

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE
MICOBACTÉRIAS NÃO CAUSADORAS DE TUBERCULOSE**

CÁSSIA MARIA CARDOSO

Porto Alegre, março de 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE
MICOBACTÉRIAS NÃO CAUSADORAS DE TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada por Cássia Maria
Cardoso para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Porto Alegre, março de 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof^a. Dr^a. Andréia Rosane de Moura Valim

Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

Universidade de São Paulo – USP

Cardoso, Cássia Maria

Avaliação de técnicas moleculares para identificação de micobactérias não causadoras de tuberculose / Cássia Maria Cardoso. -- 2012.

68 f.

Orientador: Afonso Luis Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Micobactérias não causadoras de tuberculose.
2. Biologia Molecular. 3. gene hsp65. I. Barth, Afonso Luis, orient. II. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Micobactérias do Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central do Estado (IPB-LACEN/RS) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). O projeto recebeu financiamento do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) n° 09/2010 da FEPPS, do Projeto Universal n° 480789/2010-0 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) verba Fundo de Incentivo a Pesquisa e Ensino (FIPE) n° 10-0361.

*Dedico este trabalho aos meus amados pais Deoclécio Antonio Cardoso (in memoriam)
e Doroti Soares Antunes, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo,
pois graças a eles eu consegui realizar este sonho.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, Dr. Afonso Luis Barth pelo exemplo, carinho, confiança e amizade, a quem tenho enorme admiração, muito obrigada pela orientação.

À minha querida companheira de trabalho, Luciana de Souza Nunes, que se tornou muito mais que colega, tornou-se minha grande amiga de todos os momentos. Todo o meu agradecimento nunca será suficiente!

À grande amiga Ludmila Baethgen, pelos ensinamentos, considerações, momentos de companheirismo, e, principalmente, pelo enorme carinho que recebi.

À querida Marta Osório Ribeiro, por ter sido a grande responsável pelo meu encantamento pelas micobactérias, pelos momentos de aprendizado, carinho e acolhimento.

À amiga Raquel de Abreu Maschmann pela amizade de tantos anos, companheirismo e por ter participado desde o início deste momento importante da minha vida.

Às queridas amigas Gabriela Remonato, Ledamir Risti, Ane Elise Bruhn, Luciane Gelatti e Rodrigo Minuto por todos os momentos de desabafo, alegrias, e, principalmente, por fazerem parte da minha vida.

À minha amiga-irmã Jeanne Scheffer Germann Leffa, mesmo distante, sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Às amigas e colegas Flávia Brust, Bárbara Netto e Patricia Tenconi pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Juliana Walenciuk e Alexande Nazário por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim.

À amiga Iolencia Tybusch pelo apoio e carinho.

À querida amiga Vanessa Bley pelo companheirismo, pelos momentos de estudo, mas principalmente pela amizade.

À querida amiga do Laboratório de Biologia Molecular - HCPA, Fernanda de Paris, por ter sido a responsável por iluminar meu caminho no início desta decisão.

Às queridas amigas do Setor de Microbiologia – Tuberculose HCPA, Katia Ruschel Pilger de Oliveira, Dirce Mayora Alves e Denise Maria da Cunha Willers pelo apoio constante.

Aos colegas do Laboratório de Micobactérias IPB/LACEN-RS, Simone de David, Joceli Carollo, Tais Marcon, Simone Minghelli, e Gessy por tornarem o local de trabalho muito mais agradável.

À querida estagiária Verônica Costa Farias por sua imensa disposição em ajudar e seu carinho.

Aos queridos amigos de laboratório, Andrezza Wolowski Ribeiro, Fernanda Spies e Sérgio Ferreira pela agradável convivência e carinho.

Aos colegas do Setor de Bacteriologia do Laboratório Central – ISCMPA pelo companheirismo, carinho e amizade.

Aos colegas do grupo de pesquisa, coordenado pelo Dr. Afonso Luis Barth, pelo carinho e ajuda nos momentos difíceis, em especial Franciéli Rozales.

Ao PPGCF pela grande competência, organização e preocupação com os alunos.

À minha família, em especial aos meus irmãos Deoclécio Jr, Maria da Graça, Lisiane e Luciane, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos. Aos meus sobrinhos, Tatiane, Cinthia e Bernardo por serem a luz que me guia nos momentos difíceis e tornarem minha vida mais feliz. Aos meus pais, Deoclécio e Doroti pelo amor, apoio e incentivo em toda a minha vida. Muito obrigada!

E a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

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

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

As micobactérias compreendem um grupo de organismos que são heterogêneos em termos de metabolismo, crescimento, nicho ambiental, epidemiologia, patogenicidade, distribuição geográfica e associação com doenças. O diagnóstico micobacteriológico é atualmente um desafio aos laboratórios. Com a descrição de novas espécies de micobactérias nos últimos anos, tem sido cada vez mais difícil identificar com precisão estas espécies. Uma questão básica na identificação em micobactérias é a diferenciação entre o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e as Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose (MNT); no entanto tem sido cada vez mais importante a diferenciação das MNT. Em virtude das semelhanças fenotípicas e genotípicas, é necessário a aplicação e desenvolvimento de metodologias que melhor caracterizem as MNT para que seja possível determinar de forma mais precisa a prevalência das diferentes espécies. Além disso, diferentes espécies de MNT podem apresentar diferenças no perfil de sensibilidade às drogas terapêuticas, sendo que a identificação precisa é crucial para a adoção de terapia medicamentosa adequada. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os isolados de MNT através da comparação entre duas técnicas moleculares, a técnica de PRA-*hsp65* e um kit comercial GenoType[®] Mycobacterium CM, usando o método de sequenciamento do gene *hsp65* como padrão-ouro. Foram analisadas 96 isolados e a concordância entre os resultados do PRA-*hsp65* e do GenoType[®] Mycobacterium CM foi de 92%. O método molecular PRA-*hsp65* mostrou-se eficaz na identificação das espécies em 91% das amostras e o GenoType[®] Mycobacterium CM em 92%. Em relação aos custos referentes aos dois métodos, foi possível estabelecer que o PRA-*hsp65* apresentou um valor final consideravelmente inferior ao do GenoType[®] Mycobacterium CM. No entanto, a técnica comercial necessita um prazo mais curto (2 dias) para ser realizada em comparação com a técnica PRA-*hsp65* (requer 5 dias). Na nossa avaliação, a aplicabilidade do PRA-*hsp65* aumenta a qualidade e rapidez do resultado final, já que se mostrou discriminatório, de baixo custo e relativamente de fácil execução na identificação de micobactérias. É possível concluir que ambas as técnicas moleculares avaliadas neste estudo apresentaram uma ótima capacidade de identificação de MNT, sendo que a implementação destas técnicas dependerá das características dos diferentes laboratórios bem como as necessidades clínicas das diferentes instituições.

Palavras-chave: MNT, *Mycobacterium*, Biologia Molecular, PRA-*hsp65*, GenoType[®] Mycobacterium CM, gene *hsp65*

“ABSTRACT”

EVALUATION OF MOLECULAR TECHNIQUES FOR NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IDENTIFICATION

Mycobacteria comprise a group of organisms that are heterogeneous in terms of metabolism, growth, environmental niche, epidemiology, pathogenicity, geographic distribution and disease association. The laboratory diagnosis of mycobacteria is currently a challenge to laboratories. Due to the increased description of new species of mycobacteria in recent years it is becoming difficult to accurately identify these species. A basic question in the identification of mycobacteria is the differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and the Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM); however it has been increasingly important to differentiate the NTM species. Due to the fact that there are phenotypic and genotypic similarities, it is necessary to apply and develop methodologies to better characterize the NTM to be able to determine more accurately the prevalence of different species. Furthermore, different NTM species may differ in the profile of sensitivity to therapeutic drugs, and accurate identification is crucial for the adoption of appropriate drug therapy. The objective of this study was to characterize NTM isolates by comparing two molecular techniques, the technique of PRA-*hsp65* (PCR-Restriction Enzyme Analysis) and a commercial kit GenoType[®] Mycobacterium CM, using the sequencing the *hsp65* gene as gold standard. We analyzed 96 samples and the concordance between the results of the PRA-*hsp65* and the GenoType[®] Mycobacterium CM was 92%. The PRA-*hsp65* molecular method proved to be effective in 91% of species identification and the GenoType[®] Mycobacterium CM in 92%. Regarding costs for the two methods, we could establish that the PRA-*hsp65* had a final value considerably lower than the GenoType[®] Mycobacterium CM. However, the commercial technique requires a shorter period (2 days) to be performed in comparison with the technique PRA-*hsp65* (requires five days). In our evaluation, the applicability of the PRA-*hsp65* increases the quality and speed of the final result (in relation to traditional phenotypic identification or outsourcing in referral centers), and proved to be discriminatory, inexpensive and relatively easy to perform the identification of mycobacteria. Finally, we conclude that both molecular techniques evaluated in this study showed a great capacity for identification of NTM and that the implementation of these techniques. However, depend on the characteristics of different laboratories as well as the clinical needs of different institutions.

Keywords: NTM, *Mycobacterium*, Molecular Biology, PRA-*hsp65*, GenoType[®] Mycobacterium CM, *hsp65* gene.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PAREDE CELULAR DE MICOBACTÉRIAS E SEUS COMPONENTES.....	20
FIGURA 2: CIDADES DE SETE ESTADOS BRASILEIROS COM INFECÇÕES PÓS-CIRÚRGICAS POR MCR.	29
FIGURA 3: SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE <i>hsp65</i> INDICANDO OS INICIADORES E O PRODUTO AMPLIFICADO.	39
FIGURA 4. EXEMPLO DE PARTE DA CHAVE DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE MNT PELO MÉTODO MOLECULAR PRA- <i>hsp65</i>	42
FIGURA 5. GEL DE AGAROSE 4% CORADO COM GELRED™ E VISUALIZADO EM TRANSLUMINADOR UV. CLIVAGEM DO PRODUTO AMPLIFICADO DE 8 AMOSTRAS COM AS ENZIMAS <i>BstEII</i> E <i>HaeIII</i>	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: MICOBACTÉRIAS DE ACORDO COM PATOGENICIDADE EM HUMANOS.	21
TABELA 2: ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Mycobacterium</i>	22
TABELA 3. CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DE ACORDO COM TEMPO DE CRESCIMENTO E PIGMENTAÇÃO DAS COLÔNIAS.	25
TABELA 4: IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES COM O PERFIL DE FRAGMENTOS GERADOS PELO PRA- <i>hsp65</i>	49
TABELA 5: IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES COM O PADRÃO DE HIBRIDIZAÇÃO DO GENOTYPE [®] MYCOBACTERIUM CM.	50
TABELA 6: RESULTADOS CONCORDANTES OBTIDOS PELO PRA- <i>hsp65</i> E O GENOTYPE [®] MYCOBACTERIUM CM CONFORME O SEQUENCIAMENTO.	51
TABELA 7: RESULTADOS DISCORDANTES OBTIDOS PELO PRA- <i>hsp65</i> OU O GENOTYPE [®] MYCOBACTERIUM CM CONFORME O SEQUENCIAMENTO.	52
TABELA 8: RESULTADOS DISCORDANTES OBTIDOS ENTRE O PRA- <i>hsp65</i> E O GENOTYPE [®] MYCOBACTERIUM CM.	52
TABELA 9: CUSTOS DE INSUMOS E TEMPO DE LIBERAÇÃO POR AMOSTRA PROCESSADA - PRA- <i>hsp65</i> VERSUS GENOTYPE [®] MYCOBACTERIUM CM.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> ou síndrome da imunodeficiência adquirida
BAAR	bacilo ácido álcool resistente
BCG	bacille calmette-guérin
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
CC	controle do conjugado
CM	<i>common Mycobacteria</i>
CMA	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CRPHF	Centro de Referência Prof. Hélio Fraga
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	deoxirribonucleosídeo trifosfato
FC	fibrose cística
HCl	ácido clorídrico
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> ou vírus da imunodeficiência humana
<i>hsp</i>	<i>heat shock protein</i> ou proteína de choque térmico
KCl	cloreto de potássio
LJ	Löwestein-Jensen
MCR	micobactérias de crescimento rápido
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MNT	micobactérias não causadoras de tuberculose
NaCl	cloreto de sódio
OK	Ogawa-Kudoh
pb	pares de base
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>pulsed field gel electrophoresis</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
PNB	ácido p-nitrobenzóico
PRA	PCR Restriction Analysis
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecilsulfato de sódio
TB	tuberculose
TE	tris+ edta
TEB	tris + EDTA + ácido bórico
Tris	tris(hidroxi-metil) aminometano
UC	controle universal
UV	radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO MYCOBACTERIUM	19
3.2. MICOBACTÉRIAS NÃO CAUSADORAS DE TUBERCULOSE (MNT)	22
3.3. INFECÇÃO E DOENÇA	25
3.4. EPIDEMIOLOGIA	28
3.5. IDENTIFICAÇÃO DAS MNT	31
3.5.1. Identificação Fenotípica.....	32
3.5.2. Identificação Genotípica	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. DESENHO DO ESTUDO	37
4.2. AMOSTRAS	37
4.3. ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS	37
4.4. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	37
4.5. IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA	37
4.5.1. Extração de DNA	37
4.6. PCR COM ANÁLISE POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (PRA-HSP65)	39
4.6.1 Oligonucleotídeos para reação da PCR	39
4.6.2 Reação da PCR	40
4.6.3 Controle de Qualidade da reação da PCR	40
4.6.4 Condições da reação da PCR.....	40
4.6.5 Detecção do produto amplificado	40
4.6.6 Clivagem pelas enzimas de restrição	41
4.6.7 Análise da clivagem.....	41
4.7. SEQUENCIAMENTO DO GENE HSP65	43
4.7.1. Purificação	43
4.7.2. Sequenciamento	43
4.8. GENOTYPE[®] MYCOBACTERIUM CM	44

4.8.1. Extração de DNA	44
4.8.2. Amplificação do DNA pela PCR	44
4.8.3. Hibridização	44
4.8.4. Avaliação e Interpretação dos resultados.....	45
4.9. AVALIAÇÃO DE CUSTOS DOS INSUMOS DAS TÉCNICAS DE PRA-HSP65 E GENOTYPE® MYCOBACTERIUM CM	45
5. RESULTADOS	47
5.1. ISOLADOS.....	47
5.2. IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA.....	47
5.2.1. Extração de DNA	47
5.2.2. Sequenciamento do gene <i>hsp65</i>	47
5.2.3. PRA- <i>hsp65</i>	48
5.2.4. GenoType® Mycobacterium CM.....	49
5.2.5. Comparação dos resultados entre o PRA- <i>hsp65</i> e o GenoType® Mycobacterium CM.....	50
5.3. COMPARAÇÃO DOS CUSTOS DE INSUMOS DAS TÉCNICAS DE PRA-HSP65 E GENOTYPE® MYCOBACTERIUM CM	52
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. ANEXOS	69
ANEXO I	70
ANEXO II: CURRÍCULO DO AUTOR	71

1. INTRODUÇÃO

As micobactérias são um grupo de microrganismos de importância clínica, já que existem múltiplas espécies que causam diversas infecções em humanos, com morbidade e mortalidade importantes (Cantón, 2005). Compreendem organismos que são heterogêneos em termos de metabolismo, crescimento, nicho ambiental, epidemiologia, patogenicidade, distribuição geográfica e associação com doenças (Chimara *et al*, 2008).

As micobactérias podem ser subdivididas em dois grandes grupos: o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) que compreende as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* – BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (Brosch *et al*, 2002; Euzéby, 2009) e outras que atualmente são denominadas Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose (MNT) (Ueki *et al*, 2005), sendo descritas 154 espécies e 13 subespécies de micobactérias até o momento (Euzéby, 2009).

