



Universidade Federal de Uberlândia

Faculdade de Medicina



Pós Graduação em Ciências da Saúde

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS POR
PCR-RFLP *hsp65* E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DO DIAGNÓSTICO
CONVENCIONAL**

FABIANE NUNES RIELLO

Uberlândia

2015

FABIANE NUNES RIELLO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS POR
PCR-RFLP *hsp65* E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DO DIAGNÓSTICO
CONVENCIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Isabela Maria Bernardes Goulart
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Uberlândia

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R555i Riello, Fabiane Nunes, 1990-

2015 Identificação molecular de espécies de micobactérias por PCR-RFLP hsp65 e implicações clínicas do diagnóstico convencional / Fabiane Nunes Riello. - 2015.

95 f. : il.

Orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart. Coorientador: Luiz Ricardo Goulart.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Diagnóstico molecular - Teses. 3. Tuberculose - Diagnóstico - Teses. I. Goulart, Isabela Maria Bernardes. II. Goulart, Luiz Ricardo. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS POR
PCR-RFLP *hsp65* E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DO DIAGNÓSTICO
CONVENCIONAL**

Dissertação aprovada para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia (MG) pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 24 de fevereiro de 2015.

Prof^a Dr^a Isabela Maria Bernardes Goulart, UFU/MG

Prof^a Dr^a Denise Von Dolinger de Brito, UFU/MG

Prof^a Dr^a Adriana Freitas Neves, UFG/GO

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos e amados pais Edoardo Riello e Creonice Nunes que me fizeram chegar até aqui, me apoiara e me incentivaram em todas minhas escolhas e por me amarem incondicionalmente;

Ao meu namorado Danilo Moura que esteve ao meu lado nos momentos de dificuldade, e pela sua paciência e compreensão nos meus períodos de ausência;

À minha orientadora Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart pela sua confiança, por sua experiência e competência em me orientar e contribuir imensamente para meu desenvolvimento profissional e pessoal;

Ao meu co-orientador Dr. Luiz Ricardo Goulart exemplo de pesquisador, sempre disposto a me auxiliar nas horas mais difíceis norteando as pesquisas e trabalhando incansavelmente para o desfecho dos projetos;

Ao Técnico do laboratório de Análise Clínicas da UFU Ms. Tomáz Aquino Moreira pelo tempo disponibilizado para me auxiliar nas técnicas de cultura, às longas tardes de sábado de trabalho e todos os ensinamentos transmitidos;

À Rebecca Tavares companheira e amiga do laboratório CREDESH em quem pude confiar e contar me ensinou e me ajudou diversas vezes sempre com boa vontade e presteza;

Ao Sérgio Araújo que me encaminhou e auxiliou nos primeiros passos, até que eu pudesse “andar com as próprias pernas”;

À todos os técnicos e estagiários do laboratório do CREDESH, por todo auxílio, pela boa companhia, muitas risadas e companheirismo que tornaram os dias de trabalho muito mais agradáveis;

Ao Dr. Aércio Sebastião Borges pelas valiosas informações clínicas;

As secretárias do curso de Ciências da Saúde pela presteza em solucionar minhas dúvidas.

RESUMO

Introdução: O estabelecimento do regime terapêutico para micobacterioses depende da identificação precisa da espécie de micobactéria, sendo que a falha no diagnóstico pode resultar em tratamento inadequado e aumento da taxa de mortalidade dos pacientes. A diferenciação entre espécies de micobactérias tem sido feita por meio de testes convencionais que analisam características fenotípicas e bioquímicas após um longo período de cultura. O diagnóstico molecular de micobactérias permite a rápida detecção e identificação das espécies, embora não esteja disponível nos programas de saúde pública. **Objetivo:** Padronizar o uso da técnica molecular PCR-RFLP *hsp65* na identificação de espécies de micobactérias, testar esse método em amostras de cultura de pacientes diagnosticados com micobacterioses, comparando com as técnicas convencionais e determinar as implicações clínicas da falha no diagnóstico baseado na sintomatologia, cultura e baciloscopia. **Metodologia:** A técnica de PCR-RFLP *hsp65* foi padronizada em amostras já identificadas em centros de referência e posteriormente testadas em 55 amostras de cultura provenientes de pacientes com micobacterioses ocorridas em 2013 e 2014, comparando os resultados com o diagnóstico clínico. **Resultados:** Todos os pacientes foram diagnosticados por método convencional como tuberculose, mas apenas 63,7% (35/55) das amostras de cultura foram confirmadas como *M. tuberculosis* pela PCR-RFLP e o restante, 36,3% (20/55) dos pacientes foram diagnosticados por método molecular como micobactérias atípicas. A PCR-RFLP *hsp65* identificou 32,7% (18/55) amostras positivas para micobactérias não tuberculosas (*M. avium* tipo 1, *M. avium* tipo 2, *M. kansasii* tipo 1, *M. intracellulare* tipo 1, *M. mucogenicum*, *M. chelonae*, *M. terrae* tipo 3 e uma sem padrão conhecido na literatura) e 3,7% (2 amostras) foram negativas. Quanto ao tratamento, apenas 11% (6/55) tiveram tratamento substitutivo no caso de falha do tratamento padrão e suspeita ou confirmação de infecção por micobactéria atípica. **Conclusão:** A PCR-RFLP *hsp65* diferenciou o complexo tuberculose das micobactérias não-tuberculosas classificando-as em nível de espécie, demonstrando ser discriminatório, rápido e econômico. A identificação da espécie em infecções micobacterianas é imprescindível para a escolha do esquema terapêutico correto e o uso dessa técnica poderá auxiliar os programas de saúde pública aumentando a precisão nos diagnósticos e diminuindo os tratamentos inadequados.

Palavras-chave: Micobacterias. PCR-RFLP. Diagnóstico Molecular.

ABSTRACT

Introduction: The establishment of the therapeutic regimen for mycobacteriosis depends on the accurate identification of the species of mycobacteria and the misdiagnosis can result in inappropriate treatment and increased mortality rate of patients. Differentiation between mycobacterial species has been made by conventional tests that analyze phenotypic and biochemical characteristics after a long culture period. The molecular diagnosis of mycobacteria allows fast detection and identification of the species, although it is not available in public health programs. **Objective:** To standardize the use of molecular technique PCR-RFLP_{hsp65} in species identification of mycobacteria, test method in culture samples from patients diagnosed with mycobacteriosis compared to the conventional techniques and to determine the clinical implications of erroneous diagnosis based on symptoms, culture and bacilloscopy. **Methodology:** The PCR-RFLP hsp65 technique was standardized in samples already identified in reference centers and subsequently tested in 55 culture samples from patients with mycobacterial infections occurred in 2013 and 2014, comparing the results with the clinical diagnosis. **Results:** All patients were clinically diagnosed with tuberculosis, but only 63.7% (35/55) of culture samples were confirmed as *M. tuberculosis* by PCR-RFLP and the rest, 36.3% (20/55) of the patients were diagnosed by molecular method as atypical mycobacteria. The molecular method identified 18 positive samples (32.7%) for non-tuberculous mycobacteria (*M. avium* type 1, *M. avium* type 2, *M. kansasii* type 1, *M. intracellulare* type 1, *M. mucogenicum*, *M. chelonae*, *M. terrae* type 3 and one NTM without pattern known in literature) and 3.7% (2 samples) were negative. Concerning to the treatment only 11% (6/55) had substitute treatment in the case of failure of the standard treatment and suspected or confirmed infection with atypical mycobacteria. **Conclusion:** PCR-RFLP_{hsp65} differentiated complex tuberculosis of non-tuberculous mycobacteria classifying them at the species level, showed be discriminatory, fast and economical. Species identification in mycobacterial infections is essential to choose the correct therapeutic regimen and the use of this technique for diagnosis can assist public health programs increasing accuracy in diagnostic and reducing inappropriate treatment.

Keywords: Mycobacteria. PCR-RFLP. Molecular Diagnosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de micobactérias descritas até 2004.....	16
Tabela 2. Perfis de restrição enzimática para as enzimas <i>BstEII</i> e <i>HaeIII</i>	34
Tabela 3. Identificação dos pacientes, dados demográficos, informações de cultura, diagnóstico clínico e identificação molecular.....	40
Tabela 4. Espécies identificadas por PCR-RFLP e o tempo de cultura.....	44
Tabela 5. Características dos pacientes.....	45
Tabela 6. Micobactérias em amostras HIV positivo.....	46
Tabela 7. Casos de discordância entre o diagnóstico convencional e o molecular.....	46

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Conformação da parede celular de micobactérias.....	15
Figura 2. Classificação das micobactérias segundo Runyon.....	17
Figura 3. Classificação da patogenicidade de algumas espécies de micobactérias.....	18
Figura 4. Site PRASITE.....	31
Figura 5. Perfil de restrição enzimática com enzima <i>HaeIII</i> visualizadas em gel de agarose.....	35
Figura 6. Perfil de restrição enzimática com enzima <i>BstEII</i> visualizadas em gel de agarose.....	35
Figura 7. Distribuição por faixa etária e gênero dos pacientes.....	36
Figura 8. Restrição enzimática com a enzima <i>HaeIII</i> em amostras de cultura de pacientes.....	37
Figura 9. Restrição enzimática com enzima <i>BstEII</i> em amostras de cultura de pacientes.....	38
Figura 10. Distribuição das espécies identificadas pela metodologia molecular PCR-RFLP.....	39
Figura 11. Distribuição de amostras BAAR positivas e negativas.....	44

LISTA DE ABREVIACÕES

- AIDS - *Acquired immunodeficiency syndrome*
BAAR - bacilos álcool-ácido resistentes
CMTB- Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
CREDESH - Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase
CT - *Cycle threshold*
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FRET - *Fluorescence resonance energy transfer*
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
MAC - Complexo *M. avium*
MCL - Micobactérias de crescimento lento
MCR - Micobactérias de crescimento rápido
MNT - Micobactérias não tuberculosas
MOTT - *Mycobacteria other than tubercle bacilli*
OMS - Organização Mundial de Saúde
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PRA - *Restriction enzyme analysis*
RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*
RPM – Rotação por minuto
SNP - polimorfismos de nucleotídeos únicos
TB - Tuberculose
UFU - Universidade Federal de Uberlândia
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Histórico.....	13
1.2 Gênero.....	14
1.3 Taxonomia e Classificação.....	15
1.4 Complexo <i>mycobacterium Tuberculosis</i>.....	19
1.5 Micobactérias Não Tuberculosas.....	19
1.5.1 Principais Complexos de espécies de Micobactérias NãoTuberculosas.....	20
1.6 Epidemiologia.....	21
1.7 Tratamento.....	22
1.8 Identificação de Micobactérias.....	23
1.8.1 Métodos Convencionais.....	23
1.8.2 Sistemas Automatizados.....	25
1.8.3 Métodos Moleculares.....	25
1.8.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	25
1.8.3.2 PCR e Análise de Restrição – PCR RFLP <i>hsp65</i>.....	26
1.8.3.3 Sequenciamento de DNA.....	26
1.8.3.4 PCR em Tempo Real.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVOS.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Padronização da Técnica PCR-RFLP <i>hsp65</i>.....	30
4.1.1 Extração de DNA.....	30
4.1.2 Amplificação de DNA PCR Convencional.....	30

4.1.3 Restrição Enzimática (PCR-RFLP).....	31
4.2 Utilização da técnica PCR-RFLP em amostras de cultura.....	32
4.2.1 Delineamento do Estudo.....	32
4.2.2 Local de Realização.....	32
4.2.3 População de Estudo.....	32
4.2.4 Aspectos Éticos.....	32
4.2.5 Amostras.....	32
4.2.6 Baciloscopia e Cultura.....	32
4.2.7 Diagnóstico.....	33
4.2.8 Tratamento.....	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Padronização da Técnica PCR-RFLP.....	34
5.2 Dados dos Pacientes.....	36
5.3 Identificação molecular.....	37
5.4 Baciloscopia e Cultura.....	43
5.5 Locais de acometimento.....	44
5.6 Co-Infecção com HIV.....	45
5.7 Discordância entre os diagnóstico e Tratamento inadequado.....	46
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO.....	52
8 PERSPECTIVAS.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO I - Artigo.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A tuberculose já era conhecida por médicos da era de Hipócrates (460 a.C.), mas somente em 1679 surgiram as primeiras descrições anatomo-patológicas da doença, porém ainda não se mencionava sua origem infecciosa (McKINNEY, 1998).

Desde o século XIX doenças infecciosas endêmicas e epidêmicas como sarampo, varíola, gripe, difteria, tuberculose, lepra e outras vinham assolando a população, devido ao desconhecimento sobre a etiologia e a transmissibilidade dessas doenças, o que impedia o avanço de medidas profiláticas, terapêuticas e favorecendo o caos infeccioso (DOBSON, 1996).

O *Mycobacterium leprae* foi o primeiro representante do gênero relacionada a uma doença humana descrito por Gerhard Amauer Hansen, em 1873. Em 1882, Robert Koch isolou o bacilo da tuberculose dos mamíferos, caracterizando o agente etiológico da doença. Nos anos seguintes, os tipos humano e bovino foram diferenciados. Em seu artigo original “*Die Ätiologie der Tuberkulose*”, demonstrou uma associação entre a presença de microrganismos e a ocorrência da doença tuberculose (KOCH, 1932).

O próprio Robert Koch observou que o bacilo da hanseníase tinha as mesmas características de coloração do bacilo da tuberculose, mas somente alguns anos depois elas foram agrupadas no mesmo gênero por Lehmann e Neumann em 1896, os quais estabeleceram e comprovaram que as duas espécies possuíam as mesmas características morfológicas e tintoriais, bacilos finos, com alguma ramificação, resistentes ao ácido, com colônias secas e enrugadas no ágar (CONN, 1947).

Robert Koch também descreveu outras espécies de micobactérias que não pertenciam ao *M. leprae* e nem ao complexo *M. tuberculosis*, as quais foram então denominadas micobactérias atípicas e receberam várias denominações, como, ambientais, oportunistas, micobactérias que não o bacilo da tuberculose (*Mycobacteria other than tubercle bacilli*– MOTT). Após algumas modificações na nomenclatura elas são conhecidas hoje como micobactérias não tuberculosas MNT (WAYNE et al., 1969; FALKINHAM III, 1996).

As MNTs não eram associadas a doenças humanas e somente em 1954 Timpe e Runyon descreveram os primeiros casos. A partir daí foram apresentados uma série de casos de doenças pulmonares com manifestações semelhantes a tuberculose, mas não foram identificados como portadores da *M. tuberculosis*. Com esses achados fez-se necessária a identificação dessas espécies, assim estudiosos classificaram mais de 50% das espécies após este período (TIMPE; RUNYON, 1954; HARTMANS, 2006).

Várias MNT foram isoladas, do homem, de animais e do meio ambiente, e outras características foram observadas. Características morfológicas e bioquímicas foram importantes para identificação de novas espécies e classificação de espécies já descritas. Assim, em 1959 Runyon criou a classificação mais aceita que se baseia no tempo de crescimento e na produção de pigmentos em presença ou ausência de luz (HARTMANS, 2006).

O aparecimento de casos de AIDS em meados de 1980 nos estados Unidos modificou o quadro de importância de identificação e diagnóstico das MNT, onde até então as infecções referiam-se a doenças pulmonares ou de forma localizada em órgãos isolados (WOLINSKY, 1979).

Nos indivíduos HIV positivos observou-se aumento da incidência, a forma de comprometimento da doença e infecções por diferentes espécies de MNT. Estudos da

década de 80 demonstraram que até 50% dos portadores de AIDS possuíam algum tipo de MNT (YOUNG et al., 1986).

Estes novos achados estimularam os estudos e aprimoramentos de técnicas de identificações laboratoriais assim como a preocupação e vigilância acerca de infecções por micobactérias não tuberculosas.

No Brasil, o primeiro estudo com MNT foi descrito por Costa Cruz em 1938, no qual apresentou uma infecção cutânea causada pelo *M. fortuitum* (CRUZ, 1938). Após este, várias outras publicações descreveram casos isolados de infecções e o gênero passou a ser mais conhecido devido a um aumento significativo nas taxas de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido (MCR) relacionadas a casos de contaminação hospitalares (FONSECA, 1997).

1.2 Gênero

As micobactérias pertencem ao domínio Bactéria, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae e família Mycobacteriaceae, onde possui apenas um gênero denominado *Mycobacterium (fungus bacterium)*, nome proposto por Lehmann e Neumann em 1896, em referência à película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos, que era similar a película produzida por alguns fungos (COLLINS et al. 1997).

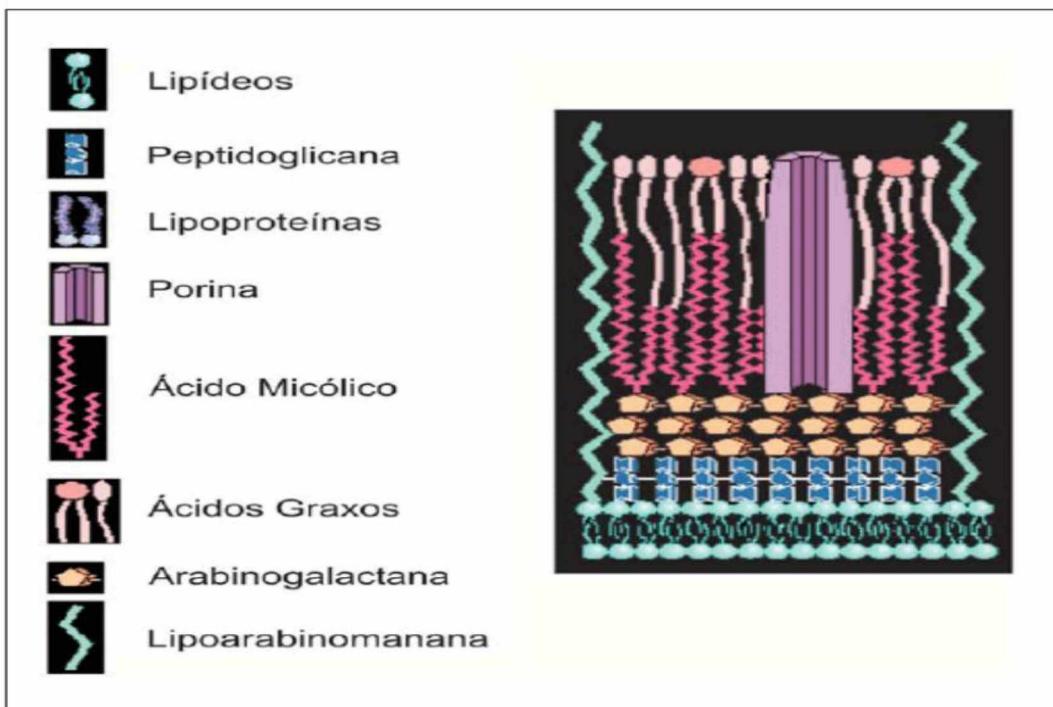
As espécies desse gênero são definidas como bacilos com dimensões de 0,2-0,7 x 1,0-10 μ m, imóveis, levemente curvas, algumas vezes retas, finas, aeróbias, não formadoras de esporos e sem cápsula. A parede celular desses microrganismos é rica em lipídios, entre eles os característicos ácidos micólicos, que conferem resistência a soluções álcool-ácidas e podem ser usados para a identificação de espécies micobacterianas (BRASIL, 2008; EUZÉBY, 2009).

Embora classificadas como bactérias Gram-positivas, as micobactérias não são coradas pelo método de Gram. Para a sua coloração são usadas, geralmente, as técnicas de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun. Ambas utilizam carbolfucsina, que confere coloração vermelha às micobactérias. Por resistirem ao descoloramento subsequente com solução álcool-ácido, receberam a designação de “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) (ROSENBERG; TARANTINO, 2002; TORTORA et. al., 2006).

A membrana plasmática possui uma estrutura básica que não difere à de outras bactérias: lipídios polares, principalmente fosfolipídios agrupados, em associação com proteínas, formando uma bicamada lipídica (DAFFÉ; DRAPER, 1998).

A parede celular das micobactérias possui uma conformação única, é constituída por quatro camadas que diferem entre si em composição, localização e função (Figura 1). A camada mais interna é formada por peptideoglicano (mureína) e confere resistência aos microrganismos, formado por ácido N-glicolilmurâmico (BRITO, 2008). A segunda camada é composta por arabinogalactano, ligado ao peptideoglicano por ligações fosfodiéster. A camada seguinte representa cerca de 60% do peso seco da parede celular micobacteriana, formada por ácido micólico. Estes são lipídeos constituídos de cadeias longas de ácidos graxos com 60 a 90 átomos de carbono e conferem resistência à dessecção, permitindo a sobrevivência por períodos prolongados em condições desfavoráveis, estes lipídios também são responsáveis pela característica tintorial das micobactérias. A última camada, e mais externa, é composta por diferentes tipos de lipídeos, dentre eles: glicolipídeos, sulfolipídeos, fenolglicolipídeos, peptídeoglicolipídeos e lipoarabinomanano (Figura 1) (DAFFÉ; DRAPER, 1998).

Figura 1 Conformação da parede celular de micobactérias.



(Fonte:http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/MicrobiologiaeImunologia/aula_mycobacterium.pdf acessado em 22/04/2014).

As células das micobactérias apresentam crescimento mais lento que a maioria das outras bactérias que causam infecção nos seres humanos. Esta lentidão parece estar relacionada à absorção mais demorada de nutrientes, provavelmente devido à grande quantidade de lipídeos da parede celular (ISENBERG, 1992).

Estes microrganismos dividem-se em patogênicos e saprófitos, podendo ser isolados de amostras clínicas, água, solo, de outras fontes ambientais, objetos, alimentos, tendo sido encontradas também em material médico (endoscópios e soluções cirúrgicas) (LEÃO et al., 2005).

1.3 Taxonomia e Classificação

O gênero *Mycobacterium* tem sofrido constantes modificações e atualizações devido ao grande número de novas espécies de micobactérias descobertas. Nos últimos anos, graças aos recentes avanços na identificação e taxonomia, baseados num melhor conhecimento da genética das micobactérias. Atualmente são descritas 169 espécies e 13 subespécies (EUZEBY, 2014; MCNABB et al., 2004; TORTOLI, 2003).

Para exemplificar esse rápido aumento na descrição de novas espécies tínhamos em 2000, 70 espécies descritas, em apenas 2 anos esse número cresceu para 100 espécies. Em 2004 havia a descrição de 114 espécies e em 2010 esse número cresceu para 148 (Tabela 1)(KRITSKI, 2000; MCNABB et al., 2004; EUZEBY, 2010).

Tabela 1 Espécies de micobactérias descritas até 2004 (Fonte: MCNABB *et al.*, 2004).

