



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS

Ana Roberta Fusco da Costa

**DIVERSIDADE GENÉTICA DAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS IDENTIFICADAS EM LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA PARA O
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE NA REGIÃO NORTE**

Belém – Pará

2009

Ana Roberta Fusco da Costa

**DIVERSIDADE GENÉTICA DAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS IDENTIFICADAS EM LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA PARA O
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE NA REGIÃO NORTE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Área de Concentração: Patologia das Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Corvelo

Co-orientadora: Profa. Dra. Karla Valéria Lima

Belém – Pará

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical

Costa, Ana Roberta Fusco da

Diversidade genética das espécies de micobactérias não tuberculosas identificadas em laboratório de referência para o diagnóstico da tuberculose na Região Norte / Ana Roberta Fusco da Costa; orientadora, Tereza Cristina Corvelo. — 2009.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2009.

1. Pulmões - Doenças. 2. Pulmões - Diagnóstico molecular. I. Corvelo, Tereza Cristina, orient. II. Título.

CDD - 22. ed. 616.24098115

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA ROBERTA FUSCO DA COSTA

DIVERSIDADE GENÉTICA DAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS IDENTIFICADAS EM LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE NA REGIÃO NORTE

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais. Área de Concentração: Patologia das Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Corvelo

Co-orientadora: Profa. Dra. Karla Valéria Lima

Aprovada em: Belém, 20 de fevereiro de 2009

Banca Examinadora:

Dra. Ana Cecília Cruz

Instituto Evandro Chagas – IEC

Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro

Instituto Evandro Chagas – IEC

Dra. Karla Valéria Batista Lima

Instituto Evandro Chagas – IEC

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Tereza Cristina de Oliveira Corvelo, agradeço profundamente pela compreensão, pela confiança, pelos conselhos e pela ajuda em todas as etapas percorridas até a finalização deste trabalho.

Agradeço especialmente a Professora Dra. Karla Valéria Batista Lima, minha co-orientadora e responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas (SABMI/IEC), pelo apoio a este trabalho. Agradeço também pelo estímulo e constante exemplo de perseverança e profissionalismo. Mais ainda, agradeço por todos estes anos de convivência, e pela amizade e confiança recebidas.

Agradeço a Dra. Maria Luiza Lopes, chefe da SABMI/IEC, por permitir a realização deste projeto dentro da SABMI. Por ceder as cepas de micobactérias e acreditar no trabalho. Nada disto teria sido possível sem a presença dela. Agradeço também pela força em aceitar este desafio e por sua ajuda em todos os momentos.

Ao Dra. Elisabeth Santos, diretora do Instituto Evandro Chagas, por possibilitar o desenvolvimento deste projeto e pelo apoio a esta e outras iniciativas de pesquisa que reafirmam o prestígio do IEC como laboratório de saúde pública.

Agradeço a Professora Dra. Maísa Silva dos Santos pela importante ajuda para execução do projeto, na utilização de programas de bioinformática, contribuição e revisão do trabalho escrito.

Ao Professor Dr. Artur Silva, por suas contribuições imprescindíveis com seus extensos conhecimentos em genética e biologia molecular.

Agradeço a Emilyn Costa Conceição e José Góes dos Santos pela inestimável ajuda no trabalho técnico de bancada. A colaboração deles, marcada pela

competência e profissionalismo, foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais, Maria das Graças Fusco da Costa e Vespasiano Pantoja da Costa, pelo amor, pelo grande incentivo para os estudos e pela presença em todos os momentos importantes de minha vida.

Aos meus irmãos Adriano, Tomaz e Rosana, e cunhado Robson, pela amizade, amor e incentivo para progredir sempre.

Ao meu noivo, Reynaldo Lima, pela amizade, compreensão e apoio nas decisões importantes de minha vida. Pelo incentivo e trabalho exemplar na saúde pública.

Aos meus amigos da SABMI, Andréa, Natália, Sirene, Elizandra, Edimilson, Oneide, Madalena, Odete, Caetano, Cláudio, Arnaldo, Elys, Jeann, Renée.

Aos meus amigos de toda hora: Jocilene, Sarah, Romina, Ismari, Ana, Fábio e João.

Ao Núcleo de Medicina Tropical-UFPA pela oportunidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa.

“Una de las características más interesantes que posee el trabajo científico es su flexibilidad para abandonar marcos conceptuales restrictivos a la luz de información más completa.”

David Romero

RESUMO

Nos últimos anos tem sido observado um aumento de relatos de infecções associadas às micobactérias não tuberculosas (MNT). No entanto, o conhecimento da frequência e as espécies envolvidas nas infecções pulmonares no Brasil são limitados. Neste trabalho foi avaliada a ocorrência de espécies de MNT isoladas no Laboratório de Micobactérias do Instituto Evandro Chagas, Laboratório de Regional de Saúde Pública da Região Norte. Foram analisadas todas as MNT isoladas de espécimes clínicos pulmonares e não pulmonares de indivíduos com infecção, de acordo com os critérios da *American Thoracic Society* e Ministério da Saúde entre os anos de 2004 a 2007. As MNT foram caracterizadas por *PCR-restriction analysis* (PRA-*hsp65*) e sequenciamento dos genes do RNAr 16S, *hsp65*, *rpoB*. Foram identificados 51 indivíduos com infecção pulmonar, sendo as seguintes MNT envolvidas: *M. abscessus* (n=2), *M. bolletii* (n=4), *M. massiliense* (n=9), *M. avium* (n=5), *M. colombiense* (n=5), *M. fortuitum* (n=4), *M. simiae* (n=2), *M. interjectum* (n=4), *M. intracellulare* (n=5), *M. kansasii* (n=1), *M. scrofulaceum* (n=1) e *M. terrae* (n=1). Em oito indivíduos foram isoladas MNT não identificadas ao nível de espécie, podendo representar nova entidade taxonômica pertencente ao complexo *M. simiae*. O presente estudo descreveu a diversidade de MNT isoladas de espécimes clínicos pulmonares no estado do Pará, Região Amazônica Brasileira. O achado de casos infecções pulmonares diagnosticados e tratados sem sucesso por vários meses como tuberculose apontam para a necessidade de isolamento e identificação da micobactéria envolvida antes estabelecimento de falência terapêutica.

Palavras-chave: micobactérias não tuberculosas, infecção pulmonar, identificação molecular, diversidade de espécies.

ABSTRACT

Recent years has seen an increase in reports of infections associated with nontuberculous mycobacteria (NTM). However, knowledge of the frequency and the species involved in pulmonary and non-pulmonary infections in Brazil are limited. We evaluated the occurrence of species of NTM isolated Mycobacteria Laboratory of the Instituto Evandro Chagas, Regional Laboratory of Public Health of the North. We analyzed all NTM isolates from pulmonary clinical specimens of individuals with infection, according to the criteria of the American Thoracic Society and the Department of Health between the years 2004 to 2007. The NTM were characterized by PCR-restriction analysis (PRA-*hsp65*) and 16S rRNA, *hsp65* e *rpoB* genes sequencing. We identified 51 patients with infection caused by NTM, which the *M. abscessus* (n=2), *M. bolletii* (n=4), *M. massiliense* (n=9), *M. avium* (n=5), *M. colombiense* (n=5), *M. fortuitum* (n=4), *M. simiae* (n=2), *M. interjectum* (n=4), *M. intracellulare* (n=5), *M. kansasii* (n=1), *M. scrofulaceum* (n=1) e *M. terrae* (n=1) species that involved in lung infection. In eight individuals the NTM isolates were not identified at the species level, which may represent new taxonomic entity from *M. simiae* complex. This study describes the diversity of NTM isolated from pulmonary clinical specimens in the state of Pará, Brazilian Amazon Region. The finding cases of lung infections diagnosed and treated unsuccessfully for several months as tuberculosis suggest the need for isolation and identification of mycobacteria involved before establishment of treatment failure.

Key-words: nontuberculous mycobacteria; pulmonary infection; molecular identification; species diversity.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Fotomicrografia de micobactéria corada pela técnica de Ziehl-Neelsen | 18 |
| Figura 2. | Estrutura da parede celular de micobactéria | 19 |
| Figura 3. | Esquema de interação entre macrófago e células T/NK na infecção por micobactérias | 27 |
| Figura 4. | Raio-X de tórax de um indivíduo com doença cavitária destrutiva devido a MAC | 30 |
| Figura 5. | Aspecto da infecção cutânea causada por MNT | 31 |
| Figura 6 | Doença do globo ocular por MNT | 32 |
| Figura 7. | Linfadenite cervical causada por micobactéria | 33 |
| Figura 8. | Aspecto das colônias escotocromogênicas de <i>M. kansasii</i> | 37 |
| Figura 9. | Fluxograma dos procedimentos laboratoriais para identificação de MNT | 59 |
| Figura 10. | Dendograma das sequências do gene do RNAr 16S de micobactérias não tuberculosas construído através do método neighbor-joining utilizando o modelo de correção de distância Kimura-2-parâmetros | 62 |
| Figura 11. | Dendograma das sequências do gene <i>hsp65</i> de micobactérias não tuberculosas construído através do método neighbor-joining utilizando o modelo de correção de distância Kimura-2-parâmetros .. | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Classificação fenotípica das micobactérias | 21 |
| | Classificação das micobactérias de acordo com o risco para | |
| Tabela 2. | infecção em humanos | 22 |
| Tabela 3. | Provas bioquímicas para identificação de micobactérias | 37 |
| | Rede hierarquizada de execução de exames para o diagnóstico e | |
| Tabela 4. | controle da tuberculose e outras micobactérias | 46 |
| | Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências | |
| Tabela 5. | parciais dos genes de RNAr 16S, <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i> | 54 |
| Tabela 6. | Seqüências do GenBank usadas para comparações | 58 |
| | Alterações de aminoácidos entre as espécies <i>M. abscessus</i> , <i>M.</i> | |
| Tabela 7. | <i>bolletii</i> e <i>M. massiliense</i> | 67 |
| | Frequência das micobactérias não tuberculosas isoladas de | |
| Tabela 8. | espécimes pulmonares | 68 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| BAAR | Bacilo Álcool-Ácido Resistente |
| <i>BstEII</i> | Enzima isolada de <i>Bacillus stearothermophilus</i> |
| CEP/ IEC | Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| <i>gyrB</i> | Gene codificador da sub-unidade β da DNA girase |
| <i>HaeIII</i> | Enzimas isolada de <i>Haemophilus aegyptius</i> |
| <i>hsp65</i> | Gene codificante da proteína de Choque Térmico de 65 KDa |
| HUJBB | Hospital Universitário João de Barros Barreto |
| IEC/SVS/MS | Instituto Evandro Chagas/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde |
| IL-12 | Interleucina-12 |
| IL-12R | Receptor de Interleucina-12 |
| IL-12R β 1 | Sub-unidade β 1 do Receptor de Interleucina-12 |
| <i>Indels</i> | Inserções ou deleções em um segmento de DNA |
| INF- γ | <i>Interferon-γ</i> |
| INF- γ R | Receptor de <i>Interferon-γ</i> |
| INF- γ R1 | Cadeia ligante do <i>Interferon-γ</i> |
| INF- γ R2 | Cadeia Transdutora de Sinal do <i>Interferon-γ</i> |
| IIER | Instituto de Infectologia Emílio Ribas |
| ITS1 | Seqüências transcritas internas dos genes do RNAr 16S e 23S |
| JAK | Proteína <i>Janus kinase</i> |
| LACEN-PA | Laboratório Central de Saúde Pública do Pará |
| LJ | Meio de cultura Löwenstein Jensen |
| MAIS | Complexo <i>M. avium-intracellulare-scrofulaceum</i> |
| MCR | Micobactérias de Crescimento Rápido |
| MNT | Micobactérias Não Tuberculosas |
| MCL | Micobactérias de Crescimento Lento |
| MSMD | <i>Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases</i> |

| | |
|---------------|---|
| pb | Pares de Bases |
| PNB | Ácido ρ -Nitrobenzóico |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PRA | <i>PCR-Restriction Enzyme Analysis</i> |
| <i>recA</i> | Gene de recombinação e reparo de danos no DNA |
| RNAr | Ácido Ribonucléico Ribossômico |
| <i>rpoB</i> | Gene codificador da sub-unidade β da RNA-polimerase |
| SABMI | Seção de Bacteriologia e Micologia |
| SIDA | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| STAT1 | <i>Signal Transducers and Activators of Transcription 1</i> |
| <i>sodA</i> | Gene codificador da enzima superóxido dismutase |
| Th1 | Células T <i>helper</i> 1 |
| TLR | Receptor <i>Toll-like</i> |
| TNF- α | <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS | 16 |
| 1.2 CARACTERÍSTICAS DAS MICOBACTÉRIAS | 18 |
| 1.3 CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS | 20 |
| 1.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS INFECÇÕES | 23 |
| 1.5 RESPOSTA IMUNE ÀS INFECÇÕES POR MICOBACTÉRIAS | 26 |
| 1.6 DOENÇAS CAUSADAS POR MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS | 29 |
| 1.6.1 Doença Pulmonar | 29 |
| 1.6.2 Doença em Sítios Extra-Pulmonares | 31 |
| 1.6.2.1 Doença de Pele e Tecidos Moles | 31 |
| 1.6.2.2 Doença do Globo Ocular | 32 |
| 1.6.2.3 Doença do Trato Geniturinário | 32 |
| 1.6.2.4 Linfadenite Cervical | 33 |
| 1.6.2.5 Doença Disseminada | 34 |
| 1.7 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO | 34 |
| 1.7.1 Critérios para o Diagnóstico de Doença Pulmonar | 34 |
| 1.7.1.1 Critérios Clínicos | 35 |
| 1.7.1.2 Critérios Radiográficos | 35 |
| 1.7.1.3 Critérios Bacteriológicos | 35 |
| 1.7.2 Métodos de Identificação | 36 |

| | |
|--|----|
| 1.7.2.1 Tradicionais | 36 |
| 1.7.2.2 Teste de Sensibilidade | 38 |
| 1.7.2.3 Sorotipagem | 39 |
| 1.7.2.4 Cromatografia | 39 |
| 1.7.2.5 Métodos Moleculares | 40 |
| 1.7.2.5.1 Sondas Comerciais | 40 |
| 1.7.2.5.2 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição enzimática do produto de PCR de <i>hsp65</i> (PRA- <i>hsp65</i>) | 41 |
| 1.7.2.5.3 Sequenciamento | 42 |
| 1.8 REDE HIERARQUIZADA DE LABORATÓRIOS DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE PARA O DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA TUBERCULOSE E OUTRAS MICOBACTÉRIAS | 44 |
| 2 OBJETIVOS | 48 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 48 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 48 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 49 |
| 3.1 CASUÍSTICA | 49 |
| 3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO | 49 |
| 3.3 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO | 50 |
| 3.4 ASPECTOS ÉTICOS | 50 |
| 3.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS | 50 |
| 3.5.1 Isolados micobacterianos | 50 |
| 3.5.2 Extração do DNA micobacteriano | 51 |
| 3.5.3 Identificação por análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição enzimática do produto de PCR de <i>hsp65</i> (PRA-<i>hsp65</i>) | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.3.1 Amplificação do fragmento de 441pb do gene <i>hsp65</i> | 51 |
| 3.5.3.2 Digestão Enzimática | 52 |
| 3.5.3.3 Eletroforese | 52 |
| 3.5.4 Análise das sequências do RNAr 16S, <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i> | 53 |
| 3.5.4.1 Seleção dos Alvos | 53 |
| 3.5.4.2 Amplificação dos Fragmentos dos Genes do RNAr 16S, <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i> | 54 |
| 3.5.4.3 Purificação dos Produtos de PCR | 55 |
| 3.5.4.4 Reação de Sequenciamento | 55 |
| 3.5.4.5 Precipitação dos Produtos Seqüenciados | 56 |
| 3.5.4.6 Preparo das Amostras para Eletroforese Capilar | 56 |
| 3.5.4.7 Eletroforese Capilar e Análise dos Resultados | 57 |
| 3.5.4.8 Análise das Seqüências | 57 |
| 4 RESULTADOS | 60 |
| 4.1 Identificação por análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição enzimática do produto de PCR de <i>hsp65</i> (PRA-<i>hsp65</i>) | 60 |
| 4.2 Análise das sequências do RNAr 16S, <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i> | 61 |
| 4.2.1 Gene do RNAr 16S | 61 |
| 4.2.2 <i>hsp65</i> | 63 |
| 4.2.3 <i>rpoB</i> | 65 |
| 4.3 Comparação entre os resultados de PRA-<i>hsp65</i> e sequenciamento | 67 |
| 5 DISCUSSÃO | 69 |
| 6 CONCLUSÕES | 79 |
| 7 REFERÊNCIAS | 80 |

| | |
|------------------------|-----|
| APÊNDICES | 98 |
| APÊNDICE 1 | 99 |
| APÊNDICE 2 | 100 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As micobactérias pertencem ao filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, subclasse Actinobacteridae, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium* (EUZÉBY, 2009). Mais de cem espécies foram descritas para este gênero, sendo algumas patogênicas e outras saprófitas (TORTOLI, 2003). Elas podem ser classificadas em complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e em micobactérias não tuberculosas (MNT).

As infecções humanas por micobactérias são causadas principalmente por espécies do complexo *M. tuberculosis*, complexo *M. avium* e *M. kansasii* (KIM et al., 2005). A doença humana como resultado da infecção por MNT é classificada em quatro síndromes clínicas distintas: doença pulmonar, linfadenite, doença cutânea e doença disseminada. Dentre essas, a doença pulmonar crônica é a mais comum condição clínica localizada (LEÃO et al., 2004; KOH et al., 2006).

A doença pulmonar por MNT pode estar associada a comprometimento pulmonar estrutural. e clinicamente pode se estender desde a forma assintomática, doença branda com sintomas clínicos mínimos até a bronquectasia e doença pulmonar cavitária com significativa morbi-mortalidade (DE GROOTE; HUITT, 2006).

O isolamento de espécies de MNT de uma amostra respiratória é insuficiente para evidenciar a presença de doença pulmonar. O diagnóstico deve ser baseado em critérios clínicos, radiográficos e bacteriológicos. As Sociedades Americana e Britânica Torácica (BRITISH THORACIC SOCIETY, 2000; GRIFFITH et al., 2007) têm divulgado diretrizes referentes ao diagnóstico de doenças pulmonares por MNT, e ambas realçam a dificuldade com relação à diferenciação de pacientes

com doença clínica pulmonar causada por MNT daqueles de quem os isolados de espécimes clínicos levantam apenas suspeita clínica de doença (KOH et al., 2005).

O diagnóstico de doença por MNT exige muita cautela, pois o seu isolamento de espécimes clínicos não estéreis do organismo pode significar colonização transitória ou contaminação. Por isso, a correlação clínico-laboratorial é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico de doença por MNT e para determinação da estratégia terapêutica (GRIFFITH et al., 2007).

Nos últimos anos no Brasil tem sido relatado um aumento do número de infecções por MNT, mas sem nenhum informe sistemático destas infecções que incluam dados de incidência precisos, em contraste com as informações epidemiológicas da tuberculose (BRASIL/MS, 2008). Por outro lado, Serviços de Saúde de países europeus relatam atualmente que em alguns países o número de MNT isoladas ultrapassa o de *M. tuberculosis* (PASTEUR INSTITUTE, 2005).

O Instituto Evandro Chagas/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS), em Belém, tem diagnosticado números crescentes de infecções por MNT associadas a doenças pulmonares, cirurgias de redução de estômago, cirurgias laparoscópicas, mesoterapias, uso de medicamentos injetáveis e implante de próteses, tendo a frequência de isolamento aumentada em 4 vezes nos últimos dois anos (LIMA et al, 2005; LOPES et al, 2005a,b).

Condições de imunossupressão como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), transplantes e co-morbididades também têm contribuído para o aumento significativo de micobacterioses (ALMEIDA et al, 2003). O Instituto de Infectologia Emílio Ribas – IIER, São Paulo/SP, no período de 2000 a 2001 caracterizou 112 micobactérias não tuberculosas entre 574 isolados do gênero *Mycobacterium* obtidos de uma população predominantemente positiva para o vírus da imunodeficiência humana (HIV-positiva) (BACHA et al., 2004).

Essa situação reforça a necessidade de um diagnóstico preciso e precoce, uma vez que a elevada frequência de MNT identificadas na população HIV-positiva torna questionável a opção clínica de tratamento (limitado ao Esquema I de tratamento da tuberculose) baseada em manifestações clínicas e/ou radiológicas sugestivas de tuberculose (BRASIL/MS, 2002).

1.2 CARACTERÍSTICAS DAS MICOBACTÉRIAS

O gênero *Mycobacterium* é o único da família *Mycobacteriaceae* e compartilha muitas características comuns com os gêneros *Corynebacterium* e *Actinomyces*. Dentre essas, a produção dos ácidos graxos de cadeias longas ramificadas, denominados ácidos micólicos (DUCATI et al., 2004). As micobactérias são aeróbias estritas, consideradas fracamente Gram-positivas, apresentam forma de bastonete fino (Figura 1), não possuem flagelos, não formam esporos, não produzem toxinas e não possuem cápsula. Inclui espécies de vida livre e patógenas de vertebrados (WINN et al., 2008; DUCATI et al., 2004).

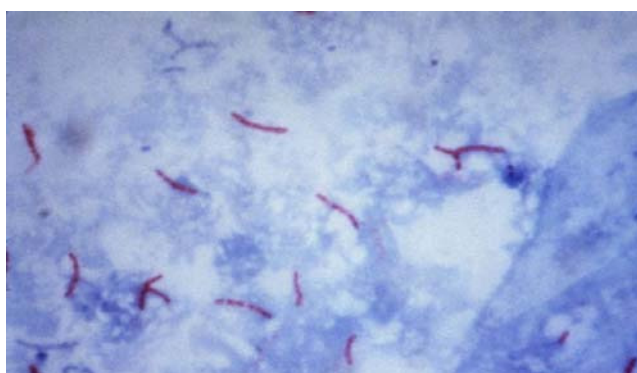


Figura 1. Fotomicrografia de micobactéria corada pela técnica de Ziehl-Neelsen. Fonte: Kubica (2008).

A parede celular das micobactérias contém um glicopeptídeo unido por meio de ligações fosfodiéster a um polissacarídeo de cadeia ramificada denominado

arabinogalactana. As terminações distais da arabinogalactana estão esterificadas com o ácido micólico (Figura 2) (WINN et al., 2008).