Os organismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium* são considerados bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). A coloração de Ziehl-Neelsen é normalmente utilizada para esfregaços clínicos provenientes de indivíduos com suspeita de infecções por micobactérias, principalmente para pacientes com suspeita de tuberculose, mas é limitado pela sua falta de sensibilidade. Além do BAAR, outros critérios são aplicados para a identificação deste gênero, tais como: conteúdo GC (guanina, citosina) do DNA, perfil de ácidos micólicos, morfologia e pigmentação das colônias isoladas em meio de cultura sólido. O diagnóstico das infecções causadas por micobactérias é realizado através da avaliação clínica e radiológica do paciente, dos testes intradérmicos (PPD/Mantoux), e laboratorialmente através dos métodos de baciloscopia e cultura. Este último método é fundamental para a identificação das espécies, através de provas bioquímicas, contudo é demorado e, muitas vezes, não permite a diferenciação e caracterização de algumas micobactérias dificultando o diagnóstico (Brasil, 2008).

O Brasil tem um vasto território, e uma considerável parte do país tem um clima quente e úmido, condições estas favoráveis ao desenvolvimento de

micobactérias (Rocha *et al*, 2002). Além disso, cada vez mais estão sendo identificadas espécies adaptadas a ambientes com condições adversas (poucos nutrientes, baixo pH e temperaturas extremas) (De Groote & Huitt, 2006).

A alta prevalência de tuberculose em nosso Estado ainda não propiciou a possibilidade de estudos locais mais detalhados de doenças causadas por outras espécies de micobactérias. Entretanto, a partir do aumento de casos de co-infecção TB/HIV, aumentou o interesse em conhecer as espécies de MNT que ocorrem mundialmente, sabendo da dificuldade de tratamento, da alta morbidade e mortalidade associadas a algumas espécies e também da dificuldade de obtenção de dados epidemiológicos locais mais precisos.

Por sua vez, sendo as MNT classificadas quanto a sua capacidade de causar doença no homem, torna-se fundamental a identificação dessas espécies, já que a conduta médica será diferenciada, levando em consideração a espécie, o grau de infecção, a sintomatologia e o estado imunológico do paciente associado a outros exames.

O diagnóstico micobacteriológico é atualmente um desafio. Com a descrição de novas espécies de micobactérias nos últimos anos tem sido cada vez mais difícil uma identificação fenotípica precisa. Em virtude das semelhanças fenotípicas e genotípicas, é necessário o desenvolvimento e aplicação de metodologias que melhor caracterizem as MNT. Dessa forma, torna-se possível uma vigilância epidemiológica e adoção de medidas de controle adequadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Esse estudo teve como objetivo geral caracterizar os isolados de Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose através da comparação entre duas técnicas moleculares, a técnica de PRA-*hsp65* (*PCR-Restriction Enzyme Analysis*) e Kit comercial GenoType[®] Mycobacterium CM, utilizando o método de sequenciamento do gene *hsp65* como padrão-ouro.

2.2. Objetivos Específicos

- Sequenciar parcialmente o gene *hsp65* para identificação das espécies de micobactérias;
- Implementar a metodologia PRA-*hsp65* para a identificação molecular das espécies de MNT;
- Avaliar o Kit comercial GenoType[®] Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) para caracterização de MNT;
- Avaliar os resultados de identificação obtidos por ambas metodologias e compará-los com a identificação obtida no sequenciamento;
- Calcular os custos de materiais/insumos na realização de ambas metodologias.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Características do gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* é constituído por um grande e crescente número de espécies (Euzéby, 2009). Embora muitas espécies de micobactérias sejam saprófitas, estima-se que, pelo menos, 1/3 destas espécies esteja associada a doenças causadas no homem e nos animais (Katoch, 2004).

O nome genérico *Mycobacterium* foi introduzido por Lehmann e Neumann na primeira edição do “Atlas de Bacteriologia” em 1896, para incluir as espécies causadoras da hanseníase e da tuberculose (TB), que haviam sido classificadas respectivamente como *Bacterium leprae* e *Bacterium tuberculosis* (apud Wright & Wallace, 1994). A primeira descrição de micobactérias ocorreu em 1873, quando o físico norueguês G. A. Hansen descreveu alguns “corpos em forma de haste” a partir de material de biópsia de paciente com hanseníase (apud Goodfellow & Minnikin, 1984). Em 1882, o físico alemão Robert Koch isolou o bacilo da TB humana (apud Palomino *et al*, 2007). São microorganismos aeróbios estritos, imóveis, de morfologia variável (bacilar ou cocóide) que não formam esporos e não possuem flagelos nem cápsula (Cantón, 2005).

As micobactérias são diferentes das demais bactérias em uma série de propriedades, muitas das quais estão relacionadas com a quantidade e tipos de lipídeos complexos (glicolipídeos, ácidos micólicos, arabinogalactano, lipoarabinomananos (LAM), peptídeoglicano \Rightarrow N-glicolilmurâmico) que contêm na parede celular (Figura 1). Esta estrutura lipídica pode atingir até 60% do peso seco da célula e está associada a profundos efeitos biológicos no hospedeiro. A presença de ácidos micólicos na parede celular é responsável pela propriedade tintorial mais peculiar destas bactérias: resistência à descoloração com álcool-ácido, por isso são denominadas BAAR (Bacilos Álcool-Ácido Resistentes) (Cattoir *et al*, 2004).

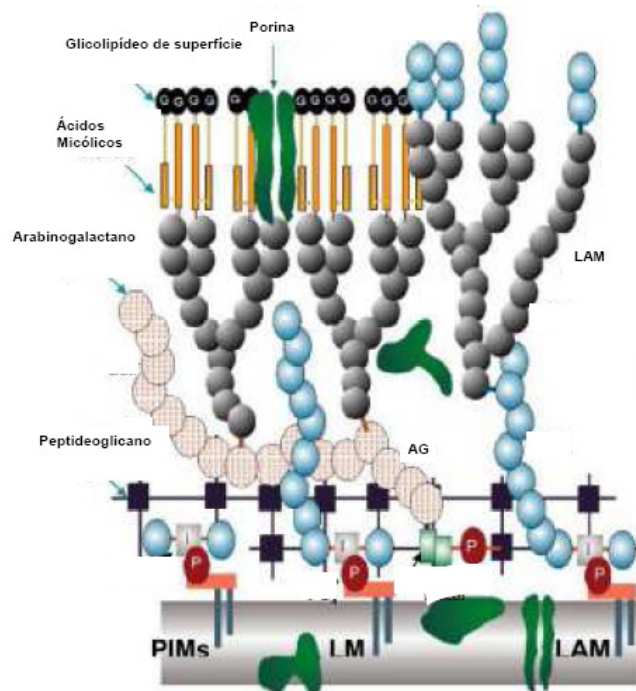


Figura 1: Parede celular de micobactérias e seus componentes.

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).

Com exceção do *M. leprae* que não cresce *in vitro*, as micobactérias podem ser subdivididas em dois grandes grupos: as do CMTB e as MNT (Ueki *et al*, 2005). Dentre as MNT podemos citar três importantes grupos: o Complexo *M. avium* (CMA) que agrupa as espécies *M. avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*, o Complexo *M. terrae* que agrupa as espécies *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale* (Brasil, 2008) e o Grupo *M. chelonae*, composto pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum* (Brown-Elliott & Wallace, 2002; Pitombo *et al*, 2009).

As micobactérias podem ainda ser classificadas conforme sua capacidade de causar doença no homem, em (a) patogênicas, que obrigatoriamente causam doença; (b) potencialmente patogênicas, que podem causar doença; (c) raramente patogênicas, nunca ou com extrema raridade

causam doença. Dentre as micobactérias patogênicas encontram-se as espécies *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*. Dentre as potencialmente patogênicas destacam-se *M. avium*, *M. genavense*, *M. malmoense*, *M. simiae*, *M. avium subsp paratuberculosis*, *M. haemophilum*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. ulcerans*, *M. asiaticum*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi* (Tabela 1). Já dentre as MNT, geralmente oportunistas, também podem ser classificadas conforme sua capacidade de causar doença no homem, como potencialmente patogênicas e raramente patogênicas (Brasil, 2008).

Tabela 1: Micobactérias de acordo com patogenicidade em humanos.

Raramente patogênicas		Potencialmente patogênicas	Patogênicas
<i>M. agri</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. aichiense</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. africanum</i>
<i>M. culum</i>	<i>M. madagascariense</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. microti</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. caprae</i>
<i>M. branderi</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. chitae</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. intracellulare</i>	
<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. kansasii</i>	
<i>M. chubuense</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. malmoense</i>	
<i>M. confluentis</i>	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. genavense</i>	
<i>M. conspicuum</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. marinum</i>	
<i>M. cookii</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. poriferae</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	
<i>M. duvalli</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. simiae</i>	
<i>M. fallax</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. szulgai</i>	
<i>M. flavescens</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. ulcerans</i>	
<i>M. gilvum</i>	<i>M. sphagni</i>	<i>M. xenopi</i>	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. terrae</i>		
<i>M. hassiacum</i>	<i>M. thermoresistibile</i>		
<i>M. hiberniae</i>	<i>M. tokaiense</i>		
<i>M. holderi</i>	<i>M. triplex</i>		
<i>M. interjectum</i>	<i>M. triviale</i>		
	<i>M. vaccae</i>		

Fonte: CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Desde 1986, muitas novas espécies têm sido descritas. Em 2004 havia descrição de 114 espécies, conforme a Tabela 2 (Mcnabb *et al*, 2004). Já em 2011, estão descritas 154 espécies e 13 subespécies de micobactérias (Euzéby, 2009).

Tabela 2: Espécies do gênero *Mycobacterium*.

Espécies			
<i>M. abscessus</i>	<i>M. doricum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. africanum</i> *	<i>M. duvalii</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. pinipedi</i>
<i>M. agri</i>	<i>M. elephantis</i>	<i>M. kubicae</i>	<i>M. porcinum</i>
<i>M. aichiense</i>	<i>M. engbaekii</i>	<i>M. lacticola</i>	<i>M. poriferae</i>
<i>M. album</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. lacus</i>	<i>M. pulveris</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. rhodesiae</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. flavesecens</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. senegalense</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. frederiksbergense</i>	<i>M. madascariense</i>	<i>M. septicum</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. fuerthensis</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. seriolae</i>
<i>M. bohemicum</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. margeritense</i>	<i>M. sherrisii</i>
<i>M. bonickei</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. marium</i>	<i>M. shimoidei</i>
<i>M. bovis</i> *	<i>M. genavense</i>	<i>M. monacense</i>	<i>M. shottsii</i>
<i>M. branderi</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. brisbanensee</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. murale</i>	<i>M. sphagni</i>
<i>M. canariense</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. nebraskiae</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. canettii</i> *	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. terea</i>
<i>M. capri</i> *	<i>M. heckeshornense</i>	<i>M. neworleanese</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. heidelbergense</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. hiberniae</i>	<i>M. novocastrense</i>	<i>M. triples</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. hodleri</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. holsaticum</i>	<i>M. palustre</i>	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. chubuense</i>	<i>M. houstonense</i>	<i>M. paraffinicum</i>	<i>M. tusciae</i>
<i>M. conluentis</i>	<i>M. immunogenum</i>	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. conspicuum</i>	<i>M. interjectum</i>	<i>M. parmense</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. cookii</i>	<i>M. intermedium</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. visibile</i>
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. petroleophilum</i>	<i>M. wolinskyi</i>
			<i>M. xenopi</i>

114 espécies* Micobactérias do complexo *M. tuberculosis*Fonte: McNabb *et al*, 2004

A discriminação das espécies pertencentes aos diferentes grupos é importante para estudos epidemiológicos, a fim de prever a susceptibilidade a antimicrobianos e ter reconhecida sua importância médica (Viana - Niero *et al*, 2008).

3.2. Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose (MNT)

As espécies de MNT estão amplamente distribuídas na natureza e têm sido isoladas de diversas fontes ambientais, como solo, poeira, pedras bioaerossóis, água natural, água potável e soluções cirúrgicas e/ou de animais (Carson *et al*, 1978; Katoch, 2004; De Groote & Huitt, 2006). Algumas espécies são encontradas na própria microbiota epidérmica e nos tratos respiratório e gástrico-intestinal dos seres humanos (Brasil, 2008).

Existem poucas evidências da possibilidade de transmissão pessoa a pessoa, com exceção de equipamentos médicos ou estéticos (clínico-cirúrgicos) inadequadamente limpos e esterilizados (Saiman, 2004). Infecções hospitalares e surtos causados por desinfecção/esterilização inadequadas de dispositivos médicos ou contaminação ambiental de medicamentos também já foram descritas (Padoveze *et al*, 2007; Cardoso *et al*, 2008; Viana-Niero *et al*, 2008; Duarte *et al*, 2009). Essas infecções têm sido facilitadas principalmente em hospitais, onde os pacientes com imunidade reduzida estão mais expostos. No entanto, parece que a infecção por MNT pode quase que exclusivamente estar associada a micobactérias ambientais que se adaptaram a seres humanos (Senna *et al*, 2008).

A capacidade das MNT em produzir doença está claramente documentada na literatura e sua importância vem aumentando progressivamente, com isolamentos de diferentes espécies nos laboratórios de micobactérias (Falkinham, 1996; ATS, 1997; De Groote & Huitt, 2006).

As micobactérias são prevalentes em biofilmes (Schulze-Robbecke & Buchholtz, 1992), sendo relativamente resistentes a agentes como glutaraldeído e formaldeído (Wilson *et al*, 2001; Pitombo *et al*, 2009). A formação de biofilme sobre as superfícies sólidas favorece às MNT a persistirem no ambiente, apesar de seu crescimento lento. Além disso, em função da parede rica em ácidos micólicos e ácidos graxos, fica dificultada a penetração de desinfetantes na matriz extracelular (Brennan, 2003). A limpeza mecânica adequada pode prevenir a formação de biofilme e adesão bacteriana (Goller & Romeo, 2008).

A presença de micobactérias ambientais nesses biofilmes pode causar impactos na saúde humana e podem ser responsáveis por infecções e surtos de doenças, devido a problemas de contaminação (Senna *et al*, 2008).

Como mencionado anteriormente, as micobactérias também podem ser isoladas de água potável tratada, sistemas de água em hospitais e clínicas, centros de hemodiálise e piscinas. Devido à sua resistência intrínseca ao cloro e a outros desinfetantes químicos frequentemente utilizados para tratamento de água, as micobactérias têm sido capazes de colonizar uma ampla extensão de superfícies em hospitais, fábricas e áreas residenciais (Bland *et al*, 2005).

Estudos demonstraram que *M. chelonae* isolada de líquidos peritoneais de pacientes e máquinas de diálise peritoneal foi capaz de se multiplicar em água destilada comercial a 25 °C (Carson *et al*, 1978). Além disso, a amostra de *M. chelonae* ATCC 14472, por exemplo, é capaz de manter a viabilidade e multiplicar-se por no mínimo 30 dias em água destilada a 25 °C (Carson *et al*, 1988).

As MNT podem ser classificadas de acordo com seu crescimento. A distinção entre as espécies com crescimento lento e rápido é determinada pelos seguintes critérios: (a) As espécies de crescimento lento requerem aproximadamente 30 dias para produzir colônias visíveis em meios ricos; b) As espécies de crescimento rápido evidenciam crescimento em menos de 7 dias. Certas espécies são intermediárias quanto à velocidade de crescimento (Primm *et al*, 2004).

Algumas espécies de Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) foram reunidas em três grupos: (i) grupo *M. fortuitum*, composto pelas espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense*, *M. bonickei*; (ii) grupo *M. chelonae*, composto pelas espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum* (iii) grupo *M. smegmatis*, composto pelas espécies *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. godii* (Brown-Elliott & Wallace, 2002).