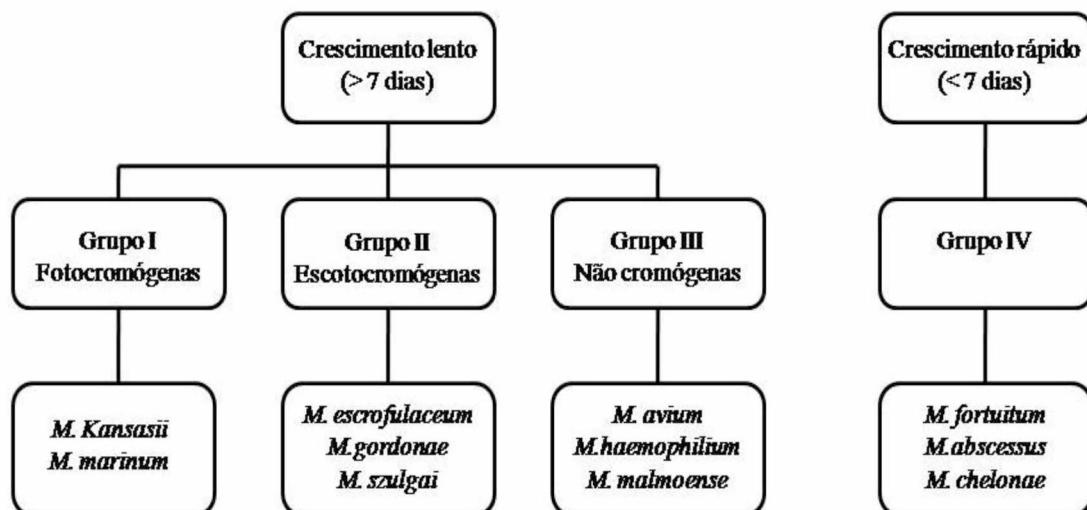
<i>M. abscessus</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. aichiense</i>
<i>M. album</i>	<i>M. alvei</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. aurum</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. bohemicum</i>	<i>M. bonickei</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. brisbanensee</i>	<i>M. brumae</i>
<i>M. canariense</i>	<i>M. canettii</i>	<i>M. capri</i>	<i>M. celatum</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. chubuense</i>
<i>M. conuentis</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. cookii</i>	<i>M. diernhoferi</i>
<i>M. doricum</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. elephantis</i>	<i>M. engbaekii</i>
<i>M. fallax</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. flavesecens</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. frederiksbergense</i>	<i>M. fuerthensis</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. gastri</i>
<i>M. genavense</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. gordonaee</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. heckeshornense</i>	<i>M. heidelbergense</i>
<i>M. hiberniae</i>	<i>M. hodleri</i>	<i>M. holsaticum</i>	<i>M. houstonense</i>
<i>M. immunogenum</i>	<i>M. interjectum</i>	<i>M. intermedium</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. kubicae</i>	<i>M. lacticota</i>
<i>M. lacus</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. lepraemurium</i>
<i>M. madascariense</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. margeritense</i>	<i>M. marium</i>
<i>M. monacense</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. murale</i>
<i>M. nebraskiae</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. neworleanese</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
<i>M. novocastrense</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. palustre</i>	<i>M. paraffinicum</i>
<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. parvum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. petroleophilum</i>
<i>M. phlei</i>	<i>M. pinipedi</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. poriferae</i>
<i>M. pulvris</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. senegalense</i>
<i>M. septicum</i>	<i>M. seriolaee</i>	<i>M. sherrisii</i>	<i>M. shimoidei</i>
<i>M. shottssii</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. sphagni</i>
<i>M. szulgai</i>	<i>M. terea</i>	<i>M. thermoresistible</i>	<i>M. tokaiense</i>

<i>M. triples</i>	<i>M. triviale</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tusciae</i>
<i>M. ulcerans</i>	<i>M. vaccae</i>	<i>M. visible</i>	<i>M. wolinskyi</i>
<i>M. xenopi</i>			

A classificação das micobactérias, ainda segue os padrões de Runyon e é muito utilizada nos laboratórios para auxiliar a identificação das espécies. Com base nesses critérios, foram criados quatro grupos: três de crescimento lento (Grupos I, II e III, que requerem de duas a seis semanas de incubação para apresentar crescimento colonial visível) e um de crescimento rápido (Grupo IV). O Grupo I engloba as micobactérias fotocromógenas, que produzem pigmento somente após a exposição à luz. São exemplos deste grupo *M. kansasii* e *M. marinum*. No Grupo II, encontram-se as micobactérias escotocromógenas, que produzem pigmento tanto na presença quanto na ausência de luz, como *M. scrofulaceum*, *M. gordonae* e *M. szulgai*. No Grupo III, estão as micobactérias não cromógenas ou acromógenas, que geralmente apresentam crescimento extremamente lento, como *M. avium*, *M. malmoense* e *haemophilium*, essas apresentam características semelhantes ao complexo *M. tuberculosis*. O Grupo IV abrange as espécies que possuem a capacidade de crescer em dois a sete dias. Suas colônias são geralmente lisas e podem ser pigmentadas, como *M. vaccae*, *M. parafurtuitum*, ou não pigmentadas, como *M. fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae* (Figura 2) (GENTRY, 2005; JARZEMBOWSKI; YOUNG, 2008).

Segundo esse critério então a árvore filogenética das micobactérias pode ser dividida em dois grandes grupos: micobactérias de crescimento rápido (MCR) e micobactérias de crescimento lento (MCL). As micobactérias de crescimento rápido formam colônias visíveis a olho nu em até sete dias, quando incubadas em meio sólido. Aquelas de crescimento lento o fazem após sete a 30 dias de incubação (HERRERA-LEÓN et al., 2009).

Figura 2 Classificação das micobactérias segundo Runyon.



Fonte: adaptado de Leão et al., 2005.

Algumas espécies de micobactérias, isoladas frequentemente de materiais biológicos humanos, foram classificadas de acordo com o seu grau de patogenicidade em: patogênicas, potencialmente patogênicas ou raramente patogênicas (Figura 3) (TSUKAMURA, 1984). Outras espécies, com descrição recente na literatura, ainda não foram incluídas nessa classificação (DAVIDSON, 1989).

Figura 3 Classificação da patogenicidade de algumas espécies de micobactérias.

Patogênicas				
		<i>M. leprae</i>		
<i>M. bovis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>
Potencialmente patogênicas				
<i>M. avium</i>	<i>M. branderri</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. xenopi</i>
Raramente patogênicas				
<i>M. agri</i>	<i>M. cooki</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. alchiense</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. obuense</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. homossenze</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. lepraeumurium</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. neoaurum</i>	<i>M. gordonaie</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. shimoidei</i>	<i>M. gilvum</i>
<i>M. chubuense</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>
<i>M. confluens</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. sphagni</i>	

Fonte: BRASIL, 2008a.

Além destas classificações as micobactérias também podem ser divididas em micobactérias causadoras da tuberculose e micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT), que podem ser patogênicas para o ser humano, causando as enfermidades conhecidas como micobacterioses. Enquanto as características patogênicas clássicas de

Mycobacterium tuberculosis têm sido mais extensivamente descritas, pouco se sabe sobre as MNT (POROCA et al., 2009).

1.4 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é composto por *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium canettii* (LEÃO et al., 2005; PIERSIMONI; SCARPARO, 2008).

Recentemente, foi proposta a inclusão de novas espécies neste complexo, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii* (LEÃO et al., 2005).

A tuberculose é uma doença infecciosa e transmissível, pode ser causada por qualquer uma das sete espécies integrantes do grupo, afeta prioritariamente os pulmões, embora possa acometer outros órgãos e sistemas. A apresentação pulmonar, além de ser mais frequente, é também a mais relevante para a saúde pública, pois é a principal responsável pela transmissão da doença (BRASIL, 2014).

A tuberculose (TB) continua sendo uma das doenças transmissíveis mais mortais do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2013, estimou-se que 9,0 milhões pessoas desenvolveram tuberculose e 1,5 milhão morreram da doença, dos quais 360 mil eram HIV-positivos. Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul (BRICS), representam quase 50% dos casos mundiais de tuberculose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

No Brasil, a tuberculose é um sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. A cada ano, são notificados aproximadamente 70 mil casos novos e ocorrem 4,6 mil mortes em decorrência da doença. O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (BRASIL, 2009).

A identificação do complexo *M. tuberculosis* é essencial para o diagnóstico da tuberculose. A diferenciação dos membros do complexo *M. tuberculosis* é necessária para o tratamento dos doentes (seleção da terapêutica adequada) e também é muito útil para fins epidemiológicos, em especial em áreas onde a tuberculose está presente em proporções epidémicas ou sempre que ocorra a transmissão de *M. bovis* entre os animais ou entre produtos animais e o homem (PARSONSET et al., 2002).

A principal distinção entre o complexo *M. tuberculosis* e as restantes micobactérias patogênicas reside nas diferenças dos seus habitats e da sua propagação, bem como a susceptibilidade aos agentes quimioterapêuticos padrões (PIERSIMONI; SCARPARO, 2008). A maior diferença entre tuberculose e outras micobacterioses é que o agente infeccioso *M. tuberculosis*, é transmitido de pessoa para pessoa através de aerossóis, sendo importante que o diagnóstico da tuberculose seja o mais rápido possível para interromper a sua propagação (SOINI; MUSSER, 2001).

1.5 Micobactérias Não Tuberculosas

O grupo das MNT inclui as espécies de micobactérias que não são *M. leprae* nem os membros do CMTB. Este é um grupo muito heterogêneo, que apresenta bactérias com grande variação em relação ao tempo de crescimento, morfologia de colônias, sensibilidade a antibióticos e agentes desinfetantes, virulência e carreamento de plasmídeos (PRIMM et al., 2004).

É importante ressaltar que a ecologia e fisiologia das micobactérias não tuberculosas são significativamente diferentes daqueles de *M. tuberculosis*. Muitas

micobactérias não tuberculosas são saprófitas de vida livre que têm sido detectada e isolada a partir de uma grande variedade de ambientes, incluindo água, solo, poeira e aerossóis. Devido a grande resistência a desinfecção, elas podem ser encontradas em locais potencialmente pouco prováveis como sistemas de água potável e até em materiais cirúrgicos devido a sua resistência intrínseca ao cloro e a outros desinfectantes químicos (BULLIN et al., 1970; DAWSON et al., 1982).

As micobactérias não tuberculosas crescem em amplas faixas de temperatura, pH, salinidade e tensão de oxigênio. Assim, elas podem ser isoladas a partir de uma ampla variedade de amostras ambientais (IIVANAINEN et al., 1993).

As MNT são patógenos oportunistas. Eles são capazes de provocar linfadenite e infecções nos pulmões, pele, tecidos moles, articulações, tendão e ossos (BENSON, 1994).

As micobactérias não causadoras de tuberculose ao contrário do que se acreditava antigamente tem potencial para causar doenças em humanos, estas são chamadas micobacteriose. As MNT são encontradas geralmente em pacientes de países desenvolvidos e raramente em pacientes em países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos e na Europa, onde a incidência da tuberculose é baixa, a incidência de infecções não tuberculosas é alta em pacientes com AIDS (HORSBURGH, 1991).

Como as MNT não são transmitidas de hospedeiro para hospedeiro – homem-homem ou animal-homem – seus reservatórios no ambiente são também considerados suas fontes de infecção (BRASIL, 2008).

As MNT compreendem uma enorme diversidade de espécies e são responsáveis por uma grande variedade de sintomas e sinais clínicos (JARZEMBOWSKI; YOUNG, 2008). Existem poucas evidências da possibilidade de transmissão direta de pessoa para pessoa, através de aerossóis. Pensa-se que a infecção é adquirida a partir do meio ambiente, através da ingestão, inalação de água, partículas ou inoculação (DANTEC et al., 2002), existindo relatos de infecções provocadas pela inadequada desinfecção de equipamentos médicos (VIJAYARAGHAVAN et al., 2006). Através de análise de DNA, verificou-se que estripes de várias espécies recuperadas a partir de amostras ambientais (água, solo e aerossóis) eram idênticas às isoladas de vários doentes (FALKINHAM, 1996; FALKINHAM, 2003).

1.5.1 Principais complexos e espécies de Micobactérias Não Tuberculosas

No gênero *Mycobacterium* existem algumas espécies de micobactérias com relações muito próximas entre si, as quais se encontram agrupadas por complexo de espécies. Os complexos de espécies de micobactérias não tuberculosas mais importantes são o complexo *M. avium* (MAC), o complexo *M. fortuitum*, complexo *M. chelonae-abscessus*, complexo *Mycobacterium terrae* e complexo *Mycobacterium smegmatis*.

As espécies de micobactérias incluídas no complexo *M. avium* são de crescimento lento. O MAC inclui as espécies *M. avium* e *M. intracellulare*. Dentro da espécie *M. avium* foram propostas as subespécies *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *hominissuis* (TURENNEet al., 2008). Assim a existência de novas variantes de *M. avium* são esperadas, colocando novos desafios em termos de taxonomia, mas também no seu diagnóstico. Em hospedeiros imunocompetentes, o (MAC) ocorre principalmente como patógeno respiratório, especialmente em indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica e pode causar fibrose pulmonar ou doença pulmonar cavitária, enquanto que em hospedeiros imunodeprimidos pode originar infecção sistêmica (BANNALIKAR;VERMA, 2006).

A maioria das infecções causadas em doentes com AIDS são devido a *M. avium* causando, sobretudo doença disseminada. Por outro lado, *M. intracellulare* é detectado com maior frequência em doentes sem AIDS. Por esta razão, a diferenciação entre as duas espécies é recomendada, especialmente no contexto da AIDS (Leão et al., 2005).

O complexo *M. fortuitum* inclui três táxons: *M. fortuitum*, *M. peregrinum* e complexo terceira biovariante. A partir do complexo terceira biovariante foi proposta a inclusão neste complexo de novas espécies tais como *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. conceptionense*, *M. brisbanense* e *M. boenickei*, bem como as espécies já anteriormente descritas na literatura como *M. septicum* e *M. mageritense* (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002, SCHINSKY et al., 2004). O complexo *M. fortuitum* inclui ainda *M. mucogenicum*, *M. senegalense* e *M. porcimum* (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002, SCHINSKY et al., 2004; WALLACE et al., 2004).

O complexo *M. fortuitum* está envolvido em 60% das infecções cutâneas causadas por micobactérias de crescimento rápido nos indivíduos imunocompetentes, sendo raramente causa de doença pulmonar (WALLACE et al., 2004).

O complexo *M. cheloneae-abscessus* constituído por pelas espécies: *M. cheloneae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum*, *M. bolletii*, *M. massiliense*. Classificados como micobactérias de crescimento rápido, costumam causar infecções pós-operatórias, infecções de pele, tecido mole, ossos, infecções sanguíneas e abscessos em indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes. É o grupo de organismos mais resistente a fármacos das MNT (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002; KIM et al., 2008).

O complexo *M. terrae* é composto por *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale*. A colonização do epitélio humano por estas micobactérias é rara e geralmente são consideradas como não patogênicas (LEE et al., 2004). No entanto, *M. nonchromogenicum* pode ocasionalmente causar doenças no homem, tais como infecções pulmonares e tendinopatia. Nos últimos anos, um número crescente de infecções causadas por estes organismos foram diagnosticados, em particular infecções oportunistas em doentes com AIDS (LEE et al., 2004).

M. kansasii não faz parte de um complexo, mas é o segundo patógeno mais comum em infecções causadas por micobactérias não tuberculosas, oportunista associada à AIDS, superado apenas pelo complexo *Mycobacterium avium*. A incidência de infecções por *M. kansasii* aumentou com o agravamento da epidemia de AIDS. A apresentação mais comum de *M. kansasii* é uma infecção pulmonar crônica que se assemelha a tuberculose pulmonar, no entanto, também pode infectar outros órgãos (SCHRAUFNAGEL et al., 1986).

1.6 Epidemiologia

As doenças causadas por MNT não são de notificação compulsória, ao contrário da TB. Por isso, poucos são os dados oficiais referentes às micobacterioses. Grande parte dos dados baseia-se em estudos realizados a partir do isolamento de MNT em laboratório, principalmente em países da América do Norte, Europa e Japão (ALVAREZ-URIA, 2010; GRIFFITH, 2010). Apesar dos dados de incidência e de prevalência reais não serem conhecidos, esses estudos foram capazes de demonstrar um aumento significativo no isolamento de MNT nas últimas décadas. Isto ocorreu devido a um conjunto de fatores: maior informação e atenção dos médicos, avanços na detecção laboratorial de micobactérias e no diagnóstico de imagem e aumento da população de risco e da exposição ambiental às MNT (ARENDS, van SOOLINGEN & OTENHOFF, 2009; COOK, 2010; WINTHROP, 2010).

Em países desenvolvidos, nos quais a incidência de TB encontra-se em declínio e em fase de estabilização, os índices de infecção por MNT estão muito

próximos ou até já ultrapassam aqueles de TB (ARENDS, van SOOLINGEN & OTTENHOFF, 2009; COOK, 2010).

O número de doenças causadas por micobactérias não-tuberculosas (MNT) vem aumentando consideravelmente principalmente em indivíduos susceptíveis as infecções por esse tipo de bactéria oportunista, como os imunossuprimidos e indivíduos que utilizam imunossupressores em doenças crônicas intestinais, doenças reumatológicas e/ou dermatológicas. O uso de fármacos anti-TNF no tratamento das doenças inflamatórias crônicas favorece a progressão de infecções por *M. tuberculosis* e outras micobactérias atípicas (LOPES, et al., 2011).

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) são responsáveis principalmente por infecções de pele e outros tecidos moles. No Brasil, surtos causados por esse tipo de MNT têm sido relatados desde 1998 (DUARTE et al., 2009). No período de 2000 a 2008, foram notificados 2.128 casos de infecção por MCR no país, relatados principalmente nos Estados do Rio de Janeiro (1.105 casos), Pará (321 casos), Espírito Santo (293 casos), Rio Grande do Sul (101 casos) e Goiás (70 casos) (RENISS, 2009). O agente etiológico mais comum foi *M. massiliense* nomenclatura substituída por *M. abscessus* subsp. *bolletii* (LEÃO et al., 2011), com exceção dos casos de infecção secundários a mamoplastias, nos quais *M. fortuitum* foi mais frequente. Em 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou em Nota Técnica a notificação compulsória das infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido, decorrentes de procedimentos invasivos (cirúrgicos ou cosmiátricos) realizados em serviços de saúde do Brasil, sejam eles públicos ou privados (BRASIL, 2009a).

1.7 Tratamento

Em locais que não possuem técnicas de identificação as MNT são facilmente confundidas com espécies do complexo tuberculose devido à semelhança de sintomas clínicos, sítios acometidos e características morfológicas é fundamental a diferenciação das espécies para a escolha do esquema terapêutico mais adequado.

O tratamento das micobacterioses é bastante complexo, uma vez que as MNT são naturalmente resistentes ou têm pouca sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento da TB. Esta sensibilidade ainda difere entre as espécies e entre cepas de uma mesma espécie. Por esta razão, para um tratamento eficiente, é necessário, inicialmente, fazer a identificação do agente causal, para que, de acordo com a sua sensibilidade, sejam escolhidos os fármacos a serem utilizados (ROSEMBERG; TARANTINO, 2002; GRIFFITH et al., 2007).

As orientações terapêuticas atuais de tratamento das MNT envolvem vários esquemas e múltiplas drogas e, portanto, o risco de reações adversas a medicamentos e/ou toxicidade é relativamente alto (BRITO, 2004). Além disso, o esquema terapêutico ideal ainda não foi estabelecido, embora, haja consenso entre especialistas, que para se obter um tratamento eficiente é necessário inicialmente identificar a espécie causadora da doença, para que de acordo com a sua sensibilidade, sejam escolhidos os fármacos a serem utilizados (ROSEMBERG; TARANTINO, 2002).

No tratamento eficiente de TB, devem ser combinados pelo menos dois fármacos, visando evitar a seleção de cepas resistentes. Geralmente é adotado um esquema padrão definido pelo ministério da saúde (2RHZE / 4RH): 2 meses COCXIP 4 (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) + 4 meses rifampicina e isoniazida. Muitos são os esquemas utilizados para o tratamento das MNT, o fundamento da terapia encontra seus pilares nos macrolídeos (claritromicina e azitromicina) e etambutol. Esses agentes são então combinados com outra droga, geralmente uma rifampicina. Entretanto, ainda são

poucos os estudos randomizados relacionados a este tema para grande parte das espécies. Sabe-se que para alguns fármacos e espécies, não há correlação da susceptibilidade *in vitro* com a resposta efetiva aos antibióticos *in vivo* (GRIFFITH, 2010; BRASIL, 2014).

Diferente do tratamento para *M. tuberculosis* que costuma perdurar por 6 meses para as MNT usualmente a terapia deve ser administrada diariamente, até a negativação da cultura, que ocorre geralmente entre 06 e 12 meses. O tratamento deve ser mantido por no mínimo 12 meses após a negativação da cultura. Portanto, o tratamento medicamentoso deve durar em média 18 a 24 meses (SÃO PAULO, 2005).

1.8 Identificação de Micobactérias

A identificação da micobactéria em nível de espécie é crucial, já que fornece uma grande quantidade de informações úteis sobre a epidemiologia e facilita a escolha do esquema para o tratamento dos pacientes (FIELD et al., 2006).

A diferenciação das micobactérias não tuberculosas do complexo *M. tuberculosis*, numa fase inicial do diagnóstico, é muito importante, pois o tratamento é distinto, devido às diferenças na susceptibilidade aos antibióticos (KIM et al., 2006).

1.8.1 Métodos Convencionais

O diagnóstico inicial de uma micobacteriose é frequentemente baseado em dados clínicos, mas o diagnóstico definitivo geralmente envolve o isolamento e a identificação do microrganismo em laboratório (SOINI; MUSSER, 2001).

Os laboratórios devem estar aptos não só para diferenciar as MNT do complexo *M. tuberculosis*, como também para identificar as micobactérias ao nível de espécie, usando métodos convencionais e/ou moleculares. Como todos os métodos de identificação possuem suas limitações, o uso de pelo menos duas técnicas de metodologias diferentes facilita a identificação e evita erros (BRASIL, 2008). Essa identificação não só ajuda no diagnóstico como também é importante para a realização do teste de sensibilidade para definição do tratamento adequado (SÃO PAULO, 2005; GRIFFITH, 2007).

Os métodos convencionais de investigação de doenças infecciosas incluem técnicas de baciloscopia, cultura e ensaios bioquímicos.

A baciloscopia, exame básico para o achado laboratorial das micobactérias em espécimes biológicos, consiste na pesquisa direta de BAAR, geralmente pela coloração de Ziehl-Neelsen, apesar da coloração com auramina O ser a mais recomendada pela OMS. Por ser uma metodologia de execução rápida, fácil, de baixo custo e que permite estimar o número de bacilos presentes na amostra clínica, favorece a ampla cobertura diagnóstica. Assim, identifica, no caso da TB, a principal fonte de infecção (pacientes bacilíferos), permitindo a pronta atuação na interrupção da cadeia de transmissão. Além disso, é muito importante para o acompanhamento da eficácia do tratamento (GRIFFITH et al., 2007; BRASIL, 2008a).

Sua principal desvantagem é a sensibilidade limitada, já que são necessários de 5.000 a 10.000 bacilos por mL de amostra para a obtenção de um resultado positivo. Estudos demonstraram que a sensibilidade da baciloscopia pode variar de 20 a 80%, com média de 70% em amostras pulmonares. Apresenta menores taxas de positividade em amostras paucibacilares, como por exemplo, de pacientes HIV-soropositivos, crianças e amostras extrapulmonares (CASTELO, 2004).

O exame microscópico é um procedimento rápido, econômico, fácil de executar, fornece informações preliminares importantes sobre a possível presença de micobactérias, mas não é útil para identificar as micobactérias ao nível da espécie, sendo a sua sensibilidade menor que a da cultura (WU et al., 2009).

Portanto não é só importante detectar micobactérias, mas também identificá-las ao nível da espécie. Assim, a identificação de um isolado clínico é normalmente realizada através das suas características em cultura (morfologia das colônias e sua pigmentação), temperatura e taxa de crescimento (BARRETO et al., 2000; KELLOGG et al., 2001).

A cultura é o método bacteriológico disponível mais sensível para o diagnóstico das infecções por micobactérias, capaz de detectar a partir de 10 bacilos/mL de amostra e é considerada o padrão áureo para o diagnóstico de micobactérias.

A coleta de amostras para investigação de micobacterioses pode ser feita em vários sítios do corpo humano, porém, a significância clínica de uma MNT isolada de uma amostra depende se o sítio é estéril ou potencialmente contaminado e se o procedimento de coleta foi feito assepticamente. Amostras potencialmente contaminadas devem ser descontaminadas (GRIFFITH, 2007).

O cultivo do bacilo é usualmente feito em meios *Lowenstein-Jensen* (LJ) ou *Middlebrook 7H10* e *7H11*, e demandam tempo (2 a 8) semanas devido à lenta taxa de crescimento de algumas micobactérias, os processos de isolamento e de identificação podem levar várias semanas (SOINI; MUSSER, 2001).

