	10,0	50	8,96	159,04	168	89,6	80,0
SP8	100	16	34	32,0	50	5,6	162,4	168	179,2	160,0
SP9	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP10	100	3	47	6,0	50	2,8	165,2	168	16,8	15,0
SP11	100	6	44	12,0	50	2,8	165,2	168	33,6	30,0
SP12	100	12	38	24,0	50	2,8	165,2	168	67,2	60,0
SP13	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP14	100	6	47	12,0	50	2,8	165,2	168	33,6	30,0
SP15	100	19	44	38,0	50	8	160	168	304,0	271,4
SP16	100	2,5	38	5,0	50	5,6	162,4	168	28,0	25,0
SP17	100	20	47,5	40,0	50	2,8	165,2	168	112,0	100,0
SP18	100	2,5	44	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP19	100	2,5	31	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP20	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP21	100	16	30	32,0	50	8,4	159,6	168	268,8	240,0
SP22	100	2,5	47,5	5,0	50	5,6	162,4	168	28,0	25,0
SP23	100	10	40	20,0	50	2,8	165,2	168	56,0	50,0
SP24	100	10	40	20,0	50	2,8	165,2	168	56,0	50,0
SP25	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP26	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP27	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP28	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP29	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP30	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	1665,2	168	14,0	12,5
SP31	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP32	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP33	100	20	30	40,0	50	2,8	165,2	168	112,0	100,0
SP34	100	5	45	10,0	50	8,96	159,04	168	89,6	80,0
SP35	100	2,5	47,5	5,0	50	5,6	162,4	168	28,0	25,0
SP36	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP37	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP38	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP39	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP40	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP41	100	2,5	47,5	5,0	50	2,8	165,2	168	14,0	12,5
SP42	100	5	45	10,0	50	2,8	165,2	168	28,0	25,0
SP43	100	16	34	32,0	50	2,8	165,2	168	89,6	80,0

7.2 ANEXO 2 – PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA *SPOLIGOTYPING*

Antes de se iniciar a técnica é necessário preparar todas as soluções necessárias.

Para a preparação de 1 litro de 20 x SSPE adicionou-se 175,3 g de NaCl; 27,6 g de NaH₂PO₄; e 7,4 g de EDTA a 800 mL de água bidestilada, ajustando-se o pH posteriormente para 7.4. Perfez-se o volume da solução para os 1000 mL e autoclavou-se.

Para a preparação de 200 ml de 10% SDS adicionou-se 20 g de SDS em 200 mL de água bidestilada.

Na solução de 1000 mL EDTA a 20 mM adicionou-se 7,4 g de EDTA a 800 mL de água bidestilada, ajustou-se o pH para 7.4 e perfez-se o volume, levando posteriormente a autoclavar.

Através da solução 20x SSPE preparou-se 500 mL de 2x SSPE; e juntamente com o 10% SDS preparou-se 1 L de 2x SSPE / 0,1% SDS e 1 L de 2x SSPE / 0,5% de SDS.

7.3 ANEXO 3 – SEQUÊNCIAS DE *PRIMERS*Tabela 7.2 – Sequência de *Primers* utilizados para realização do PCR por MIRU-VNTR (adaptado de Suplly et al., 2006[61]).

Multiplex	Locus	Tamanho da unidade repetitiva (pb)	Pares de <i>primers</i> (de 5' para 3' com marcação indicada*)
Mix A	580	MIRU 04	77 GCGCGAGAGCCCCGAAGTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	2996	MIRU 26	51 TAGGTCTACCGTGCAGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)
	802	MIRU 40	54 GGGTTGTGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
Mix B	960	MIRU 10	53 GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
	1644	MIRU 16	53 TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)
	3192	MIRU 31	53 ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
Mix C	154	MIRU 02	53 TGGACTTGACGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAT (FAM)
	2531	MIRU 23	53 CTGTGATGGCCGCAACAAAACG (VIC) AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTGTC
	4348	MIRU 39	53 CTGTGATGGCCGCAACAAAACG (NED) AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTGTC
Mix D	2059	MIRU 20	77 TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCGACCAGGTAATTGTA
	2687	MIRU 24	54 CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)
	3007	MIRU 27	53 TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)
Mix E	424	MIRU 42	51 CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC (FAM)
	577	MIRU 43	58 CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTTGTA
	2165	ETR A	75 AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT
Mix F	2401	MIRU 47	58 CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
	3690	MIRU 52	58 CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
	4156	MIRU 53	59 TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)
Mix G	2163b	QUB-11b	69 CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)
	1955		57 AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
	4052	QUB-26	111 AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED) CGGCCGTGCCGCGCCAGGTCCTTCCCGAT
Mix H	2347	MIRU 46	57 GCCAGCCCGCTGCATAAACCT (FAM) AGCCACCGGTGTGCCTTGTATGAC
	2461	MIRU 48	57 ATGGCCACCGATACCGTTCAGT (VIC) CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
	3171	MIRU 49	54 GGTGCGCACCTGTCCAGATAA (NED) GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC

* FAM (6-carboxifluoresceína); VIC e NED não têm constituição conhecida publicamente.