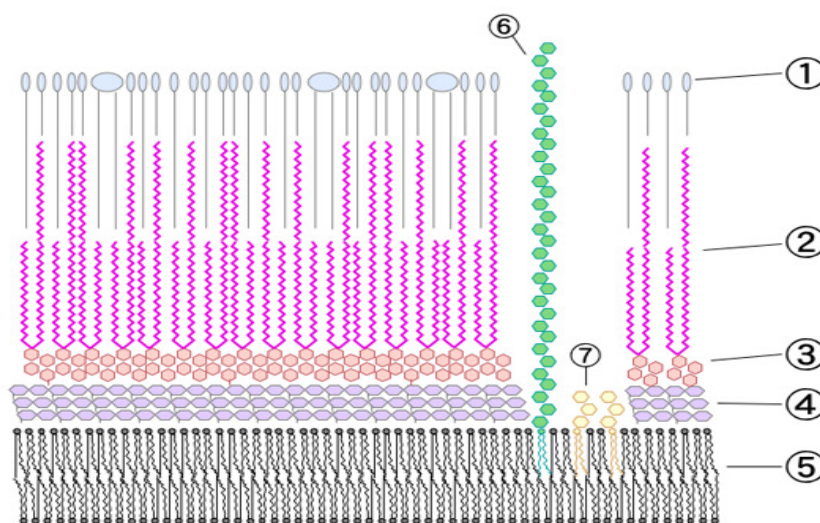


Figura 2. Estrutura da parede celular de micobactéria:
 1 – outros lipídeos, 2 – ácido micólico, 3 – arabinogalactana, 4 – peptidoglicano, 5 – membrana plasmática, 6 – lipoarabino manano, 7 – fosfatidil inositol manosídeo. Fonte: Tambe (2009).

Os ácidos micólicos são ácidos graxos complexos, beta-hidroxilados e alfa-substituídos, que ocorrem como ésteres. O complexo glicopeptídeo-ácido micólico-arabinogalactana forma o esqueleto da parede celular micobacteriana. As cadeias de carbono dos ácidos micólicos estão intercaladas com as de numerosos lipídios e glicolipídeos associados à parede. Os lipídeos são responsáveis por 60% do peso seco da parede celular das micobactérias (WINN et al., 2008). A velocidade de crescimento entre as espécies é bastante variável, diferenciando-as entre os grupos de crescimento lento, moderado e rápido (RUNYON, 1959).

Uma propriedade compartilhada entre as micobactérias e que as distingue das demais bactérias refere-se a retenção de fucsina básica pela parede celular, mesmo após serem submetidas à descoloração com álcool acidificado, conferindo-lhes a designação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (WINN et al., 2008).

Certas espécies de bactérias, sobretudo *Nocardia* e *Rhodococcus*, retêm a carbolfucsina somente se for utilizado um agente decolorante menos enérgico. Essas espécies são denominadas “parcialmente ácido-resistentes”. A grande concentração de lipídios é responsável pela: hidrofobicidade das micobactérias em meio líquido; pelo lento crescimento quando comparadas a *E. coli*; pela resistência aos ácidos, aos desinfetantes, aos anticorpos e a dessecação (WINN et al., 2008).

Os bastonetes apresentam-se retos ou levemente curvos medindo 0,2 - 0,7µm de espessura por 1,0 - 10 µm de comprimento. Algumas espécies são de difícil crescimento, necessitando de meios especiais e, outros não são cultiváveis como é o caso do *M. leprae* (WINN et al., 2008). São catalase positivos, arilsulfatase positivos e lisozima resistentes. São relativamente resistentes à dessecação, à álcali e a muitos desinfetantes químicos, tornando-se difícil prevenir sua transmissão em instituições e em meios urbanos em geral (DUCATI et al., 2004).

1.3 CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e outras denominadas coletivamente micobactérias não tuberculosas (MNT) (COLLINS et al., 1997; BROSCHE et al., 2002). Até o momento, 143 espécies, incluindo subespécies, estão registradas na lista de nomes bacterianos aprovados (DSMZ, 2009).

As espécies do complexo *M. tuberculosis* compreendem as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. africanum*, e *M. microti*. Recentemente, foram incluídas neste complexo o *M. bovis* subespécie *caprae* (TORTOLI, 2003) e *M. pinnipedii* (COUSINS et al., 2003). Já as MNT abrangem uma grande diversidade de espécies micobacterianas com diferentes características fenotípicas ou genéticas (TORLOLI, 2003; DSMZ, 2009). A classificação tradicional de Runyon (1959) para

MNT reconhece quatro grupos com base em características fenotípicas como velocidade de crescimento e pigmentação das colônias (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação fenotípica das micobactérias

| Grupos | Classificação | Características |
|-----------|----------------------|--|
| Grupo I | Fotocromogênicas | Colônias que desenvolvem pigmentação amarela após exposição à luz. Colônias visíveis acima de sete dias de cultivo em meio sólido |
| Grupo II | Escotocromogênicas | Colônias que desenvolvem pigmento amarelo na presença e na ausência de luz. Colônias visíveis acima de sete dias de cultivo em meio sólido |
| Grupo III | Não fotocromogênicas | Colônias que não produzem pigmentos. Colônias visíveis acima de sete dias de cultivo em meio sólido |
| Grupo IV | Crescimento rápido | Colônias visíveis em sete dias ou menos de cultivo em meio sólido |

Fonte: Runyon (1959).

Os grupos I a III comportam os microrganismos de crescimento lento e o grupo IV os de crescimento rápido. As MNT de crescimento lento podem ainda ser divididas em três grupos, de acordo com as características de pigmentação das colônias (Tabela 1) (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 1998).

No grupo I estão incluídas micobactérias fotocromogênicas como *M. marinum* e *M. kansasii*. No Grupo II encontram-se as escotocromogênicas como *M. scrofulaceum* e *M. goodii*. O Grupo III inclui as não cromogênicas como *M. avium* e *M. intracellulare*, assemelhando-se ao gênero *Nocardia*. E, finalmente o Grupo IV engloba as micobactérias de crescimento rápido como *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. phlei* e *M. smegmatis* (HADAD et al., 2005).

O sistema de classificação de Runyon (1959) tem sido uma ferramenta primária para os microbiologistas e fornece uma fácil identificação de grupos de MNT, entretanto tornou-se pouco relevante atualmente devido aos avanços na micobacteriologia (KOH, KWON; LEE, 2002). Adicionalmente, esse sistema tem

pouco valor para o clínico devido micobactérias de uma classe particular causar diferentes padrões de doença, sendo mais apropriado o agrupamento baseado no tipo de síndrome clínica que elas produzem (BRITISH THORACIC SOCIETY, 2000; GRIFFITH et al., 2007). Uma classificação de microrganismos em grupos de risco, capaz de causar infecção no homem também tem sido usada para as micobactérias (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação das micobactérias de acordo com o risco para infecção em humanos¹

| Risco | Características | Espécies | | |
|------------------------|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| I | Risco de infecção individual e comunitária baixo. Doenças nunca ou raramente descritas em adultos normais. As espécies são geralmente classificadas como patógenos raros | <i>M. agri</i> | <i>M. flavescens</i> | <i>M. neoaurum</i> |
| | | <i>M. aichiense</i> | <i>M. gadium</i> | <i>M. obuense</i> |
| | | <i>M. alvei</i> | <i>M. gastri</i> | <i>M. parafortuitum</i> |
| | | <i>M. aurum</i> | <i>M. gilvum</i> | <i>M. phlei</i> |
| | | <i>M. austroafricanum</i> | <i>M. gordonae</i> | <i>M. porcinum</i> |
| | | <i>M. branderi</i> | <i>M. hassiacum</i> | <i>M. poriferae</i> |
| | | <i>M. brumae</i> | <i>M. hiberniae</i> | <i>M. pulveris</i> |
| | | <i>M. chitae</i> | <i>M. hodleri</i> | <i>M. rhodesiae</i> |
| | | <i>M. chlorophenolicum</i> | <i>M. interjectum</i> | <i>M. senegalense</i> |
| | | <i>M. chubuense</i> | <i>M. komossense</i> | <i>M. smegmatis</i> |
| | | <i>M. confluentis</i> | <i>M. lentiflavum</i> | <i>M. sphagni</i> |
| | | <i>M. conspicuum</i> | <i>M. lepraemurium</i> | <i>M. terrae</i> |
| | | <i>M. cookii</i> | <i>M. madagascariense</i> | <i>M. thermoresistibile</i> |
| | | <i>M. diernhoferi</i> | <i>M. mageritense</i> | <i>M. tokaiense</i> |
| | | <i>M. duvalii</i> | <i>M. moriokaense</i> | <i>M. triplex</i> |
| | | <i>M. fallax</i> | <i>M. mucogenicum</i> | <i>M. triviale</i> |
| <i>M. farcinogenes</i> | <i>M. neoaurum</i> | <i>M. vaccae</i> | | |
| II | Risco de infecção individual moderado, existência de doença com severidade média na comunidade. As espécies indicadas são geralmente classificadas como patógenos potenciais ou oportunistas | <i>M. abscessus</i> | <i>M. intracellulare</i> | <i>M. shimoidei</i> |
| | | <i>M. asiaticum</i> | <i>M. kansasii</i> | <i>M. simiae</i> |
| | | <i>M. avium</i> | <i>M. malmoense</i> | <i>M. scrofulaceum</i> |
| | | <i>M. celatum</i> | <i>M. genavense</i> | <i>M. szulgai</i> |
| | | <i>M. chelonae</i> | <i>M. marinum</i> | <i>M. ulcerans</i> |
| | | <i>M. fortuitum</i> | <i>M. peregrinum</i> | <i>M. xenopi</i> |
| | | <i>M. haemophilum</i> | <i>M. paratuberculosis</i> | |
| | | | | |
| III | Risco de infecção pelo ar, doença é severa e às vezes fatal após a infecção. Risco alto para o indivíduo, mas moderado para a comunidade. As espécies indicadas são geralmente classificadas como patógenos estritos | <i>M. tuberculosis</i> | | |
| | | <i>M. bovis</i> | | |
| | | <i>M. africanum</i> | | |
| | | <i>M. microti</i> | | |
| | <i>M. leprae</i> | | | |

Fonte: Adaptado de Leão et al. (2004).

1. Muitas espécies recentemente descritas ainda não foram classificadas em grupos de risco. Existem quatro grupos de risco, porém somente os grupos de risco I, II, e III podem ser aplicados às micobactérias (LEÃO et al., 2004).

1.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS INFECÇÕES

Com o advento do tratamento efetivo para a tuberculose a partir de 1950, espécies de micobactérias começaram a ser cultivadas rotineiramente, e foi reconhecido que alguns casos aparentes de tuberculose se deviam a MNT (WOLINSKY, 1979).

As MNT causam diversos tipos de doença tanto em pacientes imunodeprimidos como em imunocompetentes (PORTAELS, 1995). Entre esse grupo de organismos, as MCR se encontram entre as espécies isoladas com maior frequência no laboratório, além disso, estão frequentemente associadas a infecções de feridas em tecidos moles, trato respiratório, infecções ortoarticulares e bacteremias relacionadas ao uso de cateteres (KOH et al., 2002; ESTEBAN et al., 2007).

Muitas dessas infecções estão relacionadas com a presença de corpos estranhos (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JÚNIOR, 2002). Dentre as micobactérias mais isoladas no laboratório clínico têm-se o *Mycobacterium abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*, ainda que em muitos casos essas bactérias possam ser isoladas de amostras sem possuir significado clínico. Este é o caso do *M. peregrinum* e *M. mucogenicum*, que na maioria das vezes apresentam-se como espécies colonizadoras ou contaminantes (ESTEBAN et al., 2007).

As micobactérias são habitantes naturais de uma ampla variedade de reservatórios ambientais, incluindo águas naturais e de sistema de distribuição municipal, solo, aerossóis, protozoários, animais e humano (PRIMM et al., 2004). A água é considerada a principal fonte primária da infecção humana pelo complexo *M. avium* (GOSLEE; WOLINSKY, 1976). Essa informação é corroborada com achados de um estudo epidemiológico envolvendo pacientes com SIDA, que demonstrou que indivíduos que beberam de uma mesma fonte de água apresentaram isolados de *M. avium* com perfis idênticos (VON REYN et al., 1994).

A prevalência de muitas espécies de micobactérias ambientais nas águas de abastecimento municipal é explicada pela elevada resistência inata daquelas ao cloro e biocidas. Além disso, as micobactérias ambientais são capazes de formar biofilmes (*M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. avium*) e essas populações podem persistir mesmo na presença de sistema corrente (PRIMM et al., 2004).

As micobactérias ambientais têm extraordinária capacidade de sobrevivência sob baixos níveis de nutrientes em água de torneira (NYKA, 1974). *M. intracellulare* persistiu com apenas uma perda de log de viabilidade após 1,4 anos em água estéril deionizada (NIKA, 1974).

A tolerância a temperaturas extremas resulta em contaminação de água quente de torneira e máquinas de gelo por espécies como o complexo *M. avium*, *M. xenopi*, *M. phlei* e *M. chelonae* (PORTAELS, 1995). Em investigação no Zaire, Portaels (1995) identificou complexo *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. gordonae*, *M. parafortuitum* e *M. marinum* em vários biótipos e latitudes.

Reservatórios artificiais como águas de torneira e piscina têm demonstrado ser colonizados por considerável espectro de espécies de micobactérias, algumas que vivem exclusivamente em habitats artificiais (PORTAELS, 1995). Este é o caso de *M. kansasii* e *M. xenopi*, que não são encontrados em reservatórios naturais, mas tem sido frequentemente isolados de águas de abastecimento e esgoto, entretanto seus reservatórios naturais são desconhecidos (COLLINS, GRANGE e YATES, 1984). *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, *M. genavense* e *M. szulgai* nunca foram isolados do ambiente, entretanto a epidemiologia das doenças que estas espécies causam sugere sua presença no meio ambiente (PORTAELS, 1995).

Embora as micobactérias sejam amplamente encontradas no meio ambiente, tem sido observado um padrão de distribuição. Vários fatores influenciam a ocorrência de micobactérias no meio ambiente. Biótipo, temperatura, composição

e pH do solo e água desempenham um importante papel na distribuição de micobactérias e de cada espécie, em particular (PORTAELS, 1995).

É marcante a variabilidade geográfica da prevalência de doença e das espécies de MNT causadoras de doenças (KOH et al., 2002). A doença pulmonar por MNT nos Estados Unidos é comumente causada pelo complexo *M. avium* (MAC), seguida pelo *M. kansasii* (GRIFFITH et al., 2007).

No Reino Unido, o *M. kansasii* é o mais comum patógeno na Inglaterra (BRITISH THORACIC SOCIETY, 2000), enquanto que o *M. malmoense* é mais frequente na Escócia. No Japão, o MAC é a causa mais comum de doença pulmonar por MNT (TSUKAMURA et al., 1988). Na Coréia, relatos apontam como patógenos mais frequentemente relacionados a doença pulmonar por MNT o MAC, seguido pelo grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. Já na África do Sul as espécies mais frequentes na doença pulmonar são *M. kansasii* e *M. scrofulaceum* (MARRAS e DALEY, 2002). Dados de epidemiologia das infecções por MNT na América Central e América do Sul são limitados (MARRAS; DALEY, 2002).

São pouco precisos os dados sobre frequência de doença pulmonar e espécies de MNT em infecções no Brasil, sendo, no entanto detectado aumento de casos a partir da pandemia da AIDS (FERREIRA et al., 2002). No estado de São Paulo entre 1991 e 1997, as MNT com maior frequência de isolamento foram MAC e *M. kansasii* (UEKI et al., 2005). Zamaroli et al. (2008), descreveu treze diferentes espécies associadas a infecção na Baixada Santista, São Paulo, das quais *M. kansasii* e *M. fortuitum* foram mais frequentes em indivíduos HIV negativos e *M. avium* em HIV positivos. Em Belém, estado do Pará, Sousa (2003) encontrou, entre os anos de 1999 a 2002, cinco espécies de MNT causando doença dentre as quais se destacaram o *M. avium* e o *M. fortuitum*, sendo este último relacionado a casos de infecções extra-pulmonares.

Surtos por infecções por MNT têm sido frequentemente registrados no mundo (WALLACE JÚNIOR, BROWN-ELLIOT, GRIFITTH, 1998). Um total de 15 surtos por MNT foi relatado no Brasil entre os anos de 1998 e 2007. As infecções

ocorreram após procedimentos cosméticos ou médicos invasivos, envolvendo as espécies *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. immunogenum*, *M. massiliense* e *M. bolletii* (SAMPAIO et al., 2006a; SAMPAIO et al., 2006b; VIANA-NIERO et al., 2008). Em Belém, estado do Pará, um surto atingindo 311 pacientes, com 66 casos confirmados laboratorialmente foram descritos. As espécies identificadas nos surtos foram *M. massiliense*, em pacientes previamente submetidos a cirurgia laparoscópica, e *M. bolletii*, em pacientes pós-mesoterapia (VIANA-NIERO et al., 2008).

No Brasil, entre janeiro de 2003 até abril de 2008 foram notificados 2.102 casos de infecções por MNT associadas a surtos. Estes casos estavam relacionados a procedimentos médicos invasivos, cuja distribuição foi: Rio de Janeiro (1.014), Pará (315), Espírito Santo (244), Goiás (230), Paraná (110), Rio Grande do Sul (79), São Paulo (43), Mato Grosso (21), Distrito Federal (16), Minas Gerais (10), Piauí (09), Mato Grosso do Sul (08), Bahia (02) e Paraíba (01) (BRASIL/MS, 2009).

1.5 RESPOSTA IMUNE ÀS INFECÇÕES POR MICOBACTÉRIAS

As MNT são definidas como espécies de pobre patogenicidade, o que as distingue do complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae* (NEWPORT, 2003). Embora, a maioria dos indivíduos esteja constantemente exposta a MNT, elas não desenvolvem doença (TIMPE e RUNYON, 1954). As infecções com patógenos intracelulares como as micobactérias e salmonelas, na maioria dos casos são efetivamente controladas pela resposta imune mediada por células (VAN DE VOSSE; HOEVE; OTTENHOFF, 2004).

A ligação de patógenos às células dendríticas e macrófagos, via receptores inatos de reconhecimento padrão como os membros da família do receptor *Toll-like* (TLR), DC-SIGN e manose representa a primeira etapa do encontro entre o sistema imune do hospedeiro humano e a bactéria invasora (OTTENHOFF et al., 2005).

A ativação de TLR2 ou TLR4 induz a produção precoce de interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral- α (em inglês: *tumor necrosis factor- α* – TNF- α) de subgrupos específicos de fagócitos (VAN DE VOSSE, HOEVE e OTTENHOFF, 2004). A IL-12, subseqüentemente, direciona a produção de IFN- γ na fase inicial da resposta imune e desempenha um papel chave na ativação, diferenciação e expansão das células T *helper* 1 (Th1) (HOLLAND, 2001). Estas células são as principais fontes de interferon- γ (INF- γ) durante a resposta imune adaptativa e são necessárias para o controle da fase crônica de infecção (OTTENHOFF et al., 2005).

O INF γ , em sinergia com TNF- α , ativa macrófagos infectados mediando o início do mecanismo efetor principal da resposta imune mediada por célula (NEWPORT, 2003). O receptor de INF- γ , expresso na superfície das células dendríticas e macrófagos, interage com o INF- γ , levando a ativação de duas famílias de proteínas *Janus kinases* (JAK) e transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição 1 (em inglês: *signal transducers and activators of transcription 1* – STAT1), que resulta na ativação de genes responsivos ao INF- γ (Figura 3) (NEWPORT, 2003).

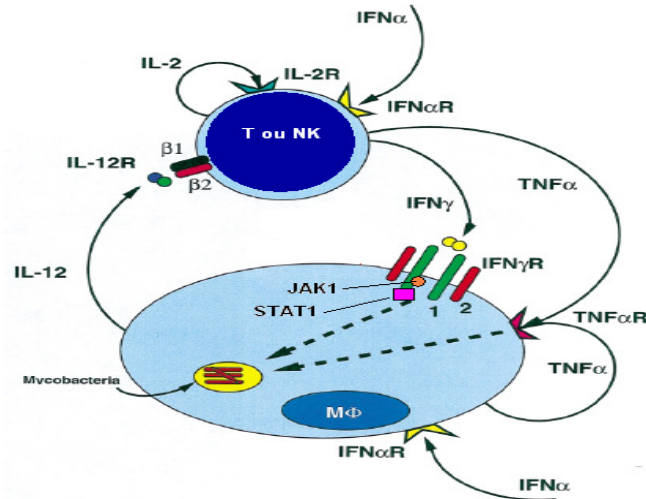


Figura 3. Esquema de interação entre macrófago e células T/NK na infecção por micobactérias. A micobactéria infecta o macrófago levando a produção de IL-12. A IL-12 atua sobre as células T/NK através de seu receptor IL-12R, aumentando a produção de INF- γ , IL-2 e TNF- α . O INF- γ liga-se ao seu receptor INF- γ R no macrófago, levando ao início da sinalização celular via STAT1, o que ativa um amplo número de genes responsivos ao INF- γ . Fonte: Adaptado de Holland (2001).

A IL-12, produzida por células dendríticas e subgrupos de macrófagos, age sobre as células T, formando uma ligação principal entre as respostas imunes inatas e adaptativas (NEWPORT, 2003).

Embora certos fatores de risco, como doenças pulmonares estruturais (bronquiectasia, pneumoconioses, doença pulmonar obstrutiva crônica, história de tuberculose anterior), estejam associados com o desenvolvimento de infecção pulmonar, a maioria dos indivíduos é imunocompetente e responde ao tratamento antimicrobiano (NEWPORT, 2003).

No caso da imunossupressão, as MNT apresentam-se como patógenos oportunistas que pode causar doença disseminada severa (YOUNG, 1993). Antes da emergência do vírus HIV, casos de infecção disseminada de MNT eram raros e ocorriam em: transplantados, em pacientes com história de um período longo de uso de corticosteróides, leucemia ou imunodeficiência herdada, incluindo a imunodeficiência combinada severa, doença granulomatosa crônica e síndrome de DiGeorge (NEWPORT, 2003).

Elevadas taxas de consangüíneos afetados em alguns casos de doença por MNT sugerem que uma nova imunodeficiência genética, na rota de citocinas Tipo 1, possa estar envolvida (PATEL; HOLLAND, 2005). Pacientes com deficiências nas cadeias ligantes e transdutoras de sinais do INF- γ (respectivamente, INF- γ R1 e INF- γ R2), na subunidade P040 interleucina 12 (IL-12), na sub-unidade β 1 do receptor de IL-12 (IL-12R β 1) e na família de proteínas STAT1 foram identificados (HOLLAND, 2001).

A síndrome geral de susceptibilidade micobacteriana que eles conferem tem sido categorizada como susceptibilidade mendeliana a doenças micobacterianas (em inglês: *mendelian susceptibility to mycobacterial diseases* – MSMD), sendo todas essas envolvidas na resposta imune do tipo Th1, que representa a rota central da resposta imune mediada por células aos patógenos intracelulares, como as micobactérias (OTTENHOFF et al., 2002).