A técnica de identificação por testes bioquímicos permite fazer a distinção entre uma e outra espécie bacteriana com base na capacidade do micro-organismo metabolizar ou não determinado substrato para atender às suas necessidades fisiológicas. (DAWSON; JENNIS, 1980).

O teste de inibição de crescimento em meio com ácido p-nitrobenzóico (PNB) separa os membros do CMTB, pois ao contrário da maioria das MNT, todas as espécies do CMTB não crescem neste meio. Algumas espécies de MNT como *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. xenopi* podem eventualmente não crescer no meio contendo PNB. O teste da niacina baseia-se na detecção visual da produção de niacina pelas bactérias. Embora seja produzida por todas as micobactérias, somente algumas espécies do CMTB, como *M. tuberculosis* e *M. africanum* e raras espécies de MNT (*M. simiae*, *M. chelonae* e *M. marinum*) produzem quantidades detectáveis por meio deste teste (BRASIL, 2008). Por isso estes testes podem auxiliar na diferenciação entre o CMTB e as MNT.

A identificação das espécies que constituem o grupo das MNT pode ser feita pelos testes de produção de pigmento, crescimento em meio de cultura a 45°C e a 25°C, determinação do tempo de crescimento em *Löwenstein-Jensen* (LJ), meio Sauton com ácido pícrico e em ágar comum, inibição de crescimento em meio com NaCl 5%, arilsulfatase, hidrólise do tween 20, β-galactosidase, redução do telurito de potássio, inibição do crescimento em meio contendo PNB, redução do nitrato, urease e pirazinamidase. Ainda, para MCR, são realizados os testes de captação do ferro, inibição de crescimento em meio contendo citrato de sódio, manitol e inositol (BRASIL, 2008). As principais limitações do método fenotípico consistem na demora para a obtenção de resultados e a dificuldade de diferenciar diversas espécies, além de resultados duvidosos que podem ser apresentados pelos testes bioquímicos (BRASIL, 2008; NEONAKIS et al., 2008; NGAN et al., 2011).

Os métodos convencionais, para além de serem trabalhosos e morosos, podem fornecer resultados ambíguos ou mesmo errados que podem ser explicados pela convergência de uma série de características (BARRETO et al., 2000; KELLOGG et al., 2001; LEITE et al., 2005; YAM et al., 2006). A variabilidade de estirpes presentes numa mesma espécie pode levar a uma variabilidade nos resultados dos testes

bioquímicos, podendo também ocorrer espécies diferentes com morfologias e perfis bioquímicos indistinguíveis ou muito idênticos (BARRETO *et al.*, 2000; KELLOGG et al., 2001; YAM *et al.*, 2006).

Assim sendo, várias espécies de micobactérias, em particular as mais recentemente descritas, não podem ser identificadas utilizando apenas os testes convencionais (KELLOGG et al., 2001).

1.8.2 Sistemas Automatizados

Os sistemas automatizados para detecção de micobactérias como o *BACTEC 460 TB®*, *BACTEC 9000®* e o *MGIT®* são importantes na diferenciação entre complexo *M. tuberculosis* e Micobactérias não tuberculosas e nos testes de sensibilidade a drogas antituberculose. O método é baseado na detecção de CO₂ liberado pelo metabolismo micobacteriano, a partir do ácido palmítico durante o seu crescimento em meio líquido de *Middlebrook* (JOST *et al.*, 1995). O problema desses testes é a limitação no reconhecimento de algumas espécies, principalmente as mais recentes que podem indicar resultados falso-positivos devido à contaminação por outras bactérias (CASTELO *et al.*, 2003).

1.8.3 Métodos Moleculares

A necessidade de um teste rápido e sensível para o diagnóstico laboratorial das micobactérias levou ao desenvolvimento dos métodos moleculares para detecção e identificação das espécies, diretamente de amostras clínicas ou a partir de colônias isoladas em cultivo. Dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico, encontram-se principalmente aquelas que promovem a amplificação de ácidos nucléicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e suas variações (*Nested-PCR*, *Multiplex-PCR* e PCR em tempo real, por exemplo). Para a identificação das espécies, há as técnicas que empregam sondas genéticas (Sistemas *AccuProbe®* e INNO-LiPA, por exemplo), sequenciamento de DNA e análises com enzimas de restrição (como o PRA-*hsp65*) (WILLIAMS *et al.*, 2007; NEONAKI *et al.*, 2008; WILSON, 2011).

1.8.3.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação de ácido nucleico *in vitro*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), também, tornou-se uma das mais potentes e versáteis técnicas utilizadas em pesquisa na atualidade. A técnica de PCR é um método baseado na amplificação enzimática de um fragmento de DNA pela extensão de dois oligonucleotídeos (primers), que hibridizam com fitas complementares de uma sequência molde (alvo) (ROSSETTI; SPERHACKE, 2006).

No caso das micobactérias, a sequência de DNA amplificada pode ser comum a todas as bactérias do gênero ou ser específica para uma espécie ou complexo. A maioria dos protocolos utiliza a amplificação da sequência de inserção *IS6110*, presente especificamente nas espécies do CMTB. Por estar presente em várias cópias no genoma, este alvo molecular promove um aumento na sensibilidade da técnica, o que representa uma vantagem sobre os demais alvos (HERMANS *et al.*, 1990; PIERSIMONI; SCARPARO, 2003; SCHERER *et al.*, 2011). Entretanto, sua desvantagem está na existência de isolados de *M. tuberculosis* que perderam as sequências *IS6110*, o que tem sido observado principalmente na Ásia (YUEN *et al.*, 1993; CHAUHAN *et al.*, 2007).

Quando a sequência amplificada é comum ao gênero, a região 16S do RNA ribossômico (16S rRNA) é um importante alvo. Essa região é altamente conservada no gênero *Mycobacterium* e contém diferenças na sequência de nucleotídeos que podem ser específicas de um grupo ou espécie. Por esta razão, seu produto amplificado também pode ser utilizado para posterior identificação molecular da espécie de micobactéria (KATOCH, 2004; WU et al., 2008).

Em relação às técnicas convencionais, a PCR apresenta como vantagens a redução do tempo de liberação do resultado, a alta especificidade e a mínima manipulação das bactérias, já que não há necessidade do cultivo de microorganismos, proporcionando maior segurança ao laboratório. Entretanto, sua sensibilidade ainda não é tão elevada variando de acordo com o alvo, os iniciadores (*primers*) e o tipo de amostras utilizadas (PIERSIMONI; SCARPARO, 2003; GRECO et al., 2006; WILSON, 2011).

1.8.3.2 PCR e Análise de Restrição – PCR RFLP *hsp65*

Telenti e colaboradores descreveram, em 1993, o método RFLP (“*restriction fragment length polymorphism*”); também descrito na literatura como PRA (“*PCR-restriction enzyme analysis*”). PRA-*hsp65*, capaz de diferenciar a maioria das espécies de MNT, a partir de isolados de cultura sólida e líquida. Este método baseia-se na amplificação, pela PCR, de um fragmento de 441 pb do gene que codifica a proteína de 65 kDa, que contém epítópos específicos comuns a várias espécies de micobactérias, com posterior digestão com enzimas de restrição, *BstE II* e *Hae III*. Os fragmentos obtidos são visualizados por eletroforese em gel de agarose. As diferentes espécies de micobactérias apresentam padrões de restrição diferentes e a definição da espécie é possível comparando-se esses padrões com um algoritmo (TELENTI et al., 1993; CHIMARA et al., 2008). Este é um dos métodos utilizados pelo Laboratório de Referência Nacional para identificação das MNT a partir das culturas previamente identificadas como não pertencentes ao CMTB (BRASIL, 2008a).

Este método apresenta como principais vantagens sua alta especificidade, a obtenção rápida de resultado, em poucas horas, e o fato de requerer somente equipamentos básicos de PCR e de eletroforese em gel de agarose. Entretanto, não é capaz de distinguir as espécies do CMTB, algumas espécies de MNT apresentam perfil compartilhado por mais de uma espécie e, ainda, é possível verificar que uma mesma espécie pode apresentar mais de um perfil de restrição. Pode-se encontrar, também, perfis que ainda não foram descritos na literatura (BRASIL, 2008a; CHIMARA et al., 2008).

1.8.3.3 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA é considerado o método padrão áureo para a identificação da espécie de micobactéria. Baseia-se na identificação da sequência de nucleotídeos de um gene comum ao gênero *Mycobacterium* e posterior comparação com sequências de referência disponíveis em bancos de dados. Dentre os genes utilizados para este propósito, pode-se citar *hsp65*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e o 16S rRNA (TORTOLI, 2003; WILLIAMS et al., 2007; NEONAKIS et al., 2008).

O seqüenciamento do gene 16S rRNA é uma poderosa técnica de diferenciação das espécies, no entanto, é trabalhosa e cara. O rRNA 16S constitui seqüência de cerca de 1.500 nucleotídeos codificados pelo DNA ribossomal 16S (rDNA), que é um gene cuja característica é a sua alta capacidade de manter-se conservado, com regiões comum a todos os organismos (regiões conservadas) e

também áreas onde os nucleotídeos apresentam variações (regiões variáveis). Para fins de identificação de micobactérias, a análise da seqüência enfoca duas seqüências hipervariáveis, conhecidas como as regiões A e B. A seqüência da região A é geralmente suficiente para identificar a maioria das espécies de MNT, porém sempre se realiza o seqüenciamento da região B, pois ele pode ser necessário em alguns momentos, especialmente na identificação de espécies ainda não descritas ou as espécies que não podem ser diferenciadas pela seqüência de uma só região (PATEL et al., 2000).

Uma das dificuldades com este método são que as espécies de divergência recentes podem conter muitas seqüências semelhantes de genes 16S rRNA (VINCENT et al., 2003).

1.8.3.4 PCR em Tempo Real

A recém-introduzida técnica da PCR em tempo real vem sendo utilizada para a detecção de diferentes micro-organismos patógenos e gradativamente substituindo a PCR convencional que utiliza eletroforese em gel de agarose. Na PCR em tempo real os ensaios utilizam a transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), o que permite a visualização instantânea da reação de amplificação da seqüência específica em um único equipamento. A PCR em tempo real também permite a detecção de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) pela análise da curva de dissociação dos fragmentos de DNA de fita dupla resultantes da reação de amplificação (HONG et al., 2011).

Em relação às técnicas convencionais, a PCR em tempo real apresenta algumas vantagens como a redução do tempo de liberação do resultado (o tempo necessário para a realização da PCR é, em média, de um dia e o das técnicas convencionais varia entre quatro e oito semanas) e mínima a manipulação das bactérias, pois não há necessidade de cultivo e crescimento de microrganismos, o que proporciona maior segurança ao laboratório. Este ensaio além da vantagem da rapidez tem maior sensibilidade e especificidade, utilização de reagentes com baixa contaminação e a identificação simultânea de múltiplos alvos em um único equipamento (PUERTO, CASTRO, RIBÓN, 2007).

Em particular, os sinalizadores moleculares, ou sondas TaqMan® (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA), são utilizados para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em sua extremidade um fluoróforo e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipá na forma de luz ou calor) os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5' - 3'da Taq DNA polimerase (HOLLAND et al., 1991). Essa técnica confere maior sensibilidade e especificidade para determinar a ausência ou presença de seqüências específicas reduzindo significativamente o aparecimento de falso-positivos que comumente aparecem em uma reação em tempo real.

2 JUSTIFICATIVA

As micobactérias são organismos amplamente distribuídos na natureza, com características heterogêneas. Além de conhecidos patógenos como o *M. tuberculosis* e o *M. leprae*, diversas micobactérias têm sido identificadas como patógenos oportunistas no homem.

Estamos diante de uma situação nova para os profissionais da saúde em todo o mundo. As infecções por micobactérias, na proporção como as alcançadas não têm registro anteriores, se configurando epidemiologicamente uma doença emergente.

Um percentual de pacientes com diagnóstico de tuberculose em tratamento, na realidade são portadores de micobacterioses atípicas.

O sistema de saúde pública da cidade de Uberlândia e região não realizam a tipagem de micobactérias, sendo que a identificação das espécies de MNT é processada em Laboratórios conveniados de outros estados, somente quando o caso se torna crônico ou apresenta sintomatologia diferenciada.

Existe uma grande diversidade de espécies de micobactérias não tuberculosas em pacientes suspeitos ou em tratamento de tuberculose.

Além das ações de prevenção e interromper as infecções por micobactérias torna-se necessária a identificação das infecções para que os casos sejam melhor diagnosticados e tratados.

A identificação das espécies é importante para a conduta terapêutica adequada, pois cepas isoladas de casos relacionados com doença apresentam diferenças no padrão de susceptibilidade aos medicamentos.

As infecções por micobactérias não são facilmente identificáveis devido as características similares do gênero *Mycobacterium*, como a coloração álcool-ácido resistente (BAAR) e formação de lesões granulomatosas, o que torna necessário a utilização de métodos complementares.

As micobactérias em geral possuem lento crescimento em cultura, levando ao atraso no diagnóstico e na adoção de esquema terapêutico inadequado. A infecção por micobactérias necessita de tratamento estruturado, o qual é espécie-dependente, e a terapêutica inapropriada pode levar à iatrogenia e resistência medicamentosa. Portanto, a utilização de novas ferramentas moleculares, tais como a PCR-RFLP-*hsp65e* a PCR em tempo real, permite a identificação rápida e específica da espécie bacteriana, além de possuir maior sensibilidade, determinando precocemente a escolha do tratamento, evitando assim as formas crônicas da doença, e diminuindo a morbidade e mortalidade devido à falha no diagnóstico baseada apenas em cultura e na clínica.

3 OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Padronizar o uso da técnica molecular PCR-RFLP *hsp65* na identificação de espécies de micobactérias, avaliar sua aplicação para a identificação de micobactérias em amostras clínicas e comparar com o diagnóstico pelo método convencional.

Objetivos Específicos

Realizar os testes de restrição enzimática PCR-RFLP*hsp65* para a padronização do método em espécies de micobactérias previamente identificadas em centro de referência;

Identificar por PCR-RFLP as espécies de micobactérias presentes em amostras de culturas positivas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia nos anos de 2013-2014 e comparar com o diagnóstico clínico realizado por método convencional;

Determinar as principais espécies de micobactérias circulantes em Uberlândia e região;

Demonstrar a importância do diagnóstico correto e avaliar a utilização da técnica proposta para um diagnóstico diferencial de micobacterioses no âmbito do SUS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Padronização da Técnica PCR-RFLP *hsp65*

Para referência de padrões moleculares foram utilizadas 13 amostras de espécies de micobactérias já identificadas e doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ): *M. avium*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. phlei*, *M. gordonaiae*, *M. kansasii*, *M. bovis*, *M. szulgai*, *M. massiliense*. A referênciade*M. Tuberculosis* foi cedida pelo Instituto Hélio Fraga/RJ e para *M. leprae* uma amostra clínica positiva foi cedida pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH/HC/UFU).

4.1.1 Extração de DNA

As amostras de referência liofilizadas foram ressuspensas em água ultrapura e cultivadas em meios *Middlebrook* 7H10 ágar e *Middlebrook* 7H9 caldo para crescimento de colônias.

As amostras crescidas no meio *Middlebrook* caldo foram inativadas por choque térmico em três repetições de 10 minutos de banho maria 95°C e congelamento -20°C. Posteriormente foi realizada a extração foi pelo método *salting-out* da seguinte forma: (MILLER, 1988).

Foram adicionados 40 µl de SDS10% (*sodiumdodecyl sulfate*) e incubadas por 37°C/ 1h, e posteriormente adicionado uma solução de Proteinase K (10 mg/ml) 65°C/ 5h e armazenados em -20°C por 30 min. Após, foram adicionados 340µl (1/3 do volume) de NaCl saturado (6 M). Centrifugação por 15 minuto a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 600 µl de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugados por 15 minuto a 10.000 rpm. O etanol absoluto foi descartado e adicionado 600 µl de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o *pellet*. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Repetiu-se a lavagem com etanol 70% mais uma vez, desprezou-se o sobrenadante e assim que os tubos ficaram completamente secos adicionou-se 50 µl de TE para diluir o DNA.

4.1.2 Amplificação de DNA PCR Convencional

Os DNAs extraídos foram usados para amplificação do fragmento de 439 pb do gene Hsp65 com os primers *Tb11* (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e *Tb12* (5' - CTTGTCGAACCGCATACCCT) modificado a partir do protocolo descrito por TELENTI et al., 1993. A composição da mistura para PCR (50µL) foi 25 µL de Taq DNA polimerase 2.0X Master Mix (MgCl₂ 1.5 mM), 1,5µL com concentração de 10µM de cada primer, 4 µL de DNA extraído, com concentração total de 25ng/µL e 18µL de água ultrapura. A reação foi sujeita a 45 ciclos de amplificação (1min a 94°C, 1min a 60°C, 1 min. a 72°C); seguido de 10 min. de extensão a 72°C.

Uma parte do produto da amplificação (8µL) foram adicionados a 2µL de tampão de corrida em gel de agarose (0,25% bromofenol azul, 40% sacarose em água) e separados em um gel de 2% em tampão TBE 0,5X em um tempo de 45 minutos a 100V. Os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta misturados com 2 µL do reagente fluorescente intercalante de DNA brometo de etídio. Foi utilizado um marcador molecular de 50 pb e foto documentados sob iluminação UV.

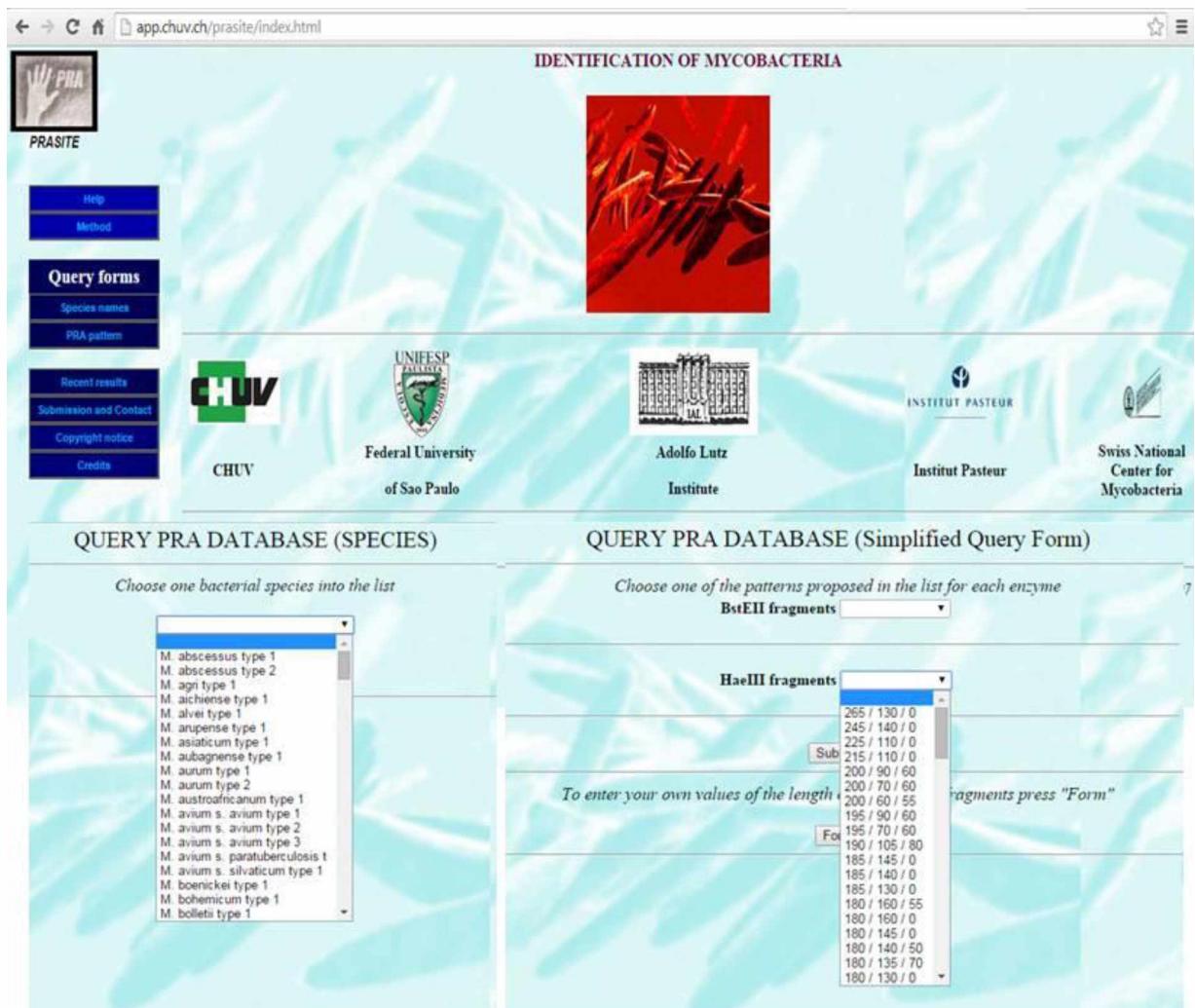
4.1.3 Restrição Enzimática (PCR-RFLP)

Para a restrição foram utilizadas as enzimas *BstEII* e *HaeIII*, 15 μ L de produto da PCR foi adicionado a mistura contendo de 0,5 μ L (5U) de enzima, 2,5 μ L de tampão para restrição (5X tampão B), 0,2 μ L de BSA e 11,3 μ L de água ultrapura. A reação com *BstEII* foi incubada por 60 min à 60°C e a reação com *HaeIII* foi incubada à 37°C por 3 horas.

Após a restrição 8 μ L dos produtos digeridos foram adicionados a 3 μ L de tampão de corrida em gel de agarose (0,25% bromofenol azul, 40% sacarose em água) e separados em um gel de 4% em tampão TBE 0,5X por aproximadamente 3 horas a 80V. Os fragmentos foram visualizados em luz ultra-violeta misturados ao reagente fluorescente intercalante de DNA brometo de etídio. Foi utilizado um marcador molecular de 25pb.

A identificação foi finalizada comparando os padrões das bandas com algoritmos descritos no site PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) (Figura 4).

Figura 4. Site PRASITE



4.2 Utilização da técnica PCR-RFLP em amostras de cultura

A fim de testar a técnica padronizada em amostras de referência e identificar espécies de micobactérias não tuberculosas, coletamos amostras de cultura de pacientes diagnosticados com tuberculose acreditando que algumas infecções por micobactérias atípicas são diagnosticados erroneamente.

4.2.1 Delineamento do Estudo

Foi realizado um estudo descritivo retrospectivo transversal com amostras de cultura de pacientes com micobacterioses no período de 2013 a 2014.

4.2.2 Local de Realização

O estudo foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, onde as amostras clínicas foram coletadas e preparadas. A extração de DNA, e PCR-RFLP foram desenvolvidas no Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase da Universidade Federal de Uberlândia (CREDESH/UFU) e no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2.3 População de Estudo

Foi utilizada amostra de uma cultura positiva de cada paciente com micobacteriose atendidos no Hospital. Posteriormente foram analisadas informações como idade, sexo, perfil HIV, diagnóstico clínico e o tempo de tratamento dos pacientes obtidos através da análise dos prontuários.

4.2.4 Aspectos Éticos

Amostras de cultura de diversos tecidos e fluídos corporais de pacientes com infecção por micobactérias do Ambulatório de Doenças Infecciosas do Hospital de Clínicas da UFU foram coletadas para a realização da genotipagem molecular, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia sob o processo CEP/UFU No. 123/10 (Parecer CEP 457/10, Tuberculose) e CEP/UFU No. 355/11 (Parecer CEP 097/12, HIV e coinfeções).

4.2.5 Amostras

Foram coletadas cinquenta e cinco amostras clínicas de cultura positivas e viáveis de *Mycobacterium sp.* provenientes de diversos materiais como: aspirado brônquico, linfonodo cervical, aspirado medular, escarro, líquido pleural, líquido vesicular, lavado brônquico, secreção traqueal, aspirado gástrico, líquor, raspado de lesão gengival, cicatriz cirúrgica e fragmento de figado.

