



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

JULIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE
MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS ISOLADAS DE
AMOSTRAS CLÍNICAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

FLORIANÓPOLIS

2021

Juliano dos Santos

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE
MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS ISOLADAS DE
AMOSTRAS CLÍNICAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmácia da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre
em Farmácia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Bazzo

Coorientadora: Dr^ª. Mara Cristina Scheffer

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dos Santos, Juliano

Avaliação de técnicas para identificação de micobactérias não tuberculosas isoladas de amostras clínicas no Estado de Santa Catarina / Juliano Dos Santos ; orientadora, Maria Luiza Bazzo , coorientadora, Mara Cristina Scheffer , 2021.
137 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Micobactérias não tuberculosas. 3. PCR PRAhsp65. 4. MALDI-TOF MS. 5. Sequenciamento dos genes hsp65 e rpoB. I. , Maria Luiza Bazzo. II. , Mara Cristina Scheffer. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Juliano dos Santos

Avaliação de técnicas para identificação de micobactérias não tuberculosas isoladas de amostras clínicas no Estado de Santa Catarina

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Jussara Kasuko Palmeiro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés (suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em farmácia.

Prof^a. Dr^a. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Bazzo
Orientadora

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2021

Dedico este trabalho aos profissionais de saúde que fazem da sua missão instrumento de dedicação e competência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha família, e amigos. Em especial meus pais Vilmar e Zilda e meu irmão Diogo, por estarem sempre ao meu lado.

Às minhas queridas, orientadora Dra. Maria Luiza Bazzo e coorientadora Dra. Mara Cristina Scheffer, pela competência, confiança e experiência à realização deste trabalho.

Aos dedicados profissionais e pesquisadores de diversos centros que prontamente se dispuseram a me ajudar, em especial ao Dr. Camilo Fernandes e Dr. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés, companheiros de projeto; Darcita Buerger Rovaris e Sabrina Gonçalves do Lacen/SC; Claudia Márcia Lopes Bartel, Cássia Maria Zoccoli e Mirian Karolaine Pires Correia do Laboratório Médico Santa Luiza / Grupo DASA; Richard Steiner Salvato e Larissa Vitória da Silva do CDCT/RS. Agradeço demais.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, em especial a Manoela Valmorbidia, que me ensinou a técnica do PRA. E também, Fernando Hartmann Barazzetti e Marcos André Schorner por todos os cafés, géis, dúvidas de biomol e sequenciamento solucionadas.

Aos meus colegas de trabalho do HU/UFSC em especial do setor de Microbiologia, pela paciência e por segurar as pontas em alguns momentos.

Aos queridos companheiros de mestrado/doutorado, pelas contribuições e por serem ouvidos de minhas preocupações e ansiedade.

A todos, meu muito obrigado.

“A mais honrosa das ocupações é servir ao público e ser útil
ao maior número de pessoas.”

(Michel Eyquem de Montaigne)

RESUMO

O gênero *Mycobacterium* compreende aproximadamente 200 espécies, incluindo bactérias patogênicas, oportunistas e não patogênicas. As micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* são responsáveis por causar tuberculose, enquanto as micobactérias não tuberculosas podem causar micobacterioses. A identificação das espécies de micobactérias é essencial, pois fornece informações importantes sobre epidemiologia e possibilita o tratamento bem-sucedido dos pacientes. Tradicionalmente, a identificação do gênero *Mycobacterium* foi baseada nas características bioquímicas fenotípicas. No entanto, esses testes são demorados e às vezes produzem resultados ambíguos. Muitos métodos foram desenvolvidos para identificação de micobactérias não tuberculosas nas últimas décadas, superando as limitações dos métodos fenotípicos convencionais. O tratamento de micobacteriose em geral é espécie-específico, algumas espécies dentro de complexos apresentam alta resistência a antimicrobianos, assim, o poder discriminatório de cada metodologia é de fundamental importância para o sucesso do tratamento. O Objetivo do presente estudo foi avaliar o poder discriminatório em nível de espécie de diferentes metodologias para identificação de micobactérias não tuberculosas, bem como, a epidemiologia de infecções por micobactérias não tuberculosas no Estado de Santa Catarina. O projeto iniciou com um relatório que incluiu todos os isolados de micobactérias não tuberculosas associados a infecções, enviados ao laboratório de referência estadual para identificação entre 2010 e 2019. Foram recuperados 58 isolados de micobactérias não tuberculosas de amostras clínicas da coleção estadual, previamente identificados no laboratório de referência, que foram caracterizados utilizando três metodologias: análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição por PCR (PCR-PRAhsp65), espectrometria de massa por ionização e dessorção assistida por matriz (MALDI-TOF MS) e sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*. A PCR-PRAhsp65, MALDI-TOF MS e o Sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB* mostraram elevado poder discriminatório de espécies de micobactérias não tuberculosas isoladas de amostras clínicas. Os métodos PCR-PRAhsp65 e MALDI-TOF MS apresentaram concordância de 94,23% entre si. Quando comparados ao sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*, observou-se que a PCR-PRAhsp65 identificou corretamente 94,82% dos isolados e o MALDI-TOF MS, 96,15%. O método de identificação de espécies de micobactérias não tuberculosas por MALDI-TOF MS se mostrou mais rápido, de maior facilidade de execução, com ótimo poder discriminatório e apresentou melhor custo-benefício para a implantação em laboratórios de rotina de microbiologia clínica entre as metodologias analisadas.