Cerca de 50% dos pacientes com MSMD têm infecções com *Salmonella*, enquanto que uma pequena fração apresenta infecções virais (PATEL; HOLLAND, 2005). Na maioria dos casos familiares, a herança é autossômica e recessiva, mas heranças recessivas ligadas ao X e autossômicas dominantes foram relatadas (FRUCHT et al., 1999; JOUANGUY et al., 1999).

O espectro de infecções e o fenótipo de severidade correlacionados, bem como os defeitos genéticos, fornecem os mecanismos envolvidos na imunidade contra micobactérias e ajuda na sua diferenciação na imunidade a vírus e outras bactérias (PATEL; HOLLAND, 2005).

1.6 DOENÇAS CAUSADAS POR MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

1.6.1 Doença Pulmonar

A doença pulmonar por MNT geralmente ocorre em pacientes com doença pulmonar crônica como pneumoconiose, doença pulmonar obstrutiva crônica, tuberculose pré-existente, bronquite crônica, bronquiectasia e doença esofágica associada à aspiração crônica de material alimentar pelas vias aéreas (KATOCH, 2004).

Avaliação clínica é frequentemente complicada devido à similaridade da sintomatologia com as doenças pulmonares pré-existentes. Os sinais e sintomas das doenças causadas pelas MNT são variáveis e inespecíficos. Na maioria das vezes, a sintomatologia clínica se assemelha à evolução crônica da tuberculose. Os pacientes podem apresentar: tosse crônica com expectoração e menos frequentemente fadiga, febre, hemoptise e perda de peso (KOH et al., 2002; GRIFFITH et al., 2007).

A doença por MNT pode ocorrer, também, em pacientes imunodeprimidos como os submetidos a transplante renal, portadores de doenças linfoproliferativas, leucoses e/ou em uso de drogas imunodepressoras (McWHINNEY et al., 1992; ENA et al., 2005; SAFDAR et al., 2005).

Aproximadamente 80% das doenças pulmonares por micobactérias de crescimento rápido são causadas pela espécie *M. abscessus* e ocorrem mais frequentemente em indivíduos com mais de 50 anos, mulheres e não fumantes (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JÚNIOR, 2002; KOH et al., 2002).



Figura 4. Raio-X de tórax de um indivíduo com doença cavitária destrutiva devido a MAC. Fonte: Prendki et al. (2008).

No Brasil, as espécies mais frequentemente associadas à doença pulmonar por MNT são: *M. kansasii* e *M. avium*. Outros patógenos como, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. lentiflavum*, *M. abscessus* e *M. szulgai* são isolados ocasionalmente (SILVA et al., 1987; FERRAZOLI et al., 1992; BARRETO; CAMPOS, 2000; CHIMARA, 2005).

1.6.2 Doença em Sítios Extra-Pulmonares

1.6.2.1 Doença de Pele e Tecidos Moles

As doenças causadas por MNT na pele ou tecidos moles, geralmente apresentam sinais e sintomas de inflamação, com nódulos e ou abscessos, podendo evoluir com drenagem de secreção, fístulas ou deiscências de suturas (Figura 5). O período de incubação pode variar de uma semana a dois anos (HADAD et al., 2005).

As espécies mais comumente associadas a doenças de pele são: *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. Geralmente as lesões ocorrem após traumatismos, fraturas ou injeções (GRIFFITH et al., 2007).



Figura 5. Aspecto da infecção cutânea causada por MNT. Fonte: Scholze et al. (2005)

Recentemente, têm sido descritos muitos casos de infecções e surtos causados por *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*. Esses surtos ocorreram por quebra da barreira corneana, cutânea ou mucosa nasal, por procedimentos médicos para fins terapêuticos ou estéticos, muitas vezes realizados em clínicas de estética (FREITAS et al., 2003; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2004; PRADO; CASTILHO, 2004).

1.6.2.2 Doença do Globo Ocular

As doenças oculares por MNT, como úlcera de córnea e ceratites (Figura 6) são geralmente precedidas de trauma ou uso de lentes de contato, sendo o grupo de MCR frequentemente envolvido (FREITAS et al., 2003).

Doenças causadas por MNT podem ocorrer devido a uma complicação de cirurgias refrativas, podendo levar a importante diminuição da acuidade visual. Um rápido reconhecimento clínico com a confirmação laboratorial e uma terapia adequada são fundamentais para melhora clínica do paciente (CHUNG et al., 2000; WINTHROP et al., 2003).

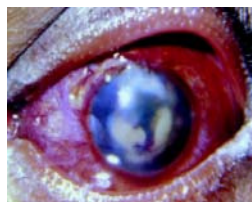


Figura 6. Doença do globo ocular por MNT.

Fonte: Lalitha et al. (2004).

Muitos casos de infecção por *M. chelonae* foram descritos após cirurgias a laser, principalmente, naquelas para correção de miopia (CHUNG et al., 2000; FREITAS et al., 2003). Sampaio et al. (2006b) relataram um surto de ceratite causado *M. immunogenum* após cirurgia de correção de miopia em São Paulo, Brasil.

1.6.2.3 Doença do Trato Geniturinário

As doenças do trato geniturinário por MNT são muito raras. Alguns estudos descrevem a ocorrência em pacientes imunodeprimidos submetidos a transplante renal (QUNIBI et al., 1990, QUEIPO et al., 2003). Formas ainda mais raras são representadas pelo acometimento da próstata e do epidídimo (MIKOLICH;

MATES, 1992). A caracterização de infecção do trato urinário por MNT é um dilema diagnóstico, uma vez que a urina não se constitui em material confiável, devido ao elevado índice de isolamento de MNT saprófitas comumente encontradas na uretra terminal (HADAD et al., 2005).

1.6.2.4 Linfadenite Cervical

A linfadenite cervical (Figura 7) é a forma clínica mais frequente da infecção por MNT em crianças (HAZRA et al., 1999). A idade das crianças na maioria dos casos é em torno de 6 meses a 2 anos, e coincide com o período da erupção dos dentes (PRIMM et al., 2004). A infecção é limitada aos linfonodos cervical e mandibular, e o aumento de volume dos mesmos é a primeira evidência de infecção (PRIMM et al., 2004). A inflamação granulomatosa é o achado mais comum na avaliação do excisado cirúrgico de casos de linfadenopatia crônica (SUSKIND et al., 1997).

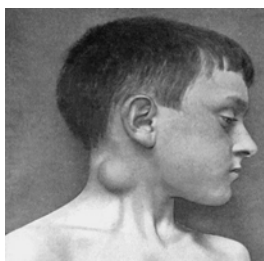


Figura 7. Linfadenite cervical causada por micobactéria. Fonte: Thomson; Miles (2006).

Ainda não se tem estabelecido um tratamento padronizado para a linfadenite cervical por MNT em crianças. A excisão cirúrgica de todos os linfonodos afetados tem sido a prática frequente, embora registros de tratamento bem sucedidos com antimicrobianos sejam frequentes. Entretanto, um recente estudo multicêntrico apontou a excisão cirúrgica como sendo mais efetiva que a terapia antimicrobiana (LINDEBOOM et al., 2007).

Foi observado que a incidência de linfadenite cervical causada por MNT em crianças na Suíça elevou-se dramaticamente após a cessação de vacinação com BCG, indicando que a vacinação protegia as crianças contra a infecção dos linfonodos pelas MNT (PRIMM et al., 2004).

1.6.2.5 Doença Disseminada

Em geral os pacientes com doença disseminada apresentam alguma alteração do sistema imunológico (PORTAELS, 1995). Os principais fatores de risco incluem infecção por HIV, doenças hematológicas, transplante de órgãos e tratamento com corticóides (HOLLAND, 2001). A infecção disseminada é muito mais frequente em pacientes com SIDA que em pacientes HIV negativos (GRIFFITH et al., 2007).

A espécie mais frequentemente isolada de pacientes com SIDA é o *M. avium*. Outras espécies de MNT podem causar doença disseminada, a exemplo do *M. kansasii* que geralmente está associado com doença pulmonar e *M. genavense*; que requer meios especiais para seu isolamento (HADAD et al., 2005). Espécies menos frequentes relacionadas a doença disseminada incluem: *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. malmoense* (GRIFFITH et al., 2007).

1.7 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO

1.7.1 Critérios para o Diagnóstico de Doença Pulmonar

O isolamento de MNT não é suficiente para evidenciar a presença de doença pulmonar, sendo necessário o diagnóstico baseado em critérios clínicos, radiográficos e bacteriológicos (GRIFFITH et al., 2007).

1.7.1.1 Critérios Clínicos

Presença de sinais e sintomas compatíveis, com exclusão de outros agentes etiológicos de doença pulmonar (GRIFFITH et al., 2007). Entretanto, os sinais e sintomas da doença pulmonar por MNT são geralmente variáveis e não específicos. Os pacientes geralmente apresentam tosse produtiva e fadiga. A infecção pulmonar ocorre comumente no contexto de doença pulmonar pré-existente, especialmente doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasia, pneumoconiose e tuberculose prévia (KOH, KWON, LEE, 2002).

1.7.1.2 Critérios Radiográficos

Presença de infiltrados, cavitação e múltiplos nódulos em radiografia de tórax (GRIFFITH et al., 2007) e/ou múltiplos nódulos menores que 10mm de diâmetro ou bronquiectasia multifocal em tomografia computadorizada de alta resolução do pulmão (KOH et al., 2005). Tais achados que dependem, em parte, das espécies envolvidas na infecção pulmonar (KOH, KWON; LEE, 2002).

1.7.1.3 Critérios Bacteriológicos

Na ausência de diagnóstico baseado especificamente em achados clínicos e radiográficos, a doença pulmonar por MNT requer a confirmação microbiológica (KOH, KWON; LEE, 2002).

Culturas de escarro positivas para MNT devem ser interpretadas cautelosamente, pois o achado de MNT em uma única amostra não significa doença,

especialmente quando a baciloscopia for negativa e a cultura apresentar poucas colônias (GRIFFITH et al., 2007).

Para amostras de escarro e lavado bronco-alveolar será considerado como indicativo de doença pulmonar: três culturas positivas com baciloscopia negativa ou duas culturas positivas e uma baciloscopia negativa. Caso apenas um lavado bronco-alveolar esteja disponível, uma cultura é suficiente para baciloscopias de 2+, 3+ ou 4+, ou crescimento em meio sólido de 2+, 3+ ou 4+. Uma biópsia transbrônquica ou pulmonar disponível com MNT é suficiente para estabelecer o diagnóstico (GRIFFITH et al., 2007). Alternativamente, se a biópsia demonstrar inflamação granulomatosa, baciloscopia positiva e uma ou mais amostras de escarro ou lavado bronco-alveolar positivos, mesmo se o número de microrganismos for baixo (GRIFFITH et al., 2007).

1.7.2 Métodos de Identificação

1.7.2.1 Tradicionais

Com o recente aumento de infecções causadas por *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas, há uma demanda aumentada para métodos de diagnóstico mais específicos, sensíveis e rápidos para sua detecção e identificação (KIM et al. 2005).

Inicialmente, a capacidade de crescimento das micobactérias em meios contendo agentes inibidores seletivos é utilizada como ferramenta para diferenciação de MNT do complexo *M. tuberculosis*. O crescimento das micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* é inibido em meios contendo 500µg/mL de ácido *p*-nitrobenzóico (PNB), o que não ocorre com as MNT (BRASIL/MS, 1994; WINN et al., 2008).

As características das colônias, como tempo de crescimento e pigmentação, podem fornecer uma identificação presuntiva do organismo (Figura 8) e por isso podem ser usadas para sugerir quais testes bioquímicos ou sondas de ácidos nucleicos deve-se usar para a identificação definitiva (NOLTE; METCHOCK, 1995).



Figura 8. Aspecto das colônias escotocromogênicas de *M. kansasii*.

Dentre os testes fenotípicos, provas bioquímicas chaves são utilizadas para identificação das micobactérias (Tabela 3).

Tradicionalmente, as micobactérias são identificadas por ensaios fenotípicos, como avaliação de características morfológicas, taxa de crescimento, preferência por temperatura de crescimento, pigmentação das colônias e perfis bioquímicos. Estes métodos estão bem estabelecidos e padronizados.

Tabela 3. Provas bioquímicas para identificação de micobactérias.

| Grupos | Características |
|--|---|
| Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Niacina, redução do nitrato, catalase a 58°C |
| Fotocromogênicas | Redução de nitrato, hidrólise do Tween 80, catalase, urease |
| Escotocromogênicas | Redução de nitrato, hidrólise do Tween 80, urease, crescimento em NaCl a 5% |
| Não fotocromogênicas | Redução do nitrato, redução de telurito, catalase a 68°C, catalase semi-quantitativa, hidrólise do Tween 80 |
| Crescimento rápido | Aril-sulfatase, redução de nitrato, incorporação de ferro, crescimento em ágar MacConkey |

Fonte: FORBES; SAHM; WEISSFELD (1998)

1.7.2.2 Teste de Sensibilidade

Por cerca de 20 anos, os testes de sensibilidade foram usados como ferramenta adicional para separação taxonômica das MCR. Muitas espécies apresentam um único perfil de sensibilidade às drogas, e esses perfis não são importantes apenas por razões terapêuticas, mas também podem ser usados com propósitos taxonômicos para auxiliar na identificação dos organismos (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JÚNIOR, 2002).

Os agentes antimicrobianos mais utilizados são a polimixina B, amicacina, canamicina e cefoxitina. O grupo *M. fortuitum* é facilmente separado do “complexo *M. chelonae-M. abscessus*” pela técnica de disco-difusão em ágar com polimixina B, sendo o último grupo resistente com ausência de zona de crescimento próximo ao disco com antimicrobiano (HADAD et al., 2005).

A susceptibilidade do grupo *M. fortuitum* a sulfonamidas, fluoroquinolonas e amicacina, bem como a outros antimicrobianos, com baixas concentrações inibitórias mínimas (CIM), auxilia na separação com o “complexo *M. chelonae-M. abscessus*” (DE GROOTE; HUITT, 2006).

Já a separação de *M. chelonae* e *M. abscessus* se faz com a utilização de cefoxitina e tobramicina. Isolados de *M. chelonae* têm CIM maior que 256 lg/mL a cefoxitina e CIM de 4 lg/mL ou menos para tobramicina. Em contraste, isolados de *M. abscessus* tem CIM entre 16 e 64 lg/mL para cefoxitina, e CIM para tobramicina de 16 lg/mL ou mais. Diferente do grupo *M. fortuitum*, todas as amostras de *M. chelonae* e *M. abscessus* são susceptíveis a claritromicina (DE GROOTE; HUITT, 2006).

1.7.2.3 Sorotipagem

Métodos de sorotipagem usando anticorpos específicos para aptenos oligossacarídicos localizados na superfície celular foram descritos para MNT (KATOCH, 2004). Kitada et al. (2002) detectaram 31 sorotipos distintos de membros do complexo *M. avium-M. intracellulare-M. scrofulaceum* (MAIS) através da pesquisa de glicolipídios de superfície celular. Dentre esses alguns estão preferencialmente associados a doença pulmonar em pacientes com SIDA (KRZYWINSKA; KRZYWINSKA; SCHOREY, 2004).

Isoenzimas e eletroesferograma de proteínas baseados em esquemas para identificação rápida e caracterização de amostras de *M. tuberculosis* e MNT foram desenvolvidos, podendo ser usados em pequenos laboratórios (SHARMA et al., 1995). Apesar de serem técnicas fáceis, necessitam de infraestrutura especial e profissionais experientes para executá-las (KATOCH, 2004).

1.7.2.4 Cromatografia

Estudos demonstram que os ácidos micólicos em micobactérias são espécie-específicos (VOSSLE, 2000). A identificação cromatográfica de micobactérias há muito tempo tem sido objeto de interesse e os métodos são alterados conforme a tecnologia evolui (BUTLER; GUTHERTZ, 2001).

Métodos empregados no início, como cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada, foram substituídos pela cromatografia líquido-gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (TORTOLI, 2003).

Os métodos atuais permitem fácil extração de suficiente quantidade de ácidos micólicos a partir de pequenas quantidades de bactérias (VOSSLER, 2000).

Sistemas de CLAE com detectores de fluorescência têm aumentado significativamente a sensibilidade do método, além de reduzirem a massa celular e o tempo de identificação de micobactérias (SOMOSKOVI et al., 2002).

Apesar de Butler e Guthertz (2001) relatarem a CLAE como um método seguro para distinguir espécies de micobactérias, estudos comparativos demonstraram discrepâncias na identificação de MNT (THIBERT et al., 1993; LEITE et al., 2005). Além disso, a CLAE baseada nos padrões dos ácidos micólicos não permite separar MCR (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JÚNIOR, 2002).

1.7.2.5 Métodos Moleculares

Métodos moleculares, como a amplificação de ácidos nucleicos, podem ser usados diretamente em espécimes clínicos de pacientes suspeitos de doença micobacteriana (SOMOSKOVI et al., 2002). Porém, os resultados devem ser cautelosamente avaliados.

1.7.2.5.1 Sondas Comerciais

Sondas gênero-específicas para triagem foram testadas em espécimes clínicos pulmonares e extra-pulmonares, demonstrando sensibilidade inicial de 78,5% e especificidade de 93,5%, entretanto apresentaram a limitação de fornecer resultados falso-positivos na presença de MNT clinicamente não significantes nos espécimes (SOMOSKOVI et al., 2002).

Sondas comerciais de ácido desoxirribonucleico (DNA) complementares ao ácido ribonucleico ribossômico (RNAr) estão disponíveis para a identificação rápida de culturas de *M. tuberculosis*, complexo *Mycobacterium avium*, *M.*

intracellulare, *M. gordonae* e *M. kansasii*, com acurácia de 90% (LEÃO et al., 2004; FIELD; COWIE., 2006). Entretanto, as sondas disponíveis para MCR nos Estados Unidos e Europa permitem a identificação de apenas algumas espécies (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JÚNIOR, 2002).

Os principais sistemas comerciais disponíveis que utilizam sondas para identificação de micobactérias compreendem: (I) AccuprobeND (Gen-Probe), que utiliza a técnica de amplificação por transcrição reversa de RNAr 16S com detecção por quimioluminescência e permite a diferenciação entre de espécies do complexo *M. tuberculosis* e as MNT mais frequentemente associadas a infecções. É específico, rápido (resultados em 2 horas) e fornece um diagnóstico precoce de infecção por organismos do complexo *M. tuberculosis*; (II) Inno LiPAND Mycobacteria (Innogenetics) e Genotype MycobacteriaND (Hain Diagnostika) utiliza o princípio de hibridização reversa com sondas imóveis. Inicialmente, se realiza a amplificação da região intergênica 16S-23S do gene do RNAr seguida de reação de hibridização reversa. Apresenta sensibilidade e especificidade idêntica a AccuprobeND, no entanto, o tempo de realização da técnica é mas longo (6 horas) e o custo para implantação laboratorial é maior (CATTOIR, 2004).

1.7.2.5.2 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição enzimática do produto de PCR de *hsp65* (PRA-*hsp65*)

A análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição enzimática do produto de PCR de *hsp65*, conhecida como PRA-*hsp65* (do inglês *Polymerase Chain Reaction Restriction Analysis of the gene hsp65*), permitiu grandes avanços na identificação de MNT (BROWN-ELLIOTT et al., 2002). O método de PRA-*hsp65* consiste na PCR de uma sequência gênica codificadora da proteína de choque térmico de 65 KDa (*hsp65*), seguida pela restrição enzimática e análise dos fragmentos resultantes, sendo que os perfis dos fragmentos são espécies-específicos e diferenciam muitas espécies de MCL (PLIKAYTYS et al., 1992).

Telenti et al. (1993), modificaram o método de Plikaytys et al. (1992) usando um fragmento menor do gene *hsp65* e duas endonucleases de restrição (*Bst*EI - isolada de *Bacillus stearothermophilus*, e *Hae*III - isolada de *Haemophilus aegyptius*), sendo a espécie definida por comparação do polimorfismo o que resultou na diferenciação de mais de 30 espécies de MNT. Mais de 90% das MCR clinicamente significantes foram reconhecidas com as duas enzimas (STEINGRUBE et al., 1995).

Atualmente, a avaliação de PRA-*hsp65* tem se mostrado como método vantajoso na identificação de muitas espécies de MNT conhecidas (SILVA et al., 2001; HÄFNER et al., 2004; KIM et al., 2005; LEÃO et al., 2005; WANG et al., 2005; MARTIN et al., 2007; CHIMARA et al., 2008). A técnica PRA-*hsp65* é amplamente usada, e um algoritmo baseado neste enfoque permite diferenciar atualmente 54 espécies micobacterianas, incluindo membros do grupo de MCR (BRUNELLO et al., 2001).

1.7.2.5.3 Sequenciamento

O sequenciamento de genes constitutivos tem sido amplamente aplicado para caracterização de micobactérias, sendo que a metodologia baseada no sequenciamento do gene de RNAr 16S é considerada “padrão ouro” (NEONAKIS et al., 2008). Este gene consiste em uma sequência de aproximadamente 1.500 pb, mas geralmente os primeiros 500 pb são adequados para a identificação de espécies comumente isoladas nos laboratórios clínicos. Apesar de ser considerado como referência para identificação, em algumas situações as sequências desse gene apresentam poucas variações nucleotídicas entre espécies do gênero *Mycobacterium*, o que revela a necessidade de utilização de outros alvos mais variáveis (GOMILA; RAMIREZ; LALUCAT, 2007).

Roth et al. (1998) determinaram sequências espaçadoras ITS (16S-23S rRNA internal transcribed spacer) e demonstraram que elas são capazes de diferenciar MCL que apresentam sequências idênticas do gene de RNAr 16S.

Uma sequência de 441 pb muito variável do gene *hsp65* (presente em todas as micobactérias) vem sendo bastante utilizada e tem comprovado ser útil na distinção de espécies micobacterianas (RINGUET et al., 1999; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JÚNIOR, 2002).

O sequenciamento do gene *rpoB* (codificador da sub-unidade α da RNA polimerase) foi proposto como método adicional a identificação baseada no gene do DNAr 16S de micobactérias, sendo utilizado para apoiar o delineamento de novas espécies (ADÉKAMBI; COLSON; DRANCOURT, 2003). Adékambi et al. (2003) verificaram que as sequências de *rpoB* são mais variáveis que as do gene do DNAr 16S nas MCR, sugerindo que *rpoB* pode aumentar a discriminação molecular entre as mesmas. Este estudo também encontrou percentual de homologia inter-espécies e intra-espécies de 84,3 – 96,6% e 98,2 – 99,9%, respectivamente, o que demonstra que a escolha da região do gene *rpoB* estudada é uma boa opção para uso na identificação de MCR (ADÉKAMBI et al., 2003).