4.2.6 Baciloscopia e Cultura

A baciloscopia foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas UFU, segundo recomendações descritas no Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e Outras

Micobactérias (BRASIL, 2008a). Foi utilizada a coloração de *Ziehl-Neelsen* e a presença de bacilos, pesquisada com objetiva de 100X.

Sintomas clínicos que indiquem fortemente a presença de micobactérias e/ou baciloscopia positiva para bacilo álcool ácido resistente (BAAR) são critérios para realização de cultura em amostras dos pacientes.

As amostras de diferentes espécimes clínicos foram descontaminadas, isoladas em meio *Lowenstein-Jensen* e acondicionadas em estufa a 37°C pelo técnico responsável do laboratório. Após a liberação dos resultados para o médico, essas amostras eram armazenadas em local acondicionado por aproximadamente 2 anos.

Amostras das culturas armazenadas foram repicadas em meios *Middlebrook 7H10* ágar e *Middlebrook 7H9* caldo para novo crescimento para posterior extração de DNA. Os resultados do tempo de crescimento na cultura e da baciloscopia foram registrados para análise.

A extração de DNA, a amplificação do gene *hsp65* e a restrição enzimática PCR-RFLP foram realizadas como descrito nos itens 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3.

4.2.7 Diagnóstico

O Hospital de Clínicas de Uberlândia não realiza identificação por testes moleculares e a interpretação dos resultados é feita pelo médico responsável, com diagnóstico clínico baseado na sintomatologia, baciloscopia e no tempo de crescimento das colônias. É padronizado pelo hospital considerar o diagnóstico de tuberculose quando o paciente possui sintomas clínicos característicos e amostras de baciloscopia ou cultura positivas para *Mycobacterium sp*. Assim todas as culturas positivas que utilizamos foram primeiramente caracterizadas como tuberculose.

A discordância entre os métodos foi considerada quando a técnica molecular detectou outra espécie de micobactéria diferente daquela da cultura e/ou do diagnóstico clínico dado pelo médico.

4.2.8 Tratamento

Como os pacientes com *Mycobacterium sp*. são inicialmente diagnosticados como tuberculose, o tratamento inicial é o padrão recomendado pelo Ministério da Saúde (2RHZE / 4RH): 2 meses COCXIP 4 (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) + 4 meses rifampicina e isoniazida. Os tratamentos substitutivos com outras drogas complementares são instaurados quando há falha terapêutica, provavelmente devido à baixa sensibilidade e especificidade do diagnóstico convencional ou pela resistência da cepa ao tratamento padrão. Os medicamentos comumente utilizados no caso de suspeita ou confirmação de infecção por micobactérias atípicas são: claritromicina, ciprofloxacina, amicacina, cefoxetina, imipenem, doxiciclina ou azitromicina.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da Técnica PCR-RFLP

A PCR convencional amplificou o gene *hsp65* de aproximadamente 439pb nos 15 isolados testados de amostras já conhecidas.

A PCR-RFLP *hsp65* gerou produtos de amplificação com padrões de diferentes tamanhos equivalentes a cada espécie em todas as amostras. As micobactérias *M. Avium intracelulare*, *M. abcessus*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. gordonai*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. massiliense*, *M. leprae*, *M. peregrinum*, *M. szulgai* e *M. kansasii* apresentaram padrões idênticos aos descritos na literatura, mas *M. marinum* apresentou um padrão diferente (*HaeIII* 140/80/30 e *BstEII* 250/120/100) o único padrão achado na literatura para essa micobactéria é (*HaeIII* 145/105/80/0 e *BstEII* 235/210/0) (Tabela 2, Figuras 5 e 6).

Tabela 2. Perfis de restrição enzimática obtidos para as enzimas *BstEII* e *HaeIII*

Peso Molecular		Espécie	Tipo	Cepa
<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>			
235-210	145-70-60-55	<i>M. abscessus</i>	1	CC05800
	145-140-100-50	<i>M. peregrinum</i>	1	INCQS00614
	140-80-60-50	<i>M. phlei</i>	1	INCQS00133
	130-105-80	<i>M. kansasii</i>	1	CC00134
	200-70-60-50	<i>M. massiliense</i>	1	INCQS0059
235-120-85	145-120-60-55	<i>M. fortuitum</i>	1	CC02000
	160-115-60	<i>M. gordonae</i>	1	INCQSCC1000
235-115-85	150-130-70	<i>M. tuberculosis</i>	Complexo tuberculosis1	Paciente151978
	150-130-70	<i>M. bovis</i>	Complexo tuberculosis1	INCQS00037
235-120-100	140-125-60	<i>M. intracellulare</i>	1	CC1400
320-115-0	180-130-0	<i>M. terrae</i>	1	INCQS00138
235-130-85	145-125-60	<i>M. smegmatis</i>	1	INCQS00021
320-130-0	265-130-0	<i>M. leprae</i>	1	Pool de DNA
Sem digestão	130-105-70	<i>M. szulgai</i>	1	INCQS00141
250-120-100	140-80-30	<i>M. marinum</i>	Novo padrão	INCQS500139

Figura 5 Perfil de restrição enzimática das 15 micobactérias restringidas com enzima HaeIII visualizadas em gel de agarose 4%.

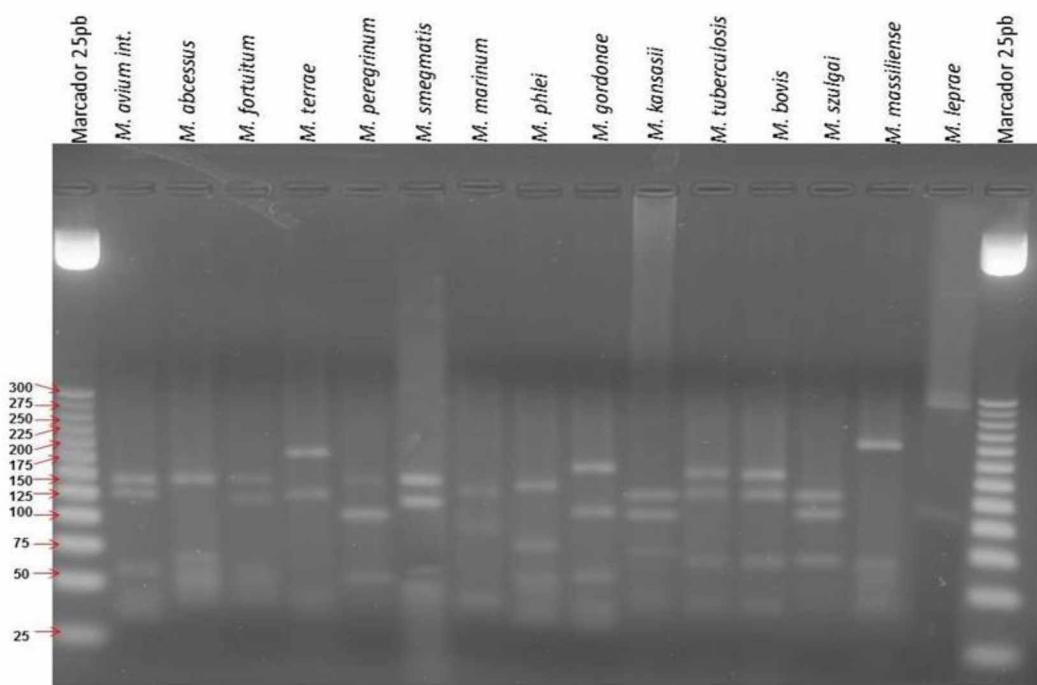
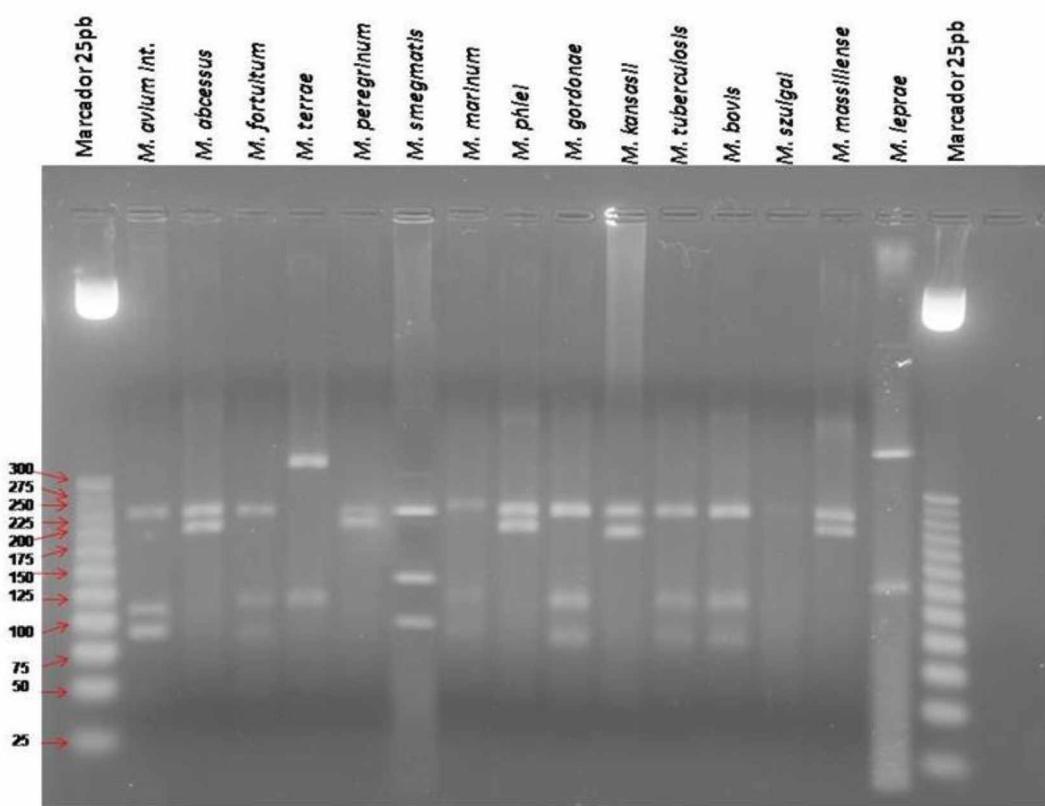


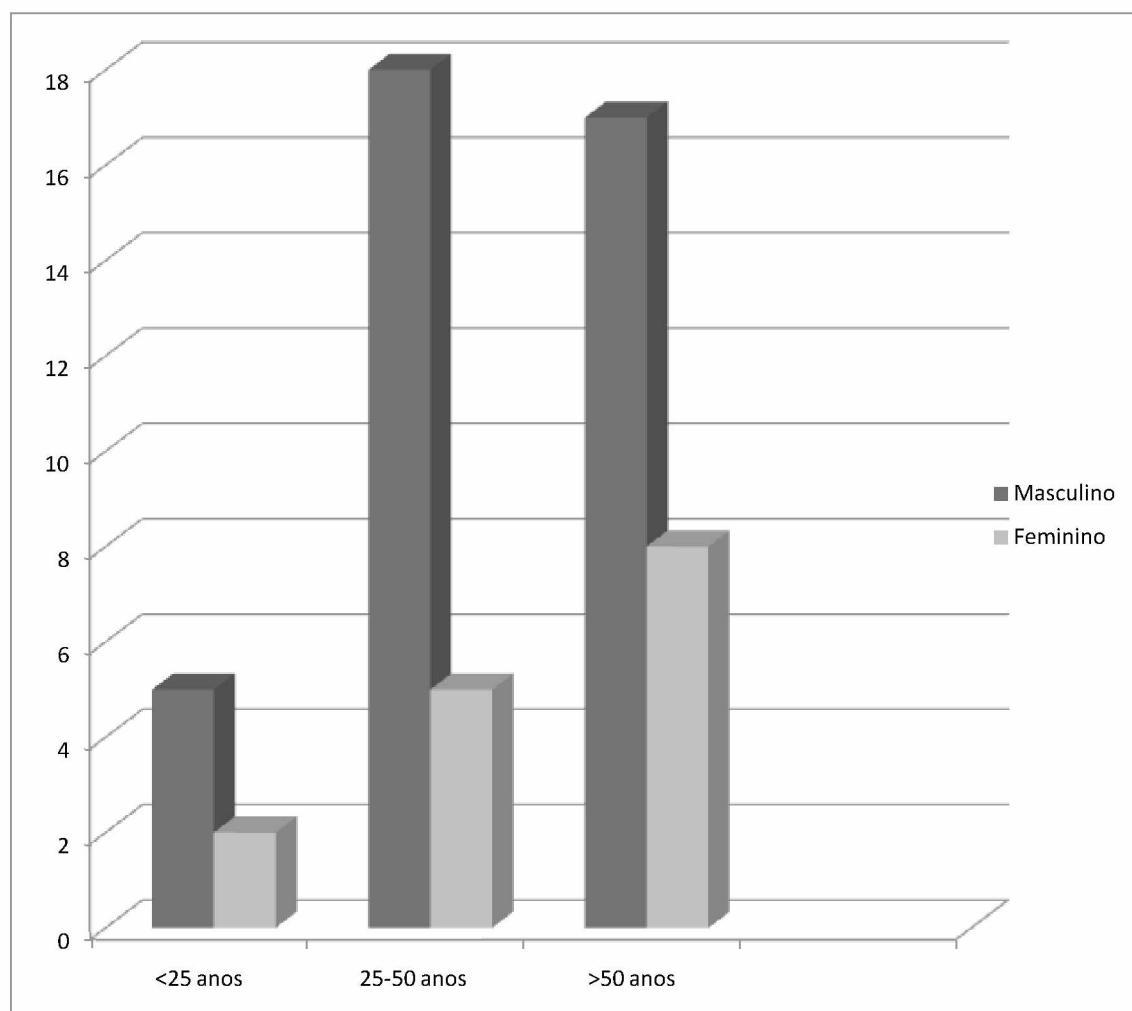
Figura 6 Perfil de restrição enzimática das 15 micobactérias restringidas com enzima *BstEII* visualizadas em gel de agarose 4%



5.2 Dados dos Pacientes

No período de 2013 a 2014 foram coletadas 55 culturas de micobactérias de pacientes diagnosticados com tuberculose atendidos pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Por análise dos prontuários 15 pacientes eram do sexo feminino (27,3%) enquanto 40 eram do sexo masculino (72,7%). A média de idade foi de 46 anos, com amplitude de 11 a 92 anos (Figura 7, Tabela 3).

Figura 7. Distribuição por faixa etária e gênero dos pacientes.
No eixo X o número de pacientes e eixo Y a faixa etária.



5.3 Identificação molecular

O gene *hsp65* foi amplificado por PCR convencional em todas as 55 amostras de cultura, exceto nas amostras 21 e 31 que foram então consideradas negativas.

Realizamos o teste de identificação molecular por restrição enzimática (PCR-RFLP) em todas as culturas (Figura 8 e 9) com 63,6% (35/55) de amostras positivas para *M. tuberculosis*, 16,3% (9/55) para *M. avium* tipo 1, 3,7% (2/55) para *M. avium* tipo 2, 3,7% (2/55) para *M. kansasii* tipo 1, 1,8% (1/55) para *M. intracellulare* tipo 1, 1,8% (1/55) para *M. mucogenicum*, 1,8% (1/55) para *M. chelonae*, 1,8% (1/55) para *M. terrae* tipo 3, 1,8% (1/55) sem padrão conhecido na literatura (HaeIII-150/110; BstEII-235/210). Houve negatividade em 3,7% (2/55) das amostras. (Figura 10, Tabela3).

Não foram detectados co-infecção por mais de um tipo de micobactéria na mesma amostra, devido o material analisado ter sido retirado de colônias específicas no crescimento das culturas.

Figura 8 Restrição enzimática com a enzima HaeIII em amostras de cultura de pacientes. Amostras 25 a 52, marcador de 25 pb. Gel de agarose 4%.

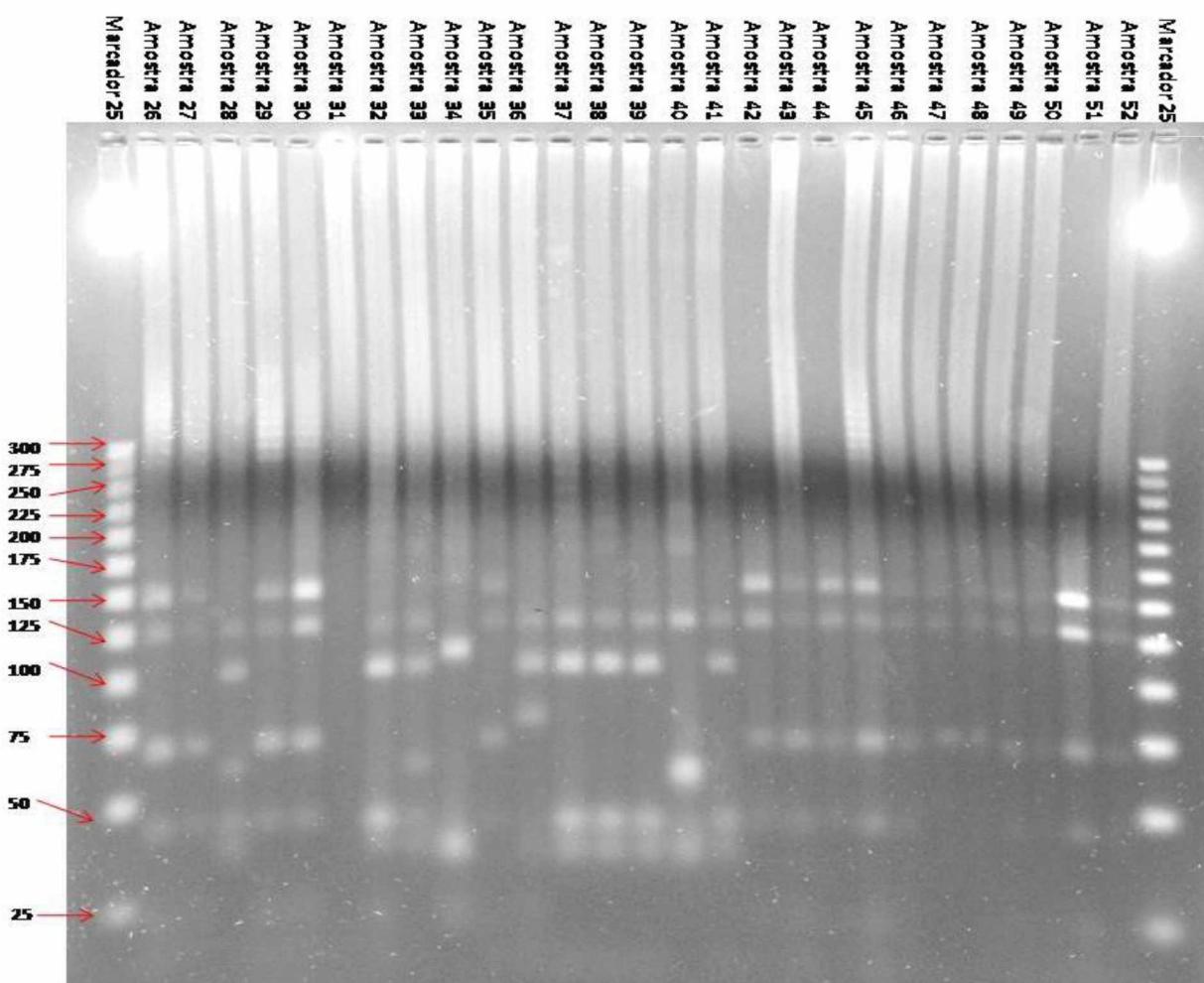
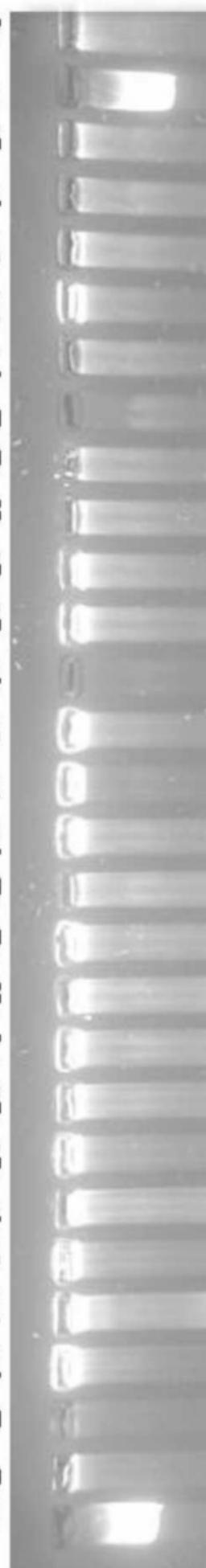


Figura 9 Restrição enzimática com enzima BstEII em amostras de cultura de pacientes. Amostras 29 a 55, marcador de 25pb. Gel de agarose 4%.

Amostra 47
Marcador 25 pb
Amostra 55
Amostra 54
Amostra 53
Amostra 52
Amostra 51
Amostra 50
Amostra 49
Amostra 48
Amostra 46
Amostra 45
Amostra 44
Amostra 43
Amostra 42
Amostra 41
Amostra 40
Amostra 39
Amostra 38
Amostra 37
Amostra 36
Amostra 35
Amostra 34
Amostra 33
Amostra 32
Amostra 31
Amostra 30
Amostra 29
Marcador 25 pb



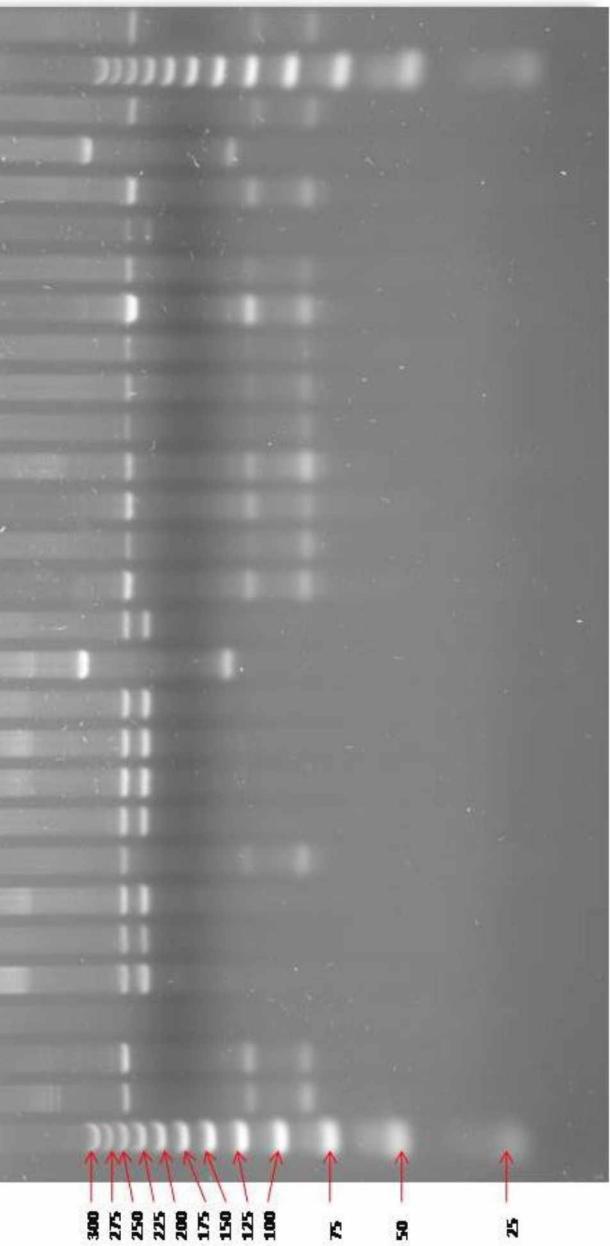


Figura 10 Distribuição das espécies de micobactérias identificadas em cultura de pacientes pela metodologia PCR-RFLP.