Palavras-chave: Micobactérias não tuberculosas. PCR-PRAhsp65. MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

The genus *Mycobacterium* comprises approximately 200 species, including pathogenic, opportunistic, and non-pathogenic. Mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis complex* are responsible for causing tuberculosis, while nontuberculous mycobacteria can cause mycobacteriosis. The identification of mycobacteria at the species level is essential, as it provides important information about epidemiology and enables the successful treatment of patients. Traditionally, the identification of the *Mycobacterium* genus was based on the phenotypic biochemical characteristics. However, these tests are time-consuming and sometimes produce ambiguous results. Many methods have been developed for the identification of nontuberculous mycobacteria in recent decades, overcoming the limitations of conventional phenotypic methods. The treatment of mycobacteriosis in general is species-specific, some species within complexes have high resistance to antimicrobials, thus, the discriminatory power of each methodology have fundamental importance for the success of the treatment. The objective of the present study was to evaluate the discriminatory power at the species level of different methodologies for the identification of non-tuberculous mycobacteria, as well as the epidemiology of infections by non-tuberculous mycobacteria in the State of Santa Catarina, Brazil. The project started with a report that included all nontuberculous mycobacteria isolates associated with the infections, sent to the State reference laboratory for identification between 2010 and 2019. 58 nontuberculous mycobacterial isolates from clinical samples were recovered from the State collection, previously identified in the reference laboratory, which were characterized using three methodologies: Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-PRA_{hsp65}), Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Partial sequencing of the *hsp65* and *rpoB* genes. PCR-PRA_{hsp65}, MALDI-TOF MS and the Partial sequencing of *hsp65* and *rpoB* genes showed high discriminatory power of identification of nontuberculous mycobacterial species isolated from clinical samples. The PCR-PRA_{hsp65} and MALDI-TOF MS methods showed 94.23% agreement between them. When compared to partial sequencing of the *hsp65* and *rpoB* genes, it was observed that PCR-PRA_{hsp65} correctly identified 94.82% of the isolates and MALDI-TOF MS, 96.15%. The method of identifying species of nontuberculous mycobacteria by MALDI-TOF MS proved to be faster, easier to perform, with excellent discriminatory power and presented a better cost-benefit ratio for implantation in routine clinical microbiology laboratories among the analyzed methodologies.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria. PCR-PRA_{hsp65}. MALDI-TOF MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore filogenética do gênero <i>Mycobacterium</i>	20
Figura 2 – Relevância clínica de MNT isoladas de amostras respiratórias.....	30
Figura 3 – Fatores de risco combinados em relação ao hospedeiro, ao ambiente e às espécies, que contribuem para o desenvolvimento de doença por MNT.....	33
Figura 4 – Sinais em tomografia computadorizada da doença pulmonar por MNT	35
Figura 5 – Manifestações clínicas da doença extrapulmonar por MNT	36
Figura 6 – Algoritmo para investigação de indivíduos com suspeita clínica de doença pulmonar por MNT.....	48
Figura 7 – Microscopias de lâminas coradas por Ziehl-Neelsen.....	61
Figura 8 – Colônias de diferentes micobactérias em meio Ogawa-Kudoh.....	62
Figura 9 – Análise dos perfis de restrição dos padrões PCR-PRAhsp65 em gel de agarose ...	65
Figura 10 – Aplicação da amostra extraída no slide alvo	66
Figura 11 – Espectros de massas de identificação de micobactérias do MALDI-TOF MS	72
Figura 12 – Análise filogenética.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das principais micobactérias patogênicas e potencialmente patogênicas	21
Quadro 2 – Características estruturais e fisiológicas relevantes para a ecologia das MNT.....	22
Quadro 3 – Fontes de MNT em ambientes nosocomiais e suas possíveis rotas de transmissão e fatores de risco em ambientes de saúde	25
Quadro 4 – Exemplos de espécies de MNT e infecções associadas	32
Quadro 5 – Impedimentos à terapia eficaz para tratamento da doença pulmonar por MNT ...	40
Quadro 6 – Antimicrobianos sugeridos para pacientes com micobacteriose extrapulmonar .	44
Quadro 7 – Critérios para o diagnóstico de doença pulmonar por MNT	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos clínicos e epidemiológicos sobre doença pulmonar por MNT no Brasil..	28
Tabela 2 – Esquemas de tratamento recomendados para doença pulmonar pelo Complexo <i>Mycobacterium avium</i> , <i>M. kansasii</i> e <i>M. xenopi</i>	39
Tabela 3 – Diretrizes de dosagem para medicamentos utilizados no tratamento da doença pulmonar por MNT	42
Tabela 4 – Métodos moleculares para a identificação de MNT	51
Tabela 5 – Espécies de micobactérias identificadas pelo método PCR-PRAhsp65	70
Tabela 6 – Resultado das análises do sequenciamento parcial dos genes <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i> utilizando o programa BLAST.....	75
Tabela 7 – Identificações discordantes entre a PCR-PRAhsp65 e MALDI-TOF MS.....	79
Tabela 8 – Identificações discordantes entre o Sequenciamento parcial dos genes <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i> , PCR-PRAhsp65 e MALDI-TOF MS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA	Subunidade pequena da molécula de rRNA procariótico
ALIS	Suspensão inalatória de amicacina lipossomal (<i>Amikacin liposome inhalation suspension</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção Americana de culturas (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATS	Sociedade Torácica Americana (<i>American Thoracic Society</i>)
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BLAST	Ferramenta de busca de alinhamento local básico (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BTS	Sociedade Torácica Britânica (<i>British Thoracic Society</i>)
CDCT/RS	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Rio Grande do Sul
CEPSH	Comitê de ética em pesquisa com seres humanos
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>)
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CPAP	Pressão positiva contínua na via aérea (<i>Continuous positive airway pressure</i>)
CRPHF	Centro de Referência Professor Helio Fraga
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DHPLC	Cromatografia líquida desnaturante de alto desempenho
dNTP	Deoxinucleotídeos
DPMNT	Doença pulmonar por micobactérias não tuberculosas
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EUA	Estados Unidos da América
<i>erm</i>	Eritromicina ribossomo metilase
H37Rv	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepa H37Rv
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HNR	Hospital Nereu Ramos