Outros genes foram descritos para diferenciação de espécies e incluem: *gyrB* (gene que codifica a sub-unidade β da DNA girase), *recA* (gene que tem função crucial na recombinação de DNA homólogo e reparo de danos no DNA), *secA* (gene que codifica componente da principal rota de secreção de proteínas através da membrana citoplasmática) e *sodA* (gene que codifica a enzima superóxido dismutase) (GOMILA; RAMIREZ; LALUCAT, 2007).

1.8 REDE HIERARQUIZADA DE LABORATÓRIOS DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE PARA O DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA TUBERCULOSE E OUTRAS MICOBACTÉRIAS

O sistema nacional de laboratórios de saúde pública compreende um conjunto de redes nacionais de laboratórios, organizadas em sub-redes, por agravo ou programas, de forma hierarquizada, por grau de complexidade das atividades relacionadas à vigilância em saúde. De acordo com as atribuições, as unidades laboratoriais são classificadas como (BRASIL/Portaria 2.031/2004):

I. Centros Colaboradores (CC): são unidades laboratoriais especializadas e capacitadas em áreas específicas, que apresentam os requisitos necessários para desenvolver atividades de maior complexidade e de ensino e pesquisa;

II. Laboratórios de Referência Nacional (LRN): são unidades laboratoriais de excelência técnica altamente especializada;

III. Laboratórios de Referência Regional (LRR): são unidades laboratoriais capacitadas a desenvolver atividades mais complexas, organizadas por agravo ou programas, que prestam apoio técnico-operacional àquelas unidades definidas para sua área geográfica de abrangência;

IV. Laboratórios de Referência Estadual (LRE): são os Laboratórios Centrais de Saúde Pública – LACEN, vinculados às secretarias estaduais de saúde e com área geográfica de abrangência estadual;

V. Laboratórios de Referência Municipal (LRM): são unidades laboratoriais vinculadas às secretarias municipais de saúde e com área geográfica de abrangência municipal;

VI. Laboratórios Locais (LL): são unidades laboratoriais que integram a rede estadual ou municipal de laboratórios de saúde pública;

VII. Laboratórios de Fronteira (LF): são unidades laboratoriais localizadas em regiões de fronteira para a viabilização do diagnóstico de agentes etiológicos, vetores de doenças transmissíveis e outros agravos à saúde pública, bem como a promoção do controle analítico para a verificação da qualidade sanitária dos serviços prestados e de produtos.

A execução dos exames para o controle da tuberculose e outras micobactérias é orientada pela centralização, em laboratórios de referência, em função da exigência de recursos humanos, ambientais e materiais mais especializados (BRASIL/MS, 2008).

Dentro da rede hierarquizada, a identificação das MNT é realizada pelo Laboratório de Referência Nacional (Centro de Referência Professor Hélio Fraga) e Laboratórios de Referências Regionais (BRASIL/MS, 2008). Os locais de execução de exames na rede hierarquizada são apresentados na tabela 4.

A identificação de MNT pode ser realizada por métodos fenotípicos, moleculares ou pela combinação de ambos, sendo o PRA-*hsp65* o método molecular preconizado pelo Ministério da Saúde Brasileiro (BRASIL/MS, 2008).

Tabela 4. Rede hierarquizada de execução de exames para o diagnóstico e controle da tuberculose e outras micobactérias.

| Laboratórios | Baciloscopia | Cultura | Identificação do Complexo <i>M. tuberculosis</i> | | Identificação de MNT ⁷ | | Teste de Sensibilidade | |
|------------------------|--------------|---------|--|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---|---|
| | | | Identificação Fenotípica | Identificação Molecular | Identificação Fenotípica | Identificação Molecular | Drogas de 1 ^a Linha Método das Proporções | Outras Drogas Concentração Inibitória Mínima |
| LRN ¹ | x | x | x | x | x | x | x | x |
| LRR ² | x | x | x | x | x | x | x | x |
| LRE/LACEN ³ | x | x | x | | | | | |
| LRM ⁴ | x | x | x | | | | | |
| LF ⁵ | x | x | x | | | | | |
| LL ⁶ | x | | | | | | | |

Fonte: Adaptado de Brasil (2008).

1. Laboratórios de Referência Nacional (LRN); 2. Laboratórios de Referência Regional (LRR); 3. Laboratórios de Referência Estadual (LRE); 4. Laboratórios de Referência Municipal (LRM); 5. Laboratórios de Fronteira (LF); 6. Laboratórios Locais (LL); 7. Micobactérias não tuberculosas (MNT); X indica a realização do exame.

Há o consenso de que a identificação das micobactérias ao nível de espécie seja importante por razões epidemiológicas, de saúde pública e terapêuticas. Contudo, os testes fenotípicos tradicionais são laboriosos, consomem muito tempo e os resultados geralmente não são fornecidos em tempo oportuno para auxiliar nas decisões clínicas. Além disso, uma identificação incorreta pode ocorrer pelo fato de diferentes espécies apresentarem perfis morfológicos e bioquímicos indistinguíveis (YAM et al., 2006).

No Brasil, informações sobre a situação da infecção pulmonar por MNT não são precisas, o que pode ser devido a sua não inclusão como agravo de notificação compulsória, sendo a solicitação de diagnóstico requisitada a critério médico. Neste contexto, o Laboratório de Micobactérias da Seção de Bacteriologia do IEC/SVS, que atua como referência regional para o diagnóstico da tuberculose, é o único no Estado do Pará com estrutura para oferecer o serviço de identificação molecular de MNT para comunidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a diversidade das espécies de micobactérias não tuberculosas (MNT) de origem pulmonar identificadas no Laboratório de Micobactérias da Seção de Bacteriologia do IEC/SVS/MS, referência regional para diagnóstico da tuberculose, no período de 2004 e 2007.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar as MNT segundo tempo de crescimento e presença de pigmentação;
- Aplicar o PRA-*hsp65* como metodologia de identificação molecular preconizada pelo Ministério da Saúde;
- Realizar o sequenciamento dos genes do RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB*;
- Avaliar a concordância dos resultados de PRA-*hsp65* e sequenciamento dos genes do RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB*;
- Descrever a diversidade das espécies de MNT isoladas de espécimes clínicos pulmonares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

No período de janeiro de 2004 a dezembro de 2007, 125 culturas foram classificadas como de micobactérias não tuberculosas (MNT) e consideradas com significância clínica, de acordo com os critérios da Sociedade Torácica Americana (GRIFFITH et al., 2007). As culturas de MNT obtidas foram provenientes de espécimes clínicos de 51 indivíduos classificados clinicamente como sintomáticos pulmonares. As MNT selecionadas foram isoladas consecutivamente e estão estocadas na Seção de Bacteriologia e Micologia do IEC/SVS/MS.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas as MNT provenientes de espécimes clínicos de origem pulmonar encaminhadas ao IEC/SVS/MS, no período de janeiro de 2004 e dezembro de 2007 que atenderam aos critérios diagnósticos de doença causada por micobactérias sugeridos pela Sociedade Americana Torácica (GRIFFITH et al., 2007).

3.3 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes com mais de uma espécie de micobactéria isolada de seus espécimes clínicos.

3.4 ASPECTOS ÉTICOS

As condutas da pesquisa seguiram os termos da resolução no 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde, e da declaração de Helsinque–Tóquio sobre pesquisas biomédicas em humanos (BRASIL/MS, 2007).

Foi solicitado aos pesquisadores responsáveis pelo isolamento e identificação das cepas, bem como a direção do IEC/SVS autorização para utilização das MNT estocadas na Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI) para o desenvolvimento deste projeto. O projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas (CEP/ IEC) e aprovado sob o Parecer nº 0010/2008, CAAE: 0001.0.072.073-08.

3.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

3.5.1 Isolados micobacterianos

Os 125 isolados micobacterianos foram obtidos após o cultivo de espécimes clínicos pulmonares, descontaminados pelo método de lauril-sulfato, em meio de cultura Löwenstein Jensen, com e sem PNB (ácido p-nitrobenzóico - 0.5 mg/mL).

Posteriormente foram incubados à 35-37°C na ausência de luz. Todos os procedimentos de processamento das amostras foram realizados em cabine de segurança biológica classe II B2.

A distinção presuntiva entre MNT e complexo *M. tuberculosis* foi realizada através do teste de inibição de crescimento em meio com PNB (0,5 mg/mL), no qual todas as espécies do complexo *M. tuberculosis* não crescem. A avaliação fenotípica foi baseada na observação dos aspectos das colônias (morfologia, pigmentação e tempo de crescimento). Os isolados foram posteriormente estocados a - 80°C. A

cepa de referência H37Rv (*M. tuberculosis*) foi utilizada como controle de testes (BRASIL/MS, 1994; BRASIL/MS, 2008).

3.5.2 Extração do DNA micobacteriano

O protocolo de extração utilizado seguiu as condições estabelecidas em Lima et al. (2007). A extração do DNA foi realizada a partir de culturas de micobactérias estocadas a -80°C , utilizando 300 μL de tampão de lise (Tris HCl pH 9,0 300mM, EDTA 100mM, sucrose 4,8%, SDS 1,25%), 300 μL de tampão de homogeneização (Tris HCl pH 8 10mM, NaCl 60mM, EDTA pH 8 10mM, sacarose 5%), 15 μL de proteinase K (20mg/mL de água ultrapura) e incubação a 56°C por 12 horas. Os detritos celulares foram removidos por tratamento com 600 μL de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamil 25:24:1 (Invitrogen). O DNA foi precipitado com 100 μL de acetato de sódio 3M, pH 4,8 (Sigma) e 500 μL de isopropanol (Merk), centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e tratado com 500 μL de álcool etílico 70% (Merk). Posteriormente, foi centrifugado a 13.000 rpm a 4°C . O álcool foi removido por evaporação e o DNA hidratado com 100 μL de tampão TE 1X (Tris HCl pH8 10mM, EDTA pH8 1mM). A avaliação da pureza e a quantificação do DNA foram realizadas por espectrofotometria utilizando o equipamento UV1101 Biotech Photometer (WPA Ltd.)

3.5.3 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição enzimática do produto de PCR de *hsp65* (PRA-*hsp65*)

3.5.3.1 Amplificação do fragmento de 441pb do gene *hsp65*

Todas as amostras foram primariamente caracterizadas pela análise de suas características fenotípicas sobre culturas (tempo de crescimento e pigmentação) e por PRA-*hsp65*. O PRA-*hsp65* foi utilizado como método molecular preconizado pelo Ministério da Saúde para identificação de MNT (2008).

Inicialmente, um fragmento de 441 pb do gene *hsp65*, fragmento de Telenti, foi amplificado com os oligonucleotídeos TB11 (5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3') e TB12 (5' CTTGTGCGAACCGCATACCCT 3'), como descrito previamente (TELENTI et al, 1993). *M. tuberculosis* H37Rv foi incluído como controle positivo das reações.

A mistura para reação de PCR foi constituída por tampão de PCR 1x (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3 - Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen); 200µM dNTP (Invitrogen), 25 pMol de cada oligonucleotídeo (Invitrogen), 0,5 U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 5µL de DNA genômico e água purificada autoclavada para completar volume final de 50µL. As condições para amplificação foram: um ciclo de 95°C por 5 minutos; 45 ciclos de 94°C, 60°C e 72°C por 1 minuto e um ciclo de 72°C por 10 minutos para finalização de extensão, realizada em termociclador (Thermo Hybaid/CE 3832).

3.5.3.2 Digestão Enzimática

Para digestão enzimática foram utilizadas as enzimas *BstEII* (5'-G↓GTNACC-3' e 3'-CCANTG↑G-5') e *HaeIII* (5'-GG↓CC-3' e 3'-CC↑GG-5'). Os produtos de PCR foram digeridos separadamente. Para a digestão enzimática com *BstE II*, um total de 12µL do produto de PCR foi adicionado a uma mistura contendo 10 U de enzima, 2,5µL de tampão de enzima (BioLabs) e 9,5µL de água purificada autoclavada. A mistura foi incubada a 60°C por 3h. Para a digestão enzimática com *Hae III*, 21,5µL do produto de PCR foi adicionado a uma mistura contendo 10 U de enzima, 2,5µL de tampão de enzima (Invitrogen) e incubado a 37°C por 3h.

3.5.3.3 Eletroforese

Um total de 8 µL dos produtos de restrição foram submetidos a eletroforese em gel de agarose Seakem LE 3% (BioWhittaker Molecular Applications) a 5V/cm, contendo 0,375 X de SyberSafe (Invitrogen), um do corante

fluorescente que se intercala com as moléculas de DNA, e tampão de eletroforese foi Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X. Foram utilizados marcadores de peso molecular de 50 pb e 25 pb (Invitrogen).

Após a eletroforese, os produtos foram visualizados e registrados no sistema de detecção BioImaging Systems (UVP, EUA). Os perfis de PRA foram analisados por simples comparação visual com os marcadores de peso molecular, sendo interpretados com algoritmos publicados (TELENTI et al., 1993; DEVALLOIS et al., 1997; BRUNELLO et al., 2001; LEÃO et al., 2004; FERDINAND et al., 2004; CHIMARA et al., 2008; BRASIL/MS, 2008) e disponíveis no PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

3.5.4 Análise das sequências dos genes do RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB*

3.5.4.1 Seleção dos Alvos

Um dos alvos selecionados para identificação de MNT foi o gene do RNAr 16S, com sequência completa de aproximadamente 1.500 pb. É considerado o “padrão ouro” para identificação micobacteriana e 500 pb são considerados suficientes para distinção das espécies (TURENNE et al., 2001). Entretanto, as poucas variações encontradas nas sequências gene de RNAr 16S não permite a diferenciação de algumas espécies, particularmente MCR (BROWN-ELLIOTT; WALLACE JUNIOR, 2002).

Para contornar essa limitação, selecionaram-se alvos amplamente usados na identificação de MNT, como *hsp65* e *rpoB*, para classificação mais precisa (DEVULDER et al., 2005). O gene *hsp65* apresenta 1.620 pb e codifica a proteína de choque térmico de 65KDa, presente em todas as micobactérias. O sequenciamento de um fragmento de 441pb desse gene é extensamente aplicado a diferenciação de MNT (RINGUET et al., 1999; McNABB et al., 2004). A análise de *rpoB*, gene de

3.516 pb codificador da subunidade β da RNA polimerase, vem sendo utilizado para a identificação de MNT, particularmente a região V considerada como alvo promissor para diferenciação de MCR (ADÉKAMBI et al., 2003).

3.5.4.2 Amplificação dos Fragmentos dos Genes do RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB*

Uma amostra por indivíduo, cujo perfil de PRA-*hsp65* foi idêntico entre todos os isolados daquele indivíduo, foi selecionada por amostragem aleatória simples e incluída no sequenciamento. Um total de 50 amostras foi usada para identificação baseada na análise comparativa das sequências parciais do gene do RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB*. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos alvos citados anteriormente estão listados na tabela 5.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências parciais do gene de RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB*.

| Gene | Oligonucleotídeos | Sequência (5' → 3') | T (°C) | Produtos (pb) | Referências |
|--------------|-------------------|----------------------|--------|---------------|------------------------|
| RNAr 16S | 16S rRNA F | AGTTTGATCCTGGCTCAG | 55 | 499 | Shin et al. (2006) |
| | 16S rRNA R | GTATTACCGCGGCTGCTG | | | |
| <i>hsp65</i> | HSP03 F | ATCGCCAAGGAGATCGAGCT | 62 | 644 | Kim et al. (2005) |
| | HSP03 R | AAGGTGCCGCGGATCTTGTT | | | |
| <i>rpoB</i> | Myco F | GGCAAGGTCACCCCGAAGGG | 64 | 764 | Adékambi et al. (2003) |
| | Myco R | GCGGCTGCTGGGTGATCATC | | | |

A reação de amplificação foi preparada para um volume final de 25 μ L, sendo constituída por tampão de Taq DNA Polimerase 1x (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3 - Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen), 5pmol/ μ L de cada oligonucleotídeo (Invitrogen), 0,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 20ng do DNA e 13 μ L de água deionizada estéril. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador Thermo Hybaid/CE 3832, segundo as condições descritas previamente, com algumas modificações (Tabela 5).

A amplificação do gene de RNAr 16S foi realizada sob um ciclo de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C, 55°C e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O protocolo de amplificação de *hsp65* foi um ciclo a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C, por 1 minuto, 62°C por 45 segundos e 72°C por 1,5 minutos, seguidos de extensão a 72°C por 5 minutos. Já para *rpoB* se utilizou um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundo e 72°C por 1,5 minutos, e uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.5.4.3 Purificação dos Produtos da PCR

Os produtos de PCR (8 µL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose Seakem LE 1% (BioWhittaker Molecular Applications) a 5V/cm, contendo SyberSafe 0,375X (Invitrogen), um do corante fluorescente que se intercala com as moléculas de DNA, e tampão de eletroforese Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Posteriormente foram visualizados e registrados em sistema de detecção BioImaging Systems (UVP, E.UA.).

Para a mensuração dos tamanhos dos fragmentos amplificados utilizou-se o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os fragmentos amplificados foram recortados do gel e purificados com S.N.A.P.TM Gel Purification Kit (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante.

3.5.4.4 Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram diretamente sequenciados utilizando o kit Big Dye (*Terminator v3.1 Cycle Terminator* - Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Em cada reação foram utilizados 2 µL de uma mistura contendo os terminadores marcados, dNTP e Taq DNA polimerase (*terminator ready reaction mix* - Applied Biosystems), 2 µL de tampão de

sequenciamento 2,5X (Applied Biosystems), 1,6 pmol de oligonucleotídeo, 1 µL de produto de PCR e água deionizada autoclavada suficiente para completar um volume final de 10 µL. A reação foi realizada em termocilador (Thermo Hybaid/CE 3832), programado para 30 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.5.4.5 Precipitação dos Produtos Sequenciados

Para a precipitação dos produtos sequenciados, utilizou-se o protocolo isopropanol/etanol (Applied Biosystems). Inicialmente foram preparadas as soluções de isopropanol (Merk) a 75% e etanol (Merk) a 70%, e armazenadas em temperatura ambiente. Foi adicionado 40 µL de isopropanol 75% em cada amostra e deixou-se em repouso de 15 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. Posteriormente, centrifugou-se por 25 minutos a 3.000 g (~ 4.000 rpm). Descartou-se o sobrenadante invertendo a placa sobre papel absorvente e aplicando-se um pulso na centrifuga. Adicionou-se 200µL de etanol 70% em cada amostra e centrifugou-se por 10 minutos a 3.000 g (~ 4.000 rpm). Descartou-se o sobrenadante como citado anteriormente e repetiu-se a etapa do etanol a 70% por mais uma vez. Após o último descarte a placa com o produto precipitado foi submetida a temperatura de 60°C por 4 minutos. Finalmente, depois de seco o produto foi armazenado a -20°C com a placa selada com adesivo até o momento de ser submetida a eletroforese capilar.

3.5.4.6 Preparo das Amostras para Eletroforese Capilar

As amostras precipitadas foram ressuspensas utilizando Formamida Hi-Di (Applied Biosystems), que se encontrava congelada antes do uso. Adicionou-se 10 µL de formamida em cada poço da placa e homogeneizou-se bem com o produto precipitado, sem que ficassem bolhas no fundo. Posteriormente, a placa foi selada e as fitas de DNA foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos em termociclador

(Thermo Hybaid/CE 3832), e imediatamente colocada em recipiente com gelo por 2 minutos.

3.5.4.7 Eletroforese Capilar e Análise dos Resultados

Os produtos foram submetidos a eletroforese capilar na plataforma de análise genética ABI 3130 (Applied Biosystems), que utiliza o sistema de eletroforese capilar para separação de fragmentos. As extremidades dos capilares são revestidas por um eletrodo o que gera condições para o um processo conhecido como eletroinjeção, onde as moléculas de DNA suspensas são introduzidas nos capilares (Applied Biosystems). Neste trabalho foi utilizado um conjunto de capilares de 50 cm, padrão para sequenciamento, e um polímero de dimetilpoliacrilamida (POP7), que atua como meio onde ocorre a eletroforese. Os resultados obtidos após a eletroforese foram analisados com o programa Sequencing Analysis, versão 5.2 (Applied Biosystems), sendo que os parâmetros adotados para avaliação da qualidade das sequências foram aqueles estabelecidos pelo fabricante.

3.5.4.8 Análise das Sequências

As sequências completas dos produtos amplificados do gene do RNAr 16S e *rpoB* foram usadas nas análises. Para o gene *hsp65* apenas uma sequência de 423 pb (posição 414 a 836 de *M. tuberculosis* H37Rv) foi analisada, devido algumas sequências de MNT disponíveis no GenBank, que foram utilizadas para comparações, apresentarem tamanho inferior aos dos isolados neste estudo. Este fragmento está incluído nos 441 pb da sequência de *hsp65* usada em estudos anteriores para diferenciação de micobactérias (TELENTI et al., 1993; DEVALLOIS et al., 1997; RINGUET et al., 1999; McNABB et al., 2004).