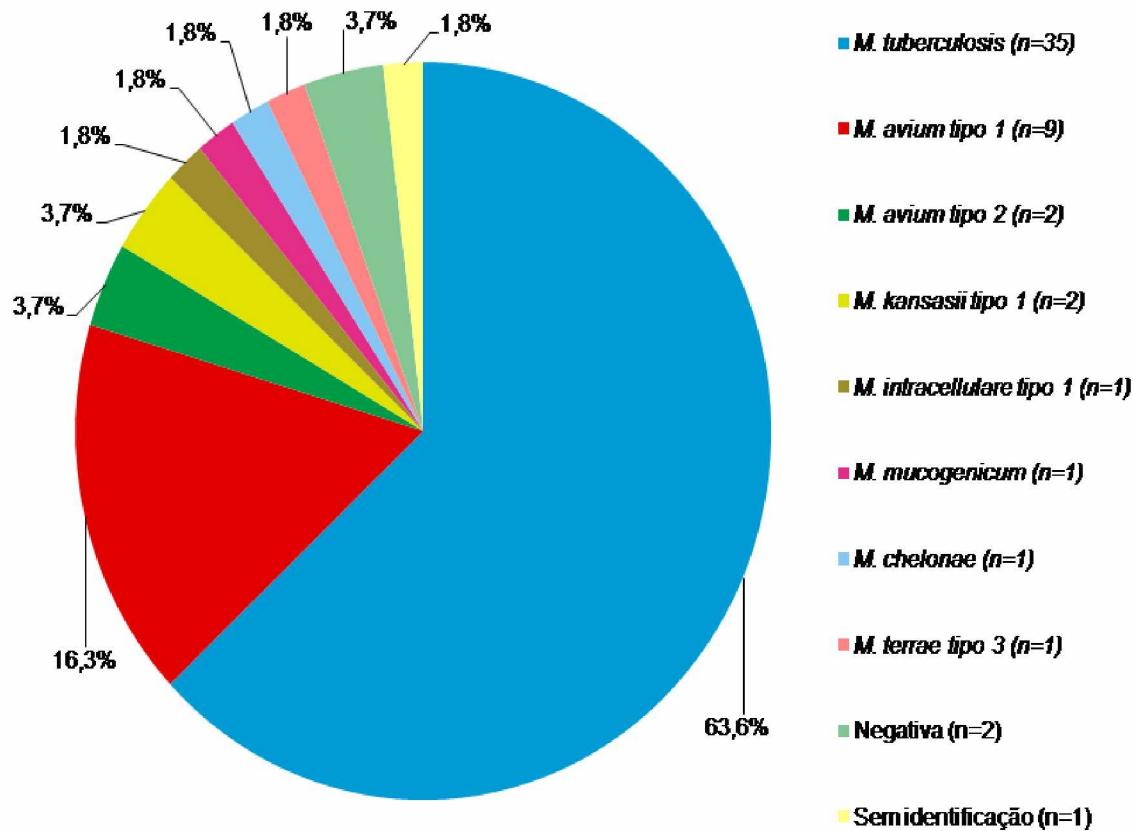


Tabela 3 Identificação dos pacientes, dados demográficos, informações de cultura, diagnóstico clínico e identificação molecular

Paciente ID	Idade	Gênero	Status HIV	BAAR	Cultura	Diagnóstico Clínico Pós-cultura	Análise Molecular		Resultado molecular PCR-RFLP <i>hsp65</i>
							HaeIII	BstEII	
1	17	Fem	Neg	Negativo	<i>Myc. sp</i> / 20 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
2	25	masc	Pos	Negativo	<i>Myc. sp</i> / 21 dias	Tuberculose pleural	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
3	16	fem	Neg	Negativo	<i>Myc. sp</i> / 18 dias	Tuberculose não pleural	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
4	54	masc	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 15 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
5	48	masc	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 20 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
6	44	masc	Pos	Negativo	<i>Myc. sp</i> / 26 dias	Tuberculose pleural	150/125/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
7	64	fem	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 16 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
8	27	masc	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 21 dias	Tuberculose não especificada	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
9	67	masc	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 24 dias	Tuberculose pulmonar	130/105	235/210	<i>M. avium</i> tipo I
10	23	masc	Pos	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 25 dias	Tuberculose não especificada	130/105	235/210	<i>M. avium</i> tipo I
11	65	fem	Pos	Negativo	<i>Myc. sp</i> / 30 dias	Tuberculose pulmonar	130/105	235/210	<i>M. avium</i> tipo I
12	11	masc	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 13 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
13	34	masc	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 18 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
14	83	masc	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / s.info	Tuberculose pulmonar	130/105/80	235/210	<i>M. kansasii</i> tipo I
15	64	fem	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 30 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
16	24	masc	Neg	Positivo	<i>Myc. sp</i> / 20 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>

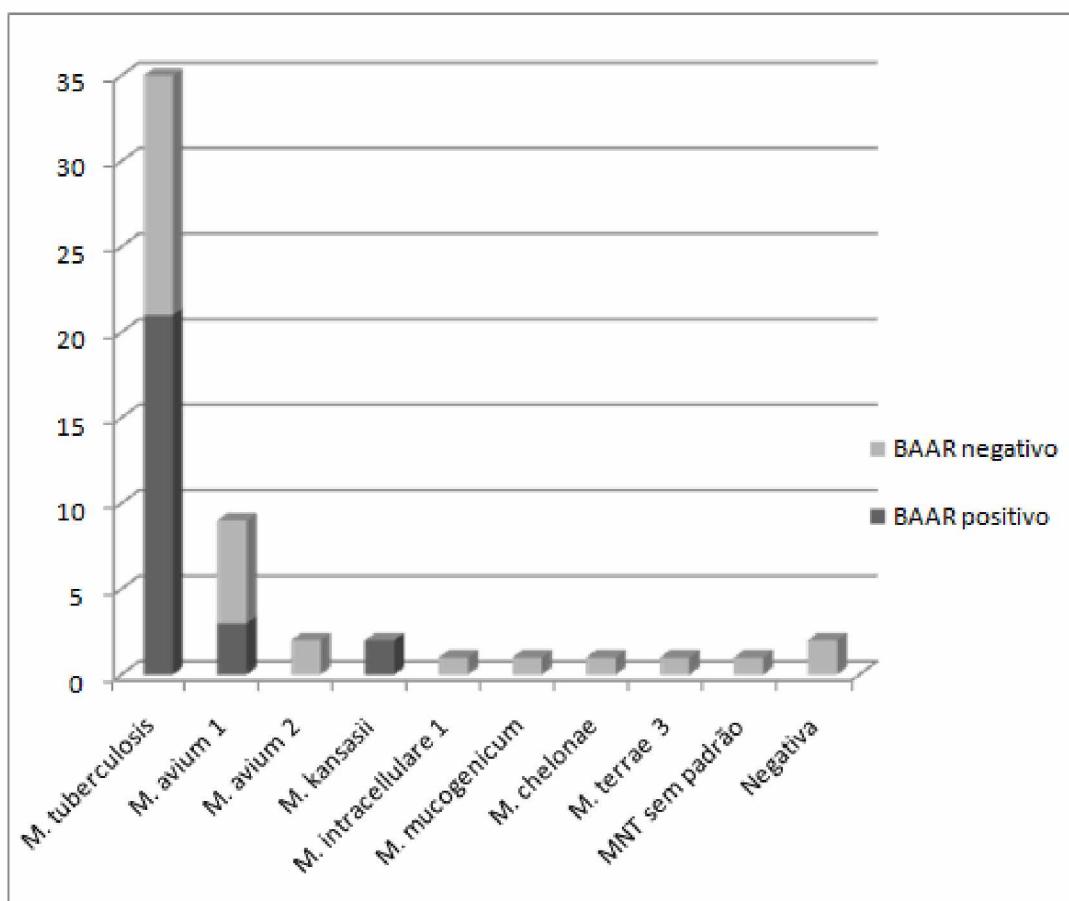
17	46	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / 40 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
18	53	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / 9 dias	Tuberculose vesical	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
19	46	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / 22 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
20	38	fem	Pos	Negativo	Myc.sp / 20 dias	Tuberculose ganglionar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
21	45	masc	Pos	Negativo	Negativo	Tuberculose pulmonar	Negativo	Negativo	Negativo
22	77	fem	Neg	Negativo	Myc.sp / >15 dias	Tuberculose não especificada	145/60/50	ND	<i>M. terrae tipo 3</i>
23	28	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / 15 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	ND	<i>M. tuberculosis</i>
24	65	masc	Neg	Negativo	Myc.sp / 34 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	ND	<i>M. tuberculosis</i>
25	83	masc	Neg	Negativo	Myc.sp / 30 dias	Tuberculose pulmonar	140/125/60/30	235/120/100	<i>M. intracelulare 1</i>
26	34	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / 40 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
27	53	masc	Neg	Negativo	Myc.sp / 20 dias	Tuberculose sistema nervoso	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
28	22	masc	Pos	Negativo	Myc. sp. / s. info	Tuberculose sistema nervoso	125/105/65	235/210	<i>M. avium 2</i>
29	30	fem	pos	Negativo	Myc.sp / >15 dias	Tuberculose miliar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
30	33	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / 15 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
31	57	masc	Pos	Negativo	Myc. sp. / s. info	Tuberculose pulmonar	Negativo	Negativo	Negativo
32	52	masc	Pos	Negativo	Myc.sp / 45 dias	Tuberculose pulmonar	130/105	235/210	<i>M. avium tipo 1</i>
33	36	masc	Pos	Negativo	Myc.sp / 20 dias	Tuberculose miliar	130/105/65	235/210	<i>M. avium 2</i>
34	92	fem	Neg	Negativo	Myc.sp / 18 dias	Tuberculose pulmonar	155/110	235/210	MNT sem padrão conhecido
35	27	masc	Neg	Negativo	Myc.sp / >20 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
36	52	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / >15 dias	Tuberculose pulmonar	130/105/80	235/210	<i>M. kansasii tipo 1</i>
37	24	masc	Pos	Positivo	Myc.sp / 35 dias	Tuberculose pulmonar	130/105	235/210	<i>M. avium tipo 1</i>

38	42	fem	Pos	S/Info	Myc.sp / 16 dias	Tuberculose óssea e das articulações	130/105	235/210	<i>M. avium tipo 1</i>
39	40	masc	Pos	Negativo	Myc.sp / 45 dias	Tuberculose ganglionar	130/105	235/210	<i>M. avium tipo 1</i>
40	29	fem	Neg	Negativo	Myc.sp / 10 dias	Tuberculose pulmonar	130/65/60	320/130	<i>M. mucogenicum</i>
41	44	masc	Pos	Negativo	Myc. sp. / s. info	Tuberculose miliar	130/105	235/210	<i>M. avium tipo 1</i>
42	27	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / 21 dias	Tuberculose não especificada	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
43	27	masc	Pos	Positivo	Myc.sp / 12 dias	Tuberculose miliar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
44	54	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / >10 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
45	66	fem	Neg	Positivo	Myc.sp / >20 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
46	61	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / 18 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
47	75	masc	Neg	Negativo	Myc.sp / 15 dias	Tuberculose não especificada	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
48	49	fem	Neg	Negativo	Myc.sp / 28 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
49	54	masc	Neg	Positivo	Myc.sp / 25 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
50	52	masc	Neg	Negativo	Myc.sp / 10 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
51	66	fem	Neg	Negativo	Myc.sp / 20 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
52	59	fem	Pos	Negativo	Myc.sp / 25 dias	Tuberculose miliar	130/105	235/210	<i>M. avium tipo 1</i>
53	61	mas	Neg	Negativo	Myc.sp / 20 dias	Tuberculose pulmonar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>
54	77	masc	Neg	Negativo	Myc.sp / 05 dias	Tuberculose óssea e das articulações	200/60/55	320/130	<i>M. chelonae</i>
55	27	masc	Pos	Positivo	Myc.sp / 20 dias	Tuberculose miliar	150/130/70	235/120/85	<i>M. tuberculosis</i>

5.4 Baciloscopy e Cultura

Considerando as 35 amostras de *M. tuberculosis* identificados pelo método molecular, 21 eram BAAR positivos e 14 negativas. Para as amostras positivas de MNT (18/55; 32,7%), 5 foram BAAR positivos (3 *M. avium* tipo 1 e 2 *M. kansasii*) e 13 BAAR negativos (6 *M. avium* tipo 1, 2 *M. avium* tipo 2, 1 *M. terrae* tipo 3, 1 *M. intracellulare*, 1 *M. mucogenicum*, 1 *M. chelonae*, 1 MNT sem padrão). Para as duas amostras restantes ambas foram PCR e BAAR negativas (Figura 11, Tabela 3).

Figura 11. Distribuição de amostras BAAR positivas e negativas



Das 35 culturas identificadas como *M. tuberculosis* por PCR-RFLP, 30 tiveram crescimento maior que 15 dias e 5 tiveram crescimento menor que 15 dias. Das 9 culturas de *M. avium* tipo 1 identificadas pelo método molecular, todas tiveram tempo de crescimento de colônias maior que 15 dias. Das duas culturas de *M. kansasii* tipo 1, 1 teve crescimento em 15 dias e a outra sem informação de crescimento. Entre as 2 culturas de *M. avium* tipo 2, uma não teve informação de tempo de crescimento e a outra cresceu com mais de 15 dias. As culturas de *M. mucogenicum* e *M. chelonae* tiveram crescimento menor que 10 dias. A cultura de *M. terrae* tipo 3 teve crescimento em 15 dias. A espécie de MNT sem padrão conhecido na PCR-RFLP cresceu em cultura com mais de 15 dias. E as duas culturas negativas por método molecular, uma não teve informação sobre o crescimento em cultura e a outra cresceu com 15 dias (Tabelas 3 e 4).

Tabela 4 Espécies de micobactérias identificadas por PCR-RFLP e o tempo de cultura.

Espécies	Tempo de cultura		
	≥15 dias	<15 dias	Sem informação
<i>M. tuberculosis</i>	30	5	
<i>M. avium</i> tipo 1	9		
<i>M. avium</i> tipo 2	1		1
<i>M. kansasii</i>	1		1
<i>M. mucogenicum</i>		1	
<i>M. chelonae</i>		1	
<i>M. terraetipo</i> 3	1		
MNT desconhecida	1		
Negativa	1		1

5.5 Locais de acometimento

Do total de amostras diagnosticadas, 61,9% (34/55) eram em sítio pulmonar e destas, no diagnóstico molecular por PCR-RFLP, 23 eram *M. tuberculosis*, 4 *M. avium* 1, 2 *M. kansasii*, 2 eram negativos, 1 *M. intracellulare*, 1 *M. mucogenicum* e uma MNT sem padrão. Das amostras cujo local de acometimento não era especificado (9%; 5/55), o padrão molecular encontrado foi de 3 *M. tuberculosis*, 1 *M. avium* 1 e uma *M. terrae*. Infecção disseminada (miliar) foi relatado em 11% (6/55) com amostras positivas para 3 *M. tuberculosis*, 2 *M. avium* 1 e 1 *M. avium* 2; e pleural em 5,5% (3/55) identificadas como *M. tuberculosis*.

Com referência ao acometimento extrapulmonar, 3,6% (2/55) eram ganglionar, sendo 1 *M. tuberculosis* e 1 *M. avium* 1 por PCR-RFLP; 3,6% (2/55) eram de origem óssea (*M. avium* 1 e *M. chelonae*); 1,8% (1/55) era vesical (*M. tuberculosis*); e 3,6% (2/55) acometeu sistema nervoso central, 1 *M. tuberculosis* e a outra *M. avium* 2 (Tabela 5).

Tabela 5 Características dos pacientes: resultados da baciloscopy, cultura, técnica molecular PCR-RFLP e diagnóstico clínico (locais de acometimento).

		Diagnóstico Molecular (PCR-RFLP)											
Variáveis			M. tuberculosis	M. avium tipo 1	M. avium tipo 2	M. kansasii	M. intracellulare tipo 1	M. mucogenicum	M. chelonae	M. terrae tipo 3	MNT desconhecida	Negativo	Total
Gênero	Masculino	26	6	2	2	1	0	0	1	0	0	2	40
	Feminino	9	3	0	0	0	1	0	0	1	1	0	15
Idade	<25 anos	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7
	25-50 anos	17	3	1	0	0	1	0	0	0	0	1	23
	>50 anos	14	4	0	2	1	0	1	1	1	1	1	25
Baciloscopy	Positivo	21	3	0	2	1	0	0	0	0	0	0	27
	Negativo	14	6	2	0	0	1	1	1	1	1	2	28
Tempo cultura	>15 dias	30	9	1	1	1	0	0	1	1	0	0	44
	< 15 dias	5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	7
	Sem informação	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	4
Diagnóstico clínico	Tuberculose pulmonar	23	4	0	2	1	1	0	0	1	2	34	
	Tuberculose não especificada	3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5
	Tuberculose miliar	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6
	Tuberculose pleural	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	Tuberculose ganglionar	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	Tuberculose óssea	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
	Tuberculose vesical	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Tuberculose sistema nervoso	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Status HIV	HIV positivo	7	8	2	0	0	0	0	0	0	0	1	18
	HIV negativo	28	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	37

5.6 Co-Infecção com HIV

Analizando os prontuários e comparando com os resultados obtidos pelo método molecular, 32,7% (18/55) pacientes eram HIV positivos e destes, 44,4% (8/18) eram *M. avium* tipo 1, 38,9% (7/18) eram *M. tuberculosis*, 11,1% (2/18) *M. avium* tipo 2 e 5,6% (1/18) foi negativo na PCR-RFLP, ou seja, cerca de 56% das co-infecções com HIV foram causadas por MNT (Tabela 6).

Tabela 6 Micobactérias em amostras HIV positivo.

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i> 1	<i>M. avium</i> 2	Negativo
HIV positivo	7	8	2	1
HIV negativo	28	1	0	1
Total	34	9	2	2

5.7 Discordância entre os diagnósticos e Tratamento inadequado

Todos os pacientes foram diagnosticados por método convencional como tuberculose. No entanto, 63,7% (35/55) das amostras de cultura foram confirmadas como *M. tuberculosis* pela PCR-RFLP e em 36,3% (20/55) dos pacientes houve discordância entre os métodos, ou seja, a metodologia molecular identificou outras espécies de MNT em 18 amostras e 2 foram negativas (Tabelas 3 e 5).

Quanto ao tratamento, em 89% (49/55) dos pacientes foi utilizado tratamento padrão para tuberculose (2RHZE / 4RH): 2 meses COCXIP 4 (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) + 4 meses rifampicina e isoniazida. Em 11% (6/55) foi utilizado um tratamento substitutivo para micobactérias atípicas que incluiu drogas auxiliares ao tratamento padrão, sendo que, por PCR-RFLP 5/55 (7,3%) pacientes estavam no grupo das MNT e 1 era negativo (Tabela 7). Ou seja, 13 das 18 MNT identificadas por método molecular foram tratadas inadequadamente como tuberculose e apenas 5 tiveram seu tratamento substituído pelo tratamento adequado para micobactérias atípicas.

Tabela 7 Casos de discordância entre o diagnóstico convencional e o molecular.

Paciente ID	Idade	Gênero	Status HIV	BAAR	Cultura/ Período	Diagnóstico Convencional	Identificação molecular PCR-RFLP	Tratamento
9	67	masc	Negativo	Positivo	Myc.sp / 24 dias	Tuberculose pulmonar,	<i>M. avium</i> tipo 1	Tratamento substitutivo
10	23	masc	Positivo	Positivo	Myc.sp / 25 dias	Tuberculose sem especificação	<i>M. avium</i> tipo 1	Tratamento padrão
11	65	fem	Positivo	Negativo	Myc.sp / 30 dias	Tuberculose pulmonar	<i>M. avium</i> tipo 1	Tratamento substitutivo
14	83	masc	Negativo	Positivo	Myc.sp / s.info	Tuberculose pulmonar	<i>M. kansasii</i> tipo 1	Tratamento padrão
21	45	masc	Positivo	Negativo	Negativo	Tuberculose pulmonar	Negativo	Tratamento padrão

						Tuberculose sem especificação	<i>M. terrae</i> tipo 3	Tratamento substitutivo
22	77	fem	Negativo	Negativo	Myc.sp / >15 dias	Tuberculose pulmonar	<i>M. intracellulare</i> tipo 1	Tratamento padrão
25	83	masc	Negativo	Negativo	Myc.sp / 30 dias	Tuberculose do sistema nervoso	<i>M. avium</i> tipo 2	Tratamento padrão
28	22	masc	Positivo	Negativo	Myc. sp. / s. info	Tuberculose pulmonar	<i>Negativo</i>	Tratamento substitutivo
31	57	masc	Positivo	Negativo	Myc. sp. / s. info	Tuberculose pulmonar	<i>M. avium</i> tipo 1	Tratamento padrão
32	52	masc	Positivo	Negativo	Myc.sp / 45 dias	Tuberculose pulmonar	<i>M. avium</i> tipo 2	Tratamento substitutivo
33	36	masc	Positivo	Negativo	Myc.sp / 20 dias	Tuberculose miliar	<i>M. kansasii</i> tipo 1	Tratamento padrão
34	92	fem	Negativo	Negativo	Myc.sp / 18 dias	Tuberculose pulmonar	MNT sem padrão conhecido	Tratamento padrão
36	52	masc	Negativo	Positivo	Myc.sp / >15 dias	Tuberculose pulmonar	<i>M. avium</i> tipo 1	Tratamento padrão
37	24	masc	Positivo	Positivo	Myc.sp / 35 dias	Tuberculose pulmonar	<i>M. avium</i> tipo 2	Tratamento padrão
38	42	fem	Positivo	Negativo	Myc.sp / 16 dias	Tuberculose óssea	<i>M. avium</i> tipo 1	Tratamento padrão
39	40	masc	Positivo	Negativo	Myc.sp / 45 dias	Tuberculose ganglionar	<i>M. avium</i> tipo 1	Tratamento padrão
40	29	fem	Negativo	Negativo	Myc.sp / 10 dias	Tuberculose pulmonar	<i>M. mucogenicum</i>	Tratamento padrão
41	44	masc	Positivo	Negativo	Myc. >20 dias	Tuberculose miliar	<i>M. avium</i> tipo 1	Tratamento padrão
52	59	fem	Positivo	Negativo	Myc.sp / 25 dias	Tuberculose miliar	<i>M. avium</i> tipo 1	Tratamento padrão
54	77	masc	Negativo	Negativo	Myc.sp / 05 dias	Tuberculose óssea	<i>M. chelonae</i>	Tratamento substitutivo

6 DISCUSSÃO

Esse trabalho demonstrou que em um hospital universitário de referência de Minas Gerais foi possível identificar por técnica PCR-RFLP diferentes espécies de micobactérias não tuberculosas que, quando comparadas com técnicas de bacilosкопia e cultura, evidenciou a discordância entre os métodos para o diagnóstico clínico de pacientes analisados, demonstrando assim a importância da identificação das espécies e do diagnóstico correto para a escolha do tratamento apropriado de micobacterioses.

Em Uberlândia, cidade com alto fluxo de migrantes e com rápido desenvolvimento na região central do Brasil, ainda não se tem registros sobre nenhum tipo de estudo que correlacionem infecções por micobactérias.

Diversos trabalhos sobre micobactérias não tuberculosas podem ser encontrados em São Paulo e no Rio de Janeiro (CAMARGO, 2000; ANJOS, 1991; LEITE, 1989; FONSECA, 1879; CORREA, 1989). Mas no estado de Minas Gerais são identificados poucos estudos, como de Froes et al. (2003) que identificaram poucas espécies de micobacterias em registros do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, o de Casagrande et al. (1986) que estudou MNT de crescimento rápido em instrumentos cirúrgicos e o de Lambertucci et al. (2011) com um único tipo de micobactéria, relatou infecções por *M. abscessus*.

No Brasil não há estudos completos sobre a situação das MNT em território nacional, já que as micobactérias não tuberculosas não têm obrigatoriedade de notificação, assim, há apenas relatos de estudos isolados principalmente nos estados da região sudeste onde são utilizadas metodologias variadas de difícil comparação e reprodução, indisponíveis em muitos Estados Brasileiros (COSTA, et al., 2010).