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
<i>hsp</i>	Proteína de choque térmico (<i>heat shock protein</i>)
IDSA	Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (<i>Infectious Diseases Society of America</i>)
IMC	Índice de massa corporal
ITS	Espaçador interno transcrito (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
KDa	Kilodaltons
LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i> (<i>Mycobacterium avium complex</i>)
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MCL	Micobactérias de crescimento lento
MCR	Micobactérias de crescimento rápido
MNT	Micobactérias não tuberculosas
MOTT	Micobactérias outras que não o bacilo da tuberculose (<i>Mycobacteria other than tuberculosis</i>)
MS	Espectrometria de massa (<i>mass spectrometry</i>)
MSDM	Suscetibilidade mendeliana a infecções micobacterianas
NAAT	Testes de ácido nucleico (<i>nucleic acid amplification test</i> – “NAAT”)
NCBI	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
pb	Pares de base
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PRA _{hsp65}	Análise de restrição enzimática do gene <i>hsp65</i> (<i>Polymorphism Restriction Analysis of hsp65 gene</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico (<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
TARV	Terapia antirretroviral

TB	Tuberculose
TCAR	Tomografia computadorizada de alta resolução
TOF	Tempo de voo (<i>time-of-flight</i>)
TRIS	Tris-hidroxi-metil-amino-metano
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	GÊNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	19
1.2	MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS	21
1.3	EPIDEMIOLOGIA	26
1.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	29
1.4.1	Doença pulmonar	34
1.4.2	Doença extrapulmonar	35
1.5	TRATAMENTO	38
1.5.1	Prognóstico	45
1.6	DIAGNÓSTICO	46
1.6.1	Amostras	49
1.6.2	Identificação	50
1.6.2.1	Identificação fenotípica	50
1.6.2.2	Identificação genotípica	53
1.6.2.2.1	<i>Sequenciamento</i>	53
1.6.2.2.2	<i>Sondas genéticas</i>	55
1.6.2.2.3	<i>PCR seguida de análise de restrição – PCR-PRAhsp65</i>	55
1.6.2.2.4	<i>MALDI-TOF MS</i>	56
2	OBJETIVOS	59
2.1	OBJETIVO GERAL	59
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
3	METODOLOGIA	60
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	60
3.2	AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	60
3.3	CULTURA DOS ISOLADOS BACTERIANOS	60
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA PARA A REALIZAÇÃO DE PCR-PRAhsp65 E SEQUENCIAMENTO	63
3.5	IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE PCR-PRAhsp65	64
3.6	IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE MALDI-TOF MS	65
3.7	IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO	67
3.7.1	PCR para a obtenção dos amplicons	67