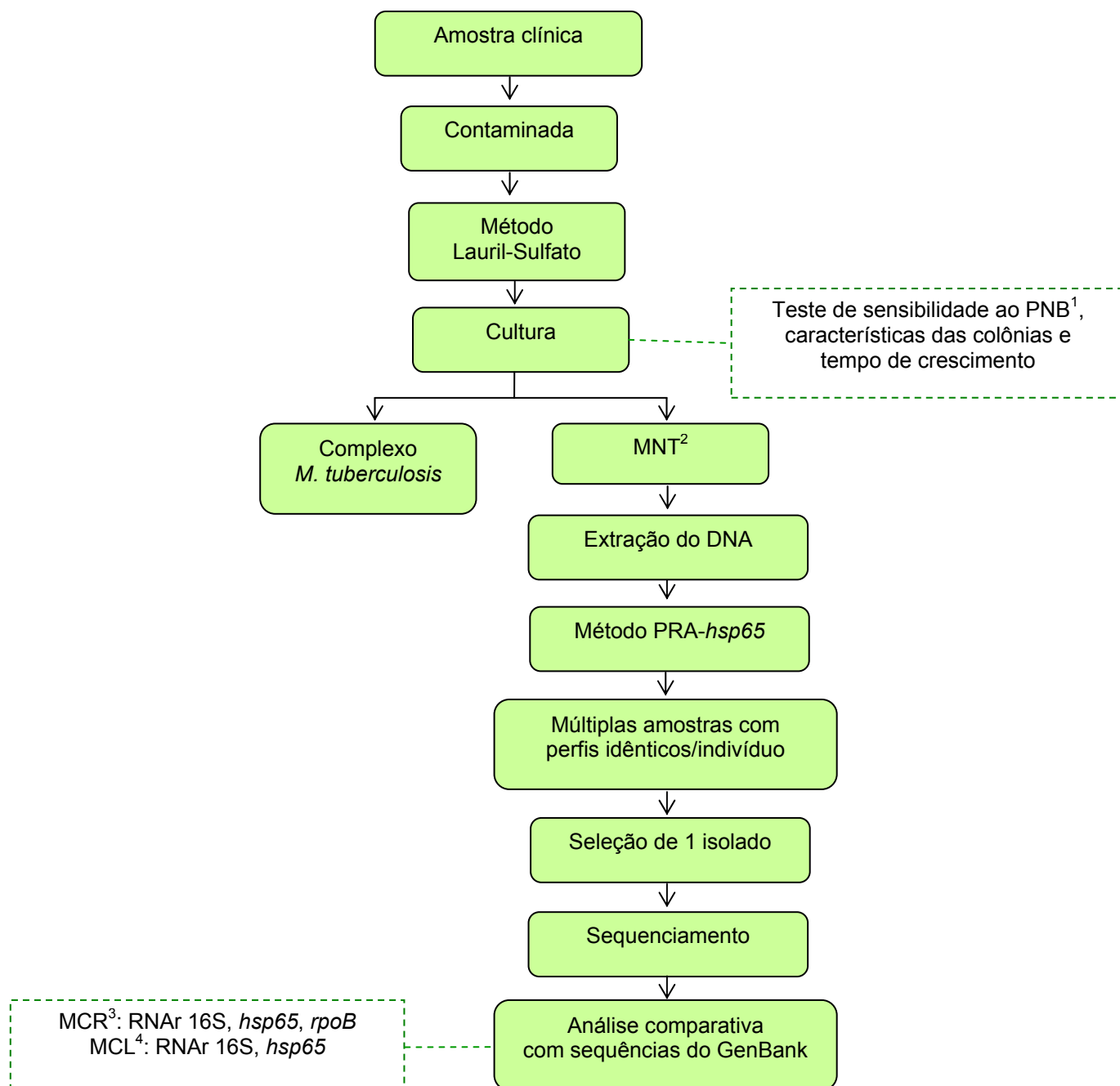
As sequências foram alinhadas e suas similaridades foram obtidas utilizando o algoritmo de múltiplo alinhamento no programa Bioedit (versão 7.0.9; Tom Hall [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). Os dendogramas foram

inferidos das sequências nucleotídicas dos genes do RNAr 16S e *hsp65* de isolados deste estudo e daquelas do GenBank usando o método neighbor-joining com modelo de correção Kimura-2-parâmetros no programa MEGA (versão 4.0; Tamura, Dudley, Nei and Kumar [http://www.megasoftware.net/]). A análise de Bootstrap (1.000 replicações) foi aplicada tomando *M. paurometabola* KCTC 9821 como grupo externo. As sequências do GenBank utilizadas para comparações com as amostras de MNT deste estudo estão listadas na tabela 6.

Tabela 6. Sequências do GenBank usadas para comparações.

| Espécie | Identificação da cepa | RNAr 16S | <i>hsp65</i> | <i>rpoB</i> |
|--------------------------|------------------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| <i>M. abscessus</i> | ATCC 19977 = CIP 104536 | AF547892 | AY458075 | AY147164 |
| <i>M. bolletii</i> | CCUG 50184 = CIP 108541 | AY859681 | AY859675 | AY859692 |
| <i>M. chelonae</i> | ATCC 35752 = CIP 104535 | AF547909 | MCU17928 | AY859692 |
| <i>M. massiliense</i> | CCUG 48898 = CIP 108297 | AY593980 | AY596465 | AY593981 |
| <i>M. fortuitum</i> | ATCC 13756 | AJ536039 | DQ866789 | DQ866802 |
| <i>M. houstonense</i> | ATCC 49403 = DSM 44676 | DQ987744 | DQ987725 | DQ866802 |
| <i>M. kansasii</i> | ATCC 12478 = CIP 104589 | AF480601 | AY299189 | EU591500 |
| <i>M. gastri</i> | ATCC 15754 = CIP 104530 | AF480602 | AY299182 | ND |
| <i>M. avium</i> | ATCC 25291 = CIP 104244 | EF521895 | DQ284768 | EF521907 |
| <i>M. intracellulare</i> | ATCC 13950 = CIP 104243 | AF547939 | DQ284774 | EF521909 |
| <i>M. chimaera</i> | DSM 44623 = CIP 107892 | AY859018 | AY943198 | EF521908 |
| <i>M. colombiense</i> | CECT 3035 = CIP 108962 | AM062764 | EU239785 | EF521910 |
| <i>M. scrofulaceum</i> | ATCC 19981 = CIP 104516 | AF480604 | AF547871 | EU591494 |
| <i>M. simiae</i> | ATCC 25257 = CIP 104531 | AF547966 | AF547875 | EU109303 |
| <i>M. interjectum</i> | ATCC 51457 = DSM 44165 | AF547937 | AY299186 | ND |
| <i>M. interjectum</i> | MS102 | ND | AY550236 | ND |
| <i>M. interjectum</i> | N364C | AY215270 | ND | ND |
| <i>M. terrae</i> | MS267 | ND | AY550213 | ND |
| <i>M. terrae</i> | ATCC 15755 | DQ058407 | AY299142 | EU591502 |
| <i>M. terrae</i> | N177 | AY215361 | ND | ND |
| <i>M. asiaticum</i> | DSM 44297 | AF547896 | AY299133 | ND |

ND: sequência não disponível no GenBank.



1. Ácido p-nitrobenzóico (PNB), 2. micobactérias não tuberculosas; 3. micobactérias de crescimento rápido (MCR); 4. micobactérias de crescimento lento.

Figura 9. Fluxograma dos procedimentos laboratoriais para identificação de micobactérias não tuberculosas.

4 RESULTADOS

Durante o período de estudo, 125 amostras de MNT foram isoladas de espécimes clínicos respiratórios de 51 indivíduos, sendo 25 do sexo masculino e 26 feminino. Estes indivíduos constituíram 3,8% (51/1.317) do total de encaminhados para pesquisa de micobactérias e 6,9% (51/742) dos indivíduos com cultura de BAAR. Em média foram detectados 12 indivíduos por ano com infecção pulmonar por MNT. Todos foram anteriormente diagnosticados e tratados para tuberculose pulmonar, sendo que o motivo de encaminhamento para o laboratório foi falência terapêutica com suspeita de tuberculose resistente. As amostras pulmonares deste estudo foram designadas P01 a P51.

De acordo com o tempo de crescimento das micobactérias, 37,2% (19/51) dos indivíduos apresentaram MCR não pigmentadas (P01 a P19). Quanto aos 32 pacientes com MCL, 12 apresentaram amostras com pigmentação variável (P39 a P50), 2 foram escotocromógenas (P20 e P23), 2 fotocromógenas (P21 e P22) e 16 não pigmentadas (P24 a P38 e P51).

4.1 Identificação por análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição enzimática do produto de PCR de *hsp65* (PRA-*hsp65*)

Doze diferentes perfis de PRA-*hsp65* foram detectados, sendo distribuídos entre MCR (n=3) e MCL (n=9). Em três indivíduos não foi possível realizar a identificação dos isolados de MNT devido apresentarem perfis desconhecidos, com os seguintes padrões de restrição: *Bst*II: 441, *Hae*III: 110/105 (P49 e P50) e *Bst*II: 320/115 e *Hae*III: 140/100/90 (P51). Apesar do perfil da amostra P39 não estar disponível na base de dados do PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) e no manual do Ministério da Saúde, foi considerada a identificação proposta por Ferdinand et al. (2004) para este perfil. Os

resultados de PRA-*hsp65*, bem como a comparação com o sequenciamento, estão demonstrados nos apêndices 1 e 2.

4.2 Análise das sequências do gene do RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB*

4.2.1 Gene do RNAr 16S

A análise das sequências parciais do gene do RNAr 16S evidenciou 7 diferentes complexos ou grupos genéticos: *M. chelonae* (15 amostras), *M. fortuitum* (4 amostras), *M. avium* (15 amostras), *M. kansasii* (1 amostra); *M. scrofulaceum* (1 amostra), *M. simiae* (14 amostras) e *M. terrae* (1 amostra), apresentados na figura 10.

Não houve variações entre as sequências das amostras P01 a P15. Estas amostras compartilharam 100% de similaridade com *M. abscessus* CIP 104536, *M. chelonae* CIP 104535, *M. massiliense* CIP 108297 e *M. bolletii* CIP 108541. As sequências das amostras P16 a P19 demonstraram similaridade de 100% com *M. fortuitum* ATCC 13756 e 99,1% com *M. houstonense* ATCC 49403.

Dentre as MCL, a amostra P20 demonstrou 100% de similaridade com *M. kansasii* CIP 104539. P21 e P22 foram 100% similares a *M. simiae* CIP 104531 e P23 foi 99,7% similar a *M. scrofulaceum* ATCC 19981. As amostras P24 a P28 compartilharam de 100% de similaridade com *M. intracellulare* CIP 104243 e 99,5% com *M. chimaera* CIP 107892. P29 e P35 a P38 apresentaram similaridade de 99,1% e 99,3%, respectivamente, com *M. avium avium* CIP 104244. P30 a P34 foram 99,7 a 100% similares a *M. colombiense* CIP 108962.

As amostras P39 a P50 divergiram 1,3% e apresentaram *indel* de 11 pb na região hipervariável B, hélice18, característica de MCR e complexo *M. simiae*. P39 a P46 foram 98,7% similares a *M. simiae* CIP 104531 e 98,4% ao *M. interjectum* N364C, enquanto que P47 a P50 apresentaram similaridades de 99,1% com *M.*

simiae CIP 104531 e 99,7% com *M. interjectum* amostra N364C. P51 demonstrou 99,5% de similaridade com *M. terrae* variante N177.

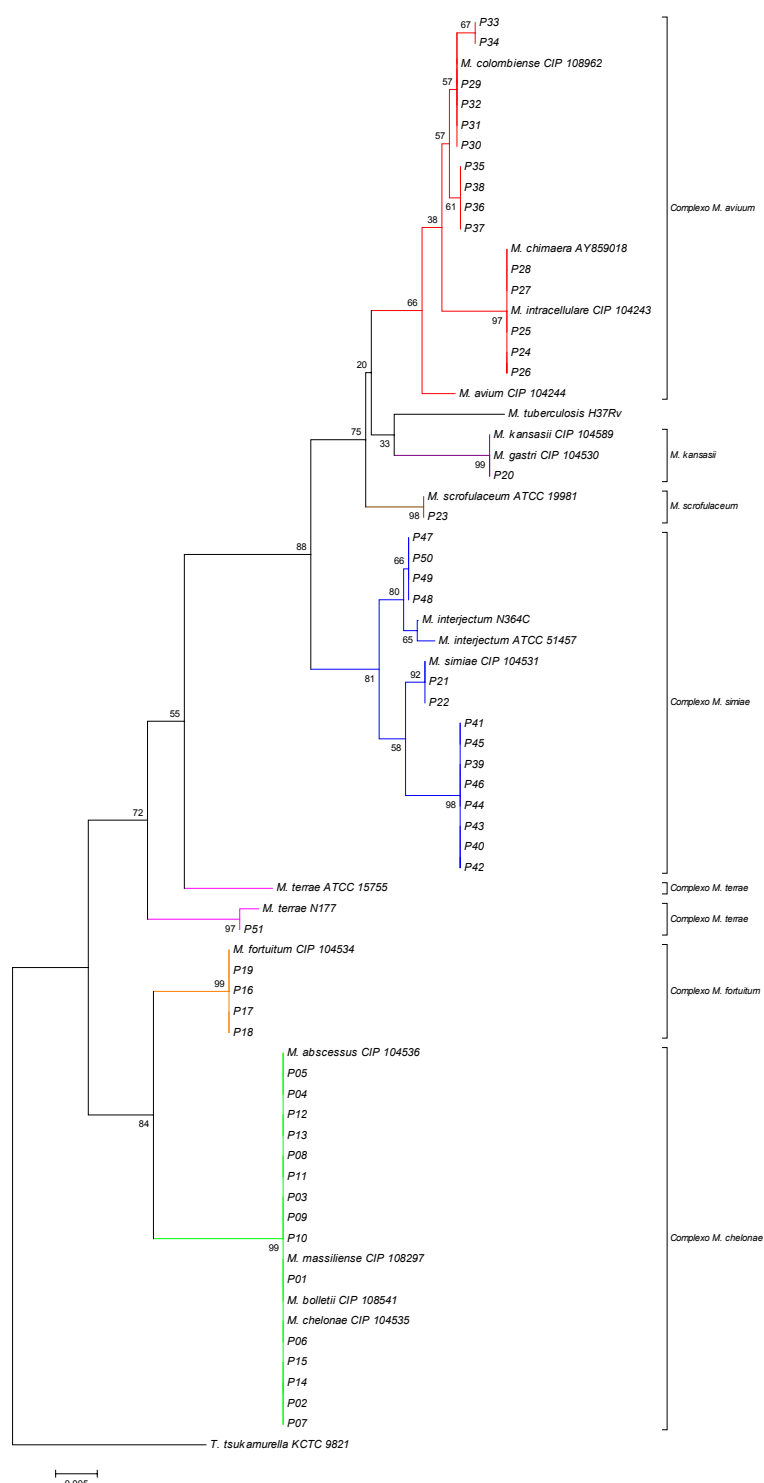


Figura 10. Dendrograma das sequências do gene do RNAr 16S de micobactérias não tuberculosas construído através do método neighbor-joining utilizando o modelo de correção de distância Kimura-2-parâmetros. Os números nos nós indicam os valores de bootstrap obtidos em 1000 repetições (expressos em porcentagem). *T. paurometabola* KCTC 9821 foi usado como grupo externo.

4.2.2 *hsp65*

Falhas de amplificação ou deleções não foram encontradas nas sequências *hsp65*. As sequências de *hsp65* demonstraram ser mais variáveis que as do gene do RNAr 16S. As substituições detectadas não resultaram em mudanças na sequência de aminoácidos.

Neste fragmento, a diversidade nucleotídica entre as amostras P01 a P015 foi representada por substituições do tipo transicional (C ↔ T). A divergência nucleotídica variou de 1,2 a 1,5% entre P01 a P15. As amostras P01 e P02 apresentaram 100% de similaridade com *M. abscessus* CIP 104536. As sequências das amostras P03 a P15 exibiram divergências de 0,5 a 0,8%. Entretanto, as amostras P03 a P06 foram mais similares (99,5 a 99,7%) ao *M. bolletii* CIP 108541, e P07 a P15 ao *M. massiliense* CIP 108297 (99,7%). P06 diferenciou de P03 a P05 pela substituição na posição 602 (T → C), encontrada em *M. abscessus* e *M. massiliense*. As amostras P16 a P19 apresentaram 100% de similaridade com *M. fortuitum* CIP 104534. A outra espécie mais próxima foi *M. houstonense* ATCC 49403, que compartilhou 99,4% de similaridade. Um polimorfismo caracterizado pela transversão na posição 827 (G → C) foi identificado em todos os isolados de MCR, quando comparados com as sequências de cepas de referência disponíveis no GenBank.

Foi observado que a amostra P20 apresentou 100% similaridade com a sequência de *M. kansasii* ATCC 12478. P21 e P22 compartilharam similaridade de 98,8 a 99% com *M. simiae* CIP 104531. A amostra P23 exibiu similaridade de 98,8% com *M. scrofulaceum* CIP 105416. As amostras 24 a 28 apresentaram similaridade de 99,5 a 100% com *M. intracellulare* ATCC 13950. P29, P35 a P38 foram 99,0 a 100% similares ao *M. avium avium* CIP 104244. Já as amostras P30 a P34 demonstraram similaridade de 98,3 a 99,7% com *M. colombiense* CIP 108962. P39 a P50 foram 97,8% a 98,1% similares a *M. interjectum* MS102, porém foi 95,2 a 95,7% similares a amostra de referência *M. interjectum* ATCC 51457. P51 compartilhou 98,8% de similaridade com o isolado *M. terrae* MS267.

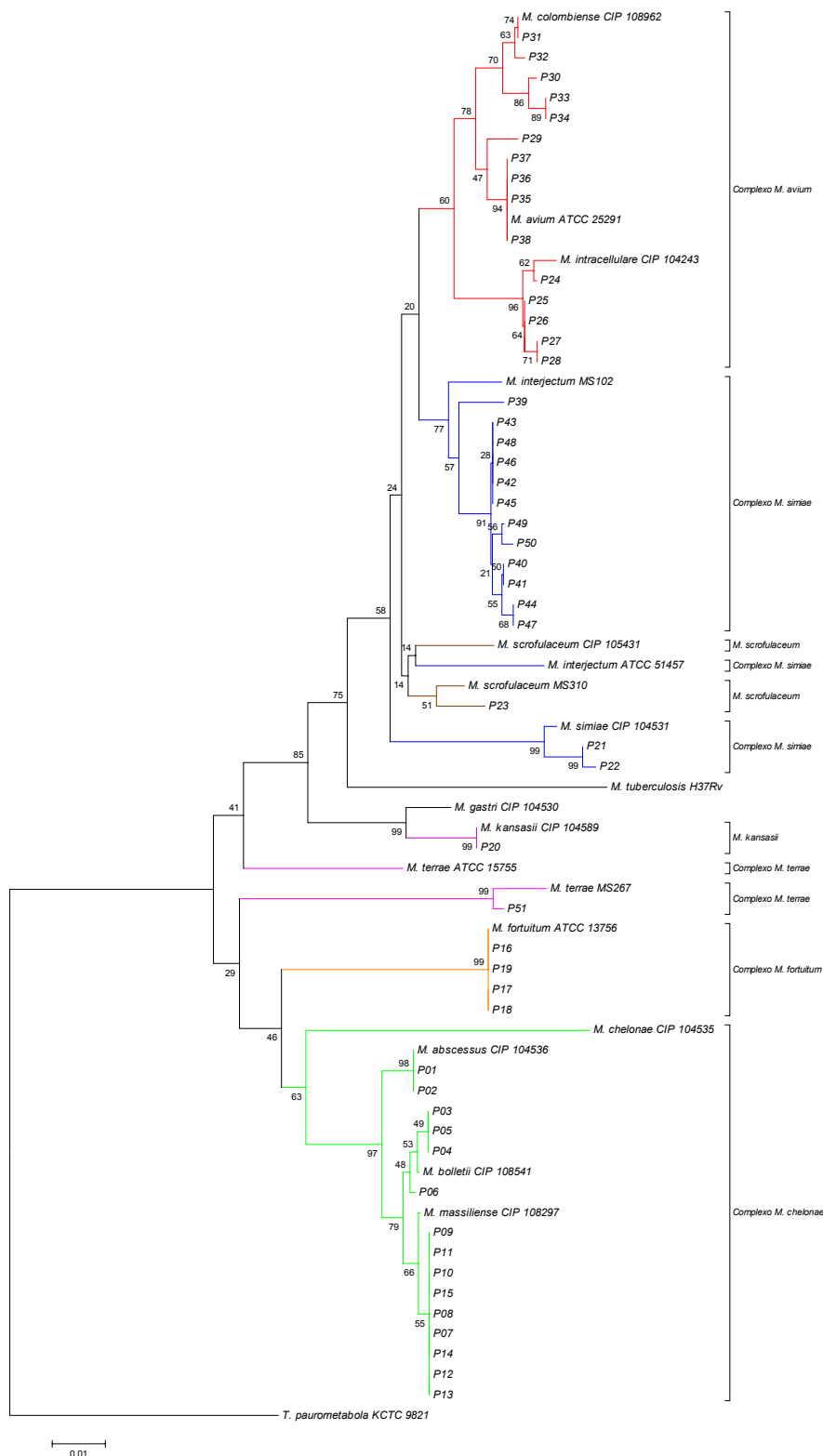


Figura 11. Dendrograma das sequências do gene *hsp65* de micobactérias não tuberculosas construído através do método neighbor-joining utilizando o modelo de correção de distância Kimura-2-parâmetros. Os números nos nós indicam os valores de bootstrap obtidos em 1000 repetições (expressos em porcentagem). *T. paurometabola* KCTC 9821 foi usado como grupo externo.

4.2.3 *rpoB*

O sequenciamento de *rpoB* foi aplicado para melhor diferenciação das espécies de MCR e os agrupamentos obtidos são apresentados na figura 12.

As sequências das amostras P01 a P02 demonstraram 100% de similaridade nucleotídica com *M. abscessus* CIP 104536. As amostras P03 a P06 apresentaram similaridade de 99,7 a 99,8% com *M. bolletii* CIP 108541 e P07 a P15 foram 99,7% a 100% similares ao *M. massiliense* CIP 108297. P03 apresentou o nucleotídeo C na posição 2.605, diferentemente da sequência de *M. bolletii* CIP 108541 que apresentou o nucleotídeo G.

A divergência nucleotídica entre as amostras P01 a P02 com P03 a P15 variou de 3,6 a 4,4%. A diversidade nucleotídica entre as amostras P03 a P06 foi de 0,2 a 0,3%, enquanto que entre P07 a P15 foi de 0,2 a 0,5%. Esses dois grupos de amostras divergiram 1,5 a 1,7%.

As amostras P16 a P19 demonstraram similaridade de 99,5 a 100% com *M. fortuitum* CIP 104534. As diferenças nucleotídicas com *M. fortuitum* CIP 104534 deveram-se a substituições nas posições 2744 e 3013 (G → A), e 2932 (G → C) na amostra P17, 2662 (T → C), e 3013 (G → C) em P19. Outra espécie mais próxima de P16 a P19 foi *M. houstonense* ATCC 49403 que compartilhou similaridade de 98,7 a 99%.

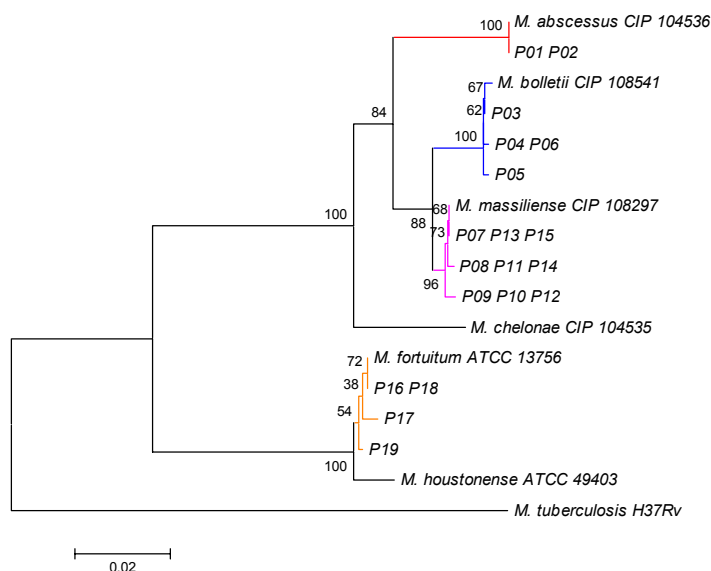


Figura 12. Dendrograma das sequências do gene *rpoB* de micobactérias de crescimento rápido construído através do método neighbor-joining utilizando o modelo de correção de distância Kimura-2-parâmetros. Os números nos nós indicam os valores de bootstrap obtidos em 1000 repetições (expressos em porcentagem). *M. tuberculosis H37Rv* foi usado como grupo externo.