Ao delinearmos o perfil dos pacientes com micobacterioses, através de consulta dos prontuários, identificamos que cerca de 70% eram do sexo masculino e com idade média de 46 anos. Em trabalho similar de Maiga e colaboradores (2012), também encontraram a maioria do sexo masculino (76%) e idade média em torno de 40 anos. Estudos recentes têm demonstrado que a doença causada por MNT é mais comum em mulheres na faixa de 50 a 80 anos (THOMSON, 2010; WINTHROP, 2010).

Para a identificação de micobactérias em amostras de cultura optamos pela metodologia PCR-RFLP devido às vantagens já enumeradas por diversos pesquisadores entre elas, a rapidez, baixo custo e a facilidade de reprodução em laboratório aparelhado, além de identificar um vasto número de espécies de MNT (CHIMARA, et al., 2008, LEÃO, et al., 2005). Outro motivo foi o objetivo de avaliar sua eficiência para implantação rotineira desta técnica para diagnóstico no âmbito do SUS.

A PCR-RFLP mostrou-se eficaz em nosso estudo e conseguiu identificar as espécies de 54 amostras de cultura testadas (a amostra de MNT sem identificação não foi considerada). Mas, como qualquer outra técnica, ela conta com empecilhos, como a necessidade de um profissional qualificado para analisar os resultados, já que estes são de difícil visualização em gel de agarose, podendo gerar resultados ambíguos.

Houve dificuldades na padronização do método, pois os trabalhos descritos na literatura não são de fácil replicabilidade (CHIMARA, et al., 2008, LEÃO, et al., 2005, TELENTI, 1993), e foi preciso realizar diversos testes até que as concentrações ideais de cada reagente e o padrão de bandas visualizados em gel pudessem ser definidos. Após a padronização, as demais amostras clínicas testadas foram facilmente diferenciadas.

Através dessa metodologia molecular identificamos entre as amostras clínicas de cultura positivas para micobactérias 63,6% (35/55) de infecções por *M. tuberculosis*, 32,7% (18/55) por MNT e 3,7% (2/55) foram negativas. Essa maior porcentagem de MTB está de acordo com diversos estudos que detectaram maior prevalência de MTB; 67% (AGERTT, et.al., 2013), 57,5% (LIMA, et al., 2013), 78,6% (BERTOLETTI, et al., 2011) e 77% (COELHO, et al., 2008)

Apesar da maior porcentagem ainda ser de MTB, um outro estudo demonstrou que há um declínio na frequência de isolamento de MTB ao longo dos anos, enquanto que a frequência de MNT teve um aumento significativo (BERTOLETTI, et al., 2011) com prevalência variando de 9,1% em 2003 para 31,9% em 2009. Esse aumento da prevalência de MNT no decorrer do tempo se deve tanto ao aprimoramento das técnicas de identificação, quanto pela maior detecção e melhor tratamento da tuberculose, ou ainda pelo aumento de pessoas imunossuprimidas seja por HIV ou por outras causas.

O diagnóstico realizado no Hospital de Clínicas de Uberlândia, leva em consideração apenas a baciloscopia, tempo de cultura e o perfil clínico. Em comparação com o método molecular, 63,7% (35/55) pacientes foram identificados corretamente como *M. tuberculosis* pelos métodos convencionais; e 36,3% (20/55) foram diagnosticados clinicamente como tuberculose sendo essas amostras MNT ou negativas quando identificadas por PCR-RFLP.

Chimara e colaboradores (2008) utilizaram o método na identificação de amostras clínicas de MNT no Instituto Adolfo Lutz. Foram analisadas 434 amostras da rotina do laboratório de micobactérias e o PRA-*hsp65* mostrou-se concordante em 74% com os métodos bioquímicos. Quando comparados com o sequenciamento de DNA, o PRA-*hsp65* apresentou acurácia de 90,3%, em comparação a 77,9% dos métodos fenotípicos. Ainda, dentre as espécies patogênicas mais comuns, o PRA-*hsp65* identificou corretamente 98,8% dos isolados.

Em nosso estudo, entre as espécies MNT potencialmente patogênicas, observamos 50% (9/18) *M. avium* tipo 1, 11,1% *M. avium* tipo 2, 5,5% *M. intracellulare*, *M. kansasii* tipo 1 (11,1%) e *M. chelonae* (5,5%). Encontramos também duas espécies raramente patogênicas, 1 *M. mucogenicum* (5,5%) e 1 *M. terrae* tipo 3 (5,5%), que apesar de não serem comumente relacionadas com doenças, são encontradas no meio ambiente e em sistemas de distribuição de água potável devido ao seu potencial de resistência aos processos de desinfecção (FALKINHAM, 2009). Identificamos ainda uma amostra MNT sem padrão conhecido na literatura, nesse caso será necessário realizar o sequenciamento para confirmar a existência de um novo subtipo de alguma espécie já conhecida ou ainda para descrever uma nova espécie.

Na maioria dos estudos semelhantes a este, os complexos de MNT mais comumente associados com a doença clinicamente foram *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. gordonaiae* e *M. abscessus* (CHIMARA, et al., 2008). Barreto e colaboradores (2000) estudaram as micobactérias não tuberculosas no Brasil das 590 culturas identificadas observaram o isolamento preponderante de *M. avium-intracellulare* sobre as demais espécies (44,4%), seguidos de *M. kansasii* e *M. fortuitum*. Campos et al. (1997) estudaram a prevalência de MNT no Brasil, em 5488 pacientes ambulatoriais bacilíferos, de 13 capitais brasileiras, no período de 1995 a 1996 e revelaram a taxa de 5,83 por mil pacientes. Os isolamentos de *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii* e *M. fortuitum* não apresentaram diferença estatística entre eles.

A baciloscopia é considerada o método de escolha para a detecção dos casos de TB, por demonstrar mais rapidamente a presença do agente etiológico e, desta forma, agilizar a implantação de ações para eliminar os focos infecciosos da doença. Em países em desenvolvimento, a cultura para isolamento e identificação de *M. tuberculosis* não é

realizada em grande parte dos casos. Devido aos altos índices de TB, geralmente, pacientes sintomáticos e com resultado positivo na baciloscopia são tratados com fármacos tuberculostáticos. Com isso, infecções causadas por MNT muitas vezes são tratadas desta mesma forma e, somente após a falha da terapia instituída para TB, a cultura para identificação da espécie é realizada (JEON et al., 2005; ZAMARIOLI et al., 2009).

A baciloscopia não é um método confiável já que pode ser negativa em 30 a 50% dos casos de pessoas infectadas com *M. tuberculosis*. No presente estudo, verificamos que 38% das amostras com TB eram BAAR negativas, enquanto que para as MNT as amostras BAAR negativas totalizaram 72%. Se o médico não tivesse solicitado o cultivo desse material devido a sintomatologia sugestiva esses pacientes não teriam diagnóstico de micobactérioses ou talvez seriam inconsistentemente tratados para TB.

Quanto ao crescimento das micobactérias em cultura é importante observar que, apesar da *M. tuberculosis* ter crescimento lento (2 a 8 semanas), em nosso estudo 5 culturas tiveram crescimento menor que 15 dias, e isso pode ter sido devido à alta concentração inicial do inóculo, o que pode ter interferido no diagnóstico clínico.

Entre os sítios mais comumente acometidos pelas MNT destaca-se o pulmonar com cerca de 80% dos casos (MARRAS et al., 2007; PEDRO et al., 2008; LAI et al., 2010). Em nossos achados temos o pulmonar com aproximadamente 62% seguido de origem extrapulmonar 12,6% e disseminada (miliar) com 11%. Em estudo realizado entre 1991 e 1997, Ueki e colaboradores (2005) relataram 29,3% de isolados provenientes de doença disseminada e 15,8% de origem extrapulmonar, enquanto apenas 48% tiveram origem pulmonar.

É comum encontrarmos altas taxas de indivíduos imunossuprimidos acometidos por espécies de MNT, principalmente no complexo *M. avium* (HAWKINS et al., 1986). Nós encontramos 55% (10/18) dos HIV positivos co-infectados com espécies de *M. avium* tipo 1 e 2. O que chama a atenção é que as outras MNT estão presentes em indivíduos considerados imunocompetentes. Os epidemiologistas admitem que nesse tipo de paciente é importante reconhecer outros fatores de risco associados a maior chance de adoecimento por MNT, tais como lesões pulmonares preexistentes que causam danos estruturais importantes, prováveis facilitadores do desenvolvimento de doença pulmonar por MNT. Assim, pacientes que apresentam doenças pulmonares crônicas com alterações estruturais possuem maior chance de adoecimento por MNT (GRIFFITH et al., 1993; WINTHROP et al., 2005).

O controle efetivo da TB depende, principalmente, de um diagnóstico rápido e eficiente, que permita a instituição do tratamento adequado e consequente interrupção da cadeia de transmissão da doença. Além disso, com o aumento do número de isolamentos de MNT, a identificação da espécie de micobactéria tornou-se também importante, devido às diferenças nos protocolos de tratamento para cada espécie (GRIFFITH et al., 2007; WU et al., 2008). Entretanto, os métodos diagnósticos convencionais apresentam limitações importantes: enquanto a baciloscopia apresenta sensibilidade reduzida, o cultivo de micobactérias para diagnóstico e identificação da espécie necessita de um período de tempo maior para obtenção dos resultados (HATTA et al., 2010).

Uma vez que cada espécie de MNT apresenta um perfil específico de susceptibilidade aos antimicrobianos e que causam doenças clinicamente indistinguíveis da TB, a identificação da espécie de micobactéria é fundamental sob o ponto de vista clínico, visando a adoção da conduta terapêutica adequada (GRIFFITH et al., 2007).

Deve-se levar em conta que a falha no diagnóstico causa atraso na identificação da verdadeira doença, acarretando ao doente sofrimento físico, psicológico, econômico e

social. Com o tratamento inadequado, as cepas podem se tornar resistentes prolongando o tratamento e em muitos casos resultam em doença crônica, levando o paciente a inúmeras internações e tratamentos sem sucesso aumentando as chances de causar danos hepáticos e mortalidade (CASTELO, et al., 2003).

O tratamento preconizado para tuberculose aplicado aos pacientes com MNT, de MNT para pacientes com tuberculose, ou de MNT com esquemas inespecíficos pode causar grandes complicações, uma vez que esquemas terapêuticos diferenciados devem ser adotados para cada grupo. Os antimicrobianos e o tempo de tratamento variam de acordo com a espécie, sendo que algumas MNT são resistentes às drogas administradas para o tratamento de TB e nem todas MNT são sensíveis aos mesmos tratamentos, podendo não levar à cura, prolongar o tratamento, levar a hospitalizações desnecessárias e ainda tornar as micobactérias mais resistentes aos diversos tratamentos, causando infecções crônicas (TANAKA et al., 2003).

O presente trabalho conseguiu identificar corretamente 98% (54/55) das amostras analisadas pela metodologia molecular PCR-RFLP *hsp65*, diferenciando o complexo *tuberculosis* das micobactérias não tuberculosas e classificando-as em nível de espécie.

Ao identificar amostras de pacientes de um hospital de clínicas de referência que tiveram falha no diagnóstico por métodos convencionais demonstramos assim a necessidade da implantação de novas técnicas moleculares para auxiliar no diagnóstico de micobacterioses.

7 CONCLUSÃO

Com a escolha da metodologia molecular PCR-RFLP *hsp65*, o presente trabalho conseguiu identificar corretamente 98% (54/55) das amostras analisadas, diferenciando o complexo *tuberculosis* das micobactérias não tuberculosas e classificando-as em nível de espécie. Enquanto os métodos convencionais só identificaram corretamente 63,6% (35/55) das amostras, apenas dos pacientes com tuberculose.

Tendo em vista que a identificação da espécie é imprescindível para a escolha do esquema terapêutico correto, esse método mostrou ser discriminatório, rápido, econômico e relativamente de fácil execução podendo ser utilizado para complementar o diagnóstico de micobacterioses, aumentando a certeza nos diagnósticos e diminuindo os tratamentos inadequados.

Apesar de possuir algumas dificuldades como visualização e interpretação dos resultados em gel de agarose e diferença em alguns padrões na amplificação, a aplicabilidade desse método aumentaria a qualidade e rapidez dos resultados finais auxiliando na rotina dos hospitais gerando vantagens aos pacientes e ao Sistema Único de Saúde (SUS).

8 PERSPECTIVAS

- 1º- Sequenciar todas as amostras de MNT para confirmação dos padrões obtidos
- 2º- Avaliar a técnica PCR-RFLP *hsp65* em amostras clínicas diversas, sem a realização prévia de cultura.
- 3º- Padronizar outras técnicas moleculares em estudos futuros a fim de aperfeiçoar o diagnóstico de micobacterioses com técnicas mais recentes e com maior reproduzibilidade e especificidade.

REFERÊNCIAS

- AGERTT, V. A. et al. Identification of mycobacteria isolated at University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 2, p. 115-117, 2013.
- AHN, C. H. et al. A demographic study of disease due to *Mycobacterium kansasii* or *Mycobacterium intracellulare-avium* in Texas. **Chest**, Chicago, v.75, n. 2, p. 120-125, 1979.
- ALVAREZ-URIA, G. Lung disease caused by non tuberculous micobactéria. **Current opinion in pulmonary medicine**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 251-256, 2010.
- ANJOS, F. O. L.; GONTIJO F. O. P.P. Micobactérias identificadas no serviço de bacteriologia do Instituto de Tisiologia e Pneumologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) no 1º semestre de 1991. In: IV Simpósio Brasileiro de Micobactérias, Santos, 1991.
- ARENDE, S. M.; van SOOLINGEN, D.; OTTENHOFF, T.H. M. Diagnosis and treatment of lung infection with non tuberculous micobactéria. **Current opinion in pulmonary medicine**, Cambridge, v.15, n.3, p. 201-208, 2009.
- ARMAND, S. et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF Test with an IS6110-Taq Man Real-Time PCR Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory and Non respiratory Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.49, n.5, p. 1772-1776, 2011.
- BANNALIKAR, A. S.; VERMA, R. Detection of *Mycobacterium avium* & *M. tuberculosis* from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of hsp65 gene & pncA PCR. **The Indian Journal of Medical Research**, Indore 123 (2): 165-172, 2006.
- BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D. Micobactérias "não tuberculosas" no Brasil. **Bol. Pneumol. Sanit.**, Rio de Janeiro , v. 8, n. 1, jun. 2000 . Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-460X2000000100004&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 26 jan. 2015.
- BARRETO, M. M. et. al. Comparison among three methods for mycobacteria identification. **Salud Pública de México**, México, v. 42, n. 6, p. 484-489, 2000.
- BENSON, C. A. Disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS: epidemiology and clinical symptoms. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford, v.18 (Suppl. 3) p. 218–222, 1994.
- BERTOLETTI, A. C. D.; et al. Mycobacterial isolates from patients clinical samples from Rio Claro region: frequency analysis. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 4, p. 622-630, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica conjunta Nº 01/2009. **Infecções por micobactérias de crescimento rápido:** fluxo de notificações, diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento. 2009a. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/nota_tecnica_conjunta.pdf.
Acesso em: out/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da saúde. **Tuberculose**. Brasília 2014. Disponível em:http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11045&Itemid=674 Acesso em 10 dez 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1.ed. Brasília, 2008a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf>. Acesso em set/2014.

BRITO, A. C. **Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em saúde pública**. 2008. 86 páginas. Tese (doutorado) Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BRITO, R. C. et al. Resistência aos medicamentos antituberculose de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos em hospital geral de referencia para tratamento de AIDS no Rio de janeiro. **J. Bras. Pneumol**, Brasilia, v. 30, n. 4, p. 335-342, 2004.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 4, p. 716-746, 2002.

BULLIN, C. H. E. I. et al. Isolation of *Mycobacterium xenopi* from water taps. **J. Hyg.**, London, v. 68, p. 97–100, 1970.

CAMARGO, S. S. R.; UEKI, S. Y. M. Freqüência de micobactérias não tuberculosas isoladas de pacientes HIV/AIDS no município de Jundiaí. **Rev.Soc. Bras. Med. Trop.** Rio de Janeiro, v. 33(supl.1), p. 99, 2000.

CAMPOS, C. E. D. et al. Prevalência de micobactérias "não tuberculosas" em pacientes de ambulatório, com bacilosscopia positiva, no período de 1995 a 1996, no Brasil. In: **XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Rio de Janeiro, 1997, p. 315-315.

CASAGRANDE, I. S. J.; LUCCIOLA, J.; SALLES, C. A. Micobactérias atípicas em biopróteses: causa potencial de endocardite com culturas negativas **Rev. bras. cir. cardiovasc.** São Paulo, v. 1, n. 1, p. 40-3, 1986.

CASTELO, F. A. et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. **J. bras.pneumol.** Brasília, v. 30 (suppl.1), p. 57-86, 2004.

CAUSSE, M. et al. Comparison of two molecular methods for the rapid diagnosis of extrapulmonary *tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.49, n.8, p. 3065-3067, 2011.

CHIMARA, E. et al. 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**, London, v.8, n.48, p. 1-12, 2008.

COELHO, A. G. V. Gene probes versus classical methods in the identification of mycobacteria. **J. Bras. Pneumol.**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 922-926, 2008.

COLLINS, C. H.; GRANJE, J. M.; YATES, M. D. **Identification of species.** In: **Tuberculosis bacteriology:** organization and Practice 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997. p. 39.

CONN, H. J.; DIMMICK, I. Soil bacteria similar in morphology to mycobacterium and Corynebacterium. **Journal of bacteriology**, Washington, v.54, n.3, p. 291-303, 1947.

COOK, J. L. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. **British Medical Bulletin**, London, v. 96, p. 45-59, 2010.

CORREA, C. N. M.; CORREA, W. M. Tuberculose humana por bacilo bovino em São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v. 41, n. 3, p.131-134, 1974.

COSTA, A. R. F. et al. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** New York, v. 68, p. 390-394, 2010.

CRUZ, J.C. *Mycobacterium fortuitum* um novo bacilo ácido resistente patogênico para o homem. **Acta med. Port.** Lisboa, v. 1, p. 297-301, 1938.

DAFFÉ, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Adv. Microb. Physiol.** London, v. 39, p. 131-203, 1998.

DANTEC, C. L. et al. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68. n. 3, p. 1025-1032, 2002.

DAVIDSON, P. T. The diagnosis and management of disease caused by *M. avium* complex, *M. Kansasii*, and other mycobacteria. **Clin.Chest Med.**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 59-63, 1989.

DAWSON, D. J.; ARMSTRONG, J. F.; BLACKLOCK., Z. M. Mycobacterial cross-contamination of bronchoscopy specimens. **Am. Rev. Respir. Dis.** New York, v. 126, p. 1095-1097. 1982.

DAWSON, D. J.; JENNIS, F. Mycobacteria with a growth requirement for ferric ammonium citrate, identified as *Mycobacterium haemophilum*. **J Clin Microbiol.** Washington, v. 11, p. 190-192, 1980.

DOBSON, A. P.; CARPER, E.R. Infectious diseases and human population history: throughout history the establishment of disease has been a side effect the growth of civilization. **Bioscience**, London, v. 46, v. 2, p. 115-126, 1996.

DUARTE, R. S. et al. Epidemic postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, p. 2149-2155, 2009.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Mycobacterium*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html> Acesso em: jun 2014.

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington, v. 9, p. 177-215, 1996.

FALKINHAM III, J. O. Nontuberculous mycobacteria in the environment. **Clin.Chest. Med.** Chicago, v. 23, p. 529-551, 2009.

FALKINHAM, J. O. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. **The Canadian Journal of Infectious Diseases**, Oakville, v. 14, n. 5, p. 281-286, 2003.

FIELD, S. K.; COWIE, R. L. Lung disease due to the more common Nontuberculous Mycobacteria. **Chest**, Chicago, v. 129, n. 6, p. 1653-1672, 2006.

FLORES, L. L.; PAI, M.; COLFORD, J. M.; RILEY, L. W. In house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. **BMC Microbiology**, London, v.5, n.55, p.1-10, 2005.

FONSECA, L. S., GONTIJO, F. P. P. Micobacterias atípicas isoladas no Rio de Janeiro. Identificação preliminar pela morfologia colonial. **Rev Microbiol**. São Paulo, v. 9, p. 125-130, 1978.

FROES, G. V. et al . Perfil e seguimento dos pacientes portadores de *Mycobacterium* sp. do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. **J. Pneumologia**, São Paulo, v. 29, n. 6, 2003 .

GANGADHARAM, P. R. J. Atypical mycobacteriosis. **Indian Journal of Tuberculosis**, New Delhi, v. XXVII, n. 3, p. 108-114, 1980.

GENTRY, C. A. Atypical Mycobacteria. In: SCHUMOCKV, G. T.; BRUNDAGE, D.; CHESSMAN, K.; DUNSWOTH, T; FAGAN, S.; KELLY, W.; RATHBURN, R.; RICHIE, D.; SELMA, T.; VASQUEZ, E.; ZAROWITZ, B. **Pharmacotherapy Self-Assessment Program - Infectious Diseases II**, 5 .ed. Kansas City: Americam College of Clinical Pharmacy, 2005.

GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.

GRIFFITH, D. E. Nontuberculous mycobacterial lung disease. **Current opinion in Infectious Diseases**, Cambridge, v. 23, p. 185-190, 2010.

GRIFFITH, D. E. Therapy of nontuberculous mycobacterial disease. **Clin. Infect Dis.** Chicago, v. 20, p. 198-203, 2007.

GRIFFITH, D. E.; GIRARD, W. M; WALLACE, R. J. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: an analysis of 154 patients. **Am Rev Respir Dis.** New York, v. 147, n. 5, p. 1271- 1278, 1993.

GUTIERREZ, R. S. et al. **Tuberculose.** In: SILVA, L. C. C. Condutas em pneumologia. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. P. 412-444.

HATTA, M. et al. Detection and identification of mycobacteria in sputum from suspected tuberculosis patients. **BMC Research Notes**, London, v.3, n.72, p. 1-6, 2010.

HAWKINS, C. C. et.al. *Mycobacterium avium* Complex Infections in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **Ann Intern Med.** Philadelphia v. 105, n.2, p. 184-8, 1986.

HERMANS, P. W. M. et. al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.28, p. 1204-1213, 1990.

HERRERA-LEÓN, L. et al. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 27, n. 9, p. 493-502, 2009.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—>3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 88, p. 7276-7280, 1991.

HONG, Y. J. et al. Usefulness of Three-Channel Multiplex Real-Time PCR and Melting Curve Analysis for Simultaneous Detection and Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Nontuberculous Mycobacteria. **Journal of clinical microbiology**, Washington v. 49, n. 11, p. 3963-3966, 2011.

HORSBURGH, C. R. Jr. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med.** Boston, v. 324, n. 19, p. 1332-8, 1991.

IIVANAINEN, E. K., P. J. et al. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, v. 59, p.398–404, 1993.

ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures handbook.** 1^a ed., Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.

JARZEMBOWSKI, J. A.; YOUNG, M. B. Nontuberculous Mycobacterial Infections. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 132, p. 1333-1341, 2008.

JEON, K. et al. Recovery rate of NTM from AFB smear-positive sputum specimens at a medical centre in South Korea. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, Paris, v. 9, n. 9, p. 1046-1051, 2005.

JOST, K. C. et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex directly from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. **J Clin. Microbiol.** Washington, v. 33, p. 1270-1277, 1995.

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

KELLOGG, J. A. et al. Application of the Sherlock mycobacteria identification system using high performance liquid chromatography in a clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 3, p. 964-970, 2001.

KIM, H. J. et al. Differentiation of mycobacterial species by hsp65 duplex PCR followed by duplex-PCR-based restriction analysis and direct sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 11, p. 3855-3862, 2006.

KIM, H. Y. et al. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae*-*Mycobacterium abscessus* group isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 10, p. 3384-3390, 2008.