Em 1958, Runyon propôs uma classificação das MNT em quatro grupos baseada na pigmentação e tempo de crescimento das colônias. Os quatro grupos estão representados na Tabela 3 (Runyon, 1959).

Tabela 3. Classificação das micobactérias de acordo com tempo de crescimento e pigmentação das colônias.

Grupo	Tempo de Crescimento	Característica da cultura	Pigmentação
I	Crescimento lento	Fotocromógenas	As culturas desenvolvem pigmento amarelo somente quando expostas à luz. Ex.: <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> .
II		Escotocromógenas	As culturas desenvolvem pigmento tanto na presença da luz como no escuro. Ex.: <i>M. goodii</i> , <i>M. szulgai</i> .
III		Acromógenas	As culturas não produzem pigmento. Ex.: <i>M. avium</i> , <i>M. terrae</i> .
IV	Crescimento rápido	As culturas podem ser pigmentadas ou não. Ex.: <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> .	

Adaptado de Runyon, 1959.

Atualmente, é muito importante entender as associações entre os casos de micobacterioses e as espécies de micobactérias no Brasil, pois as infecções por esses microrganismos têm aumentado e causado surtos em hospitais, principalmente quando relacionados a procedimentos cirúrgicos (Senna *et al*, 2008). As espécies de crescimento rápido, como *M. abscessus* e *M. fortuitum*, tem-se mostrado importantes patógenos em surtos relacionados a procedimentos cirúrgicos e estéticos, como implante de próteses mamárias e lipoaspiração (Hinrichsen *et al*, 2007).

3.3. Infecção e Doença

As MNT potencialmente patogênicas podem causar diversas formas de doença, em particular em pacientes imunocomprometidos, que incluem infecções pulmonares, linfadenites, infecções cutâneas, nas articulações, disseminadas e relacionadas a cateter (Saiman, 2004; Iseman & Marras, 2008). Na ausência de evidências de transmissão de pessoa a pessoa, especula-se que os humanos sejam infectados de amostras ambientais, via aerossol (Falkinham, 1996).

Nem todas as espécies de MNT causam igualmente doença em humanos. A significância clínica de várias espécies de MNT varia entre

algumas espécies, tais como *M. kansasii*, *M. malmoense* e *M. szulgai* que quase sempre associadas à doença e outras como *M. gordonae* e *M. simiae*, que raramente causam doença (van Ingen *et al*, 2009; Andrejak *et al*, 2010; Cassidy *et al*, 2009; Park *et al*, 2008; Hoefsloot *et al*, 2009).

Antes do advento da epidemia do HIV/AIDS, doenças causadas por MNT ocorriam nas vias respiratórias, nos linfonodos ou eram limitadas à pele, ou, em casos raros, disseminados. O quadro de doença por MNT foi radicalmente alterada por este cenário (Falkinham, 1996).

Nas últimas décadas, com o declínio da prevalência da tuberculose em países desenvolvidos, a proporção de doença por MNT está aumentando. Entre estas, o CMA emergiu como um importante patógeno humano, sendo a causa mais freqüente de doença disseminada e morte em pacientes portadores de HIV/AIDS (ATS, 1997). A prolongada e profunda imunossupressão da imunidade que caracteriza a AIDS provoca a oportunidade de MNT não virulentas a causarem doença (Khatter *et al*, 2008). Geralmente as doenças disseminadas em pacientes portadores de AIDS estão associadas a espécies de crescimento lento (Barreto *et al*, 1993; ATS, 2007).

Por outro lado, as infecções pós-traumáticas são causadas por MCR (Freitas *et al*, 2003). Agentes como *M. massiliense* e *M. bolletii* são patógenos que causam abscessos e ulcerações após cirurgias laparoscópicas, abscessos em sítios onde foram aplicadas injeções intramusculares e após procedimentos estéticos, como mesoterapia (Viana-Niero *et al*, 2008).

As MNT também são responsáveis por doenças que acometem pacientes que ficam expostos ou em contato prolongado com ambientes aquáticos, causando ferimentos ou micro-traumas na pele. Casos de granulomas na pele foram descritos em pacientes infectados pelo *M. marinum* através da manipulação com peixes e águas contaminadas (Stamm & Brown, 2004).

Pelo menos 40 espécies de MNT estão associadas à doença pulmonar (Daley & Griffith, 2010). As doenças causadas por MNT são frequentemente encontradas em pacientes com bronquiectasias e fibrose cística (FC), sendo *M. abscessus* particularmente relacionado a infecções nos pacientes fibrocísticos (Oliver *et al*, 2001; Bange & Bottger, 2002; Mussaffi *et al*, 2005). Um estudo norte-americano demonstrou uma alta prevalência de MNT

(aproximadamente 13%) no escarro de pessoas com doença pulmonar de pacientes com FC (Olivier *et al*, 2003). Além disso, também estão relacionadas a infecções em pacientes com doenças respiratórias crônicas, inclusive em pacientes HIV negativos (Henry *et al*, 2004; Dailloux *et al*, 2006).

Quando responsáveis por processos patogênicos em humanos, as MNT podem acometer qualquer tecido e disseminar-se por todo o organismo, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A doença que ocasionam é denominada de micobacteriose, independentemente da espécie responsável pela patologia. Por não serem transmissíveis, não existe obrigatoriedade de notificação e, assim, o indicador de incidência no Brasil é desconhecido (Brasil, 2008).

A maioria das infecções pulmonares causadas por MNT são devido aos seguintes organismos: CMA, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi* ou Complexo *M. abscessus*. A doença pulmonar crônica é a manifestação clínica mais comum entre as doenças causadas por MNT, sendo as espécies pertencentes ao CMA, seguido de *M. kansasii*, os patógenos mais frequentes. As características clínicas da doença pulmonar por MNT, em muitos casos, são extremamente semelhantes às da tuberculose (ATS, 2007).

Outras manifestações clínicas podem ser causadas principalmente por *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* devido a infecções peritoneais por cateterização; infecções pós-cirúrgicas, como em mamoplastias e transplantes cardíacos; devido a procedimentos invasivos, como videoscopias, e devido a procedimentos estéticos. Além desses eventos, há relatos mundiais do aumento da incidência de MNT observada pelo número de isolamentos realizados nos laboratórios, com consequente diversificação das espécies identificadas após o avanço das técnicas moleculares (Para Pedro *et al*, 2008).

MCR têm sido implicadas em surtos de infecções de feridas operatórias (Vijayaraghavan *et al*, 2006). Em um estudo realizado no Rio de Janeiro observou-se a alta frequência de um único clone de *M. massiliense*, tolerante ao glutaraldeído a 2%, associado com uma epidemia de infecções pós-cirúrgicas. Isto sugere que a tolerância a este desinfetante contribuiu para ocorrência de epidemia (Duarte *et al*, 2009). Infecções causadas por micobactérias pós-laparoscopia também foram descritas em todo o mundo como casos isolados ou surtos limitados (Rajini *et al*, 2007).

Com o aumento crescente nas infecções causadas por MNT, faz-se necessária a correta e rápida identificação de espécie, especialmente para direcionar o tratamento devido às diferenças de susceptibilidade a agentes antimicrobianos, dependendo da espécie de MNT (Shin *et al*, 2009), representando uma emergência clínica que não pode ser subestimada (Wu *et al*, 2008).

O diagnóstico de doença causada por MNT exige uma cuidadosa avaliação clínico-laboratorial (ATS, 2007), pois uma contaminação cruzada em laboratórios, instrumentos contaminados ou soluções contaminadas podem resultar em uma amostra clínica que produz resultados positivos para MNT pela cultura na ausência de doença clínica (De Groote & Huitt, 2006).

3.4. Epidemiologia

Relatos em diferentes partes do mundo têm descrito a ocorrência de espécie do grupo *M. abscessus* como causa de infecções oportunistas invasivas e surtos (Tortoli *et al*, 2008). Dentre as formas de infecção descritas, casos de infecção pós-injeção intra ou periarticular de esteróides com isolamento de *M. abscessus* (Tiwari *et al*, 2003). Outro estudo descreveu uma série de 145 infecções de ferida operatória por *M. chelonae* em 35 pacientes submetidos à cirurgia de videolaparoscopia em uma mesma unidade de saúde durante seis meses (Vijayaraghavan *et al*, 2006). No ano de 2006 foi descrito um surto de 40 casos de infecção em pacientes submetidos à acupuntura na Coreia do Sul (Song *et al*, 2006).

Na Itália foram estudadas amostras de micobactérias pelo método PRA-*hsp65* e sequenciamento do gene *hsp65*, de espécimes clínicos de pacientes de um hospital local. Destas, 32,3% pertenciam ao grupo *M. chelonae*; 26,5% *M. gordonae*; 14,7% CMA; 5,9% *M. fortuitum*; 5,9% *M. xenopi*; 4,4% *M. kansasii*; 4,4% foram identificadas como pertencentes ao CMTB; 2,9% *M. marinum*; 1,5% *M. terrae* e 1,5% *M. simiae* (Brunello *et al*, 2001). No Hospital Universitário Geral da Espanha, de 19.723 amostras clínicas analisadas, 203 eram MNT, sendo 20% CMA, seguida por *M. kansasii* (Rodriguez *et al*, 2003).

A ocorrência de surtos de infecções causadas por micobactérias, relacionadas aos cuidados com a saúde (hospitalares e não hospitalares), tem sido constatada em várias cidades brasileiras desde o final da década de 90 (Freitas *et al*, 2003; Sampaio *et al*, 2006a; Sampaio *et al*, 2006b; Padoveze *et al*, 2007; Cardoso *et al*, 2008; Viana-Niero *et al*, 2008; Duarte *et al*, 2009). Um estudo descrito por Leão e colaboradores (2010) descreve surtos ocorridos em sete estados no Brasil, conforme demonstrado na figura 2.

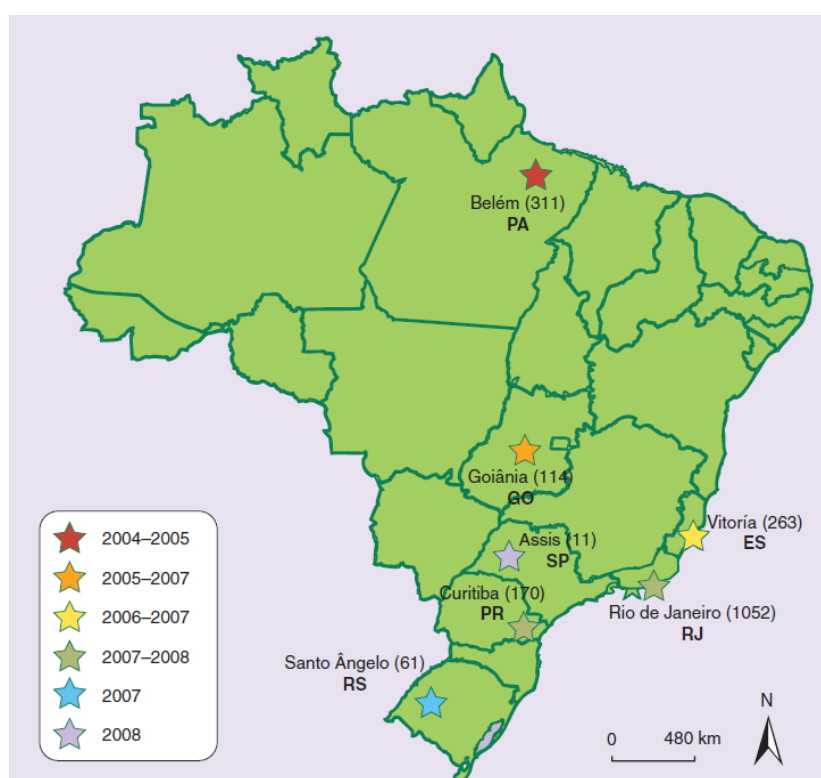


Figura 2: Cidades de sete estados brasileiros com infecções pós-cirúrgicas por MCR.

Fonte: Leão *et al*, Future Microbiology, 2010.

Um estudo realizado por Rocha e colaboradores (2002) analisou 358 amostras clínicas obtidas de 16 estados brasileiros, onde a frequência relativa das micobactérias foi de 55% *M. avium-intracellulare*; 5,7% *M. kansasii*; 5,4% *M. gordonae*; 3,4% *M. chelonae/abscessus*; 3,2% *M. fortuitum/perigrinum*; 1,4% *M. scrofulaceum*; 1,1% *M. simiae*; 0,8% *M. szulgai*; 0,8% *M. leprae*; 0,8% *M. terrae*; 0,6% *M. flavescens*; 0,6% *M. lentiflavum*; 0,3% *M. triviale*; 0,3% *M. marinum*; 0,6% não identificadas. Contudo, a maioria das amostras analisadas foram provenientes do estado do Rio de Janeiro. As demais amostras, dos outros 15 estados foram obtidas no banco de isolados do Centro de Referência

Professor Hélio Fraga (CRPHF) e não representaram o número real de casos de micobacterioses daqueles locais.

Em um estudo realizado no Hospital Clementino Fraga Filho no Rio de Janeiro, com 83 isolados de MNT no período de 1996-1997, a frequência das MNT foi de 57,8% *M. avium*; 7,2% *M. scrofulaceum*; 3,6% *M. terrae*; 2,4% *M. gordonae*; 1,2% *M. chelonae* e 1,2% *M. fortuitum* (Ferreira *et al*, 2002). Outro estudo realizado no mesmo hospital identificou 34 isolados de MNT provenientes de sítios estéreis em pacientes internados entre 2001 e 2006, sendo a maioria dos isolados identificada como *M. avium*, seguida por *M. monacense*, *M. kansasii* e *M. abscessus* em menores proporções (Senna *et al*, 2011). Em São Paulo foram estudados 76 isolados de micobactérias, que foram identificados como: CMTB (34%), *M. avium* (31%), *M. kansasii* (18,4%), *M. fortuitum* (5,2%), *M. gordone* (3,9%), *M. intracellulare* (2,6%), *M. nonchromogenicum* (1,3%), *M. chelone/abscessus* (1,3%) e *M. szulgai* (1,3%) (da Silva *et al*, 2001).

Desde 2004 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária tem divulgado a ocorrência de surtos isolados de MCR em várias Unidades Federadas brasileiras, incluindo Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Pará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo. Os números de casos variam entre as diversas localidades, sendo mais de 2.000 casos confirmados em todo o território nacional. Os surtos relacionados aos procedimentos cirúrgicos envolvem principalmente aqueles em que os instrumentos médicos foram desinfetados com soluções de glutaraldeído (Pitombo *et al*, 2009). O agente etiológico mais prevalente é a espécie *M. massiliense*, exceto nas infecções secundárias a mamoplastias, onde a maior prevalência é de *M. fortuitum* (Brasil, 2009).

O CRPHF, no Rio de Janeiro, estudou 590 culturas isoladas de 1994 a 1999, de várias regiões do país, identificadas por métodos bioquímicos clássicos e sonda genética e observou o isolamento preponderante do CMA (44,4%), seguidos de *M. kansasii* e *M. fortuitum*. Nas regiões sul e sudeste, observou-se um maior percentual de isolamento de MNT (57,6%), em relação às outras regiões do país (Barreto & Campos, 2000).

De acordo com dados da seção de Micobactérias do IPB-LACEN/RS, no período de 1995 a maio de 2005, foram enviadas ao CRPHF 211 culturas de MNT para identificação convencional, sendo 7 em 1995 e 37 em 2004, mostrando um aumento no isolamento dessas micobactérias no nosso Estado. As espécies de MNT mais isoladas foram o CMA (acima de 50%), seguidas de *M. abscessus*, *M. scrofulaceum* e *M. kansasii* (Ribeiro MO, comunicação pessoal).