Nas amostras de MCL avaliadas não foi possível a amplificação dos isolados P22, P23, P40, P41, P42 e P43. A amostra P20 apresentou 99,7% de similaridade com *M. kansasii* ATCC 12478. P21 foi 97,7% similar ao *M. simiae* CIP 104531. P24 a P28 exibiram similaridades que variaram de 99,4 a 99,7% com *M. chimaera* DSM 446232 e 99 a 99,5% com *M. intracellulare* ATCC 15985. As amostras P30 a P34 demonstraram similaridade de 99,5 a 99,8% com *M. colombiense* CIP 19981. Para os demais isolados, as similaridades foram menores que 95% com sequências depositadas no GenBank.

Substituições nucleotídicas foram detectadas em 35 diferentes posições das amostras P03 a P15, quando comparadas com a sequência de *M. abscessus* CIP 104536, predominando o tipo transicional. Em geral, as substituições se concentraram entre as posições 3019 a 3070.

Substituições do tipo transversal na posição 2659 (C → G) foram observadas nas amostras P08, P11 e P14. Entretanto, as substituições do tipo transversal nos códons 954, 959, 963 e 966 resultou em alteração da sequência de

aminoácido, com relação a sequência de referência (Tabela 7). Os códons 954 e 966 apresentaram-se específicos para *M. abscessus*, *M. bolletii* e *M. massiliense*, embora as substituições de nucleotídeos para as últimas duas espécies não resultassem na mudança de aminoácidos entre as mesmas (Tabela 7).

Tabela 7. Alterações de aminoácidos entre as espécies *M. abscessus*, *M. bolletii* e *M. massiliense*.

| Espécies | Códons (posições nucleotídicas) | | | |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| | 954 (3017-9) | 959 (3032-4) | 963 (3044-6) | 966 (3053-5) |
| <i>M. abscessus</i> | GAG (Ácido glutâmico) | GCC (Alanina) | GCA (Alanina) | ACC (Treonina) |
| <i>M. bolletii</i> | GAC (Ácido aspártico) | GAG (Ácido glutâmico) | GAG (Ácido glutâmico) | CAA (Glutamina) |
| <i>M. massiliense</i> | GAT (Ácido aspártico) | GAG (Ácido glutâmico) | GAG (Ácido glutâmico) | CAG (Glutamina) |

4.3 Comparação entre os resultados de PRA-*hsp65* e sequenciamento

Foi obtida concordância de 100% na identificação de *M. abscessus* 1, *M. kansasii* 1, *M. fortuitum* 1 e *M. intracellulare* 1. As amostras P03 a P15 não puderam se diferenciadas pelo PRA-*hsp65* de *M. abscessus* 2, *M. bolletii* e *M. massiliense*, que compartilham o mesmo perfil. Novos variantes alélicos para *M. scrofulaceum* e *M. terrae* foram encontrados neste trabalho (Apêndice 2).

Nove amostras (P40 a P48) com perfil característico de *M. asiaticum* pelo PRA-*hsp65* apresentaram similaridades de 97,8 a 98,1% com *M. interjectum* MS102, na sequência de *hsp65*, e de 98,4 a 99,7% com *M. interjectum* N364C nas sequências de RNAr 16S, enquanto que com as sequências *hsp65* (AY299133) e RNAr 16S (AF547896) de *M. asiaticum* DSM 44297 compartilharam similaridades de 94,3 a 94,7% e 93 a 93,7%, respectivamente. Dois perfis de PRA-*hsp65* desconhecidos (*Bst*E II: 441; *Hae* III: 110/105 e *Bst*e II: 320/115; *Hae* III: 140/100/90)

foram encontrados entre as amostras destes estudo representando, respectivamente, *M. interjectum* (P49-P50) e *M. terrae* (P51)., de acordo com as similaridades encontradas nas sequências *hsp65*.

A síntese dos resultados inferidos das sequências do gene do RNAr 16S, bem como a frequência de pacientes com isolados de MNT são apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Frequência das micobactérias não tuberculosas isoladas de espécimes pulmonares.

| Grupos ¹ | Agrupamentos sistemáticos baseados nas similaridades do RNAr 16S | Classificação | n | % |
|---------------------|--|--------------------------|---|------|
| MCR | Complexo <i>M. chelonae</i> | <i>M. abscessus</i> | 2 | 3,9 |
| | | <i>M. bolletii</i> | 4 | 7,8 |
| | | <i>M. massiliense</i> | 9 | 17,6 |
| MCR | Complexo <i>M. fortuitum</i> | <i>M. fortuitum</i> | 4 | 7,8 |
| MCL | Complexo <i>M. avium</i> | <i>M. avium</i> | 5 | 9,8 |
| | | <i>M. colombiense</i> | 5 | 9,8 |
| | | <i>M. intracellulare</i> | 5 | 9,8 |
| MCL | <i>M. kansasii</i> | <i>M. kansasii</i> | 1 | 2,0 |
| MCL | <i>M. scrofulaceum</i> | <i>M. scrofulaceum</i> | 1 | 2,0 |
| MCL | Complexo <i>M. terrae</i> | <i>M. terrae</i> | 1 | 2,0 |
| MCL | Complexo <i>M. simiae</i> | <i>M. simiae</i> | 2 | 3,9 |
| | | <i>M. interjectum</i> | 4 | 7,8 |
| | | NI ² | 8 | 15,7 |

1. Grupos de micobactérias definidos de acordo com as características de crescimento em meio de cultura sólido. MCR: Micobactérias de crescimento rápido; MCL: Micobactérias de crescimento lento; 2. Não identificada.

5. DISCUSSÃO

Durante os anos de 2004 a 2007, um total de 51 indivíduos com infecção pulmonar por MNT foram identificados no laboratório de micobactérias do IEC/PA, com uma frequência de detecção em torno de 13 indivíduos por ano.

Diferente da tuberculose, na maioria dos países a notificação para as doenças causadas por MNT não é requerida e, portanto, dados precisos de incidência e prevalência não estão disponíveis. As informações de infecção e a distribuição geográfica das espécies são geralmente baseadas em registros laboratoriais e estudos de vigilância (MARRAS, DALEY, 2002).

Todos os indivíduos infectados por MNT deste estudo foram inicialmente diagnosticados com tuberculose pulmonar, cujo desfecho de tratamento foi de falência terapêutica, o que foi interpretado pelos clínicos como suspeita de resistência. Esse cenário pode estar associado a dificuldade em diferenciar a infecção pulmonar causada por espécies do complexo *M. tuberculosis* e MNT, principalmente quando o diagnóstico é baseado em aspectos clínicos e baciloscopia (KOH et al., 2005). Além disso, a falência terapêutica pode ser atribuída a resistência natural de algumas MNT a agentes tuberculostáticos recomendados pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose (BRASIL/MS, 2005; GRIFFITH et al., 2007; GLASSROTH, 2008).

Dentre os agrupamentos sistemáticos identificados, três foram responsáveis por 86,1% das infecções, compreendendo os complexos *M. avium* (*M. avium*, *M. coombiense* e *M. intracellulare* - 15 indivíduos), *M. chelonae* (*M. abscessus*, *M. bolletii* e *M. massiliense* - 15 indivíduos) e *M. simiae* (*M. simiae*, *M. interjectum* e um grupo geneticamente próximo ao *M. simiae* - 14 indivíduos), sendo esta diversidade diferente daquelas relatadas em alguns estudos no Brasil.

Em um trabalho realizado no estado de São Paulo entre os anos de 1991 e 1997, *M. kansasii* e complexo *M. avium* representaram as MNT com maior

frequência de isolamento (UEKI et al., 2005). Zamaroli et al. (2008), na Baixada Santista, São Paulo, detectou treze diferentes espécies associadas a infecção, das quais *M. kansasii* e *M. fortuitum* foram mais frequentes em indivíduos HIV negativo e *M. avium* em HIV positivos. Em São José do Rio Preto, São Paulo, o complexo *M. avium* foi mais frequente nas amostras respiratórias (PEDRO et al., 2008).

São poucas as publicações descrevendo MNT na região norte do Brasil. Barreto e Campos (2000) analisando resultados de culturas de micobactérias identificadas no período de 1994 a 1999, encontraram 35 indivíduos com infecção por MNT, sendo o complexo *M. avium*, *M. terrae* e *M. fortuitum* as espécies de maior frequência. Santos et al. (2006), no ano de 2002, avaliaram amostras respiratórias de não indígenas e indígenas com suspeita de tuberculose pulmonar e identificaram 19 indivíduos com infecção por MNT, porém sem relatar as espécies encontradas.

Apenas um estudo anterior a este trabalho descreveu infecções por MNT no estado do Pará, sendo que Sousa (2003), entre os anos de 1999 a 2002, relatou 19 indivíduos com micobacteriose causadas por cinco diferentes espécies das quais se destacaram *M. avium* e *M. fortuitum*. No entanto, Sousa (2003) trabalhou apenas com casos residentes da região metropolitana de Belém, enquanto que nosso estudo abrangeu amostras encaminhadas de todo o estado do Pará, o que poderia justificar o maior número de espécies. Em relação às diferenças com a região sudeste, poderíamos sugerir que a variedade de espécies encontradas em nosso estudo pode estar associada a fatores ambientais, como por exemplo o solo que exerce importante influência na distribuição geográfica de espécies, como relatado por Portaels (1995).

Doze diferentes perfis de PRA-*hsp65* foram identificados, 3 em MCR e 9 em MCL. Destes, 50% (6/12) foram congruentes com as análises de sequenciamento do RNAr 16S, *hsp65* ou *rpoB*, correspondendo a amostras de 20 indivíduos. Portanto, 39,2% (20/50) dos casos de infecção por MNT foram identificados corretamente com o uso primário do método de PRA-*hsp65*. No entanto, algumas considerações são necessárias, quanto aos perfis de *M. abscessus* 2, *M. avium* 1.

Dos 13 indivíduos com amostras caracterizadas como *M. abscessus* 2 pelo PRA-*hsp65*, 4 apresentaram elevada similaridade com *M. bolletii* e 9 com *M. massiliense* pela análise dos genes *hsp65* e *rpoB*. Esse resultado deve-se a estreita relação taxonômica entre a variante de *M. abscessus* 2 e as duas espécies recentemente descritas (ADÉKAMBI et al., 2004; ADÉKAMBI et al., 2006). Estas três espécies compartilham o mesmo perfil de PRA-*hsp65* (CHIMARA et al., 2008).

Viana-Niero et al. (2008), Kim et al. (2008) e Simmon et al., (2007) verificaram que, após o sequenciamento de *hsp65* e/ou *rpoB*, amostras previamente caracterizadas como *M. abscessus* 2 foram todas identificadas como *M. massiliense* ou *M. bolletii*. Esses resultados corroboram com nossas especulações de que o tipo genético *M. abscessus* 2 possa ter sido reclassificado naquelas espécies se configurando, portanto, como entidades já conhecidas na rotina laboratorial.

De acordo com essas informações podemos dizer que o PRA-*hsp65* foi capaz de diferenciar *M. massiliense* e *M. bolletii* de *M. abscessus* I. Embora *M. massiliense* e *M. bolletii* serem relatadas com diferentes potenciais patogênicos e de suscetibilidade aos macrolídeos, sendo *M. bolletii* naturalmente resistente *in vitro* a claritromicina (ADÉKAMBI et al., 2004; ADÉKAMBI et al., 2006), estudos já descreveram isolados de *M. massiliense* resistentes (KIM et al., 2008), tornando-se necessário a realização teste de sensibilidade *in vitro* para isolados clínicos de espécies do complexo *M. chelonae* para melhor manejo das infecções, como recomendado por Adékambi e Drancourt (2009).

Baseado no polimorfismo da posição 644 (C → G) descrita neste trabalho, as enzimas de restrição Sm1 (C↓TYRAG) ou Sap1 (GCTCTTCN↓NNN) poderiam ser incluídas ao PRA-*hsp65* para a diferenciação dos isolados de *M. bolletii* e *M. massiliense*. Enquanto Sm1I gera fragmentos de 248 e 193 pb para *M. bolletii* e não digere a sequência *hsp65* de *M. massiliense*, a enzima Sap1 produz fragmentos de 245 e 196 pb para *M. massiliense*, mas não gera cortes nas sequências de *M. bolletii* (dados não demonstrados).

Todas as amostras do complexo *M. chelonae* deste estudo apresentavam uma substituição na posição 827 (G → C) do gene *hsp65* com relação a sequência de referência *M. abscessus* CIP 104536 e esta substituição foi concordante com aquelas encontradas em outros isolados do Brasil, bem como em amostras da Coréia (KIM et al., 2007; VIANA-NIERO et al., 2008), Entretanto, evitou-se fazer inferências, tais como a existência de um padrão de distribuição geográfica para este alelo. Este polimorfismo encontra-se na região de hibridização do oligonucleotídeo TB12, usado no PRA-*hsp65*.

Na avaliação de *rpoB*, uma variação alélica não descrita para o complexo *M. chelonae* foi observada na posição 2659 (C ou T → G) de 3 amostras (P08, P11 e P14). Neste mesmo fragmento foram identificados possíveis nucleotídeos específicos para *M. abscessus*, *M. bolletii* e *M. massiliense* nos códons 954 e 966. Os aminoácidos dos códons 954 e 966 reforçaram a estreita relação entre *M. massiliense* e *M. bolletii*.

Em termos de taxonomia, o grupo de MCR tem sofrido constantes mudanças, o que se tornou fonte de confusão para médicos e microbiologistas (TORTOLI et al., 2003). *M. abscessus* antes de 1992 foi considerada uma subespécie de *M. chelonae* (DALEY; GRIFFITH, 2002). Agora com a classificação de *M. massiliense* e *M. bolletii* há a possibilidade de que a variante *M. abscessus* 2 tenha sido elevada a status de espécie, ou melhor, nas espécies *M. massiliense* e *M. bolletii*, o que mais uma vez pode comprometer as informações sobre frequência de detecção de *M. abscessus* antes de 2006, quando os nomes dessas espécies foram validados (EUZÉBY, 2009).

É preciso considerar que *M. massiliense* e *M. bolletii* foram definidas como novas taxa baseado em ensaios que incluíram: sequenciamento dos genes do RNAr 16S, *hsp65*, *sodA*, *recA* e *rpoB*, determinação do conteúdo de G+C e caracterização fenotípica, além da análise de ácidos micólicos e teste de sensibilidade aos antimicrobianos apenas para *M. bolletii*. No entanto, de acordo com os parâmetros recomendados pelo comitê *ad hoc* para reavaliação da definição de espécies em bacteriologia, além da análise das sequências dos genes do RNAr 16S

e de codificadores de proteínas, o ensaio de hibridização DNA-DNA deve ser considerado como critério molecular para definição de espécies (STACKEBRANDT et al., 2002).

Apesar desta técnica não ser frequentemente utilizada para a descrição de novas espécies, ela representa a mais importante aproximação para definição quantitativa de espécies e é a única que reflete a total complexidade genômica. A hibridização DNA-DNA é conhecida como o método superior para a elucidação das relações entre táxons estreitamente relacionados (TORTOLI, 2003).

A identificação de amostras de *M. colombiense* caracterizadas como *M. avium* pelo PRA-*hsp65* deve-se a estreita relação genética entre essas espécies. Murcia et al. (2006) relatam que *M. colombiense* compartilha o mesmo perfil de PRA-*hsp65* com a variante *M. avium* 1, resultado que concorda com amostras de três indivíduos deste estudo. Como *M. massiliense* e *M. bolletii*, *M. colombiense* foi validada como nova espécie recentemente e também pode ser resultado de reclassificação taxonômica, com elevação ao nível de espécies de variantes de *M. avium* já conhecidas na rotina laboratorial. A descrição dessa espécie contribui para o conhecimento da diversidade dos membros do MAC encontrados na região norte do Brasil.

Outro achado importante refere-se as amostras com perfil de PRA-*hsp65* característico de *M. asiaticum* 1, que após o sequenciamento de RNAr 16S e *hsp65* apresentaram-se como membros relacionados ao *M. simiae*. Na análise de *hsp65* essas amostras demonstraram similaridade de 97,8% a 98,1% com *M. interjectum* MS102. Essas amostras próximas ao *M. interjectum*, apresentaram-se com pigmentação variável, ou seja, dos sucessivos isolados de um mesmo indivíduo alguns exibiram pigmentação enquanto outros foram não cromogênicos. Entretanto, já se tem descrito uma variante não pigmentada de *M. interjectum* (TORTOLI et al., 1996)

Na avaliação dos sítios de cortes gerados pela enzima *Hae* III a partir das sequências *hsp65* destes isolados, verificamos 12 sítios nas amostras P40 a P48

(107, 128, 140, 162, 179, 198, 221, 257, 290, 402). No entanto, na sequência de *M. asiaticum* ATCC 25276 (AY299133) dez sítios de reconhecimento foram identificados (107, 128, 162, 198, 221, 257, 290, 402). Apesar das diferenças nos números de sítios de restrição entre as sequências P40 a P48 e da cepa de referência de *M. asiaticum*, ambas produzem o mesmo perfil de fragmentos visualizados no PRA-*hsp65* (dados não demonstrados).

Diferente das falhas do método de PRA-*hsp65* citadas anteriormente, que geravam dificuldades para distinção entre membros de um mesmo complexo, o compartilhamento de um único perfil entre membros de agrupamentos sistemáticos distintos é problemático, podendo o resultado influenciar de forma muito importante na escolha da terapia medicamentosa e desfecho clínico. Um dos agravantes está no fato de que estas entidades foram encontradas em 18% (9/50) dos indivíduos.

M. asiaticum é uma espécie raramente isolada de espécimes clínicos e, devido a sua baixa frequência, seu perfil de suscetibilidade não está bem estabelecido. Alguns relatos sugerem que *M. asiaticum* seja suscetível ao etambutol, etionamida, rifampicina, isoniazida e estreptomicina, enquanto outros têm relatado resistência a isoniazida e rifampicina (BLACKLOCK et al., 1983; TAYLOR et al., 1990; WAYNE, SRAMEK, 1992; DAWSON et al., 1995). A suscetibilidade de *M. asiaticum* aos macrolídeos e quinolonas não foi determinada (GRIFFITH et al., 2007). Já *M. interjectum* é uma espécie mais conhecida, frequentemente associada a casos de linfadenite cervical em crianças (SPRINGER et al., 1993; LUMB et al., 1997; De BAERE et al., 2001; SUSKIND et al., 1997; HAZRA et al., 1999; LINDEBOOM et al., 2007). Porém, existem alguns registros de infecção pulmonar e um caso bem documentado de doença pulmonar cavitária demonstrou um tratamento bem sucedido com o uso de claritromicina por 5 meses (TORTOLI, 2003).

Estudos posteriores serão realizados para o estabelecimento taxonômico das entidades estreitamente relacionadas ao *M. simiae* deste estudo, com caracterizações bioquímicas completas, análise de ácidos micólicos e testes de sensibilidade a antimicrobianos, além da análise de outras sequências de DNA como

o ITS, que permite diferenciação de MCL cujas sequências de RNAr 16S são muito similares (ROTH et al., 1998).

Um perfil não presente no algoritmo de PRA-*hsp65* usado para identificação de MNT foi encontrados na amostra P39. Essa amostra exibiu similaridade de 98,4% e 97,8% com *M. interjectum*, respectivamente nas sequências de RNAr 16S e *hsp65*. Apesar de não estar incluído na tabela algorítmica proposta para análise do PRA-*hsp65* (LEÃO et al, 2004; BRASIL/MS, 2008), o perfil apresentado foi descrito anteriormente por Ferdinand et al. (2004), sendo atribuído ao *M. interjectum*. Porém, o perfil das amostras P49 e P50, que apresentaram similaridades de 99,7% e 97,8% com *M. interjectum*, respectivamente em RNAr 16S e *hsp65*, não foram descritos em outros trabalhos.

Duas novas variantes alélicas de PRA-*hsp65* de espécies já descritas foram encontradas entre os isolados. Uma para *M. scrofulaceum*, cujo perfil foi comum ao *M. simiae* 1 e outra para *M. terrae*, cujo de perfil de PRA-*hsp65* ainda não havia sido descrito.

M. scrofulaceum e *M. simiae* são espécies pigmentadas, entretanto, *M. scrofulaceum* é escotocromógena e *M. simiae* é fotocromógena, característica que influencia significativamente na definição da espécie pelo PRA-*hsp65*. Essa observação, se dada a devida importância, poderia presuntivamente indicar a não concordância de resultados. Porém, em muitas situações, essas informações não são fornecidas aos laboratórios de referência que recebem isolados de MNT, restando ao microbiologista o registro de presença ou ausência de pigmentação e realização de subcultivo, o que torna o processo de identificação mais demorado.

Além da importância epidemiológica, a identificação micobacteriana ao nível de espécie tem importância clínica e implicações para o prognóstico (MARTINEZ, McADAMS, BATCHU, 2007). A identificação pode ser realizada através de caracterizações bioquímicas, que têm se tornado cada vez mais complexa diante do contínuo aumento do número de novas espécies (TORTOLI, 2003). Diante das limitações dos ensaios fenotípicos vários métodos baseados em técnicas de biologia

molecular têm sido aplicados a identificação micobacteriana, e incluem o uso de sondas comerciais, PRA-*hsp65* e análise de sequências de DNA (NEONAKIS et al., 2008).

Dentre os métodos moleculares, o PRA-*hsp65* tem sido amplamente adotado como ferramenta promissora para a rápida identificação de MNT (TELENTI et al., 1993; DEVALLOIS et al., 1997; BRUNELLO et al., 2001; LEÃO et al., 2005). De acordo com um estudo realizado para avaliar a confiabilidade deste método, o PRA-*hsp65* forneceu resultados incorretos para apenas 1,2% dos isolados de MNT identificados por métodos tradicionais no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (CHIMARA et al., 2008).

Quando comparamos os resultados de PRA-*hsp65* e sequenciamento de *hsp65* das amostras deste estudo, agora considerando a identificação de *M. abscessus* 2 e *M. avium* 1 como satisfatórias para fins de tratamento, pois a não distinção ocorre entre espécies estreitamente relacionadas, cuja terapia medicamentosa obedece ao mesmo protocolo, observamos discordância em 25,5% (13/51) dos resultados. Apesar de ainda ser um valor de discordância elevado, verificamos que isso se deve a uma questão intrínseca a diversidade de espécies encontradas em nossa área geográfica e que, portanto, ao se considerar as peculiaridades regionais, não devemos eleger o PRA-*hsp65* como metodologia única em laboratórios de referência para a identificação molecular de MNT envolvidas em infecções pulmonares.