KIM, K.. et al. Development and Application of Multiprobe Real-time PCR Method Targeting hsp65 Gene for Differentiation of *Mycobacterium* Species from Isolates and Sputum Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 9, p. 3073-3080, 2010.

KOCH, R. **The etiology of tuberculosis**. In CLENDENING, L. Source Book of Medical history. New York: Dover publications, 1932. p. 392-406.

KRITSKI, A. L., LAPA E SILVA, JR.; CONDE, M.B. Tuberculosis and HIV: Renewed challenge. **Men Inst Osvaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 93, p. 417-421, 1998.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; SOUZA, G. R. M. **Tuberculose do ambulatório á enfermaria**, 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

LAI, C. C. et al. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008. **Emerg Infect Dis**. Atlanta, v. 16, n. 2, p. 294-296, 2010.

LAMBERTUCCI, J. R.; BORGES, A. H.; VOIETA, I. Disseminated *Mycobacterium abscessus* infection in an AIDS patient. **Rev. Soc.Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro , v. 44, n. 2, p. 265-265, 2011.

LEÃO, S. C. et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in Laboratories from Latin America and the Caribbean. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 61, p. 193-199, 2005.

LEÃO, S. C. et al. 2005. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria.** Brugges: Vanden Broelle, 2004. p. 147.

LEÃO, S. C.; TORTOLI, E.; EUZÉBY, J. P.; GARCIA, M. J. Porposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* comb.nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *Abscessus* subsp. Nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, England, v. 61, p. 2311-2313, 2011.

LEE, C. K.. et al. The genomic heterogeneity among *Mycobacterium terrae* complex displayed by sequencing of 16S rRNA and hsp65 genes. **Microbiology and Immunology**, Australia, v. 48, n. 2, p. 83-90,2004.

LEITE, C. Q. F. et al. A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin-layer chromatography and molecular. **Microbiology and Immunology**, Australia, v. 49, n. 7. p.571-578, 2005.

LEITE, C. Q. F.; DAVID, H.; LÉVY-FRÉBAULT, V. Prevalência e distribuição de micobactérias nas águas de algumas regiões do estado de São Paulo-Brasil. **Rev Microbiol**. São Paulo, v. 20, n. 4, p. 432-41,1989.

LIMA, A. S. et al. Rapid detection and differentiation of mycobacterial species using a multiplex PCR system. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Rio e Janeiro, v. 46, n. 4, p. 447-452, 2013.

LOPES, D. M. et al. Diagnóstico e tratamento da tuberculose latente em pacientes com doenças inflamatórias crônicas e uso de imunobiológicos inibidores do TNF- α . **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. Brasilia, v. 37, n. 3, p. 308-316, 2011.

MAIGA, M. et al. Failure to Recognize Nontuberculous Mycobacteria Leads to Misdiagnosis of Chronic Pulmonary Tuberculosis. **PLoS ONE** San Francisco, v. 7, n. 5: e36902. doi:10.1371/journal.pone.0036902, 2011.

MARRAS, T. K. et al. Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. **Thorax**, London, v. 64, p. 661-666, 2007.

McKINNEY, J. **Persiting problems in tuberculosis.** In: Krause, R. Emerging Infections – Biomedical Research Reports. New York: Academic Press, 1998. Cap. 3, p. 5-146.

McNABB, A. et al. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene (hsp65) for Routine Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Clinical Sources. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 42, n. 7, p. 3000-3011, 2004.

MILLER, S. A, DYKES, D. D, POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **NucleicAcids Res** Oxford, v. 16, p.1215, 1988.

MIRANDA, S. S. et al . Spoligotyping of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. Mem. **Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p. 267-73, 2011.

NEONAKIS, I. K. et al. A Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. **Journal of Microbiologic Methods**, Amsterdam, v. 75, p. 1-11, 2008.

NGAMLER, T. K. et al. Diagnostic performance and costs of Capilia TB for *Mycobacterium tuberculosis* Complex identification from broth-based culture in Bangkok, Thailand. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 14, n. 7 , p. 748-753, 2009.

NGAN, G. J. Y. et al. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 546-554, 2011.

PARSONS, L. et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 2, p. 314-350, 2011.

PATEL, J. B. et al. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 50016S rDNA bacterial identification system. **J. Clin Microbiol.** Washington, v. 38, p. 246-251, 2000.

PEDRO, H. S. et al. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996-2005. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 950-955, 2008.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 8, n. 5, p. 323-334.2008.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 12, p. 5355-5365, 2003.

POROCA, D. R. et al. Differentiation of micobacteria by multiplex PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 6, p. 716-722, 2009.

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

PUERTO, G; CASTRO, C. M.; RIBÓN, W. Reacción en cadena de lapolimerasa: una contribución para el diagnóstico de La tuberculosis extrapulmonar y de las micobacteriosis. **Infectio**, Santafé de Bogota, v. 11, n. 2, p. 87-94, 2007.

RENISS – Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde. **Casos de infecção por micobactérias não tuberculosas notificadas**, 2009. Disponível: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/notificados.pdf. Acesso em: out. 2014

RENTON, B. J. et al. Direct real-time PCR examination for *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples can be cost effective. **Health**, Irvine, v. 1, n. 2, p. 63-66, 2009.

RESTREPO, B. I. et al. Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. **Journal Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 220-229, 2006.

RICHARDSON, E. T.; SAMSON, D.; BANAER, N. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 5, p. 1497-1502, 2009.

ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A. B. Tuberculose. In: TARANTINO, A. B. **Doenças pulmonares**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 294-380.

ROSSETTI, M. L. R.; SPERHACKE, R. D. Tuberculose. In: ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SALES, M. L. et al. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. **Genet Mol Res**. Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p. 4607-16, 2014.

SAO PAULO. Secretaria Estadual de Saude. Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento. São Paulo, 2005. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/MNT_Final_9-12-05a.pdf Acesso em: set. 2014.

SARMIENTO, O. L. et al. Assessment by Meta-Analysis of PCR for Diagnosis of Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 7, p. 3233-3240, 2003.

SCHERER, L. C. et al.. Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection. **BMC Pulmonary Medicine**, London, v. 11, n. 15, p. 1-24, 2011.

SCHINSKY, M. F. et al. 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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, UK England, v. 54, n. 5, p. 1653-1667. 2004

SCHRAUFNAGEL D. E.; LEECH, J. A, POLLAK, B. *Mycobacterium kansasii*: colonization and disease. **Br J Dis Chest**, London, v. 80, n. 2, p. 131-137, 1986.

SOINI, H.; MUSSER, J. M. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 47, p. 809-814, 2001.

SUFFYS, P. N. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 12, p. 4477-4482, 2001.

TANAKA, I. I. et al. Comparison of a multiplex-PCR assay with mycolic acids analysis and conventional methods for the identification of mycobacteria. **Microbiology and Immunology**, Austrália, v. 47, n. 5, p. 307-312, 2003.

TANYA, A. et al. Evaluation of a Single-Tube Multiplex Real-Time PCR for Differentiation of Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Specimens. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, ,v. 49, n. 7 p. 2562-2567. 2011.

TELENTI, A. et al. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, n. 2, p.175-178, 1993.

THOMSON, R. M. Changing epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacteria Infections. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 16, n. 10, p. 1576-1583, 2010.

TIMPE, A.; RUNYON, E. H. The relationship of “atypical” acid-fast bacteria to human disease: a preliminary report. **J Lab Clin Med**. St. Louis, v. 44, p. 202, 1954.

TORTOLI, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. **Clinical Microbiology and Infections**, Paris, v. 15, p. 906-910, 2009.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington, v. 16, p. 319-354, 2003.

TORTOLI, E.; MARIOTTINI, A.; MAZZARELLI, G. Evaluation of INNO-LiPA Mycobacteria v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4418-4420, 2003.

TSUKAMURA, M. **Identification of mycobacteria**. Obu, Aichi: The National chubu Hospital; 1984.

TURENNE, C. Y.; WALLACE, R.; BEHR, M. A. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 2, p. 205-229. 2007.

UEKI, S. Y. M. et al. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade de espécies no Estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 1, p. 1-8, 2005.

VICENT, V. et al. **Mycobacterium**: Phenotypic and Genotypic identification. In: Murray PR, (Ed). Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington, DC: ASM press, 2003. p. 560-584.

VIJAYARAGHAVAN, R. et al. Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery. **The Journal of Hospital Infection**, New York, v. 64, n.4, p. 344-347, 2006.

WALLACE, R. J., et al. Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcicum*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 12, p. 5689-5697, 2004.

WAYNE, L. G., RUNYON, E. H., KUBICA, G. P. Mycobacteria: A guide to nomenclatural usage. **Am Rev Resp Dis**. Baltimore, v. 119, p. 107-159, 1969.

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

WILLIAMS, K. J.; LING, C. L.; JENKINS, C.; GILLESPIE, S. H.; McHUGH, T. D. A paradigm for the molecular identification of *Mycobacterium* species in a routine diagnostic laboratory. **Journal of Medical Microbiology**, Washington, v.56, p. 598-602, 2007.

WILSON, M. L. Recent advances in the laboratory detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and drug resistance. **Medical Microbiology**, Washington, v.52, n.11, p. 1350-1355, 2011.

WINTHROP, K. L. et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: emerging public healthy disease. **Am J Respir Crit. Care Med.** New York, v. 182, n. 7, p. 977-982, 2005.

WINTHROP, K. L. Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria: an epidemiologist's view. **Future Microbiology**, London, v. 5, n. 3, p. 343-345, 2010.

WOLINSKY, E. State of the art: nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **Am J Respir. Crit Care Med.** new York, v. 119, p. 107-159, 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014. **Global tuberculosis report**. Disponível em http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_main_text.pdf Acesso em 05 jan 2015.

WU, T. L. et al. Rapid identifications of micobactéria from smear-positive sputum samples by nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, p. 3591-3594, 2008.

YAM, W. C. et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, Washington, v. 55, p. 529-536. 2006.

YOUNG, L. S. et al. Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *M. avium* complex. **Rev Infect Dis**. Chicago, v. 8, p. 1024-1033, 1986.

YUEN, L. K. et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, p. 1615-1618, 1993.

ZAMARIOLI, L. A. et al. Identificação laboratorial de micobactérias em amostras respiratórias de pacientes HIV-positivos com suspeita de tuberculose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 3, p. 290-297, 2009.

ANEXO I

Mycobacterial infections are misdiagnosed by acid-fast bacilli test and bacterial growth time leading to inappropriate treatment and poor disease outcome

Fabiane N. Riello¹, Sergio Araújo¹, Rebecca T. Silva¹, Tomaz A. Moreira², Luiz Ricardo Goulart^{3*}, Isabela M. B. Goulart¹

¹National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy (CREDESH) Clinical Hospital Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil; ²Laboratory of Clinical Analysis, Clinics' Hospital of the Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil; ³Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Genetics and Biochemistry, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding author:**

Luiz R. Goulart. Federal University of Uberlandia, Institute of Genetics and Biochemistry, Laboratory of Nanobiotechnology, Campus Umuarama, Block 2E, Room 248, CEP 38400-902, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. lr.goulart@ufu.br.

Authors' contributions:

Conceived and designed the experiments: FNR, IMBG, LRG. Performed the experiments: FNR, SA, RTS, TAM. Analyzed the data: FNR, IMBG, LRG. Contributed with reagents, materials, and analytical tools: LRG, IMBG. Wrote the paper: FNR, IMBG, LRG.

Abstract

The establishment of the therapeutic regimen for mycobacteriosis depends on the accurate identification of *Mycobacterium* species and misdiagnosis can result in inappropriate treatment and increased mortality of patients. Differential diagnosis among *Mycobacterium* species has been made by conventional phenotypic and biochemical tests after a long culture period. Specialized molecular diagnostics of mycobacteria allows rapid detection and species identification; however, such tests are not available in public health programs. Our aim was to demonstrate the clinical implications of erroneous diagnosis by performing molecular genotyping of mycobacterial infections in patients that were diagnosed based on symptoms, culture and bacilloscopy. Culture samples of mycobacterial infections from 55 patients clinically diagnosed as tuberculosis in 2013 and 2014, based on conventional methods, were identified by PCR -RFLP and results are discussed. We have confirmed 35 (63.6%) positive samples as *M. tuberculosis*, but 18 (32.7%) were identified as non-tuberculous mycobacteria (*M. avium* type 1 , *M. avium* type 2, *M. kansasii* type 1 type 1, *M. mucogenicum*, *M. chelonae*, *M. terrae* type 3, and 1 unknown RFLP pattern) and two were negative. Regarding clinical diagnosis, 61.8% (34/55) were classified as pulmonary tuberculosis. It is important to emphasize that 36.4% (20/55) of samples were misdiagnosed by conventional methods, and 11 (61.1%) of the HIV positive patients (18/55) were NTM-coinfected. The identification of species in mycobacterial infections is essential for the correct diagnosis and choice of treatment regimen, and misdiagnosis by conventional tools can lead to chronic disease, increased resistance and death.

Introduction

Despite the large number of species [1], *M. tuberculosis* (MTB) is one of the major causes of human diseases and mortality worldwide, but the number of diseases caused by nontuberculous mycobacteria (NTM) has been considerably increased, especially in immunocompromised patients with HIV infection [2, 3], chronic inflammatory diseases [4], organ-transplantation [5], and dermatological diseases [6] with significant NTM-related deaths in individuals older than 55 year of age [7]. In Brazil, NTM infections have become an epidemiological emergency, especially after the outbreak of rapidly growing mycobacteria in post-surgical infections from 2003 to 2009 [8]. All these variable co-morbidities together with factors that remain unknown pose great challenges to the epidemiological analysis of NTM diseases and their proper treatment, greatly due to its misdiagnosis.

Differentiation between mycobacteria species are typically made in positive cultures based on phenotypic and biochemical traits. The diagnostic methods currently used are bacilloscopy and microbiological culture [9]. The main method for bacilli test is the Ziehl-Neelsen specific staining technique, and despite its simplicity and low cost, it has a very low sensitivity (30 to 50% of the *M. tuberculosis* cases are negative). The microbiological culture is generally used in suspected pulmonary cases and in negative bacilloscopy, and allows detection and isolation of the mycobacteria for subsequent identification of the isolated complex [9]. Despite its importance, the *M. tuberculosis* culture is time consuming due to its slow growth and not always presents 100% positivity [10]. Automated detection systems of mycobacteria, such as the BACTEC 460 TB®, BACTEC 9000®, and the MGIT® are promising, but they can also produce false-positive results due to contamination by other bacteria [9].

In places without appropriate identification techniques, the NTM diseases can be confounded with tuberculosis due to the similarity of clinical symptoms, affected sites and morphological characteristics, leading to misdiagnosis and improper treatment, resulting in prolonged treatment, chronic infections, drug resistance and increased mortality [11].

The establishment of therapeutic regimens depends on the species identification of mycobacteria, which can be critical for the adoption of the appropriate therapy [12]. The mycobacteriosis treatment becomes even more complex due to increasing resistance and low sensitivity to tuberculostatic drugs. Therefore, for an efficient and proper treatment, the identification of the causative agent and its drug sensitivity is necessary in order to choose appropriate drugs [13].

Tools commonly used for tuberculosis diagnosis in resource-limited settings, the direct Ziehl-Neelsen (DZN) and the direct fluorescent microscopy (DFM) have been compared, which have missed 64% and 20% of cases, respectively, supporting the concern that using DZN alone risks missing the majority of TB cases [14]. The need for fast and reliable laboratory tests for mycobacteria diagnosis led to the development of molecular methods for detection and identification of species directly from clinical specimens or from isolated culture colonies. However, while some techniques are simple, others have complex requirements, and the incorporation of these tests within a country's national health program must be carefully determined [15].

Several molecular methods have been developed for the identification of mycobacteria species [16]. Among them, the PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)-based method, despite its moderate complexity, was shown to be fast, with good accuracy, and cost-effective [17]. The method, also referred as PRA-hsp65, amplifies and digest a portion of the hsp65 (65 kDa heat shock protein) with restriction endonucleases, and is able to detect the most important and common mycobacteria species [18].

This study aimed to identify species of mycobacteria present in samples of positive cultures from patients diagnosed with tuberculosis treated at the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia in the biennium 2013-2014, and discuss the implications of misdiagnosis by using only the conventional bacilloscopy and culture methods.

Materials and Methods

Study design and patients

A transversal retrospective descriptive study of culture samples from patients diagnosed with tuberculosis treated at the Clinics' Hospital of the Federal University of Uberlândia was performed during the biennium 2013-2014. Age, sex, HIV status, and patient treatment time were obtained in their medical records. Two or more cultures were performed for each patient for clinical evaluation, and only those positive cultures were subsequently used for DNA extraction and analyses.

Sampling

Fifty-five clinical samples (bronchial aspirate, cervical lymph nodes, bone marrow aspirate, sputum, pleural liquid, vesicular fluid, bronchial lavage, tracheal secretion, gastric aspirate, liquor, gingival injury, surgical scar and liver fragment) with positive and viable cultures of *Mycobacterium sp.* were collected, which were clinically diagnosed as tuberculosis.

Thirteen reference samples of mycobacterial species were used for molecular standard patterns, which were previously identified and donated by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ/RJ): *M. avium*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. phlei*, *M. gordonaiae*, *M. kansasii*, *M. bovis*, *M. szulgai*, *M. massiliense*. The *M. tuberculosis* reference strain was provided by the Institute Hélio Fraga (Rio de Janeiro, Brazil), and the *M. leprae* reference strain was provided by the National Reference Center of Sanitary Dermatology and Leprosy (CREDESH/HC/UFU, Uberlandia, MG, Brazil).

Ethical Statement

Culture samples from various tissues and body fluids of patients with clinical diagnosis of tuberculosis from the Infectious Diseases Ambulatory Service of the Clinics' Hospital of UFU were collected for molecular genotyping after obtaining written informed consent from patients, who were invited to participate in the study approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia, under the process numbers CEP/UFU N. 123/10 (Approval

CEP 457/10, Tuberculosis) and CEP/UFU N. 355/11 (Approval CEP 097/12, HIV and co-infections).

Bacilloscopy and Culture

Bacilloscopy and mycobacteria culture were performed by the Laboratory of Clinical Analysis of the Federal University of Uberlândia, according to the recommendations outlined in the National Manual of Tuberculosis Surveillance and Other Mycobacteria [19]. Clinical symptoms that strongly indicate the presence of mycobacteria and/or positive bacilloscopy for acid-fast bacillus resistant (AFB) are criteria for conduction of culture in patients' samples. The cultures of different clinical specimens performed on Lowenstein-Jensen medium were collected and transferred to Middlebrook medium for regrowth, storage, and for subsequent DNA extraction. Results regarding culture time and bacilloscopy were recorded.

DNA Extraction

Samples in the Middlebrook medium were inactivated by heat at 95°C for 15 minutes and processed in three replicates. Subsequently, DNA extraction was performed by the salting-out method [20].

DNA Amplification and Enzymatic Restriction (PCR-RFLP)

The 439 bp fragment of the Hsp65 gene was amplified using the Tb11 primers (5'-ACCAACGATGGTGTGCCAT), and Tb12 (5 '-CTTGTCGAACCGCATACCCT) modified from the protocol described elsewhere [18]. The PCR reaction components for a final volume of 50µL consisted of: 25 µL of 2X PCR Master Mix [0.05 U/µL Taq DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP)] (Thermo Scientific), 1.5 µL of 10µM of each primer, 4 µL of sample DNA (25ng/µL) and 18µL of ultrapure water. The PCR reaction consisted of 45 amplification cycles in the following conditions: 1min at 94°C, 1min at 60°C, 1 min. at 72°C, followed by a final extension of 10 min at 72°C.

For the endonucleases' restrictions, BstEII and HaeIII, 15µL of the PCR product was added to a mix containing 0,5µL (5U) of the enzyme, 2.5µL of restriction buffer (5X buffer B), 0.2 µL of

BSA and 11.3µL of ultrapure water. The BstEII reaction was incubated for 60 min at 60°C and for the HaeIII reaction incubation was at 37°C for 3 hours.

After restriction, 8µL of digested products were added to 3µL of running buffer of agarose gel (0.25% bromophenol blue, 40% sucrose in water) and separated by 3% agarose gel electrophoresis in 0.5X TBE buffer. Fragments were visualized under UV light using ethidium bromide as a fluorescent DNA intercalator. A 25-bp molecular marker was used for fragment sizing. Electrophoresis banding patterns were submitted to algorithms described in the online tool PRASITE (<http://www.app.chuv.ch/prasite>) for species identification.

Diagnosis

Clinical diagnosis of mycobacterial infections performed at the Clinics' Hospital of Uberlândia is based on clinical symptoms, bacilloscopy and bacterial growth time, and the final interpretation is made by the responsible physician, following the standard protocol of the Brazilian Ministry of Health [19]. Clinical diagnosis of tuberculosis is reached when patients present clinical symptoms, positive bacilloscopy and/or positive slow-growing culture for *Mycobacterium sp.* All positive cultures diagnosed as TB were submitted to molecular identification of mycobacteria species. Misdiagnosis was considered when the PCR-RFLP identified other mycobacteria species different *M. tuberculosis*.

Treatment

Since patients with *Mycobacterium sp.* were initially diagnosed with tuberculosis, the first line of treatment chosen was the standard recommended by the Ministry of Health (2RHZE / 4R): two months of COCXIP 4 (rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol) and four more months of rifampicin and isoniazid. The substitutive treatments with other complementary drugs were initiated when treatment had failure, probably due to misdiagnosis or bacterial resistance. Medications commonly used in the suspected case or confirmed infection with atypical mycobacteria are: clarithromycin, ciprofloxacin, amikacin, cefoxetina, imipenem, doxycycline or azithromycin.

Results

Patients data

In the period of 2013 to 2014, 55 mycobacterial cultures were collected from patients diagnosed with tuberculosis attended at the Clinics' Hospital of the Federal University of Uberlândia. Considering the demographical characteristics 40 patients were male (72.7%), with an average age of 46 years old, ranging from 11 to 92 years (Tables 1 and 2).

Microbiological Data

The observed frequency of mycobacterial species were: 63.6% (35/55) of *M. tuberculosis*, 16.3% (9/55) of *M. avium* type 1, 3.7% (2/55) of *M. avium* type 2, 3.7% (2/55) of *M. kansasii* type 1, 1.8% (1/55) of *M. intracellulare* type 1, 1.8% (1/55) of *M. mucogenicum*, 1.8% (1/55) of *M. chelonae*, 1.8% (1/55) of *M. terrae* type 3, and 1.8% (1/55) presented an unknown pattern (HaeIII-150/110; BstEII-235/210). Two positive culture samples (3.7%) were PCR negative (Figure 1, Tables 1 and 2). Co-infections by more than one mycobacteria species in the same sample were not identified, probably because DNA was extracted from a single colony.

Considering the 35 *M. tuberculosis* samples identified by the molecular method, 21 were positive AFB and 14 were negative. For the positive NTM samples (18/55; 32.7%), 5 were AFB positives (3 *M. avium* type 1 and 2 *M. kansasii*) and 13 were AFB negatives (6 *M. avium* type 1, 2 *M. avium* type 2, 1 *M. terrae* type 3, 1 *M. Intracelulare*, 1 *M. mucogenicum*, 1 *M. chelonae*, 1 NTM with unknown pattern). The two remaining samples were both PCR and AFB negatives (Tables 1 and 2).