3.5. Identificação das MNT

Os métodos para identificação de micobactérias são compostos inicialmente de testes para separação do CMTB das MNT. Posteriormente, e conforme a necessidade e capacidade do laboratório utilizam-se testes para diferenciação das espécies do CMTB e testes para identificação das MNT. A identificação das MNT pode ser feita através de testes fenotípicos (baseados em características culturais e bioquímicas) e testes genotípicos (metodologias moleculares de identificação) (Tortoli *et al*, 2003).

Os métodos culturais de identificação de micobactérias também foram aprimorados com a introdução de sistemas automatizados comerciais. Estes sistemas comerciais são baseados na promoção do crescimento das micobactérias em meio de cultura líquido, o que permite a identificação de micobactérias de forma mais rápida que a cultura convencional em meios de cultura sólidos. Os métodos culturais comerciais não permitem a identificação das espécies de micobactérias mas apenas a diferenciação entre o CMTB e as MNT. A diferenciação das espécies de MNT, após sua identificação nos sistemas comerciais, pode ser feita por análises moleculares posteriores (Sorlozano *et al*, 2009).

Como dito anteriormente, importância etiológica das MNT em infecções é difícil de ser estabelecida. Vários estudos têm tentado estabelecer critérios para o diagnóstico das infecções causadas pelas MNT, visto que essas espécies podem colonizar transitoriamente o homem. Embora exista certa variação entre esses critérios, todos enfatizam a importância do isolamento repetido do mesmo agente a partir de espécimes biológicos não-

estéreis ou obtenção de um cultivo puro de biópsia e/ou outros fluidos de sítios supostamente estéreis. Além disso, devem ser avaliados os sinais clínicos, radiológicos e/ou histopatológicos compatíveis com um quadro de infecção por MNT (Ueki *et al*, 2005).

As espécies de micobactérias podem apresentar diferenças no perfil de sensibilidade às drogas terapêuticas, sendo que a identificação precisa é crucial para a adoção de terapia medicamentosa adequada o que, em última análise, influencia na melhora clínica do paciente (da Silva *et al*, 2001). Além disso, a identificação mais rápida e confiável de micobactérias permite tratamento mais precoce do paciente (Richter *et al*, 2006).

Em um estudo realizado no Estado do Pará foram identificadas 4 diferentes espécies que pertencem ao *M. chelonae* e ao Complexo *M. fortuitum*, frequentemente descritos como causas de infecções pulmonares. Todos os pacientes infectados por estas MCR tinham sido diagnosticados como tuberculose pulmonar, e já tinham sido tratados por seis meses com rifampicina, isoniazida e pirazinamida, levando à falência do tratamento devido à identificação incorreta do microrganismo (da Costa *et al*, 2009).

As MNT representam, portanto, um desafio no diagnóstico e terapêutica por várias razões: 1) isolados patogênicos podem ser indistinguíveis de contaminantes ou isolados saprófitas; 2) a identificação imediata e confiável dos isolados depende de uma comunicação adequada entre clínicos e pessoal de laboratório; 3) falta de testes padronizados de susceptibilidade e 4) a falta de diretrizes de tratamento o que expõe os pacientes a drogas tóxicas. Alguns autores sugerem que a criação de laboratórios de pesquisa e estudos multicêntricos controlados são necessários para melhorar o diagnóstico e tratamento dessas infecções (Piersimoni & Scarparo, 2009).

3.5.1. Identificação Fenotípica

Os métodos fenotípicos de identificação de MNT incluem um conjunto de testes baseados em características culturais e bioquímicas, tais como: tempo e temperatura de crescimento, pigmentação, capacidade de crescimento

em meios seletivos e testes enzimáticos. Estes testes apresentam a vantagem de serem facilmente realizados, porém é necessário um longo período de incubação até que as micobactérias cresçam (Cook *et al*, 2003).

Embora a análise macroscópica (morfologia colonial, produção de pigmento e determinação do tempo de crescimento) e microscópica (avaliação do fator corda) auxiliem na diferenciação das espécies do CMTB e das MNT, a diferenciação fenotípica é comumente realizada através de testes bioquímicos como: 1) Inibição de crescimento em meio contendo ácido p-nitrobenzóico (PNB) e 2) Teste da Niacina (Brasil, 2008).

No entanto, outros testes fenotípicos para a identificação das diferentes espécies de MNT também podem ser realizados como crescimento a 25 °C, crescimento a 45 °C, inibição de crescimento em meio com NaCl 5%, hidrólise do tween 80, produção de β -galactosidase, redução do telurito de potássio, redução do nitrato, produção de uréase, pirazinamidase (Brasil, 2008).

3.5.2. Identificação Genotípica

Ao longo dos anos, foram desenvolvidos métodos alternativos de identificação de micobactérias para auxiliar no diagnóstico clínico. Estes métodos incluem testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), sequenciamento de DNA, sondas genéticas, dentre outros (Telenti *et al*, 1993; Richardson *et al*, 2009; van Soolingen *et al*, 1994; ATS, 2007; Adékambi & Drancourt, 2004; Coelho *et al*, 2008).

O desenvolvimento dos testes moleculares acelerou o diagnóstico, mas a maioria dos métodos ainda são caros e tecnicamente exigentes (Suffys *et al*, 2001).

Durante a última década, sistemas comerciais baseados em sondas genéticas foram desenvolvidos. Estão disponíveis como AccuProbe[®] (Gen-Probe Inc., USA) e INNO-LiPA Mycobacterium[®] (Innogenetics NV, Bélgica) e são alternativas importantes para o laboratório de diagnóstico, mas

caracterizam um número limitado de espécies (Miller *et al*, 2000; Scarparo *et al*, 2001; Menendez *et al*, 2001; Coelho *et al*, 2008; Suffys *et al*, 2001).

3.5.2.1 Testes baseados na PCR

3.5.2.1.1 PCR-Restriction Enzyme Analysis (PRA-*hsp65*)

Todos os organismos estudados até hoje respondem a aumentos súbitos de temperatura e outros tipos de stress aumentando a síntese de um grupo de proteínas altamente conservadas. Esta resposta é chamada resposta de choque térmico e as proteínas são denominadas proteínas de choque térmico (*hsp*). Estas proteínas são divididas em famílias com base em tamanho e conservação de sequências de aminoácidos. Uma das proteínas relacionadas ao choque térmico é a *hsp65*, pertencente à família *hsp60*.

Entre as micobactérias, a *hsp65* é uma proteína conservada que contém um número limitado de polimorfismos que são espécie-específicos e representam um alvo particularmente útil para identificação de espécies. Esse método diferencia a maioria das espécies de MNT, mas não as espécies do CMTB (Telenti *et al*, 1993).

O método PRA-*hsp65*, descrito por Telenti e colaboradores (1993) é baseado na amplificação de um fragmento de 441 pb do gene *hsp65*, o qual é posteriormente digerido com duas enzimas de restrição, *BstEII* e *HaeIII*. A determinação da espécie é possível comparando os padrões de restrição com um algoritmo, sendo que o tamanho e número dos fragmentos de restrição são, geralmente, espécie-específico (Steingrube *et al*, 1995). O algoritmo original foi modificado, sendo ampliado para 176 diferentes espécies de micobactérias (PRASITE). Este método não comercial tem sido utilizado para identificar as espécies de MNT e é, sem dúvida, o mais estudado (Häfner *et al*, 2004).

É um método relativamente rápido e não requer organismos viáveis, possibilitando a identificação de muitas espécies de MNT que não são identificáveis por técnicas fenotípicas ou quimiotaxonômicas (ATS, 2007). Este método tem sido utilizado para diagnóstico (Devallois *et al*, 1997; Taylor *et al*, 1997), determinações taxonômicas, separação das subespécies (Plikaytis *et al*, 1992; Telenti *et al*, 1993; Leão *et al*, 2010), caracterização de novas espécies (Springer *et al*, 1996) ou na melhor caracterização de espécies de

micobactérias já conhecidas (Picardeau *et al*, 1997). Estudos multicêntricos têm sido realizados para contribuir para a validação deste método (Leão *et al*, 2005).

Devido ao crescente número de alelos *hsp65* descritos na literatura, a interpretação visual é cada vez mais complexa e o uso de software para reconhecimento dos padrões para identificação, por vezes, é necessário. Por essa razão, construiu-se um banco de dados com os padrões obtidos com *BstEII* e *HaeIII* para isolados de cepas de referência e obtidos de amostras clínicas. Desta forma os padrões observados no PCR podem ser comparados aos padrões reportados no PRASITE, um site desenvolvido pelo Instituto de Microbiologia - Hospital Universitário de Lausanne, Suíça (CHUV), Instituto Pasteur - França, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL-SP) e Centro Nacional da Suíça para Micobactérias. Neste site estão disponíveis diferentes perfis de clivagem referentes a cada espécie de micobactérias (Chimara *et al*, 2008).

3.5.2.1.2 Sequenciamento de genes

Técnica mais sensível, considerada o padrão-ouro dentre os métodos de biologia molecular para estudo e identificação das espécies de micobactérias. Esta metodologia é baseada no sequenciamento de fragmentos de alguns genes conservados que são importantes para a diferenciação das espécies – *hsp65*, *rpoB* e 16S rRNA (Rocha *et al*, 1999; Rinquet *et al*, 1999; Adékambi & Drancourt, 2004).

Dentre os genes descritos acima, o sequenciamento do gene *hsp65* é o mais utilizado e permite a identificação a nível de espécie e subespécie. Este método pode ser utilizado para confirmar e refinar o resultado obtido pelo PRA-*hsp65* (Itoh *et al*, 2003).

3.5.2.1.3 Kit comercial GenoType[®] Mycobacterium CM

O teste baseia-se em uma técnica de PCR com segmentação de uma região do gene 23S rRNA, seguido por hibridização reversa para uma tira de nitrocelulose. Nesta membrana encontram-se sondas específicas imobilizadas (DNA-STRIP[®]) (Hain LifeScience[®]), que permitem a identificação das seguintes espécies de micobactérias: *M. avium* spp, *M. chelonae*, *M.*

abscessus, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoeense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. xenopi* e CMTB.

O procedimento completo é dividido em 3 passos: extração do DNA a partir de material cultivado, uma amplificação através de técnica de PCR multiplex com primers biotinizados e uma hibridização reversa, sendo realizado em 2 dias. A determinação da espécie é realizada com a ajuda de uma tabela de interpretação. Este teste tem mostrado bons resultados na identificação de MNT (Richter *et al*, 2006; Couto *et al*, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo

Estudo transversal, retrospectivo e prospectivo, realizado na Central de Biologia Molecular e Seção de Micobactérias do IPB-LACEN/RS.

4.2. Amostras

Foram utilizados isolados de MNT pertencentes ao banco de micobactérias da Seção de Micobactérias, do IPB-LACEN/RS e isolados recebidos prospectivamente no período de 2010 a 2011.

4.3. Isolamento de Micobactérias

Os isolados provenientes do banco de micobactérias que estavam armazenados a -20 °C, foram descongelados e imediatamente repicados, bem como os isolados da rotina, em meio Ogawa-Kudoh (OK) ou Löwestein-Jensen (LJ), sendo cultivados a 37 °C por um período de 1 a 8 semanas.

4.4. Identificação fenotípica

Os isolados foram diferenciados entre CMTB e MNT conforme recomendação do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (Brasil, 2008).

Após o período de incubação, as culturas foram avaliadas quanto à morfologia colonial, número de colônias e produção ou não de pigmento.

As provas bioquímicas realizadas foram: produção de niacina, fator corda e crescimento em meio contendo PNB (Brasil, 2008).

4.5. Identificação Genotípica

4.5.1. Extração de DNA

Foram utilizados três métodos de extração de DNA: um método enzimático (CTAB), extração por choque térmico e banho ultra-sônico.

4.5.1.1 Extração pelo método CTAB

As amostras semeadas na cultura foram submetidas à extração do DNA conforme técnica descrita por van Soolingen *et al* (1994). Neste processo a massa bacteriana (uma alçada) foi transferida para um tubo de microcentrífuga com 400 µL de TE 1X e em seguida colocada em banho-maria a 80 °C por 20 min para eliminação da viabilidade de todas as células. A lise bacteriana aconteceu através da adição de 50 µL de lisozima a 10 mg/mL, sob agitação e incubação durante a noite, a 37 °C. Depois da incubação foram adicionados 75 µL da solução SDS 10%/Proteinase K, foi incubada em banho-maria a 65 °C por 10 min. Após, foi adicionado 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de CTAB/NaCl (solução pré-aquecida a 65 °C) e a mistura foi ressuspensa em vórtex e incubada no banho-maria a 65 °C por 10 min. Nesta etapa a mistura assumiu uma forma leitosa e adicionou-se 750 µL da solução de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1, seguido de homogeneização e centrifugação por 5 min a 12.000 rpm. Depois da centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga, foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol para precipitação dos ácidos nucleicos, e a mistura incubada a -20 °C por 30 min. Após a incubação, a mistura foi centrifugada por 15 min a 12.000 rpm e o sobrenadante foi removido, seguido da adição de 1 mL de etanol 70% gelado para lavagem do resíduo de DNA. Depois uma nova centrifugação de 5 min a 12.000 rpm, o etanol foi removido. O resíduo de DNA foi colocado para secar por 30 min a temperatura ambiente. Depois de seco, adicionou-se 30 µL de TE 1X. O DNA extraído foi incubado a 4 °C pelo menos dois dias, para ressuspensão completa do DNA, e estocado a -20 °C. O produto da extração foi checado em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed™ (Biotium, USA) e visualizado em transluminador com UV (Leão *et al*, 2004).

4.5.1.2 Extração pelo método de choque térmico

Foram retiradas de 2 a 3 alçadas do crescimento micobacteriano da cultura sendo suspendidas num microtubo em 500µL de água ultra pura (Gibco®). A mistura foi agitada no vórtex, em seguida a mistura foi submetida ao banho-maria por 20 min a 99°C. Depois do banho-maria as amostras foram congeladas a -20°C durante 12 a 14 horas. No momento do uso os extratos

foram descongelados e submetidos à centrifugação a 12.000 rpm por 60 seg. Para a reação de PCR foram utilizados 10 µL da extração (Chimara *et al*, 2004).

4.5.1.3 Extração por banho ultra sônico

O crescimento micobacteriano foi suspenso em 300 µL de água e aquecido a 95 °C por 20 min para inativação das micobactérias. Em seguida foram incubadas durante 15 min em um banho ultrasônico (Elma®), conforme instruções do fabricante. Após, foram centrifugadas durante 5 min a velocidade de 13.000 rpm. Foram utilizados 2 µL do sobrenadante para a reação da PCR.

4.6. PCR com análise por enzimas de restrição (PRA-*hsp65*)

4.6.1 Oligonucleotídeos para reação da PCR

Os oligonucleotídeos (iniciadores) foram construídos baseados na região de interesse do gene *hsp65*. Foram utilizados os iniciadores: Tb 11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb 12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCT) que amplifica um fragmento de 441pb (Telenti *et al*, 1993) (Figura 3).

```
ATGGCCAAGACAATTGCGTACGACGAAGAGGCCCGTCGCGGCCTCGAGCGGGGGCTCAACGCC
CTCGCCGACGCGGTAAAGGTCACGTTGGGCCCAAGGGTCGCAACGTCGTCTGGAGAAGAAG
TGGGGTGCCCCACGATCACCAACGATGGTGTGTCCATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGAC
CCGTACGAGAAATCGGCGCCGAGCTGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACCGACGACGTCGCCG
GTGACGGCAGCAGACGGCCACGGTGCTCGCCAGGCGTTGGTCCGCGAGGGCCTGCGCAACG
TCGCGGCCGGCGCCAACCCGCTGGGTCTCAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGGTCA
CCGAGACCCTGCTCAAGTCGGCCAAGGAGGTGAGACCAAGGACCAGATCGCTGCCACCGCGG
CCATCTCCGCGGGCGACCAGTCGATCGGCGACCTGATCGCCGAGGCGATGGACAAGGTCGGCA
ACGAGGGCGTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGCCTGCAGCTCGAGCTCACCGAGG
GTATGCGGTTTCGACAAGGGTTACATCTCGGGCTACTTCGTCACCGACGCCGAGCGTCAGGAAG
CCGTCTCGAGGACCCGTTTCATCCTGCTG
```

Figura 3: Sequência parcial do gene *hsp65* indicando os iniciadores (regiões em amarelo e em cinza) e o produto amplificado (sequência interna).