3.7.2	Purificação dos produtos das PCR	68
3.7.3	Sequenciamento dos genes <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i>	69
4	RESULTADOS.....	69
4.1	IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE PCR-PRAhsp65	69
4.2	IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE MALDI-TOF MS	71
4.3	IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS GENES <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i>	73
4.4	COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE MNT UTILIZADAS NO ESTUDO	78
5	DISCUSSÃO.....	80
6	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE I	121
	APÊNDICE II	133

1 INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO *MYCOBACTERIUM*

O gênero *Mycobacterium* inclui mais de 200 espécies (figura 1), e pertence à família *Mycobacteriaceae*, classe *Corynebacteriales*, filo *Actinobacteria* e reino *Bacteria*. Foi proposto pela primeira vez em 1896 por Lehmann e Neuman para hospedar organismos na época considerados a meio caminho entre fungos e bactérias (LEHMANN & NEUMAN, 1899; TORTOLI, 2019).

É constituído por um grupo bastante heterogêneo de espécies, incluindo importantes patógenos humanos além de espécies ambientais. Esse grupo de bactérias apresenta características fenotípicas únicas. Sua parede celular é extremamente rica em lipídios, constituída por ácidos micólicos que são essenciais para a sobrevivência dos membros do gênero. (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; MARRAKCHI *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2018).

As principais características das micobactérias são a ausência de motilidade, a morfologia dos bacilos (ligeiramente curvada e em forma de bastonete) e a resistência ao álcool-ácido após a coloração com fucsina fenicada (coloração Ziehl-Neelsen). As colônias podem ser rugosas ou lisas (ZIEHL, 1882; ZOPF, 1883; VESTAL & KUBICA, 1966; VINCENT, 1994; VELAYATI *et al.*, 2019).

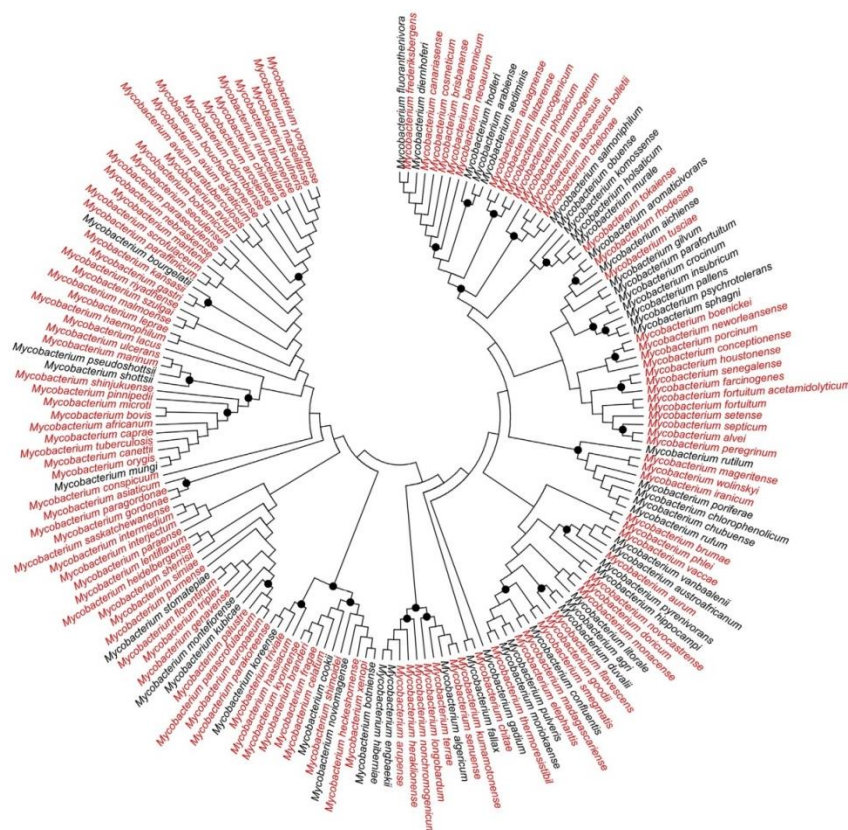
São organismos microaeróbios que crescem em atmosfera de 6 a 12% de oxigênio, possuem características metabólicas que algumas vezes resultam em um tempo de duplicação lento entre 20 e 24h. São Gram-positivos e não formadores de esporos. Esses organismos podem suportar ampla faixa de temperaturas ambientais e são resistentes a antibióticos e desinfetantes (PFYFFER, 2015; BRYANT *et al.*, 2016; RATNATUNGA *et al.*, 2020).