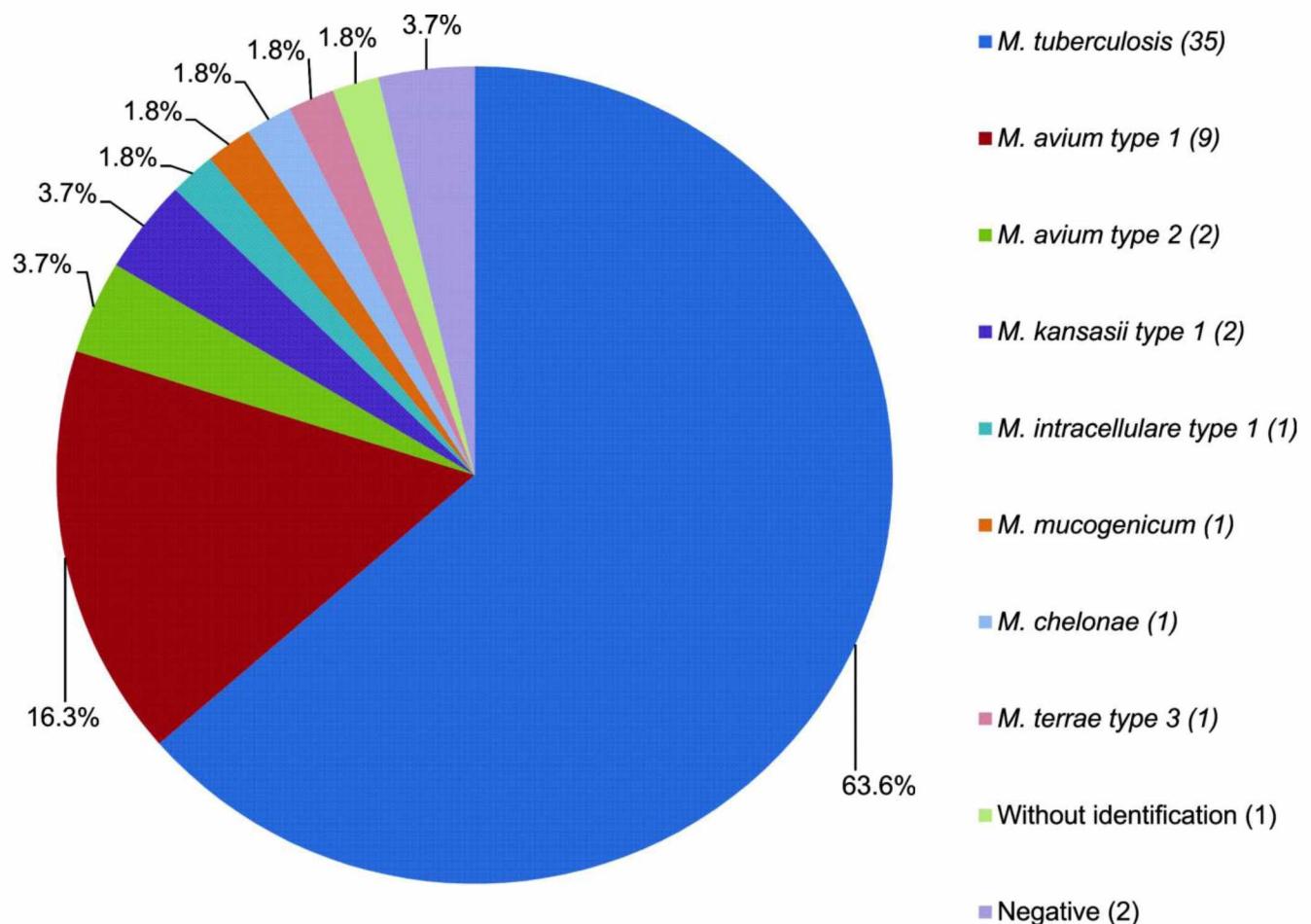


Figure 1. Frequency distribution of mycobacteria species identified by PCR-RFLP in patients clinically diagnosed with tuberculosis at the Clinics' Hospital of the Federal University of Uberlandia, MG, Brazil.

Culture vrs PCR-RFLP

Among the 35 *M. tuberculosis* cultures identified by PCR-RFLP, 30 presented slow growth (>15 days) and 5 had fast growth (<15 days). From the 9 *M. avium* type 1 cultures, all had growth times greater than 15 days. From the two *M. kansasii* type 1 cultures, one had 15-day growth and had no information about culture time. From the two *M. avium* type 2 cultures, one presented growth greater than 15 days and the other had no information. The *M. chelonae* and *M. mucogenicum* cultures had growth times lower than 10 days. The *M. terrae* type 3 culture grew in 15 days. The NTM species with unknown pattern grew more than 15 days. The two negative cultures identified by molecular method, one had no culture time information and the other grew in 15 days (Tables 1 and 2).

Affected Sites

Among diagnosed samples, 61.9% (34/55) were in pulmonary site, in which 23 were *M. tuberculosis*, four *M. avium* 1, two *M. kansasii*, two were negative, one *M. intracellulare*, one *M. mucogenicum* and one unknown NTM. Five samples involved unspecified sites (9%; 5/55), which were classified as *M. tuberculosis* (3), *M. avium* 1 (1) and *M. terrae* (1). Disseminated infection (military tuberculosis) was reported in 11% (6/55) positive samples, including 3 *M. tuberculosis*, 2 *M. avium* 1 and 1 *M. avium* 2. The 5.5% (3/55) of positive pleural sites were infected by *M. tuberculosis*.

Among the extra-pulmonary tuberculosis, 3.6% (2/55) were ganglionar (1 *M. tuberculosis* and 1 *M. avium* 1), 3.6% (2/55) were bone origin (1 *M. chelonae* and *M. avium* 1); 1.8% (1/55) was vesical (*M. tuberculosis*); and 3.6% (2/55) affected meninges and liquor (*M. tuberculosis* and *M. avium* 2) (Table 2).

HIV Co-infection

Looking for HIV co-infection, we have found that 32.7% (18/55) of the patients were HIV positive and among them, 44.4% (8/18) were *M. avium* type 1, 38.9% (7/18) were *M.*

tuberculosis, 11.1% (2/18) *M. avium* type 2, and 5.6% (1/18) were PCR negative (Table 2). Therefore, 56% of co-infections with HIV were caused by NTM.

Misdiagnosis and Inappropriate Treatment

All patients were clinically diagnosed with tuberculosis, but only 63.6% (35/55) were confirmed as *M. tuberculosis* by PCR-RFLP; therefore, 36.4% (20/55) of the patients were misdiagnosed. Among them, 18 samples were identified as NTM infections, and 2 were negatives (Tables 1 and 2).

Concerning the treatment, 89% (49/55) of patients were submitted to the standard treatment for tuberculosis (2RHZE/4R): 2 months of COCXIP 4 (rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol) more 4 months of rifampicin and isoniazid, and only 11% (6/55) had a substitute treatment for atypical mycobacteria, which included auxiliary drugs to the standard treatment, due to the chronic infection. Among those 6 chronic patients, 5 (7.3%) were NTM-infected and had their treatment replaced by appropriate treatment, and one patient was negative (Tables 1 and 2). Therefore, 13 out of 18 NTM-identified were inappropriately treated as tuberculosis.

Table 1. Characterization of NTM-infected patients diagnosed with tuberculosis based on conventional procedures, including patients' gender and age, HIV status, sample type, AFB results, culture analyses, clinical diagnosis, molecular identification and treatment.

Patient ID	Age	Gender	HIV Status	Sample type	AFB	Culture/Period	Clinical Diagnosis	PCR-RFLP	Treatment
9	67	male	-	Sputum	+	Myc.sp / 24 days	Pulmonary Tuberculosis	<i>M. avium</i> type 1	Substitute treatment
10	23	male	+	Gastric Aspirate	+	Myc.sp / 25 days	Tuberculosis unspecified	<i>M. avium</i> type 1	Standard treatment
11	65	fem	+	Bronchial Aspirate	-	Myc.sp / 30 days	Pulmonary Tuberculosis	<i>M. avium</i> type 1	Substitute treatment
14	83	male	-	Bronchial Aspirate	+	Myc. sp / no info.	Pulmonary Tuberculosis	<i>M. kansasii</i> type1	Standard treatment
21	45	male	+	Bronchial Aspirate	-	Negative	Pulmonary Tuberculosis	Negative	Standard treatment
22	77	fem	-	Sputum	-	Myc. sp / >15 days	Tuberculosis unspecified	<i>M. terrae</i> type 3	Substitute treatment
25	83	male	-	Bronchial Aspirate	-	Myc. sp / 30 days	Pulmonary Tuberculosis	<i>M. intracellulare</i> type 1	Standard treatment
28	22	male	+	Liquor	-	Myc. sp. / no info.	Meningitis - Tuberculosis	<i>M. avium</i> type 2	Standard treatment
31	57	male	+	Liquor	-	Myc. sp. / no info.	Pulmonary Tuberculosis	Negative	Substitute treatment
32	52	male	+	Bronchial Aspirate	-	Myc. sp / 45 days	Pulmonary Tuberculosis	<i>M. avium</i> type 1	Standard treatment
33	36	male	+	Gastric Aspirate	-	Myc. sp / 20 days	Miliary Tuberculosis	<i>M. avium</i> type 2	Substitute treatment
34	92	fem	-	Bronchial Aspirate	-	Myc. sp / 18 days	Pulmonary Tuberculosis	NTM unknown pattern	Standard treatment
36	52	male	-	Bronchial Aspirate	+	Myc. sp / >15 days	Pulmonary Tuberculosis	<i>M. kansasii</i> type1	Standard treatment
37	24	male	+	Bronchial	+	Myc. sp / 35	Pulmonary	<i>M. avium</i> type 1	Standard treatment

				Aspirate		days	Tuberculosis		
38	42	fem	+	Liquor	-	Myc. sp / 16 days	Bone Tuberculosis	<i>M. avium</i> type 1	Standard treatment
39	40	male	+	Cervical Lymph node	-	Myc. sp / 45 days	Ganglionar Tuberculosis	<i>M. avium</i> type 1	Standard treatment
40	29	fem	-	Bronchial Aspirate	-	Myc. sp / 10 days	Pulmonary Tuberculosis	<i>M. mucogenicum</i>	Standard treatment
41	44	male	+	Bone marrow Aspirate	-	Myc. sp >20 days	Miliary Tuberculosis	<i>M. avium</i> type 1	Standard treatment
52	59	fem	+	Gastric Aspirate	-	Myc. sp / 25 days	Miliary Tuberculosis	<i>M. avium</i> type 1	Standard treatment
54	77	male	-	Surgical Scar	-	Myc. sp / 05 days	Bone Tuberculosis	<i>M. chelonae</i>	Substitute treatment

TB= *Mycobacterium tuberculosis*; NTM= Not causative tuberculosis mycobacteria;

Myc. sp= mycobacterium without mention of specific species; Fem = Female; Male = Male.

Standard treatment for TB (2RHZE / 4RH): two months COCXIP 4 (rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol) + 4 months of rifampicin and isoniazid

Substitute treatment: After standard treatment without success, other drugs are indicated to treat atypical mycobacteria.

Table 2. Patients' characterization (gender, age, bacilloscopy results, culture time, clinical diagnosis and HIV status, according to the molecular identification of mycobacteria species of patients diagnosed with tuberculosis based on conventional procedures.

		Molecular Diagnosis (PCR-RFLP)										
Patients' Characterization		<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i> type 1	<i>M. avium</i> type 2	<i>M. kansasi</i>	<i>M. intracellulare</i> type 1	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. terrae</i> type 3	MNT unknown	Negative	Total
Gender	Male	26	6	2	2	1	0	1	0	0	2	40
	Female	9	3	0	0	0	1	0	1	1	0	15
Age	< 25 years	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	7
	25-50 years	17	3	1	0	0	1	0	0	0	1	23
Bacilloscopy	> 50 years	14	4	0	2	1	0	1	1	1	1	25
	Positive	21	3	0	2	1	0	0	0	0	0	27
Culture time	Negative	14	6	2	0	0	1	1	1	1	2	28
	> 15 days	30	9	1	1	1	0	0	1	1	0	44
	< 15 days	5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	7
	Without information	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	4
Clinical diagnoses	Pulmonary tuberculosis	23	4	0	2	1	1	0	0	1	2	34
	Unspecified tuberculosis	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	5
HIV Status	Miliary tuberculosis	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	6
	Pleural tuberculosis	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	Ganglionar tuberculosis	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	Bone tuberculosis	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
	Vesical tuberculosis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Meningitis - tuberculosis	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
	HIV positive	7	8	2	0	0	0	0	0	0	1	18
	HIV negative	28	1	0	2	1	1	1	1	1	1	37

Discussion

Nontuberculous mycobacteria infections have increased considerably in Brazil and worldwide, probably due to the reduced incidence of tuberculosis as a consequence of treatment improvements, which in turn make individuals, especially immunosuppressed ones, more vulnerable to opportunistic mycobacteria. Although this fact was first evidenced in developed countries, it has been increasingly observed in developing countries [21]. This augment can also be justified by the deployment of new techniques for species identification, which have improved the detection of NTM species, contributing to a better understanding of the epidemiology of mycobacterial infections.

In Brazil, there are few studies about nontuberculous mycobacteria epidemiology [9, 17, 22], because NTM infections have no obligatory notification, and besides none of the public hospitals and health services perform molecular methods for species identification. Also, these reports are isolated studies, mainly in the Southeastern states, with different methodologies, unavailable in most of the Brazilian states [22], so comparisons among them are difficult. The majority of investigations present restricted species identification of NTM, and only two reports associate with epidemiological data, infected body parts, diagnosis and treatment [17, 23]. In Uberlândia, a city with high flow of migrants and rapid development in central Brazil, there are still no records of mycobacterial infections.

This study performed in a reference hospital of Uberlandia, Minas Gerais State, Brazil, identified mycobacteria species by PCR-RFLP, and compared results of patients' samples that were clinically diagnosed as tuberculosis

infection, according to a conventional method algorithm using clinical symptoms, bacilloscopy and culture. We opted for the PCR-RFLP method due to its rapidity, low cost, reproducibility, and capability of identifying a large number of NTM species [17, 24]. Another reason was to evaluate its effectiveness for routine implementation in the Brazilian unified health system (SUS). Here, we showed a significant percentage of misdiagnosis (36.4%), which has led to inappropriate treatment of 13 out of 18 patients (72.2%), demonstrating the importance of species identification.

When we characterized the patient profiles with mycobacteriosis, we found that about 70% were male and the mean age was 46 years, which is corroborated by a report elsewhere [25] that found that the majority of affected patients was male (76%) with an average age of 40 years old. This may be partially explained by the predominance of middle-age men migrants that come from low-income regions looking for better opportunities.

The identification of *M. tuberculosis* infections in 63.6% (35/55) of samples is consistent with other studies that found a higher prevalence of MTB; 67% [26], 57.5% [27], 78.6% [28] and 77% [29]. Despite the higher occurrence of MTB, it has been shown elsewhere that the MTB frequency is declining over the years, while the NTM frequency is significantly increased, with prevalence ranging from 9.1% in 2003 to 31.9% in 2009 [28]. The increased NTM prevalence over time is due to the improvement of techniques for identification and to better tuberculosis diagnosis and treatment, and could also be partially attributed to the increase in immunosuppressed people, with HIV, organ transplantation, and other causes.

In most studies similar to this, the NTM complex most commonly associated with the clinical disease were *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. gordonae* and *M. abscessus* [17]. In this study, among the potentially pathogenic NTM species, we observed 50% (9/18) *M. avium* type 1, 11.1% *M. avium* type 2, 5.5% *M. intracellulare*, *M. kansasii* type 1 (11.1%) and *M. chelonae* (5.5%). We also found two rarely pathogenic species, such as 1 *M. mucogenicum* (5.5%) and 1 *M. terrae* type 3 (5.5%), although they are not commonly associated with diseases they are found in the environment and in potable water distribution systems due to its resistance potential in disinfection procedures [21]. We also identified a NTM sample with unknown pattern, for which DNA sequencing will be performed to determine the existence of a new species.

Regarding the mycobacteria culture, it is important to note that despite the slow growth of *M. tuberculosis* (2-8 weeks), 5 cultures presented fast growth (<15 days), suggesting an infection with environmental mycobacteria, and this may have happened due to the high inoculum concentration, which may have also interfered in the clinical diagnosis. The bacilloscopy is not a reliable method too, since it can be negative in 30 to 50% of cases of individuals infected with *M. tuberculosis* [9]. In this study, we found that 38% of MTB positive samples were AFB negative, while for the NTM infections, AFB negative samples totaled 72%.

It is common to find high rates of immunosuppressed individuals affected by NTM species, especially the *M. avium* complex [30]. We found 55% (10/18) of HIV positives co-infected with *M. avium* type 1 and 2 species. However, it is interesting to highlight that 45% of NTM infections occurred in supposed

immunocompetent individuals. Epidemiologists admit that for this type of patient it is important to recognize other risk factors associated with a higher chance of developing NTM, such as pre-existing pulmonary lesions or chronic diseases that cause major structural damage, predisposing the individual to the development of NTM pulmonary disease [31, 32].

It is important to emphasize that NTM positivity in clinical samples must be carefully interpreted, and may have three meanings: (a) the mycobacteria is the etiological agent, in which diagnosis is supported by clinical signs and by repeated isolation of this mycobacteria in the same patient, or by a single isolation in the case of samples taken aseptically; (b) the mycobacteria may have colonized the sample, but has no clinical significance, which may have occurred due to the use of contaminated equipment, a common phenomenon called "pseudo-infection"; or (c) the detection of mycobacteria in clinical samples comes from laboratory contamination (contaminated solutions), which can be easily verified with proper controls or by observing if the same mycobacteria was isolated from other samples analyzed in the same day [24].

The diagnosis performed at the Clinics' Hospital of Uberlândia, takes into account only bacilloscopy, culture time and symptoms for clinical diagnosis, and among 55 patients diagnosed as tuberculosis, 35 were correctly identified as MTB (63.6%) when verified by PCR-RFLP, but 36.4% (20/55) of these samples were either NTM-infected (18) or negative (2), configuring misdiagnosis. The disease caused by NTM in most cases is pulmonary or disseminated [33], but our findings, demonstrated that the largest number of pulmonary disease (51%; 18/35) occurred primarily in tuberculosis patients, while for the NTM, 39% (7/18) were pulmonary and 16.6% (3/18) were miliary disease. Misdiagnosis of this

group of patients may have been the cause of multiple sample collections, and patients' physical, psychological, economic and social suffering due to the inadequate treatment. As an additional consequence, NTM strains may have become antibiotic resistant, prolonging the treatment, and in most cases resulting in chronic disease, leading to many hospitalizations and unsuccessful treatments, and increasing the chances of liver damage and mortality [9].

The recommended treatment for MTB applied to NTM-infected patients, or for NTM applied to MTB patients, or for NTM with non-specific schemes may lead to major complications, since different therapeutic regimens should be adopted for each group. The antimicrobial and the treatment time varies according to the species, and some NTM are resistant to the drugs used for tuberculosis treatment, and not all NTM are sensitive to the same treatments, which may result in chronic infections [12]. Available studies consider the treatment of the NTM disease quite complex, and recommend the observation of three factors to guide the therapeutic decision: the bacillary load, the isolated species and the presence of clinical progression of the disease. The establishment of appropriate treatment regimens may be complicated by the large number of NTM species with differential antimicrobial susceptibility profiles. At the moment, at international level, treatment recommendations are based on a series of case reports, and consider the treatment experiences of the *M. avium* and *M. kansasii* complex, which constitute most of the cases described in the literature [34, 35].

Briefly, we have demonstrated that conventional methods used to detect mycobacterial infections, AFB and culture, have led to significant diagnostic errors, and considering that species identification is essential to choose the

correct therapeutic regimen, it is expected then that mycobacteria resistance, chronic infections, and poorer outcomes may be direct consequences of such misdiagnosis. We suggest that laboratorial routine, even in resource-poor settings, must incorporate species identification by molecular methods and resistant tests of mycobacterial infections in order to reduce the great morbidity and harmful outcomes of inappropriate treatments.

References

1. Euzéby JP. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Mycobacterium*. <http://www.bacterio.cict.fr/>. 2014.
2. Mogambery JC, Motala A, Padayachee K et al. Nontuberculous mycobacteria immune reconstitution syndrome. Case Rep Med 2014; 2014: 964612.
3. Aliyu G, El-Kamary SS, Abimiku A et al. Cost-effectiveness of point-of-care digital chest-x-ray in HIV patients with pulmonary mycobacterial infections in Nigeria. BMC Infect Dis 2014; 14: 675.
4. Jung SM, Ju JH, Park MS et al. Risk of tuberculosis in patients treated with anti-tumor necrosis factor therapy: a nationwide study in South Korea, a country with an intermediate tuberculosis burden. Int J Rheum Dis 2015; 10.1111/1756-1185X.12530.
5. Longworth SA, Blumberg EA, Barton TD, Vinnard C. Non-tuberculous mycobacterial infections after solid organ transplantation: a survival analysis. Clin Microbiol Infect 2015; 21: 43-47.
6. Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Mootsikapun P et al. Disseminated nontuberculous mycobacterial infection in patients who are not infected with HIV in Thailand. Clin Infect Dis 2007; 45: 421-427.
7. Mirsaeidi M, Machado RF, Garcia JG, Schraufnagel DE. Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999-2010: a population-based comparative study. PLoS One 2014; 9: e91879.
8. R. PDd, Lima AS, Lima JF et al. Differentiation of micobacteria by multiplex PCR. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42: 716-722.
9. Castelo Filho A, Kritski AL, Barreto ÂW et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. Jornal Brasileiro de Pneumologia 2004; 30: S57-S86.
10. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS et al. Tuberculosis. Lancet 2003; 362: 887-899.

11. Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K et al. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis* 2002; 186: 1797-1807.
12. Tanaka, II, Anno IS, Leite SR et al. Comparison of a multiplex-PCR assay with mycolic acids analysis and conventional methods for the identification of mycobacteria. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 307-312.
13. Pedro HdSP, Pereira MIF, Goloni MdRA et al. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2008; 34: 950-955.
14. Muwonge A, Malama S, Bronsvoort BM et al. A comparison of tools used for tuberculosis diagnosis in resource-limited settings: a case study at Mubende referral hospital, Uganda. *PLoS One* 2014; 9: e100720.
15. Parsons LM, Somoskovi A, Gutierrez C et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 314-350.
16. Vorská LD, Bartos M, Martin G et al. Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods. *Vet. Med. – Czech.* 2001; 46: 309-328.
17. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY et al. 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 Microbiol* 2008; 8: 48.
18. Telenti A, Marchesi F, Balz M et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175-178.
19. Brasil MS. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. In 1st Edition. Brasilia, DF, Brasil.: Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2008; Available: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf.
20. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
21. Falkinham JO, 3rd. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* 2009; 107: 356-367.
22. da Costa AR, Lopes ML, Furlaneto IP et al. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 390-394.
23. Conde MB, Figueira CM, Moraes R et al. Predictive value of the acid fast smear for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a reference center of HIV/AIDS in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 787-790.

24. Leao SC, Bernardelli A, Cataldi A et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 193-199.
25. Maiga M, Siddiqui S, Diallo S et al. Failure to recognize nontuberculous mycobacteria leads to misdiagnosis of chronic pulmonary tuberculosis. *PLoS One* 2012; 7: e36902.
26. Agertt VA, Dalmolin TV, Bonez PC et al. Identification of mycobacteria isolated at University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2013; 49: 115-117.
27. Lima AS, Duarte RS, Montenegro LM, Schindler HC. Rapid detection and differentiation of mycobacterial species using a multiplex PCR system. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46: 447-452.
28. Bertoletti ACD, Alves KJF, Chimara E, Aily DCG. Isolamento de micobactérias provenientes de amostras clínicas da região de Rio Claro: análise da frequência. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)* 2011; 70: 622-630.
29. Coelho AG, Zamarioli LA, Reis CM et al. Gene probes versus classical methods in the identification of mycobacteria. *J Bras Pneumol* 2008; 34: 922-926.
30. Hawkins CC, Gold JW, Whimbey E et al. *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 105: 184-188.
31. Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ, Jr. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1271-1278.
32. Winthrop KL, McNelley E, Kendall B et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 977-982.
33. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A et al. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 1025-1032.
34. Lee MY, Lee T, Kim MH et al. Regional differences of nontuberculous mycobacteria species in Ulsan, Korea. *J Thorac Dis* 2014; 6: 965-970.
35. Ahn CH, Lowell JR, Onstad GD et al. A demographic study of disease due to *mycobacterium kansasii* or *m intracellulare-avium* in texas. *Chest* 1979; 75: 120-125.