4.6.2 Reação da PCR

A PCR foi padronizada utilizando 20 ng de DNA de micobactérias, 25 pmol dos iniciadores Tb 11 e Tb 12 (Telenti *et al*,1993), tampão 10X (20 mM Tris-HCl pH 8; 1,5 mM MgCl₂; 50mM KCl); 0,2 mM de cada deoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTPs), 10% de glicerol, e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase em 50 µL de reação. Para otimizar a reação de amplificação foi utilizado 5 µL PCRx Enhancer System (InvitrogenTM). A PCR amplifica um produto de 441pb do gene *hsp65* (Figura 5).

4.6.3 Controle de Qualidade da reação da PCR

Como controle de qualidade foram utilizados dois controles: o controle positivo (DNA de *M. tuberculosis* H37Rv) e o controle negativo (água ultrapura - Gibco®).

4.6.4 Condições da reação da PCR

A reação de PCR foi realizada em termociclador automático (MaxyGene Gradient Thermal Cycler, modelo Therm 1000) utilizando as seguintes condições: 10 min a 95 °C (pré-desnaturação), depois 1 min a 94 °C (desnaturação), 1 min a 60 °C (anelamento), 1 min a 72 °C (extensão), totalizando 45 ciclos, e mais um ciclo de 7 min a 72 °C, para extensão final do fragmento.

4.6.5 Detecção do produto amplificado

Os produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese (100V) em gel de agarose 2% E-Gel® (InvitrogenTM) visualizados em transluminador de UV. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (InvitrogenTM). Quando positivos, os produtos foram digeridos por enzimas de restrição.

4.6.6 Clivagem pelas enzimas de restrição

O produto amplificado foi submetido à clivagem por duas enzimas de restrição: *BstEII* e *HaeIII* (Promega®, USA). Para digestão do fragmento com a *BstEII* foram utilizados 18µL de produto do PCR contendo 10U da enzima, o mesmo foi feito para enzima *HaeIII*, contendo 10U, realizada em termociclador automático (MaxyGene Gradient Thermal Cyclor, modelo -Therm-1000) a 60 °C por 3 horas para enzima *BstEII* e em termociclador automático (Mastercycler EpGradient S) a 37 °C por 3 horas para enzima *HaeIII*. As enzimas clivaram o fragmento parcial do gene *hsp65* nas regiões específicas C e G ([GGCC] = sítio de reconhecimento da enzima *Hae III*; [GGACTCC] = sítio de reconhecimento da enzima *BstE II*)

4.6.7 Análise da clivagem

A análise dos produtos clivados foi realizada em gel de agarose 4% preparado com TEB 0,5X, corado com GelRed™, utilizando o marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen™). A corrida eletroforética foi realizada em duas etapas: 60 V por 30 min, e 80 V por 2h e 30 min. O tamanho dos fragmentos clivados foram estimados quando comparados com o marcador de peso molecular. O gel foi fotodocumentado e a imagem analisada inicialmente utilizando a chave de identificação (Figura 4), e após comparando com os padrões já existentes no banco de espécies do programa disponível no PRASITE.

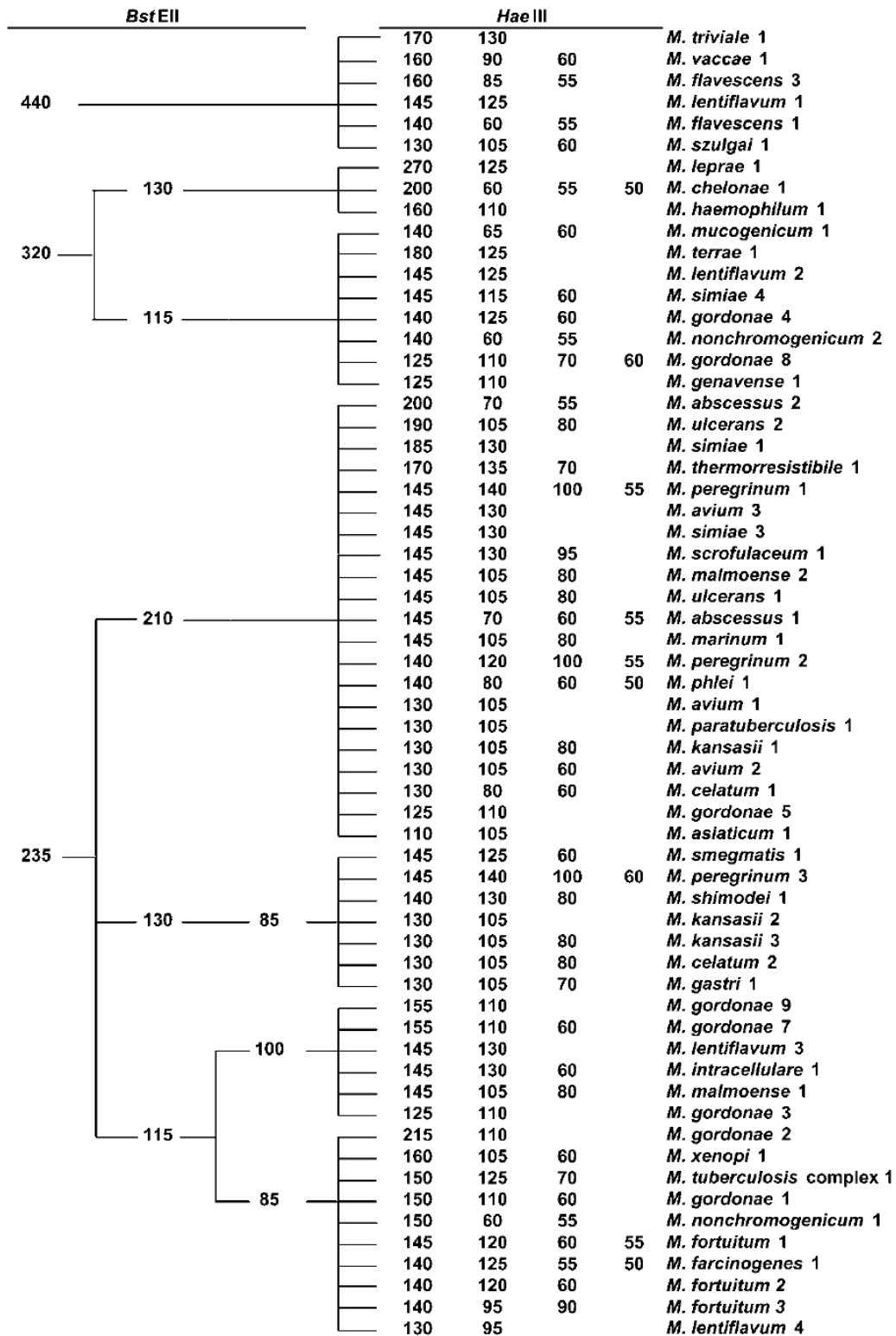


Figura 4. Exemplo de parte da chave de identificação de espécies de MNT pelo método molecular PRA-*hsp65*.

Fonte: Leão *et al.*, 2004.

4.7. Sequenciamento do gene *hsp65*

O fragmento de 441 pb do gene *hsp65* foi amplificado e visualizado em gel de agarose 2%, foram submetidos à eletroforese (100V) e visualizados no transluminador de UV.

4.7.1. Purificação

Os produtos amplificados foram purificados utilizando PEG 8000/2.5M NaCl, conforme o site <http://pubmlst.org/neisseria/info/pcr.shtml>.

4.7.2. Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) utilizando o equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram amplificados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* Tb 11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb 12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCT) e 1 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 1 min seguida de 35 ciclos de 96 °C por 15 seg, 50 °C por 15 seg e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com *BigDye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems) e eletroinjetadas no sequenciador automático.

As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Chromas™, versão 2.3 através dos cromatogramas fornecidos após o sequenciamento. O alinhamento das sequências foi realizado no programa DNASTAR - Lasergene 7, e a análise comparativa foi realizada no BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

4.8. GenoType[®] Mycobacterium CM

4.8.1. Extração de DNA

O DNA foi extraído através de banho ultrasônico, como descrito no item “4.5.1”.

4.8.2. Amplificação do DNA pela PCR

Na reação da cadeia de polimerase foi utilizado 35 µL de PNM (mistura primer/nucleotídeo), 5 µL de tampão de PCR 10x, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase em 45 µL de reação.

A reação de PCR foi realizada em termociclador automático (MaxyGene Gradient Thermal Cycler, modelo Therm 1000), utilizando as seguintes condições: 1 ciclo de 5 min a 95 °C, seguida de 10 ciclos de 30 seg a 95 °C e 2 min a 58 °C, 20 ciclos de 25 seg a 95 °C, 40 seg a 53 °C e 40 seg a 70 °C e finalizando com 1 ciclo de 8 min a 70 °C.

4.8.3. Hibridização

Foram dispensados 20 µL da Solução de Desnaturação (DEN) em cada poço utilizado para a reação. Em seguida, foram adicionados 20 µL do produto amplificado. Foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 1 mL de Tampão de Hibridização (HYB) pré-aquecido. Após homogeneização, adicionou-se uma tira em cada poço. A mistura foi colocada em banho de água com agitação/TwinCubator[®] durante 30 min a 45 °C. A seguir, o tampão é aspirado e adicionado 1 mL de Solução de Lavagem Adstringente (STR) a cada tira e incubado em banho de água com agitação/TwinCubator[®] durante 15 min a 45 °C. A solução de lavagem adstringente foi removida completamente. Em seguida, cada tira foi lavada com 1mL de Solução Rinse (RIN) durante 1 min na plataforma de agitação/ TwinCubator[®]. A solução foi removida e lavada duas vezes com água destilada por 1 min. Por fim, adicionou-se 1 mL de substrato diluído a cada tira e incubou-se por 5 min sem agitação.

4.8.4. Avaliação e Interpretação dos resultados

As tiras foram coladas em uma ficha de avaliação, fornecida com o kit, alinhando-se as bandas Controle de Conjugado (CC), Controle Universal (UC) e Controle do Gênero (GC) com as respectivas linhas na ficha. As bandas positivas foram anotadas e a determinação da espécie foi realizada com a ajuda da uma tabela de interpretação. Cada tira possui em total de 17 zonas de reação. A figura da tira reativa e a tabela de interpretação dos resultados deste kit encontram-se no ANEXO I.

Os padrões de hibridização 1, 2 e 3 referem-se aos controles da reação, onde 1 refere-se ao CC, 2 refere-se ao UC e 3 refere-se ao GC.

4.9. Avaliação de custos dos insumos das técnicas de PRA-*hsp65* e GenoType[®] Mycobacterium CM

Os custos dos insumos foram analisados levando-se em consideração os materiais de consumo direto utilizados na técnica de PRA-*hsp65* e o valor total do kit GenoType[®] Mycobacterium CM. Além disso, as técnicas foram avaliadas conforme o numero total de amostras possíveis de se analisar concomitantemente.

5. RESULTADOS

5.1. Isolados

No período do estudo foram recebidas pelo IPB/LACEN-RS 183 isolados de MNT. Neste estudo, 93 isolados de MNT (50,8%) foram analisados tanto pela técnica de PRA-*hsp65* quanto pelo GenoType[®] Mycobacterium CM. O sequenciamento foi realizado, aleatoriamente, em 87 destes isolados, desde que tivessem sido analisadas por ambos os métodos (PRA-*hsp65* e GenoType[®] Mycobacterium CM). Foram incluídas 3 amostras do CMTB para caracterizar o poder discriminatório dos dois métodos na identificação de MNT. Os outros 6 isolados foram identificados tanto pela técnica de PRA-*hsp65* quanto pelo GenoType[®] Mycobacterium CM, porém não foram sequenciados.

5.2. Identificação Genotípica

5.2.1. Extração de DNA

Primeiramente foi utilizada a extração por choque térmico, por ser a técnica de extração de DNA preconizada para a técnica de PRA-*hsp65* (Leão *et al*, 2004). Como não se mostrou eficiente, realizou-se a extração pelo método de CTAB. Após a aquisição do kit GenoType[®] Mycobacterium CM, as extrações foram realizadas por banho ultra-sônico.

5.2.2. Sequenciamento do gene *hsp65*

O gene *hsp65* foi sequenciado para servir de padrão-ouro nas análises comparativas entre os métodos PRA-*hsp65* e GenoType[®] Mycobacterium CM.

O gene *hsp65* foi escolhido para o seqüenciamento para garantir uma melhor correlação dos resultados com a técnica de PRA-*hsp65*, já que utiliza a mesma região genômica como alvo da clivagem.

5.2.3. PRA-*hsp65*

As amostras foram submetidas ao método PRA-*hsp65*, onde os fragmentos clivados foram estimados quando comparados com o marcador de peso molecular (Figura 5).

O gel foi fotodocumentado e a imagem analisada inicialmente utilizando a chave de identificação. Os padrões de clivagem dos DNAs foram analisados utilizando o PRASITE, disponibilizado na internet, que segue um algoritmo dos diferentes padrões de clivagem para identificação de micobactérias.

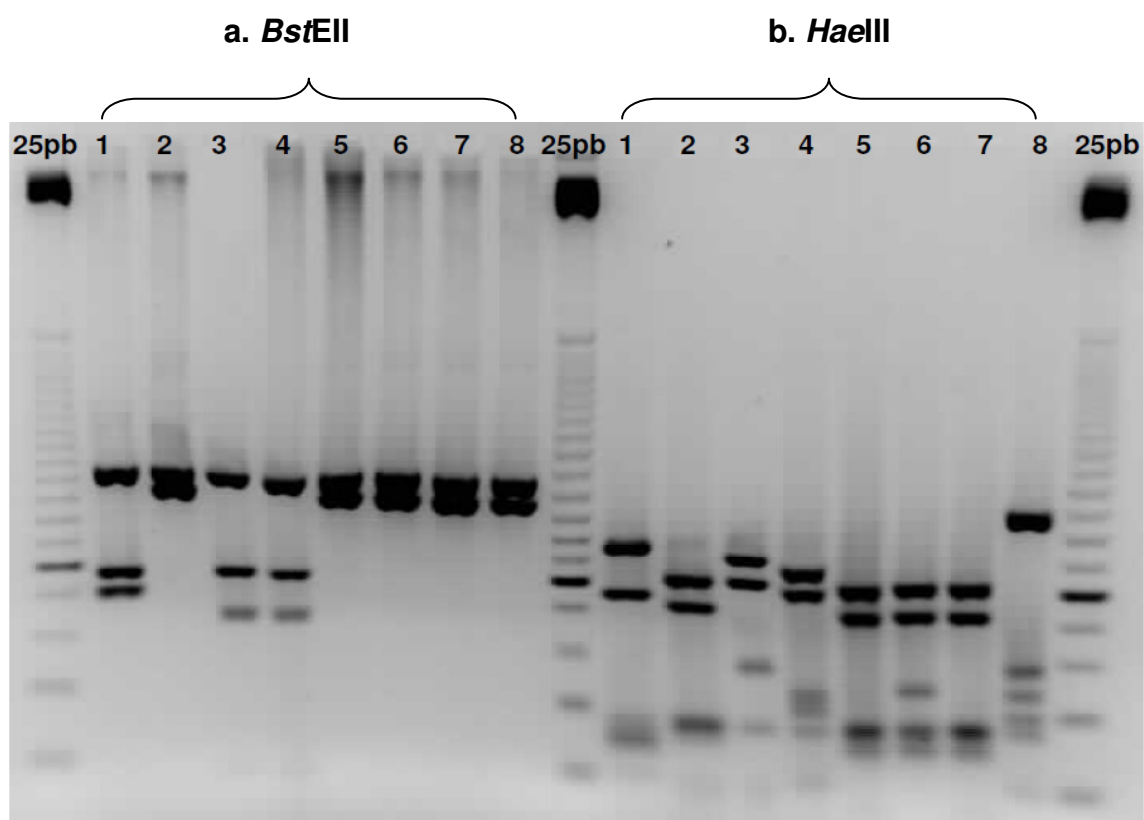


Figura 5: Gel de agarose 4% corado com GelRed™ e visualizado em transluminador UV. Clivagem do produto amplificado de 8 amostras com as enzimas *BstEII* e *HaeIII*. 25 bp: marcador de peso molecular de 25 pares de base; a. padrões de clivagem obtidos com a enzima *BstEII*; b. padrões de clivagem obtidos com a enzima *HaeIII*.