Apesar de ter como vantagens a fácil execução e requerer menores recursos para implantação em laboratórios, o PRA-*hsp65* sozinho não permitiu a identificação das mais frequentes MNT no presente estudo, limitado principalmente pela diversidade genética das espécies encontradas. As dificuldades encontradas foram: (I) presença de espécies distintas com mesmos perfis e, (II) ocorrência de novos perfis (não previamente relatados). E, em muitos casos, a diferenciação de espécies recentemente descritas daquelas já previamente conhecidas foi difícil pelo PRA-*hsp65*. Os problemas encontrados neste trabalho representam alguns dos fatores críticos conhecidos quando se trabalha com PRA-*hsp65*. Hafner et al. (2004)

descreveram que a frequente descrição de novos perfis para novas espécies, em particular para espécies com elevado número de polimorfismos nas sequências de *hsp65*, cujas pequenas variabilidades no tamanho dos fragmentos determinam diferentes tipos genéticos, torna difícil a interpretação e limita seu amplo uso para identificação.

A análise de sequências nucleotídicas do gene do RNAr 16S tem sido amplamente utilizada para detecção e definição de novas espécies de micobactérias (TURENNE et al., 2001). Porém, este gene apresenta algumas limitações como a não diferenciação da espécie patogênica *M. kansasii* da não patogênica *M. gastri*. Entretanto, neste estudo, sua utilização foi de importante valor para o posicionamento dos isolados nos principais agrupamentos sistemáticos de micobactérias.

Embora a taxonomia micobacteriana tenha avançado muito na década passada, um considerável número de taxas ainda permanecem não identificadas, representando um importante reservatório de “novas espécies”. Um estudo avaliando 72 micobactérias de isolados clínicos e ambientais encontrou 53 entidades taxonômicas sem qualquer espécie correspondente oficialmente conhecida. Elas estavam homoganeamente distribuídas entre os principais agrupamentos sistemáticos de micobactérias (TORTOLI et al., 2003).

As sequências parciais de *hsp65* apresentaram-se mais variáveis que as do gene do RNAr 16S, exibindo maior poder discriminatório. Entretanto, a avaliação do gene do RNAr 16S torna-se muito importante, principalmente quando a diversidade de espécies de micobactérias presentes em determinada área geográfica é desconhecida. O uso de *rpoB* foi importante apenas para melhor distinção de MCR estreitamente relacionadas, com aplicação limitada para identificação de MCL devido ao pequeno número de sequências de MCL disponíveis para comparações no GenBank. Em síntese, as dificuldades para identificação de espécies micobacterianas através da análise comparativa de sequências de DNA deveram-se principalmente pela carência de sequências

disponíveis para comparações e falta de parâmetros moleculares para a definição de espécies dentro do gênero *Mycobacterium*, considerando os avanços taxonômicos.

Tem sido proposto que a análise de vários genes como *hsp65*, *rpoB* e *sodA*, em conjunto com o gene do RNAr 16S, aumente a robustez e o poder discriminatório para fornecer uma precisa identificação (DEVULDER et al., 2005). Entretanto, em nosso trabalho as análises do gene do RNAr 16S e *hsp65* foram suficientes para identificação de isolados clínicos pulmonares, nos casos em que o método de PRA-*hsp65* não permitiu a separação ou identificação. A priori, a metodologia baseada na análise de sequências usada neste trabalho será implantada na Seção de Bacteriologia e Micologia do IEC/PA e aplicada, juntamente com o método de PRA-*hsp65*, a identificação de MNT isoladas de amostras clínicas. Entretanto, será preciso inicialmente, a construção de um banco de sequências de DNA de cepas de referência no próprio laboratório, visto que a duvidosa qualidade das sequências obtidas em bancos públicos limita a utilização com propósito de identificação.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram a particular diversidade de MNT envolvidas na infecção pulmonar na região Norte do Brasil. Apesar de não refletir a real frequência de infecções pulmonares por MNT, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram a diversidade de MNT em casos de infecção pulmonar, o que aponta para a necessidade de utilização de ferramentas moleculares para identificação das espécies de MNT em Laboratórios de Referências, e dessa forma fornecer subsídios para melhor manejo dos casos.

6 CONCLUSÕES

- a) As MCL estão entre as mais frequentes MNT isoladas de casos com infecção pulmonar encaminhados ao IEC;
- b) Um total de 25,5% das MNT não pôde ser diferenciada ou identificada pelo PRA-*hsp65*, o que limita o uso deste método como ferramenta isolada para identificação de MNT;
- c) Para a correta identificação de MNT é necessário a avaliação de mais de um marcador molecular, sendo que o sequenciamento dos genes do RNAr 16S e *hsp65* foram suficientes para a identificação de espécies de interesse clínico previamente relatadas;
- d) Os complexos *M. chelonae*, *M. avium* e *M. simiae*, representaram as MNT mais frequentes na infecção pulmonar;
- e) Nove amostras de MNT detectadas em nosso estudo podem representar novas entidades taxonômicas pertencentes ao complexo *M. simiae*;
- f) A maior diversidade de espécies foi encontrada entre as MCL;
- g) A identificação de MNT em indivíduos com histórico de tratamentos sem sucesso para tuberculose pulmonar reforça a necessidade de realização de cultura para confirmação diagnóstica em casos que apresentem falência ao primeiro esquema terapêutico.

7 REFERÊNCIAS

ADÉKAMBI, T.; BERGER, P.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 133-143, jan. 2006.

ADÉKAMBI, T.; COLSON, P.; DRANCOURT, M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5699-5708, 2003.

ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M. *Mycobacterium bolletii* Respiratory Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, 2009.

ADÉKAMBI T, REYNAUD-GAUBERT, M.; GREUB, G.; GEVAUDAN, M. J.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5493-5501, 2004.

ALMEIDA, D. V.; BAETHGEN, L. F.; VALIM, A. R. M.; IANZER, F. M.; ROSSETTI, M. L.; ZAHA, A. Genotipagem de micobactérias através da técnica PRA a partir de cepas isoladas de pacientes da rede pública do estado do Rio Grande do Sul. **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2003.

BACHA, Helio Arthur Cimerman; HADAD, Sergio; MENDES, David Jamil; FIGUEIREDO; Caio Marcio. Prevalence of mycobacteremia in patients with AIDS and persistant fever. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 290-295, 2004.

BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D. Micobactérias "Não Tuberculosas" no Brasil. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 8, p. 23-32, 2000.

BLACKLOCK, Z. M.; DAWSON, D. J.; KANE, D. W.; MCEVOY, D. *Mycobacterium asiaticum* as a potential pulmonary pathogen for humans. A clinical and bacteriologic review of five cases. **American Review of Respiratory Disease**; v. 127, p. 241-244, 1983.

BRANTLEY, Julie S.; READINGER, Allison L.; MORRIS, Elizabeth S. Cutaneous infection with *Mycobacterium abscessus* in a child. **Pediatric Dermatology**. v. 23, n. 2, p. 128-131, 2006.

BRASIL. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008, 436 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução CNS 196, de 10 de outubro de 1996: Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm>. Acesso em: 20 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed., Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Nota técnica 08/08/2008. Assunto: **MICOBACTÉRIAS**. Disponível em: http://www.sbcpc.org.br/NotaTecnica_Micobacteria.pdf. Acesso em: 01 jan. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica**. Comitê Acessor para Co-infecção HIV-Tuberculose. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. **Tuberculose**. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Epidemiológica, 2005, p. 732–756.

BRITISH THORACIC SOCIETY. Management of opportunistic mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines, 1999. **Thorax**, v. 55, p. 210-218, 2000.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 3684-3689, 2002.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; GRIFFITH, D. E.; WALLACE JUNIOR, R. J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 911-925, 2002.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE JUNIOR, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 716-46, 2002.

BRUNELLO, F; LIGOZZI, M; CRISTELLI, E; BONORA, S; TORTOLI, E; FONTANA, R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2799-2806, 2001.

BUTLER W. Ray; GUTHERTZ, Linda S. Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of *Mycobacterium* Species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 704-726, 2001.

CARDOSO, A. M.; MARTINS DE SOUSA, E.; VIANA-NIERO, C.; BONFIM DE BORTOLI, F.; PEREIRA DAS NEVES, Z. C.; LEÃO, S. C.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 1552-1557, 2008.

CATTOIR, V. Molecular identification of mycobacteria and detection of antibiotic resistance. **Annales de Biologie Clinique**, v. 62, n. 4, p. 405-413.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Nontuberculous mycobacterial infections after cosmetic surgery-Santo Domingo, Dominican Republic, 2003-2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53, p. 509, 2004.

CHEMLAL, K. C.; PORTAELS, F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 77-63, 2003.

CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; UEKY, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; DURHAM, A. M.; ARBEIT, R. D.; LEÃO, S. C. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 48, p 1-12, 2008.

CHIMARA, E. **Avaliação de métodos moleculares para identificação de micobactérias e elaboração de um algoritmo de identificação.** 2005. 102 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHUNG, M. S.; GOLDSTEIN, M. H.; DRIEBE, W. T.; SCHWARTZ, B. H. *Mycobacterium chelonae* keratitis after laser in situ keratomileusis successfully treated with medical therapy and flap removal. **American Journal of Ophthalmology**, v. 129, p. 382-384, 2000.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Mycobacteria in water. **Journal of Applied Microbiology**, v. 57, p. 193-211, 1984.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M.; YATES, M. D. **Tuberculosis Bacteriology – Organization and Practice.** 2 ed. Butterworth-Heinemann: Oxford, 1997.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1305-1314, 2003.

DALEY, C. L.; GRIFFITH, D. E. Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. **Clinics in Chest Medicine**, v. 23, p. 623–632, 2002.

DAWSON, D. J.; BLACKLOCK, Z. M.; ASHDOWN, L. R.; BOTTGER, E. C. *Mycobacterium asiaticum* as the probable causative agent in a case of olecranon bursitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 753-756, 1995.

DE BAERE, Thierry; MOERMAN, Mieke; RIGOUTS, Leen; DHOOGHE, Catharina; VERMEERSCH, Hubert; VERSCHRAEGEN, Gerda; VANEECHOUTTE, Mario. *Mycobacterium interjectum* as causative agent of cervical lymphadenitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 725-727, 2001.

DE GROOTE, Mary A.; HUITT, Gwen. Infections due to rapidly growing mycobacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p.1756-1763, 2006.

DEVALLOIS, A. et al. Rapid identification of Mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition

of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2969 – 2073, 1997.

DEVULDER, G.; PÉROUSE DE MONTCLOS, M.; FLANDROIS., J. P. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 293-302, 2005.

DSMZ. **Bacterial nomenclature Up to Date**. Disponível em: <<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>>. Acesso em: 4 fev. 2009.

DUCATI, Rodrigo G.; BASSO, L. A. SANTOS, Diogenes S . Micobactérias. In: Luiz Rachid Trabulsi; Flavio Alterthum. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, v. 1, p. 409-421, 2004.

ENA, P.; SECHI, L. A.; MOLICOTTI, P.; ORTU, S.; ZANETTI, S. Cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection extending in the lower extremities in a renal transplanted patient. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 4, p. 504-505, 2005.

ESCALONILLA, P.; ESTEBAN, J.; SORIANO, M. L. FARIÑA, M. C.; PIQUE, E.; GRILLI, R. Cutaneous manifestations of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 23, n. 5, p. 214-221, 1998.

ESTEBAN, J.; ROBLAS, R. Fernández; CÍA, J. I. García; ZAMORA, N.; ORTIZ, A. Clinical significance and epidemiology of non-pigmented rapidly growing mycobacteria in a university hospital. **Journal of Infection**, v. 54, p. 135-145, 2007.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em: 4 fev. 2009.

FERDINAND, Séverine; LEGRAND, Eric; GOH, Khye Seng; BERCHEL, Mylène; MAZZARELLI, Gianna; SOLA, Christophe; TORTOLI, Enrico; RASTOGI, Nalin. Taxonomic and phylogenetic status of non-tuberculous mycobacteria in a Caribbean setting. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 399 – 408, 2004.

FERRAZOLI, L.; SILVA, E. A. M.; ICHIKAWA, T.; PALACI, M. Micobactérias outras que não o *Mycobacterium tuberculosis*: análise da ocorrência e de aspectos relevantes da infecção. **Hansen International**, v. 17, p. 15-20, 1992.

FERREIRA, R. M.; SAAD, M. H.; DA SILVA, M. G.; FONSECA, L. Non-tuberculous mycobacteria 1: one year clinical isolates identificatin in Tertiary Hospital AIDS Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in pré highly active antiretroviral therapy era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 725-729, 2002.

FIELD, Stephen K.; COWIE, Robert L. Lung Disease Due to the More Common Nontuberculous Mycobacteria. **Chest**, v. 129, p. 1653-1672, 2006.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey & Scott's: diagnostic microbiology**. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1998.

FREITAS, D.; ALVARENGA, L.; SAMPAIO, J.; MANNIS, M.; SATO, E.; SOUSA, L.; VIEIRA, L.; YUMC, Martins M. C; HOFLING-LIMA, A.; BELFORT, R. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIL. **Ophtalmology**, v. 110, p. 276-285, 2003.

FRUCHT, D. M.; SANDBERG, D. I.; BROWN, M. R.; GERSTBERGER, S. M.; HOLLAND, S. M. IL-12-Independent costimulation pathways for interferon-gamma production in familial disseminated *Mycobacterium avium* complex infection. **Clinical Immunology**, v. 91, n. 2, p. 234-241, 1999.

GLASSROTH, J. Pulmonary Disease Due to Nontuberculous Mycobacteria. **Chest**, v. 133, p. 243-251, 2008.

GOMILA, M.; RAMIREZ, A.; LALUCAT, J. Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. **Applied and Environmental Mycrobiology**, v. 73, n. 12, p. 3787-3797, 2007.

GOSLEE, S.; WOLINSKY, E. Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. **American Review of Respiratory Disease**, n. 113, p. 287-292, 1976.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S. HORSBURGH, M.; R., HUITT, G.; IADEMARCO, M. F.; ISEMAN, M.; OLIVIER, K.; RUOSS, S.; FORDHAM VON REYN, C.; WALLACE JUNIOR, R. J.; WINTHROP, K. American Thoracic Society. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobactecterial Diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, p. 367-416, 2007.

HADAD, J. D.; IDE, J.; FERRAZOLI, L.; SEISCENTO, M.; TELLES, M. A. S.; MARTINS, M. C.; LEITE, O. M.; UEKI, S. Y. M. **Micobacterioses: recomendações para diagnóstico e tratamento**. Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo, 2005.

HÄFNER, B.; HAAG, H.; GEISS, H. K.; NOLTE, O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 59-65, 2004.

HAZRA, R.; ROBSON, C.; PEREZ-ATAYDE, A. R.; HUSSON, R. N. Lymphadenitis due to nontuberculous mycobacteria in children: presentation and response to therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 123-129, 1999.

HOLLAND, Steven M. Nontuberculous mycobacteria. **American Journal of The Medical Sciences**, v. 321, n. 1, p. 49-55, 2001.

JOUANGUY, E.; LAMHAMEDI-CHERRADI, S.; LAMMAS, D.; DORMAN, S. E.; FONDANÈCHE, M. C.; DUPUIS, S.; DÖFFINGER, R.; ALTARE, F.; EMILE, J. F.; GIRDELSTONE, J.; DUCOULOMBIER, H.; EDGAR, D.; CLARKE, J.; OXELIUS, V. A.; BRAI, M.; NOVELLI, V.; HEYNE, K.; FISCHER, A.; HOLLAND, S. H.; KUMARARATNE, D. S.; SCHREIBER, R. D.; CASANOVA, J. L. A human IFN-GR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. **Nature Genetics**, v. 21, n. 4, p. 370-378, 1999.

KATOCH, V. M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, p. 290-304, 2004.

KIM, H. S.; YUN, Y. J.; PARK, C. G.; LEE, D. H.; CHO, Y. K.; PARK, B. J.; JOO, S. I.; KIM, E. C.; HUR, Y. J.; KIM, B. J.; KOOK, Y. H. An Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3127–3130, 2007.

KIM, H. Y.; KOOK, Y.; YUN, Y. J.; PARK, C. G.; LEE, N. Y.; SHM, T. S.; KIM, B. J.; KOOK, Y. H. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* Group Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 3384-3390, 2008.

KIM, H.; KIM, S. H.; SHIM, T. S.; KIM, M. N.; BAI, G. H.; PARK, Y. G.; LEE, S. H.; CHA, C. Y.; KOOK, Y. H.; KIM, B. J. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. **Journal of Microbiological Methods**, v. 62, p. 199–209, 2005.

KIM, H.; KIM, S. H.; SHIM, T. S.; KIM, M.; BAI, G. H.; PARK, Y. G.; LEE, S. H.; CHAE, G. T.; CHA, C. Y.; KOOK, Y. H.; KIM, B. J. Differentiation of *Mycobacterium*

species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1649–1656, 2005.

KITADA, S.; MAEKURA, R.; TOYOSHIMA, N.; FUJIWARA, N.; YANO, I.; OGURA, T.; ITO, M.; KOBAYASHI, K. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 1328-1335, 2002.

KOH, Won Jung; KWON, Jung; JEON, Kyeongman; KIM, Tae Sung; LEE, Kyung Soo; PARK, Young Kil; BAI, Gill Han. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. **Chest**, v. 129, n. 2, p. 341-348, 2006.

KOH, Won Jung; KWON, O Jung e LEE, Kyung Soo. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. **Korean Journal of Radiology**, v. 3, n. 3, p. 145-157, 2002.

KOH, Won Jung; KWON, O Jung; LEE, Kyung Soo. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases: a Korean perspective. **Journal of Korean Medical Science**, v. 20, p. 913-925, 2005.

KÖNIG, B.; TAMMER, I., SOLLICH, V.; KÖNIG, W. Intra- and interpatient variability of the *hsp65* and 16S-23S intergenic gene region in *Mycobacterium abscessus* strains from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3500-3503, 2005.

KRZYWINSKA, Elzbieta; KRZYWINSKI, Jaroslaw; SCHOREY Jeffrey S. Phylogeny of *Mycobacterium avium* strains inferred from glycopeptidolipid biosynthesis pathway genes. **Microbiology**, v. 150, p. 1699-1706, 2004.

KUBICA, George P. *Mycobacterium tuberculosis* Ziehl-Neelsen Stain. Center for Diseases Control and Prevention. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Mycobacterium_tuberculosis_Ziehl-Neelsen_stain_02.jpg>. Acesso: 12 out. 2008.

LALITHA, P.; RATHINAM, S. R.; SRINIVASAN, M. Ocular infections due to Non-Tuberculous Mycobacteria. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 231-237, 2004.

LEÃO, S. C.; BERNADELLI, A.; CATALDI, A.; ZUMARRAGA, M.; ROBLEDO, J.; REALPE, T.; MEJÍA, G. I.; TELLES, M. A. S.; CHIMARA, E.; VELAZCO, M.; FERNANDEZ, J.; RODRIGUES, P. A.; GUERRERO, M. I.; LEÓN, C. I.; PORRAS, T. B.; RATOGLI, N.; GOH, K. S.; SUFFYS, P.; ROCHA, A. S.; NETTO, D. S.; RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; BARRERA, L.; PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; PORTAELS, F.. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. **Journal of Microbiological Methods**, v. 61, p. 193-199, 2005.

LEÃO, Sylvia Cardoso; MARTIN, Anandi; MEJIA, Gloria Isabel; PALOMINO, Juan Carlos; ROBLEDO, Jaime; TELLES, Maria Alice da Silva; PORTAELS, Françoise. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. **Vanden BROELLE, Brugges**, 2004.

LEE, H.; PARK, H. J.; CHO, S. N.; BAI, G. H.; KIM, S. J. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2966-2971, 2000.

LEITE, C. Q. J.; DA SILVA ROCHA, A.; DE ANDRADE LEITE, S. R. A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin-layer chromatography and molecular methods. **Microbiology and Immunology**, v. 49, p. 5721–5728, 2005.

LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L. L.; SOUSA, M. S.; LEÃO, S. C.; NIERO, C. V.; SALLES, G. C.; PANTOJA, A. M. Infecções por *Mycobacterium abscessus* após procedimentos estéticos invasivos. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos – SP (Resumo 317-1), 2005.

LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L.; LOUREIRO, E. C. B.; COSTA, M; M.; CARDOSO, N. C.; LIMA, G. L. F.; SOUSA, M. S. Nested-PCR for gene that encodes the antigen b applied to the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 212-215, 2007.

LINDEBOOM, J. A.; KUIJPER, E. J.; BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET, E. S.; LINDEBOOM, R.; PRINS, J. M. Surgical excision versus antibiotic treatment for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: a multicenter, randomized, controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, v.44, n. 8, p. 1057-64, 2007.

LOPES, M. L.; LIMA, K. V. B.; FURLANETO, I. P; SANTOS, J. G; MARQUES, N. R.; RABELLO, M. C. S.; LEÃO, S. C. Micobacterioses associadas a cirurgias

videolaparoscópicas em Belém. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos – SP (Resumo 660-2), 2005a.

LOPES, M. L.; LIMA, K. V. B.; LEÃO, S. C.; SOUZA, M. S.; SANTI, L. Q.; LOUREIRO, E. C. B. Micobacterioses associadas a procedimentos invasivos em Belém. **Revista Paraense de Medicina**, v. 19, n. 2, p. 87-89, 2005b.

LUMB, R.; GOODWIN, A; RATCLIFF, R.; STAPLEDON, R.; HOLLAND, A; BASTIAN, I. Phenotypic and molecular characterization of three clinical isolates of *Mycobacterium interjectum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2782-2785, 1997.

MARRAS, Theodore K.; DALEY, Charles. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. **Clinics in Chest Medicina**, v. 23, p. 553-567, 2002.

MARTIN, Anandi; UWIZEYE, Cécile; FISSETTE, Krista; DE RIJK, Pim; PALOMINO, Juan Carlos; LEÃO, Sylvia; PORTAELS, Françoise. Application of the *hsp65* PRA method for the rapid identification of mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 39–43, 2007.

MARTINEZ, S.; McADAMS, H. P.; BATCHU, C. S. The many faces of pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. **American Journal of Roentgenology**, v. 189, p. 177-186, 2007.

MCNABB, A.; EISLER, D.; ADIE, K.; AMOS, M.; RODRIGUES, M.; STEPHENS, G.; BLACK, W. A.; ISAAC-RENTON, J. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene (*hsp65*) for Routine Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Clinical Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3000–3011, 2004.

MCWHINNEY, P. H.; YATES, M.; PRENTICE, H. G.; THRUSSELL., M.; GILLESPIE, S. H.; KIBBLER, C. C. Infection caused by *Mycobacterium chelonae*: a diagnostic and therapeutic problem in the neutropenic patient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 1208-1212, 1992.

MIKOLICH, D.; MATES, S. M. Granulomatous prostatitis due to *Mycobacterium avium* complex. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 589-591, 1992.

MURCIA, M. I.; TORTOLI, E.; MENENDEZ, M. C.; PALENQUE, E.; GARCIA, M. J. *Mycobacterium colombiense*, sp. nov., a new member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2049-2054, 2006.

NEONAKIS, I. K.; GITTI, Z.; KRAMBOVITIS, E.; SPANDIDOS, D. A. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 1-11, 2008.

NEWPORT, Melanie. The genetics of nontuberculous mycobacterial infection. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-12, 2003.

NIKA, W. Studies on the effect of starvation on mycobacteria. **Infection and Immunity**, v. 9, p. 843-850, 1974.

NOLTE, F. S.; METCHOCK, B. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 6. ed. Washington: ASM; p. 400-437, 1995.

OTTENHOFF, T. H.; VERRECK, F. A.; HOEVE, M. A.; VOSSE, E. Control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberculosis**, v. 85, p. 53-64, 2005.

OTTENHOFF, T. H.; VERRECK, F. A.; LICHTENAUER-KALIGIS, E. G.; HOEVE, M. A.; SANAL, O.; VAN DISSEL, J. T. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. **Nature Genetics**, v. 32, p. 97-105, 2002.

PASTEUR INSTITUTE. **Tuberculosis & Mycobacterial**. Annual Report, 2005.

PATEL, J. B.; LEONARD, D. G.; PAN, X.; MUSSER, J. M.; BERMAN, R. E.; NACHAMKIN, I. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 246-51, 2000.

PATEL, Smita Y.; HOLLAND, Steven M. Mechanisms of diseases: atypical familial mycobacteriosis. **Drug Discovery Today: Diseases Mechanisms**, v. 2, n. 4, p. 487-494, 2005.

PEDRO, H. S. P.; PEREIRA, M. I. F.; GOLONI, M. R. A.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 11, p. 950 – 955, 2008.

PETRINI, Björn. *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 114, p. 319-328, 2006.

PLIKAYTIS, B. B.; PLIKAYTIS, B. D.; YAKRUS, M. A.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L.; SILCOX, V. A.; SHINNICK, T. M. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1815-1822, 1992.

PORTAELS, Françoise. Epidemiology of Mycobacterial Diseases. **Clinics in Dermatology**, v. 13, p. 207-222, 1995.

PRADO, A. C.; CASTILHO, P. F. Lay clinics and an epidemic outbreak of mycobacterium skin and soft tissue infection. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 113, p. 800-801, 2004.

PRASITE. **Identification of Mycobacteria**. Disponível em: <<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>>. Acesso em: 20 out. 2008.

PRENDKI, V.; GERMAUD, P.; BERNER, P.; MASSEAU, A.; HAMIDOU, M. Les infections à mycobactéries non tuberculeuses. **La Revue de médecine interne**, v. 29, n. 5, p. 370-379, 2008.

PRIMM, T. P.; LUCERO, C. A.; FALKINHAM, J. O. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 98-106, 2004.

QUEIPO, J. A.; BROSETA, E.; SANTOS, M.; SANCHEZ-PLUMED, J.; BUDIA, A.; JIMENEZ-CRUZ, F. Mycobacterial infection in a series of 1261 renal transplant recipients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 6, p. 518-525, 2003.

QUNIBI, W. Y.; AL-SIBAI, M. B.; TAHER, S.; HARDER, E. J.; DE VOL, E.; AL-FURAYH, O.; GINN, H. E. Mycobacterial infection after renal transplantation--report of 14 cases and review of the literature. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 77, n. 282, p. 1039-60, 1990.

RINGUET, H.; AKOUA-KOFFI, C.; HONORE, S.; VARNEROT, A.; VINCENT, V.; BERCHE, P.; GAILLARD, J. L.; PIERRE-AUDIGIER, C. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 852-857, 1999.

ROTH, A.; FISCHER, M.; HAMID, H. E.; LUDWIG, W.; MICHALKE, S.; MAUCH, H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 139-147, 1998.

RUNYON, E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Medical Clinics of North America**, v. 43, p. 273-290, 1959.

SAFDAR, A.; HAN, X. Y. *Mycobacterium lentiflavum*, a recently identified slow-growing mycobacterial species: clinical significance in immunosuppressed cancer patients and summary of reported cases of infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 8, p. 554-558, 2005.

SAMPAIO, J. L.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; DA SILVA TELLES, M. A.; DEL GUERCIO, V. M.; JERICÓ, Z. V.; MIYASHIRO, K.; FORTALEZA, C. M.; PADOVEZE, M. C.; LEÃO, S. C. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. **Clinical Microbiology and Infection**; v. 12, p. 142-149, 2006a.

SAMPAIO, J. L.; JUNIOR, D. N.; DE FREITAS, D.; HÖFLING-LIMA, A. L.; MIYASHIRO, K.; ALBERTO, F. L.; LEÃO, S. C. An Outbreak of Keratitis Caused by *Mycobacterium immunogenum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3201-3207, 2006b.

SANTOS, R. M. C.; OGUSKU, M. M.; MIRANDA, J. M.; DOS SANTOS, M. C.; SALEM, J. I. Avaliação da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes indígenas e não indígenas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 3, p. 234-240, 2006.

SCHINSKY, M. F.; MOREY, R. E.; STEIGERWALT, A. G.; DOUGLAS, M. P.; WILSON, R. W.; FLOYD, M. M.; BUTLER, W. R.; DANESHVAR, M. I.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE JUNIOR, R. J.; MCNEIL, M. M.; BRENNER, D. J.; BROWN, J. M. Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical

isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, n. 5, p. 1653-1667, 2004.

SCHOLZE, A.; LODDENKEMPER, C.; GRÜNBAUM, M.; MOOSMAYER, I.; OFFERMANN, G.; TEPEL, M. Cutaneous *Mycobacterium abscessus* infection after kidney transplantation. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 20, p.1764-1765, 2005.

SHARMA, V. D.; KATOCH, V. M.; SHIVANNAVAR, C. T.; GUPTA, U. D.; SHARMA, R. K.; PATIL, M. A.; BHARADWAJ, V. P.; AGRAWAL, B. H. . Protein and isoenzyme patterns of mycobacteria. II. Their role in identification of slowly growing mycobacteria. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 13, p. 119-123, 1995.

SHIN, S.; KIM, E. C.; YOON, J. H. Identification of nontuberculous mycobacteria by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA, the heat-shock protein 65 and the RNA polymerase β -subunit genes. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 26, p. 153-160, 2006.

SILVA, C.; UEKI, S. Y. M.; GEIGER, D. C. P.; LEÃO, S. C. *hsp65* PCR restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 25-28, 2001.

SILVA, E. A. M.; MIRANDA, J. B. N.; FERRAZOLI, L.; FUZIHARA, T. O.; PALACI, M. Ocorrência de infecções por *M. kansasii* em São Paulo - Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 47, p. 1, 1987.

SIMMON, K. E.; POUNDER, J. I.; GREENE, J. N.; WALSH, F.; ANDERSON, C. M.; COHEN, S.; PETTI, C. A. Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* sequencing of clinical isolates collected in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1978-1980, 2007.

SOMOSKOVI, A.; MESTER, J.; HALE, Y. M.; PARSONS, L. M.; SALFINGER, M. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. **Clinics in Chest Medicine**, v. 23, p. 585– 597, 2002.

SOUSA, M. S. **Diversidade Genômica e Epidemiologia Molecular de Micobactérias no Estado do Pará**. 103 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2003.

SPRINGER, B.; KIRSCHNER, P.; ROST-MEYER, G.; SCHRÖDER, K. H.; KROPPESTEDT, R. M.; BÖTTGER, E. C. *Mycobacterium interjectum*, a new species isolated from a patient with chronic lymphadenitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 3083–3089, 1993.

STEINGRUBE, V. A.; GIBSON, J. L.; BROWN, B. A.; ZHANG, Y.; WILSON, R. W.; RAJAGOPALAN, M.; WALLACE JUNIOR, R. J. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-Kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 149-53, 1995.

SUSKIND, D. L.; HANDLER, S. D.; TOM, L. W. C.; POTSIC, W. P.; WETMORE, R. F. Nontuberculous mycobacterial cervical adenitis. **Clinical Pediatrics**, v. 36, n. 7, p. 403-409, 1997.

TAMBE, Y. Mycobacterial cell wall diagram. Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Mycobacterial_cell_wall_diagram.png. Acesso em: Jan 2007.

TAYLOR, L. Q.; WILLIAMS, A. J.; SANTIAGO, S. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium asiaticum*. **Tubercle and Lung Disease**, v. 71, n. 4, p. 303-305, 1990.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 175-178, 1993.

THIBERT, L.; LAPIERRE, S. Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1759-1763, 1993.

THOMSON, Alexis. **Tuberculosis**. In THOMSON, Alexis; MILES, Alexander. *Manual of Surgery. General Surgery*. 6 ed. London: Oxford Medical Publications, 2006.

TIMPE, A.; RUNYON, E. H. The relationship of atypical acid-fast bacilli to human disease: a preliminary report. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 202-209, 1954.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 319-354, 2003.

TORTOLI, E. Isolation on an unusual Mycobacterium from an AIDS patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2316 – 2319, 1996.

TORTOLI, E.; GABINI, R.; GALANTI, I.; MARIOTTINI, A. Lethal *Mycobacterium massiliense* sepsis, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 984-985, 2008.

TSUKAMURA, M.; KITA, N.; SHIMOIDE, H.; ARAKAWA, H., KUZE, A. A. Studies on the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan. **American Review of Respiratory Disease**, v. 137, p. 1280-1284, 1988.

TURENNE, C. Y.; TSCHETTER, L.; WOLFE, J.; KABANI, A. Necessity of Quality-Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases: Identifying Nontuberculous *Mycobacterium* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3637-3648, 2001.

UEKI, S. Y. M.; TELLES, M. A. S.; VIRGILIO, M. C.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2005.

VAN DE VOSSE, E.; HOEVE, M. A.; OTTENHOFF, T. H. M. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. **Lancet Infectious Diseases**. v.4, p.739–49, 2004.

VIANA-NIERO, C.; LIMA, K. V.; LOPES, M. L.; RABELLO, M. C.; MARSOLA, L. R.; BRILHANTE, V. C.; DURHAM, A. M.; LEÃO, S. C. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 52-57, 2008.

VON REYN, C. F.; MASLOW, J. N.; BARBER, T. W.; FALKINHAM, J. O.; ARBEIT, R. D. Persistent colonization of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 1137-1141, 1994.

VOSSLER, J. L. *Mycobacterium tuberculosis* and other nontuberculous mycobacteria. In: MAHON, C. R.; MANUSELIS, G. **Textbook of diagnostic microbiology**. 2. ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company, p. 667-707, 2000.

WALLACE JUNIOR, R. J.; BROWN, B. A.; GRIFFITH, D. E. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 453-490, 1998.

WANG, S. X.; TAY, L.; SNG, L. H. Rapid Identification of Pathogenic Rapidly Growing Mycobacteria by PCR-Restriction Endonuclease Analysis. **Annals Academy of Medicine Singapore**, v. 34, p. 137-140, 2005.

WAYNE, L. G.; SRAMEK, H. A. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 1, p. 1-25, 1992.

WINN JUNIOR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Micobactérias. In: _____. **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 19.

WINTHROP, K. L.; STEINBERG, E. B.; HOLMES, G.; KAINER, M. A.; WERNER, S. B.; WINQUIST, A.; VUGIA, D. J. Epidemic and sporadic cases of nontuberculous mycobacterial keratitis associated with laser in situ keratomileusis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 135, p. 223-224, 2003.

WOLINSKY, E. Nontuberculous mycobacterium and associated diseases. **American Review of Respiratory Diseases**, v. 119, p. 107-159, 1979.

WU, Fann; DELLA-LATTA, Phyllis. Molecular Typing Strategies. **Seminars in Perinatology**, v. 26, n. 5, p. 357-366, 2002.

YAM, Wing-Cheong; YUEN, Kwok-Yung; KAM, Sin-Yee; YIU, Lap-San; CHAN, Kin-Sang; LEUNG, Chi-Chiu; TAM, Cheuk-Ming; HO, Po-On; YEOW, Wing-Wai; SETO, Wing-Hong; HO, Pak-Leung. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55:, p. 529-536, 2006.

YOUNG, L. S. Mycobacterial diseases and the compromised host. **Clinical and Infectious Diseases**, n. 17, S. 2, p. 436-441, 1993.

ZAMARIOLI, L. A.; Coelho; Andréa G. V.; Pereira, C. M.; Nascimento, A. C. C.; Ueki, S. Y. M.; Chimara, E.; Estudo descritivo da frequência de micobactérias não tuberculosas na Baixada Santista (SP). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 8, p. 590-594, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Tabela 1. Comparações entre os resultados de PRA-*hsp65* e sequenciamento de *rpoB*, *hsp65* e RNAr 16S para amostras de micobactérias de crescimento rápido.

| Amostra1 | PRA- <i>hsp65</i> | | | Similaridade (%) com sequências obtidas na base de dados do GenBank | | |
|----------|-------------------|----------------|-----------------------|---|---|--------------------------------------|
| | Fragmento (pb) | | Identificação2 | <i>rpoB</i> | <i>hsp65</i> | RNAr 16S |
| | <i>BstE</i> II | <i>Hae</i> III | | | | |
| P1 | 235/210 | 145/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 1 | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P2 | 235/210 | 145/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 1 | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P3 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. bolletii</i> CIP 108541 (99,8) | <i>M. bolletii</i> CIP 108541 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P4 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. bolletii</i> CIP 108541 (99,7) | <i>M. bolletii</i> CIP 108541 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P5 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. bolletii</i> CIP 108541 (99,7) | <i>M. bolletii</i> CIP 108541 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P6 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. bolletii</i> CIP 108541 (99,7) | <i>M. bolletii</i> CIP 108541 (99,5) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P7 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (100) | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P8 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,8) | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P9 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P10 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P11 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,8) | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P12 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P13 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (100) | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P14 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,8) | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P15 | 235/210 | 200/70/60/50 | <i>M. abscessus</i> 2 | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (100) | <i>M. massiliense</i> CIP 108297 (99,7) | <i>M. abscessus</i> CIP 104536 (100) |
| P16 | 235/115/85 | 145/120/60 | <i>M. fortuitum</i> 1 | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) |
| P17 | 235/115/85 | 145/120/60 | <i>M. fortuitum</i> 1 | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (99,5) | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) |
| P18 | 235/115/85 | 145/120/60 | <i>M. fortuitum</i> 1 | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) |
| P19 | 235/115/85 | 145/120/60 | <i>M. fortuitum</i> 1 | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (99,7) | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) | <i>M. fortuitum</i> ATCC 13756 (100) |

1. Amostras pulmonares designadas de P1 a P19; 2. Identificação baseada em comparações com o algoritmo de perfis de PRA-*hsp65* apresentado no Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias (Brasil, 2008).

APÊNDICE 2

Tabela 2. Comparações entre os resultados de PRA-*hsp65* e sequenciamento de *hsp65* e RNAr 16S para de micobactérias de crescimento lento.

| Amostra | PRA- <i>hsp65</i> | | Identificação ² | Similaridade (%) com sequências obtidas na base de dados do GenBank | |
|---------|-------------------|----------------|----------------------------|---|---|
| | Fragmentos (pb) | | | <i>hsp65</i> | RNAr 16S |
| | <i>BstE</i> II | <i>Hae</i> III | | | |
| P20 | 235/210 | 130/105/80 | <i>M. kansasii</i> 1 | <i>M. kansasii</i> CIP 104589 (100) | <i>M. kansasii</i> CIP 104589 (100) |
| P21 | 235/210 | 185/130 | <i>M. simiae</i> 1 | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (99,0) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (100) |
| P22 | 235/ 210 | 185/130 | <i>M. simiae</i> 1 | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (98,8) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (100) |
| P23 | 235/210 | 185/130 | <i>M. simiae</i> 1 | <i>M. scrofulaceum</i> CIP 104531 (98,8) | <i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981 (99,7) |
| P24 | 235/120/100 | 145/130/60 | <i>M. intracellulare</i> 1 | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (100) | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (100) |
| P25 | 235/120/100 | 145/130/60 | <i>M. intracellulare</i> 1 | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (99,7) | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (100) |
| P26 | 235/120/100 | 145/130/60 | <i>M. intracellulare</i> 1 | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (99,7) | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (100) |
| P27 | 235/120/100 | 145/130/60 | <i>M. intracellulare</i> 1 | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (99,5) | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (100) |
| P28 | 235/120/100 | 145/130/60 | <i>M. intracellulare</i> 1 | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (99,5) | <i>M. intracellulare</i> CIP 104243 (100) |
| P29 | 235/210 | 130/105 | <i>M. avium avium</i> 1 | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (99,0) | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (99,1) |
| P30 | 235/210 | 130/105 | <i>M. avium avium</i> 1 | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (98,8) | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (100) |
| P31 | 235/210 | 130/105 | <i>M. avium avium</i> 1 | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (99,7) | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (100) |
| P32 | 235/210 | 130/105 | <i>M. avium avium</i> 1 | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (99,5) | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (100) |
| P33 | 235/210 | 130/105 | <i>M. avium avium</i> 3 | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (98,3) | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (99,7) |
| P34 | 235/210 | 130/105 | <i>M. avium avium</i> 3 | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (98,3) | <i>M. colombiense</i> CIP 108962 (99,7) |
| P35 | 235/210 | 130/105 | <i>M. avium avium</i> 1 | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (100) | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (99,3) |
| P36 | 235/210 | 130/105 | <i>M. avium avium</i> 1 | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (100) | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (99,3) |
| P37 | 235/210 | 145/130 | <i>M. avium avium</i> 1 | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (100) | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (99,3) |
| P38 | 235/210 | 145/130 | <i>M. avium avium</i> 1 | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (100) | <i>M. avium avium</i> CIP 104244 (99,3) |

Tabela 2. Comparações entre os resultados de PRA-*hsp65* e sequenciamento de *hsp65* e RNAr 16S para de micobactérias de crescimento lento (continuação)

| Amostra1 | PRA- <i>hsp65</i> | | Identificação2 | Similaridade (%) com sequências obtidas na base de dados do GenBank | |
|----------|-------------------|----------------|-------------------------|---|---|
| | Fragmentos (pb) | | | <i>hsp65</i> | RNAr 16S |
| | <i>BstE</i> II | <i>Hae</i> III | | | |
| P39 | 441 | 130/105 | <i>M. interjectum</i> * | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,3) <i>M. interjectum</i> MS102 (97,8) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,7) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (98,7) <i>M. interjectum</i> N364C (98,4) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (97,8) |
| P40 | 235/210 | 110/105 | <i>M. asiaticum</i> 1 | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,5) <i>M. interjectum</i> MS102 (97,8) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,5) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (98,7) <i>M. interjectum</i> N364C (98,4) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (97,8) |
| P41 | 235/210 | 110/105 | <i>M. asiaticum</i> 1 | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,5) <i>M. interjectum</i> MS102 (97,8) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,5) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (98,7) <i>M. interjectum</i> N364C (98,4) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (97,8) |
| P42 | 235/210 | 110/105 | <i>M. asiaticum</i> 1 | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) <i>M. interjectum</i> MS102 (98,1) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,7) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (98,7) <i>M. interjectum</i> N364C (98,4) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (97,8) |
| P43 | 235/210 | 110/105 | <i>M. asiaticum</i> 1 | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) <i>M. interjectum</i> MS102 (98,1) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,7) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (98,7) <i>M. interjectum</i> N364C (98,4) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (97,8) |
| P44 | 235/210 | 110/105 | <i>M. asiaticum</i> 1 | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) <i>M. interjectum</i> MS102 (98,1) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,7) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (98,7) <i>M. interjectum</i> N364C (98,4) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (97,8) |

Tabela 2. Comparações entre os resultados de PRA-*hsp65* e sequenciamento de *hsp65* e RNAr 16S para de micobactérias de crescimento lento (continuação)

| Amostra1 | PRA- <i>hsp65</i> | | Identificação2 | Similaridade (%) com seqüências obtidas na base de dados do GenBank | |
|----------|-------------------|------------|-----------------------|---|--|
| | Fragmentos (pb) | | | <i>hsp65</i> | RNAr 16S |
| | BstE II | Hae III | | | |
| P45 | 235/210 | 110/105 | <i>M. asiaticum 1</i> | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) <i>M. interjectum</i> MS102 (98,1) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,7) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) <i>M. interjectum</i> N364C (98,4) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,7) |
| P46 | 235/210 | 110/105 | <i>M. asiaticum 1</i> | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) <i>M. interjectum</i> MS102 (98,1) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,7) | <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) <i>M. interjectum</i> N364C (98,4) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,7) |
| P47 | 235/210 | 110/105 | <i>M. asiaticum 1</i> | <i>M. interjectum</i> MS102 (98,1) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,2) <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) | <i>M. interjectum</i> N364C (99,7) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (99,1) <i>M. simiae</i> CIP 104531 (99,1) |
| P48 | 235/210 | 110/105 | <i>M. asiaticum 1</i> | <i>M. interjectum</i> MS102 (98,1) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,7) <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) | <i>M. interjectum</i> N364C (99,7) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (99,1) <i>M. simiae</i> CIP 104531 (99,1) |
| P49 | 441 | 110/105 | Desconhecido | <i>M. interjectum</i> MS102 (97,8) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,5) <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,5) | <i>M. interjectum</i> N364C (99,7%) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (99,1) <i>M. simiae</i> CIP 104531 (99,1) |
| P50 | 441 | 110/105 | Desconhecido | <i>M. interjectum</i> MS102 (97,8) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (95,2) <i>M. simiae</i> CIP 104531 (94,7) | <i>M. interjectum</i> N364C (99,7) <i>M. interjectum</i> ATCC 51457 (99,1) <i>M. simiae</i> CIP 104531 (99,1) |
| P51 | 320/115 | 140/100/90 | Desconhecido | <i>M. terrae</i> MS267 (98,1) <i>M. terrae</i> ATCC 15755 (93,1) | <i>M. terrae</i> N177 (99,5) <i>M. terrae</i> ATCC 15755 (96,6) |

1. Amostras pulmonares de MCL identificadas como P20 a P50; 2. Identificação baseada em comparações com o algoritmo de perfis de PRA-*hsp65* apresentado no manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias (Brasil, 2008), exceção para a amostra P39 que foi comparada com o perfil publicado em Ferdinand et al. (2004)*.