Legenda:

Amostra 1: *M. goodnae* tipo 7 (*BstEII*: 235/120/100; *HaeIII*: 155/110)

Amostras 2, 5, 7: *M. avium* tipo 1 (*BstEII*: 235/210; *HaeIII*: 130/105)

Amostra 3: *M. tuberculosis* H37Rv (controle positivo) (*BstEII*: 235/120/85; *HaeIII*: 150/130/70)

Amostra 4: *M. fortuitum* tipo 2 (*BstEII*: 235/120/85; *HaeIII*: 140/120/60)

Amostra 6: *M. avium* tipo 2 (*BstEII*: 235/210; *HaeIII*: 130/105/60)

Amostra 8: *M. abscessus* tipo 2 (*BstEII*: 235/210; *HaeIII*: 200/70/60)

Das 96 amostras analisadas pelo PRA-*hsp65*, 31 (32,3%) foram identificadas como *M. avium* tipo 1; 12 (12,5%) *M. intracellulare* tipo 1; 10 (10,4%) *M. abscessus* tipo 1; 8 (8,3%) *M. avium* tipo 2; 7 (7,3%) *M. kansasii* tipo 1; 6 (6,2%) *M. abscessus* tipo 2; 5 (5,2%) *M. fortuitum* tipo 1; 5 (5,2%) *M. fortuitum* tipo 2; 2 (2,1%) *M. gordonae* tipo 3; 2 (2,1%) *M. gordonae* tipo 7; 1 (1,06%) *M. kansasii* tipo 4; 1 (1,6%) *M. xenopi*; 1 (1,06%) *M. brisbanense*; 1 (1,06%) *M. sherisii* e 3 (3,1%) CMTB (Tabela 4).

Tabela 4: Identificação de espécies com o perfil de fragmentos gerados pelo PRA-*hsp65*.

Nº de amostras (n = 96)	<i>Bst</i> EI	<i>Hae</i> III	Espécie
31	235/210	130/105	<i>M. avium</i> tipo 1
12	235/120/100	145/130/60	<i>M. intracellulare</i> tipo 1
10	235/210	145/70/60	<i>M. abscessus</i> tipo 1
8	235/210	130/105/60	<i>M. avium</i> tipo 2
7	235/210	130/105/80	<i>M. kansasii</i> tipo 1
6	235/210	200/70/60	<i>M. abscessus</i> tipo 2
5	235/120/85	145/120/60	<i>M. fortuitum</i> tipo 1
5	235/120/85	140/120/60	<i>M. fortuitum</i> tipo 2
2	235/120/100	125/110	<i>M. gordonae</i> tipo 3
2	235/120/100	155/110	<i>M. gordonae</i> tipo 7
1	235/120/100/85	130/115/75/60	<i>M. kansasii</i> tipo 4
1	235/120/85	160/105/60	<i>M. xenopi</i> tipo 1
1	235/120/100	130/105/80	<i>M. brisbanense</i>
1	235/120/85	145/130	<i>M. sherisii</i>
3	235/120/85	150/130/ 70	CMTB

5.2.4. GenoType® Mycobacterium CM

As 96 amostras submetidas ao método PRA-*hsp65* também foram submetidas ao kit comercial GenoType® Mycobacterium CM.

Das 96 amostras analisadas pelo GenoType® Mycobacterium CM, 34 (35,4%) foram identificadas como *M. avium*; 17 (17,7%) *M. intracellulare*; 16 (16,6%) *M. abscessus*; 10 (10,4%) *M. fortuitum*; 9 (9,4%) *M. kansasii*; 4 (4,2%) *M. gordonae*; 1 (1,1%) *M. xenopi*; 2 (2,1%) sem perfil e 3 (3,1%) CMTB (Tabela 5).

Tabela 5: Identificação das espécies com o padrão de hibridização do GenoType[®] Mycobacterium CM.

Nº de amostras (n = 96)	Padrão de hibridização	Espécie
34	1, 2, 3, 4	<i>M. avium</i>
17	1, 2, 3, 9	<i>M. intracellulare</i>
16	1, 2, 3, 5, 6, 10	<i>M. abscessus</i>
10	1, 2, 3, 7, 14	<i>M. fortuitum</i>
9	1, 2, 3, 10, 12	<i>M. kansasii</i>
4	1, 2, 3, 8, 10	<i>M. gordonae</i>
1	1, 2, 3, 17	<i>M. xenopi</i>
2	1, 2, 3	Sem perfil
3	1, 2, 3, 10, 16	CMTB

5.2.5. Comparação dos resultados entre o PRA-*hsp65* e o GenoType[®] Mycobacterium CM

Entre as 87 espécies que foram sequenciadas, 43 (49,4%) foram identificadas como *M. avium*; 11 (12,6%) *M. intracellulare*; 10 (11,5%) *M. abscessus* tipo 1; 8 (9,2%) *M. fortuitum*; 6 (6,9%) *M. abscessus* tipo 2; 4 (4,6%) *M. gordonae*; 1 (1,2%) *M. kansasii*; 1 (1,2%) *M. xenopi* e 3 (3,4%) CMTB.

O método de PRA-*hsp65* apresentou 91% de concordância com o sequenciamento, identificando corretamente 79 espécies, enquanto o método GenoType[®] Mycobacterium CM apresentou 92% de concordância com o sequenciamento, identificando corretamente 80 espécies.

Entre as 43 espécies identificadas como *M. avium*, houve concordância em 36 (84%) entre o PRA-*hsp65* e o GenoType[®] Mycobacterium CM, sendo que o PRA-*hsp65* diferenciou 27 espécies de *M. avium* tipo 1 e 9 de *M. avium* tipo 2.

Entre as 11 identificadas como *M. intracellulare*, houve concordância em 11 (100%) das espécies analisadas pelos dois métodos, onde o PRA-*hsp65* diferenciou a espécie como *M. intracellulare* tipo 1.

Entre as 10 espécies identificadas como *M. abscessus* tipo 1, houve concordância em 8 (80%) das espécies analisadas pelos dois métodos.

Houve concordância entre as 8 espécies identificadas como *M. fortuitum* pelos dois métodos, sendo que o PRA-*hsp65* diferenciou 5 espécies como *M. fortuitum* tipo 1 e 3 como *M. fortuitum* tipo 2.

Houve concordância entre todas as 6 espécies identificadas como *M. abscessus* tipo 2 pelos dois métodos, embora o GenoType® Mycobacterium CM não identifique os subtipos desta espécie.

Houve concordância entre as 4 espécies identificadas como *M. gordonae* pelos dois métodos, sendo que o PRA-*hsp65* diferenciou 2 espécies como *M. gordonae* tipo 7 e 2 como *M. gordonae* tipo 3.

Houve concordância entre as 3 espécies identificadas como CMTB, pelos dois métodos (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados concordantes obtidos pelo PRA-*hsp65* e o GenoType® Mycobacterium CM conforme o sequenciamento.

Espécies*	Isolados (n = 76)	PRA- <i>hsp65</i>	GenoType® Mycobacterium CM
		Identificação	Identificação
<i>M. avium</i>	27	<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. avium</i>
<i>M. avium</i>	9	<i>M. avium</i> tipo 2	<i>M. avium</i>
<i>M. intracellulare</i>	11	<i>M. intracellulare</i> tipo 1	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. abscessus</i> tipo 1	8	<i>M. abscessus</i> tipo 1	<i>M. abscessus</i>
<i>M. abscessus</i> tipo 2	6	<i>M. abscessus</i> tipo 2	<i>M. abscessus</i>
<i>M. fortuitum</i>	5	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. fortuitum</i>	3	<i>M. fortuitum</i> tipo 2	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. gordonae</i>	2	<i>M. gordonae</i> tipo 7	<i>M. gordonae</i>
<i>M. gordonae</i>	2	<i>M. gordonae</i> tipo 3	<i>M. gordonae</i>
CMTB	3	CMTB	CMTB

* Identificadas por sequenciamento do gene *hsp65*.

Foi possível observar discordância, em pelo menos um dos métodos, na identificação das espécies em 11 amostras analisadas. Entre as 7 amostras discordantes de *M. avium*, o PRA-*hsp65* identificou 4 como *M. kansasii*, o GenoType® Mycobacterium CM também identificou as mesmas 4 como *M. kansasii* e mais 3 como *M. intracellulare*. Duas espécies de *M. abscessus* tipo 1 foram identificadas pelo PRA-*hsp65* como *M. intracellulare* tipo 2, embora o GenoType® Mycobacterium CM tenha identificado-as corretamente. Duas espécies identificadas como *M. kansasii* e *M. xenopi* foram identificadas pelo PRA-*hsp65* como *M. avium* tipo 1, embora o GenoType® Mycobacterium CM tenha identificado-as corretamente (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados discordantes obtidos pelo PRA-*hsp65* ou o GenoType[®] Mycobacterium CM conforme o sequenciamento.

Espécies*	Isolados (n = 11)	PRA- <i>hsp65</i>	GenoType [®] Mycobacterium CM
		Identificação	Identificação
<i>M. avium</i>	4	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>
<i>M. avium</i>	3	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. abscessus</i> tipo 1	2	<i>M. intracellulare</i> tipo 2	<i>M. abscessus</i>
<i>M. kansasii</i>	1	<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. kansasii</i>
<i>M. xenopi</i>	1	<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. xenopi</i>

* Identificadas por sequenciamento do gene *hsp65*.

Os dois métodos analisados apresentaram 92% de concordância na identificação das espécies entre si, utilizando as 96 amostras analisadas.

Entre 9 amostras discordantes entre os dois métodos, o PRA-*hsp65* não identificou os isolados de *M. kansasii*, *M. xenopi* e identificou incorretamente *M. intracellulare* tipo 2. Já o GenoType[®] Mycobacterium CM divergiu do PRA-*hsp65* nas espécies *M. avium*/*M. intracellulare*. Além disso, duas amostras não apresentaram perfil no GenoType[®] Mycobacterium CM (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados discordantes obtidos entre o PRA-*hsp65* e o GenoType[®] Mycobacterium CM.

PRA- <i>hsp65</i> Identificação	GenoType [®] Mycobacterium CM Identificação
<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. kansasii</i>
<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. xenopi</i>
<i>M. intracellulare</i> tipo 2	<i>M. abscessus</i>
<i>M. intracellulare</i> tipo 2	<i>M. abscessus</i>
<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. avium</i> tipo 1	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. avium</i> tipo 2	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. sherisii</i>	Sem perfil
<i>M. brisbanense</i>	Sem perfil
N = 11	

5.3. Comparação dos custos de insumos das técnicas de PRA-*hsp65* e GenoType[®] Mycobacterium CM

O PRA-*hsp65* apresentou um custo de insumos final de R\$ 10,70/amostra, enquanto que o GenoType[®] Mycobacterium CM apresentou um custo de R\$ 45,00/amostra. No entanto, para realizar a técnica de PRA-*hsp65*

foram necessários 5 dias até a emissão do resultado final sendo que é possível analisar até 8 amostras concomitantemente. A técnica de GenoType® Mycobacterium CM necessitava apenas 2 dias até a emissão dos resultados e permite a análise de até 12 amostras concomitantes (Tabela 9).

Tabela 9: Custos de insumos e tempo de liberação por amostra processada - PRA-*hsp65* versus GenoType® Mycobacterium CM

	PRA-<i>hsp65</i>	GenoType® Mycobacterium CM
Valor/ amostra	R\$ 10,70	R\$ 45,00
Tempo para liberação do laudo final	5 dias	2 dias
Nº amostras processadas concomitantemente	8	12

6. DISCUSSÃO

A identificação precisa das MNT é um processo demorado e laborioso e, muitas vezes, não é possível devido ao aumento do número de espécies de *Mycobacterium* com sobreposição de características fenotípicas. Desta forma, procedimentos bioquímicos convencionais são incapazes de distinguir as mais de 150 espécies de micobactérias (Euzéby, 2009). Os principais problemas na diferenciação das micobactérias a nível de espécie incluem a diversidade de métodos bioquímicos existentes e o tempo necessário para uma completa identificação (Telenti *et al*, 1993).

Neste estudo foram avaliados dois métodos moleculares (PRA-*hsp65* e GenoType[®] Mycobacterium CM) para a identificação de espécies de MNT através da comparação com os resultados de sequenciamento parcial do gene *hsp65*. Com exceção das espécies *M. kansasii* e *M. xenopi*, outras 10 espécies foram corretamente identificadas pelo PRA-*hsp65*. O método de GenoType[®] Mycobacterium CM apresentou dificuldades na capacidade de distinguir *M. avium* de *M. intracellulare*. No entanto, estas espécies fazem parte de um mesmo complexo (CMA) e são de difícil diferenciação com outros métodos laboratoriais pela sua alta homologia genômica.

Um estudo realizado no Brasil destacou as vantagens na utilização de técnicas moleculares como uma importante ferramenta na identificação de MNT. Chimara e colaboradores (2008) avaliaram 434 isolados de MNT a partir de espécimes clínicos, que foram analisados por métodos fenotípicos convencionais e pelo PRA-*hsp65* e comparados ao sequenciamento do gene *hsp65*. Entre os 434 isolados, o método PRA-*hsp65* forneceu a correta identificação em 392 (90,3%), enquanto os testes fenotípicos identificaram corretamente apenas 338 (77,9%). Além disso, foi demonstrado que o PRA-*hsp65* permitiu a redução do tempo para o diagnóstico final quando comparado à identificação fenotípica.

No nosso estudo não foram utilizados testes fenotípicos convencionais para a identificação de MNT, mas os resultados da técnica de PRA-*hsp65*, em comparação ao sequenciamento, foram similares (acima de 90%) aos resultados obtidos no estudo citado acima. Não identificamos relatos no Brasil de estudos utilizando o GenoType[®] Mycobacterium CM o qual, como

mencionado acima, mostrou-se bastante discriminatório para identificação de MNT em relação a técnica padrão-ouro (sequenciamento). É importante mencionar que um estudo realizado na Alemanha avaliou a técnica GenoType® Mycobacterium CM em relação ao seqüenciamento do gene 16S rRNA, encontrando uma concordância de 92,6% (Richter *et al*, 2006), que é equivalente ao percentual de concordância encontrado no nosso estudo (92%), o qual utilizou o seqüenciamento do gene *hsp65*.

A questão taxonômica das espécies de MNT é complexa e se altera muito frequentemente com o passar do tempo. Isso torna mais difícil a avaliação das eventuais discrepâncias encontradas entre dois métodos quando se avalia espécies muito similares. Este aspecto fica evidente na identificação dos membros do grupo *M. chelonae-M. abscessus*, onde análises fenotípicas e genotípicas extensas demonstraram que *M. massiliense* e *M. bolletii* não podem ser separados do grupo, apoiando a proposição de que representam uma única espécie (Leão *et al*, 2011).

O padrão denominado *M. abscessus* tipo 2 pelo PRA-*hsp65* foi caracterizado através de sequenciamento como *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Leão *et al*, 2010). Portanto, as duas subespécies de *M. abscessus* podem ser distinguidas genotipicamente por padrões diferentes do PRA-*hsp65*: o padrão *M. abscessus* tipo 1 para *M. abscessus* subsp. *abscessus* e o padrão *M. abscessus* tipo 2 para *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Leão *et al*, 2009).

O PRA-*hsp65* discrimina as espécies por subtipos enquanto o GenoType® Mycobacterium CM não apresenta esta capacidade. A diferenciação em tipos é extremamente relevante e fica bem evidente nas espécies do grupo *M. abscessus-M. chelonae*, onde a espécie *M. abscessus* tipo 1 está mais relacionada a doenças pulmonares (ATS, 2007), enquanto *M. abscessus* tipo 2 está relacionada a abscessos cutâneos com ocorrência de surtos, inclusive em diversos locais no Brasil (Viana-Niero *et al*, 2008; Cardoso *et al*, 2008; da Costa *et al*, 2009; Duarte *et al*, 2009). Assim, embora os dois métodos apresentem uma boa acurácia, o PRA-*hsp65* tem a vantagem de oferecer resultado de maior significado epidemiológico.

A identificação correta é extremamente impactante na conduta médica, pois serão levados em consideração a espécie, o grau de infecção, a

sintomatologia e o estado imunológico do paciente associado a outros exames, gerando um diagnóstico mais preciso e, conseqüentemente, um melhor tratamento disponibilizado aos pacientes. Cabe ressaltar que os tratamentos são distintos para as MNT de crescimento lento e rápido. As MNT de crescimento lento são submetidas a esquema semelhante ao tratamento de tuberculose de 18 a 24 meses, enquanto as MCR são tratadas com drogas parenterais, com duração de tratamento de 4 a 6 meses (Nota técnica conjunta Nº 1/2009/SVS/MS e ANVISA; Nota Técnica Nº 2/DEVEP/SVS/MS).

O método PRA-*hsp65* tem sido utilizado em muitos laboratórios para identificação de MNT, onde se tem descrito a sua importância na diferenciação de inúmeras espécies de MNT, bem como a redução no tempo necessário desta identificação (Häfner *et al*, 2004; Chimara *et al*, 2008; Senna *et al*, 2011). No entanto, técnicas comerciais (como o GenoType® Mycobacterium CM) tem ganhado importância por sua praticidade, embora ainda apresentem custos mais elevados. Além disso, este teste, especificamente, avalia apenas 16 espécies de MNT.

Na comparação dos custos entre os dois métodos, foi possível verificar que o PRA-*hsp65* apresentou um valor final consideravelmente inferior ao do GenoType® Mycobacterium CM, porém necessita de um prazo mais longo até a emissão do resultado final, sendo que o PRA-*hsp65* analisa 8 amostras concomitantemente, enquanto o GenoType® Mycobacterium CM analisa até 12 amostras. Porém, o GenoType® Mycobacterium CM requer a utilização de equipamentos específicos e exclusivos para a sua utilização.

A avaliação dos resultados observados neste estudo demonstra que, a aplicabilidade do PRA-*hsp65* aumenta a qualidade e rapidez do resultado final (em relação às técnicas fenotípicas tradicionais ou a terceirização de identificação em centros de referência), entretanto, algumas características fenotípicas devem ser levadas em consideração que podem ser fundamentais na complementação de técnicas moleculares. O PRA-*hsp65* mostrou-se discriminatório, de baixo custo e relativamente de fácil execução na identificação de micobactérias.

7. CONCLUSÕES

Os isolados de MNT utilizados no estudo foram caracterizados pelos métodos de PRA-*hsp65* e GenoType[®] Mycobacterium CM, os quais se mostraram bastante discriminatórios na identificação de diferentes espécies de MNT.

O sequenciamento parcial do gene *hsp65* foi realizado para caracterizar os isolados de MNT, o qual se mostrou eficiente nas identificações, não apresentando resultados ambíguos.

O método PRA-*hsp65* foi avaliado e validado, o que permitiu sua implementação no IPB/LACEN-RS como uma ferramenta de identificação mais rápida e precisa de MNT (quando comparado à identificação fenotípica), utilizando o sequenciamento parcial do gene *hsp65* como “padrão ouro”. O PRA-*hsp65* discriminou um número maior de espécies em relação ao GenoType[®] Mycobacterium CM e não dependeu de equipamentos específicos e exclusivos que acompanharam o método comercial.

O Kit comercial GenoType[®] Mycobacterium CM demonstrou ser uma importante alternativa, pois é bastante discriminatório na identificação das espécies mais comuns de MNT.

Em relação aos custos referentes aos dois métodos, foi possível estabelecer que o PRA-*hsp65* apresentou um valor final, por amostra, consideravelmente inferior ao do GenoType[®] Mycobacterium CM. No entanto, a técnica comercial necessita um prazo mais curto (2 dias) para ser realizada em comparação com a técnica PRA-*hsp65* (requer 5 dias).

Finalmente, é possível concluir que ambas as técnicas moleculares avaliadas neste estudo apresentaram uma ótima capacidade de identificação de MNT, podendo ser utilizadas em laboratórios clínicos de rotina. A implementação destas técnicas, no entanto, dependerá das características dos diferentes laboratórios bem como as necessidades clínicas das diferentes instituições. De toda forma, a possibilidade de utilização de metodologias cada vez mais precisas e discriminatórias na identificação de MNT gera, em última instância, vantagens aos pacientes e ao sistema de saúde.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÉKAMBI T & DRANCOURT M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54:2095-2105, 2004.

AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS). Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med*. 156:S1-S25, 1997.

AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS). An Official ATS/IDSA Statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 175:367-416, 2007.

ANDREJAK C, THOMSEN VO, JOHANSEN IS. Nontuberculous pulmonary mycobacteriosis in Denmark: Incidence and prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 181:514-521, 2010.

BANGE FC & BOTTGER EC. Improved decontamination method for recovering mycobacteria from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 21:546-548, 2002.

BARRETO AMW & CAMPOS CED. Micobactérias “não tuberculosas” no Brasil. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 8:23-32, 2000.

BARRETO JA, PALACI M, FERRAZOLI L, MARTINS MC, SULEIMAN J, LOURENÇO R, FERREIRA OCJR, RILEY LW, JOHNSON WDJR, GALVÃO PA. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from boné marrow aspirates of AIDS patients in Brazil. *J Infect Dis*, 168:777-779, 1993.

BLAND CS, IRELAND JM, LOZANO E, ALVAREZ ME, PRIMM TP. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Appl Environ Microbiol*. 71:5719-5727, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. 1ª Edição Brasília, 436. 2008.

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA. Nota técnica Conjunta nº 01/2009. Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Nota Técnica Nº 2/DEVEP/SVS/MS: Ocorrência de surtos de infecções por *Mycobacterium* não tuberculosis pós-cirúrgicas no Rio de Janeiro/RJ. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/SAUDE>.

BRENNAN PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 83(1-3):91-7, 2003.

BROSCH R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, EIGLMEIER K, GARNIER T, GUTIERREZ C, HEWINSON G, KREMER K, PARSONS LM, PYM AS, SAMPER S, van SOOLINGEN D, COLE S. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 3684-3689, 2002.

BROWN-ELLIOTT BA & WALLACE RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, 15(4): p. 716-46.3, 4, 2002.

BRUNELLO F, LIGOZZI M, CRISTELLI E, BONORA S, TORTOLI E, FONTANA R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol*. 39:2799-2806, 2001.

CANTÓN ECR. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2005.

CARDOSO AM, SOUSA EM, VIANA-NIERO C, BORTOLI FB, NEVES ZCP, LEÃO SC, JUNQUEIRA-KIPNIS AP, KIPNIS A. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. *Microbes Infect*. 10:1552-7, 2008.

- CARSON LA, PETERSEN NJ, FAVERO MS, AGUERO SM. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*. 36(6):839-846, 1978.
- CARSON LA, BLAND LA, CUSICK LB, FAVERO MS, BOLAN GA, REINGOLD AL. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. *Appl Environ Microbiol*. 54(12):3122-5, 1988.
- CASSIDY PM, HEDBERG K, SAULSON A, McNELLY E, WINTHROP KL. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis*. 49:124–129, 2009.
- CATTOIR V. Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques. *Ann Biol Clin*. 62: 405-413, 2004.
- CHIMARA E, GIAMPAGLIA CMS, MARTINS MC, TELLES MAS, UEKI SYM, FERRAZOLI L. Molecular Characterization of *Mycobacterium kansasii* Isolates in the State of São Paulo between 1995-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(7):739-743, 2004.
- CHIMARA E, FERRAZOLI L, UEKY SYM, MARTINS MC, DURHAM AM, D ARBEIT R, LEÃO SC. 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*. 8:48, 2008.
- COELHO AGV, ZAMARIOLI LA, REIS CMPV, NASCIMENTO ACC, RODRIGUES JS. Gene probes versus classical methods in the identification of mycobacteria. *J Bras Pneumol*. 34(11):922-926, 2008.
- COOK VJ, TURENNE CY, WOLFE J, PAULS R, KABANI A. Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. *J Clin Microbiol*. (3): 1010-15, 2003.
- COUTO I, MACHADO D, VIVEIROS M, RODRIGUES L, AMARAL L. Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. *Clin Microbiol Infect*. 16: 1161–1164, 2010.
- da COSTA ARF, LOPES ML, LEÃO SC, SCHNEIDER MPC, SOUSA MS, SUFFYS PN, CORVELO TCO, LIMA KVB. Molecular identification of rapidly growing mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the State of Pará, Amazon region, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 65:358–364, 2009.
- da SILVA CF, MIZUKA SY, PIRES DC, LEÃO SC. *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of Mycobacteria in the clinical laboratory. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 43(1):25-28, 2001.
- DAILLOUX M, ABALAIN ML, LAURAIN C, LEBRUN L, LOOS-AYAV C, LOZNIOWSKI A, MAUGEIN J. Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients. *Eur Respir J*. 28:1211-1215, 2006.
- DALEY CL & GRIFFITH DE. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int J Tuberc Lung Dis*. 14(6):665–671, 2010.
- DE GROOTE MA & HUITT G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis*. 42(12):1756-63, 2006.
- DEVALLOIS A, GOH KS, RASTOGI N. Rapid identification of mycobacteria to the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol*. 35:2969–2973, 1997.
- DUARTE RS, LOURENÇO MCS, FONSECA LS, LEÃO SC, AMORIM ELT, ROCHA ILL, COELHO FS, VIANA-NIERO C, GOMES KM, SILVA MG, LORENA NSO, PITOMBO MB, FERREIRA RMC, GARCIA MHO, OLIVEIRA GP, LUPI O, VILAÇA BR, SERRADAS LR, CHEBABO A, MARQUES EA, TEIXEIRA LM, DALCOLMO M, SENNA SG, SAMPAIO JLM. Epidemic of post-surgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol*. 47(7):2149-55, 2009.
- EUZÉBY JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>). Acesso em 07 março 2012.

- FALKINHAM JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 9 (2):177-215, 1996.
- FERREIRA RMC, SAAD MHF, SILVA MG, FONSECA LS. Non-tuberculous mycobacteria i: one year clinical isolates in tertiary hospital Aids reference center, Rio de Janeiro, Brazil, in pre highly active antiretroviral therapy era. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 97(5):725-729, 2002.
- FREITAS D, ALVARENGA L, SAMPAIO JLM, MANNIS M, SATO E, SOUSA L, VIEIRA L, YU MC, MARTINS MC, HOFFLING-LIMA A, BELFORT R Jr. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. Ophthalmology. 110:276-85, 2003.
- GOLLER CC & ROMEO T. Environmental influences on biofilm development. Curr Top Microbiol Immunol. 322:37-66, 2008.
- GOODEFELLOW M & WAYNE L. Taxonomy and a Nomenclature. In: Colin R, Stanford J. The biology of the mycobacteria. Londres Academic Press, v.1, 471-521, 1982.
- HÄFNER B, HAAG H, GEISS HK, NOLTE O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. Molecular and Cellular Probes. 18: 59-65, 2004.
- HENRY MT, INAMDAR L, O'RIORDAIN D, SCHWEIGER M, WATSON JP. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. Eur Respir J. 23:741-746, 2004.
- HINRICHSEN SL. Micobactéria de crescimento rápido – MRC. Prática Hospitalar – Infectologia. 53:106-111, 2007.
- HOEFSLOOT W, VAN INGEN J, de LANGE WC, DEKHUIJZEN PN, BOEREE MJ, VAN SOOLINGEN D. Clinical relevance of *Mycobacterium malmoense* isolation in The Netherlands. Eur Respir J. 34:926-931, 2009.
- ISEMAN MD & MARRAS TK. The importance of nontuberculous mycobacterial lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 178:999-1001, 2008.
- ISENBERG HD. Clinical microbiology procedures handbook. 1st ed., Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992.
- ITOH S, KAZUMI Y, ABE C, TAKAHASHI M. Heterogeneity of RNA polymerase gene (*rpoB*) sequences of *Mycobacterium gordonae* clinical isolates indentified with a DNA probe kit and by conventional methods. J. Clin. Microbiol. 41:1656-63, 2003.
- KATOCH VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res. 290-304, 2004.
- KHATTER S, SINGH UB, ARORA J, RANA T, SETH P. Mycobacterial infections in human immuno-deficiency virus seropositive patients: role of nontuberculous mycobacteria. Indian J Tuberc. 55:28-33, 2008.
- LEÃO SC, MARTIN A, MEJIA MGI, PALOMINO JC, ROBLEDO RJ, TELLES MAS, PORTAELS F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. 2004. Disponível em: (<http://www.esmycobacteriology.eu/PDF%20files/foreword.pdf>).
- LEÃO SC, BERNARDELLI A, CATALDI A, ZUMARRAGA M, ROBLEDO J, REALPE T, MEJÍA GI, TELLES MAS, CHIMARA E, VELAZCO M, FERNANDEZ J, RODRIGUES PA, GUERRERO MI, LEÓN CI, PORRAS TB, RASTOGI N, GOH KS, SUFFYS P, ROCHA AS, NETTO DS, RITACCO V, LÓPEZ B, BARRERA L, PALOMINO JC, MARTIN A, PORTAELS F. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. Journal of Microbiological Methods. 61:193-199, 2005.
- LEÃO SC, TORTOLI E, NIERO CV, UEKI SYM, LIMA KVB, LOPES ML, YUBERO J, MENENDEZ MC, GARCIA MJ. Characterization of mycobacteria from a major brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-M. abscessus* group is needed. J Clin Microbiol. 47:2691-2698, 2009.
- LEÃO SC, VIANA-NIERO C, MATSUMOTO CK, LIMA KV, LOPES ML, PALACI M, HADAD DJ, VINHAS S, DUARTE RS, LOURENÇO MC, KIPNIS A, NEVES ZC, GABARDO BM, RIBEIRO MO, BAETHGEN L, ASSIS DB, MADALOSSO G, CHIMARA E, DALCOLMO MP. Epidemic of

surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. *Future Microbiol.* 5(6):971-80, 2010.

LEÃO SC, TORTOLI E, EUZÉBY JP, GARCIA MJ. Proposal that the two species *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov., and emendation of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61:2311-2313, 2011.

McNABB A, EISLER D, ADIE K, AMOS M, RODRIGUES M, STEPHENS G, BLACK WA, ISSAC-RENTON J. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 42:3000-3011, 2004.

MENENDEZ MC, PALENQUE E, NAVARRO MC, NUÑEZ MC, REBOLLO MJ, GARCIA MJ. Characterization of a *Mycobacterium intracellulare* variant strain by molecular techniques. *J Clin Microbiol.* 39(12):4241-4246, 2001.

MILLER N, INFANTE S, CLEARY T. Evaluation of the LiPA Mycobacteria assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol.* 38(14):1915-1919, 2000.

MUSSAFFI H, RIVLIN J, SHALIT I, EPHROS M, BLAU H. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy. *Eur Respir J.* 25:324-328, 2005.

OLIVER A, MAIZ L, CANTÓN R, ESCOBAR H, BAQUERO F, GÓMEZ-MAMPASO E. Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Clin Infec Dis.* 32:1298-1303, 2001.

OLIVIER KN, WEBER DJ, LEE JH, HANDLER A, TUDOR G, MOLINA PL, TOMASHEFSKI J, KNOWLES MR. Nontuberculous mycobacteria II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 67:835-840, 2003.

PADOVEZE MC, FORTALEZA CM, FREIRE MP, BRANDAO D de Assis, MADALOSSO G, PELLINI AC, CESAR ML, PISANI Neto V, BELTRAMELLI MM, CHIMARA E, FERRAZOLI L, TELLES MAS, SAMPAIO JLM, LEÃO SC. Outbreak of surgical infection caused by nontuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. *J Hosp Infect.* 67:161-7, 2007.

PALOMINO JC, LEÃO SC, RITACCO V. Tuberculosis 2007 – from Basic Science to Patient Care. *TuberculosisTextbook.com*, 1ª Ed. 2007.

PARA PEDRO HS, PEREIRA MIF, GOLONI MRA, UEKI SYM, CHIMARA E. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. *J Bras Pneumol.* 34(11):950-955, 2008.

PARK S, SUH GY, CHUNG MP. Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* isolated from respiratory specimens. *Respir Med.* 102:437-442, 2008.

PICARDEAU M, PROD'HOM G, RASKINE L, LEPENNEC MP, VINCENT V. Genotypic differentiation of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol.* 35:25-32, 1997.

PIERSIMONI C & SCARPARO C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerging Infectious Diseases.* 15: (9)1351-1358, 2009.

PITOMBO MB, LUPI O, DUARTE RS. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? *Rev Bras Ginecol Obstet.* 31(11):529-33, 2009.

PLIKAYTIS BD, PLIKAYTIS BB, SHINNICK TM. Computer-assisted pattern recognition model for the identification of slowly growing mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol.* 138:2265-2273, 1992.

PRASITE. Identification of Mycobacteria. Disponível em: (<http://app.chuv.ch/prasite>).

PRIMM TP, LUCERO CA, FALKINHAM JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (1):98-106, 2004.

- RAJINI M, PRASAD SR, REDDY RR, BHAT RV, VIMALA KR. Postoperative infection of laparoscopic surgery wound due to *Mycobacterium chelonae*. Indian J Med Microbiol. 25:163-165, 2007.
- RICHARDSON ET, SAMSON D, BANAEI N. Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR. J Clin Microbiol. 47:1497-1502, 2009.
- RICHTER E, RÜSCH-GERDES S, HILLEMANN D. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for identification of mycobacterial species from cultures. J Clin Microbiol. 44(5):1769-1775, 2006.
- RINQUET H, AKOUA-KOFFI C, HONORE S, VARNEROT A, VINCENT V, BERCHE P, GAILLARD JL, PIERRE-AUDIGIER C. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol. 37:852-857, 1999.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual de Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Nota Técnica Conjunta N° 01/2007.
- ROCHA AS, LEITE CC, TORRES HM, MIRANDA AB, LOPES MQP, DEGRAVE WM, SUFFYS PN. Use of PCR-restriction fragment polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. J Microbiol Methods. 37:223-229, 1999.
- ROCHA AS, BARRETO AMW, CAMPOS ED, SILVA MVB, FONSECA L, SAAD MH, DEGRAVE WM, SUFFYS PN. Novel allelic variants of mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. J Clin Microbiol. 40:4191-96, 2002.
- RODRIGUEZ JC, AYELO A, RUIZ M, LOPEZ M, ROYO G. Infection due to *Mycobacterium kansasii* in Elche, Spain. Med Clin (Barc). 120(7):253-4, 2003.
- RUNYON EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am. 43:273-290, 1959.
- SAIMAN L. The mycobacteriology of non-tuberculous mycobacteria. Paediatric Respiratory Reviews. 5:221-223, 2004.
- SAMPAIO JL, CHIMARA E, FERRAZOLI L, TELLES MAS, DEL GUERCIO VM, JERICO ZV, MIYASHIRO K, FORTALEZA CM, PADOVEZE MC e LEÃO SC. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. Clin Microbiol Infect. 12:142-9, 2006a.
- SAMPAIO JL, VIANA-NIERO C, FREITAS D, HOFLING-LIMA AL, LEÃO SC. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 55:107-18, 2006b.
- SCARPARO C, PICCOLI P, RIGON A, RUGGIERO G, NISTA D, PIERSIMONI C. Direct identification of mycobacteria from MB/BacT Alert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. J Clin Microbiol. 39:3222-3227, 2001.
- SCHULZE-ROBBECKE R & BUCHHOLTZ K. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. Appl Environ Microbiol. 58:1869-1873, 1992.
- SENNA SG, BATTILANA J, COSTA JC, SILVA MG, DUARTE RS, FONSECA LS, SUFFYS PN, BOGO MR. Sequencing of *hsp65* Gene for Identification of *Mycobacterium* species isolated from environmental and clinical sources in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol. 46(11): 3822-3825, 2008.
- SENNA SG, MARSICO AG, VIEIRA GBO, SOBRAL LF, SUFFYS PN, FONSECA LS. Identification of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical sterile sites in patients at a university hospital in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J Bras Pneumol. 37(4):521-526, 2011.
- SHIN JH, CHO EJ, LEE JY, YU JY. Novel diagnostic algorithm using *tuf* gene amplification and restriction fragment length polymorphism is promising tool for identification of nontuberculous mycobacteria. J Microbiol Biotechnol. 19(3):323-330, 2009.
- SONG JY, SOHN JW, JEONG HW, CHEONG HJ, KIM WJ, KIM MJ. An outbreak of post-acupuncture cutaneous infection due to *Mycobacterium abscessus*. BMC Infectious Diseases, 6: 6 1-7, 2006.

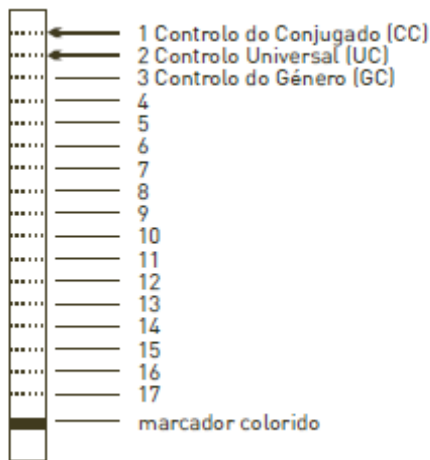
- SORLOZANO A, SORIA I, ROMAN J, HUERTAS P, SOTO MJ, PIEDROLA G, GUTIERREZ J. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. *J Microbiol Biotechnol.* 19(10):1259–1264, 2009.
- SPRINGER B, STOCKMAN L, TESCHNER K, ROBERTS GD, BOTTGER EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 34:296-303, 1996.
- STAMM LML & BROWN EJ. *Mycobacterium marinum*: the generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium. *Microb Infect.* 6:1418-1428, 2004.
- STEINGRUBE VA, GIBSON JL, BROWN BA, ZHANG Y, WILSON RW, RAJAGOPALAN M, WALLACE RJ JR. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 33:149-153, 1995.
- SUFFYS PN, ROCHA AS, OLIVEIRA M, CAMPOS CED, BARRETO AMW, PORTAELS F, RIGOUTS L, WOUTERS G, JANNES G, van REYBROECK G, MIJS W, VANDERBORGH T. Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LIPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol.* 39(12):4477-4482, 2001.
- TAYLOR TB, PATTERSON C, HALE Y, SAFRANEK WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria in liquid media. *J Clin Microbiol.* 35:79-85, 1997.
- TELENTI A, MARCHESI F, BALZ M, BALLY F, BÖTTGER EC, BODMER T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 31:175-178, 1993.
- TIWARI TS, RAY B, JOST KC JR, RATHOD MK, ZHANG Y, BROWN-ELLIOTT BA, HENDRICKS K, WALLACE RJ JR. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. *Clin Infect Dis.* 36:954-62, 2003.
- TORTOLI E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. *Clin Microbiol Rev.* 2:319-354, 2003.
- TORTOLI E, GABINI R, GALANTI I, MARIOTTINI A. Lethal *Mycobacterium massiliense* sepsis, Italy. *Emerg Infect Dis.* 14:984-985, 2008.
- UEKI SYM, MARTINS MC, TELLES MAS, VIRGILIO MC, GIAMPAGLIA CMS, CHIMARA E, FERRAZOLI L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med Lab.* 41:1-8, 2005.
- van INGEN J, BENDIEN SA, de LANGE WC. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax.* 64:502-506, 2009.
- van SOOLINGEN D, DE HASS PEW, HERMANS PWM, VAN EMBDEN JDA. RFLP analysis of mycobacteria. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands, 1994.
- VIANA-NIERO C, LIMA KVB, LOPES ML, RABELLO MCS, MARSOLA LR, BRILHANTE VCR, DURHAM AM, LEÃO SC. Molecular Characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreak of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *J Clin Microbiol.* 46:850-855, 2008.
- VIJAYARAGHAVAN R, CHANDRASHEKHAR R, SUJATHA Y, BELAGAVI CS. Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery. *J Hosp Infect.* 64(4):344-347, 2006.
- WILSON RW, STEINGRUBE VA, BÖTTGER EC, SPRINGER B, BROWN-ELLIOTT BA, VINCENT V, JOST KC JR, ZHANG Y, GARCIA MJ, CHIU SH, ONYI GO, ROSSMOORE H, NASH DR, WALLACE RJ JR. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51 (5):1751-64, 2001.

WRIGHT PW & WALLACE RJ JR. Nontuberculous mycobacteria with and without HIV infectionm – Tuberculosis: current concepts and treatment. Ed.Friedman, CRC Press, p. 183-206, 1994.

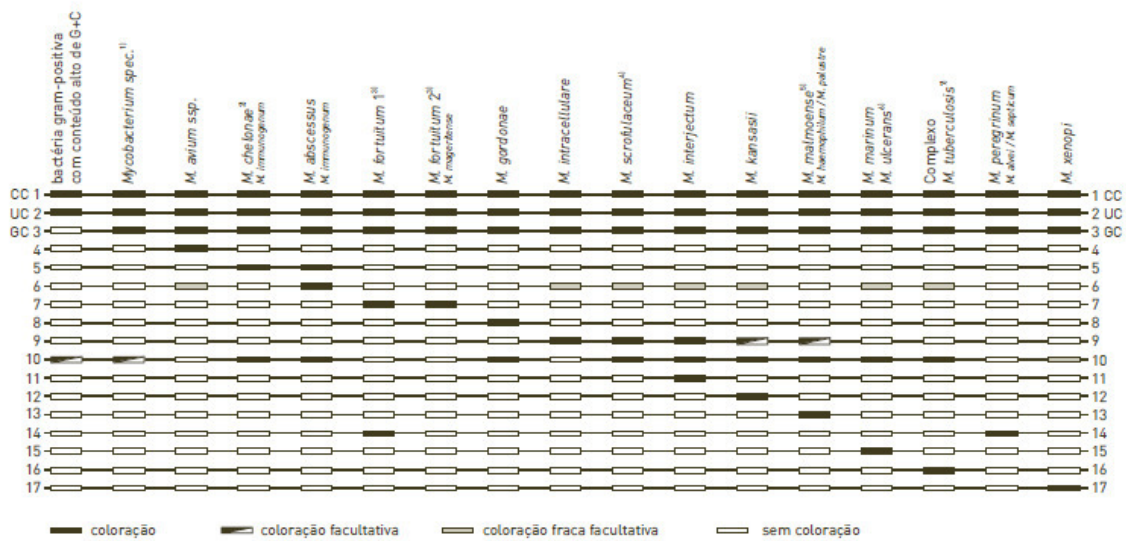
WU TL, CHIA JH, KUO AJ, SU LH, WU TS, LAI HC. Rapid identification of mycobacteria from smear-positive sputum samples by nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 46:3591-3594, 2008.

9. ANEXOS

ANEXO I



Tira reativa com as 17 zonas de reação (adaptado de Hain LifeScience®)



Banda N.º 1 (CC): Controlo do Conjugado
 Banda N.º 2 (UC): Controlo Universal
 Banda N.º 3 (GC): Controlo do Género

- ¹⁾ Certas espécies podem eventualmente ser diferenciadas com o teste **GenoType Mycobacterium AS**.
- ²⁾ No caso da banda GC não se desenvolver, a estirpe presente pode também ser *M. abscessus*.
- ³⁾ Devido a variações na região da sonda o *M. fortuitum* pode ser dividido em dois grupos.
- ⁴⁾ *M. "paraffinicum"* e *M. parascrofulaceum* mostram o mesmo padrão de bandas que *M. scrofulaceum*.
- ⁵⁾ *M. nebraskense* mostra o mesmo padrão de bandas. *M. haemophilum* pode ser identificado pelo teste **GenoType Mycobacterium AS**.
- ⁶⁾ *M. ulcerans* pode ser identificado pelo teste **GenoType Mycobacterium AS**.
- ⁷⁾ Para uma diferenciação adicional use o teste **GenoType MTBC**.

Tabela de interpretação (adaptado de Hain LifeScience®)

ANEXO II: Currículo do Autor

CURRICULUM VITAE resumido

Cardoso, C.M.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Cássia Maria Cardoso

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil, 09/01/1978

Endereço profissional: Faculdade de Farmácia, UFRGS

Av. Ipiranga, 2752 - Bairro Azenha - Porto Alegre/RS

CEP: 90610-000

Telefone profissional: (51) 3308-5090

E-mail: cassiamc@yahoo.com.br

2. FORMAÇÃO

Graduação

Curso: Farmácia

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Período: 1996-2000

Ênfase Análises Clínicas: *Bioquímica*

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Período: 2000-2004

Pós-graduação *stricto sensu*

Curso: Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Período: 2010-Atual

3. ESTÁGIOS/EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- **2005 – Atual.** Bioquímica do Setor de Bacteriologia do Laboratório Central – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brasil.

- **08/2007 – 10/2007 e 05/2008 – 11/2008.** Bioquímica do Setor de Bacteriologia do Laboratório Senhor dos Passos, Brasil.

- **03/2004 – 03/2007.** Bioquímica do Setor de Bacteriologia do Laboratório Knijnik, Brasil.

- **12/2003 – 03/2004.** Bioquímica do Setor de Bacteriologia do Laboratório Imuno, Brasil.

- **07/2003 – 12/2003.** Estágio curricular no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.
- **05/2003 – 02/2004.** Monitoria, disciplina de Análises Bacteriológicas da Faculdade de Farmácia – UFRGS, Brasil.
- **11/2002 – 03/2003.** Monitoria, disciplina de Análises Hematológicas da Faculdade de Farmácia – UFRGS, Brasil.
- **06/2002 – 12/2003.** Estágio extracurricular no Setor de Bacteriologia do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Brasil.

4. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

“Avaliação da Implementação da Técnica de PRA-*hsp65* para Identificação de Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose (MNT) no IPB/LACEN-RS”, como autora do Pôster, apresentado no II Workshop da Rede-TB, no Rio de Janeiro-RJ, no período de 21 a 23 de Novembro de 2011.

“Isolamento de Micobactérias Não-Tuberculosas no Rio Grande Do Sul: período entre 2004 e 2009, como co-autora do Resumo de Tema Livre, apresentado na forma de pôster no 2º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, em Florianópolis-SC, no período de 29 de setembro a 02 de outubro de 2010.