Algumas espécies são pigmentadas de cor amarelo ou alaranjado quando cultivadas, o pigmento pode ser constitutivo (escotocromogênico) ou induzido apenas com a exposição à luz (fotocromogênico), enquanto outras espécies nunca produzem pigmento (acromogênico). Comparadas à maioria das outras bactérias, as micobactérias crescem lentamente, exigindo pelo menos cinco dias de incubação, com muitas exigindo uma ou mais semanas para o crescimento visível (PFYFFER, 2015).

O sequenciamento genético introduzido por Sanger, um marco nas ciências biológicas, teve enorme impacto na taxonomia e representou um progresso significativo em direção à

classificação baseada em filogenia. O rRNA, que é altamente conservado por causa do papel essencial dos ribossomos na síntese proteica, logo se tornou o alvo principal. O componente 16S rRNA da subunidade 30S tem sido o mais frequentemente investigado, e atualmente a sequência deste locus está disponível, para todas as espécies conhecidas, em bancos de dados públicos (SANGER *et al.*, 1977; TORTOLI, 2019).

Figura 1 - Árvore filogenética do gênero *Mycobacterium*



Fonte: adaptado de NUNES-COSTA *et al.*, 2016. As análises filogenéticas foram realizadas usando MEGA6. As árvores foram criadas usando o algoritmo de máxima verossimilhança, com base em uma comparação de todas as sequências do gene 16S rRNA disponíveis (Gene Bank) de cepas do gênero *Mycobacterium*. O símbolo (•) indica ramos de nós conservados quando a árvore foi reconstruída usando o algoritmo de união de vizinhos (SAITOU *et al.*, 1987; OLSEN *et al.*, 1994; TAMURA *et al.*, 2013).

Dentre as espécies de *Mycobacterium spp.* estão patógenos estritos, patógenos potenciais ou oportunistas e espécies saprófitas não patogênicas. As similaridades da sequência gênica dentro do gênero (94,3% para o gene 16S rRNA) e as reconstruções filogenéticas robustas usando sequências concatenadas de genes de manutenção (“*housekeeping genes*”), confirmaram a divisão natural entre micobactérias de crescimento lento e rápido. Demonstraram também, que todas as micobactérias de crescimento lento pertencem a um único

ramo evolutivo que emergiu das micobactérias que crescem rapidamente (TORTOLI, 2003a; TORTOLI, 2012; TORTOLI, 2014; FORBES *et al.*, 2018).

Micobactérias podem ser divididas em quatro grupos principais com base em diferenças fundamentais em epidemiologia, associação com doença e capacidade de crescer *in vitro*: aquelas pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), *Mycobacterium leprae*/*M. lepromatosis*, as micobactérias não tuberculosas (MNT) de crescimento rápido (MCR) e de crescimento lento (MCL) (Quadro 1). (THOMAS *et al.*, 2006; GRIFFITH *et al.*, 2007; CORSARO *et al.*, 2010; FALKINHAM *et al.*, 2013; FORBES *et al.*, 2018).

Quadro 1 – Classificação das principais micobactérias patogênicas e potencialmente patogênicas.

Micobactéria de crescimento lento	Micobactéria de crescimento rápido	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
Complexo <i>M. avium</i> <i>M. arosiense</i> <i>M. avium</i> <i>M. bouchedurhonense</i> <i>M. chimaera</i> <i>M. colombiense</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. marseillense</i> <i>M. paraintracellulare</i> <i>M. timonense</i> <i>M. vulneris</i> <i>M. yongonense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. xenopi</i>	Complexo <i>M. abscessus</i> <i>M. abscessus subesp. abscessus</i> <i>M. abscessus subesp. bolletii</i> <i>M. abscessus subesp. massiliense</i> Complexo <i>M. fortuitum</i> <i>M. boenickei</i> <i>M. brisbanense</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. houstonense</i> <i>M. neworleansense</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. septicum</i> <i>M. setense</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. smegmatis</i>	<i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i> <i>M. canettii</i> <i>M. caprae</i> <i>M. microti</i> <i>M. pinnipedii</i> <i>M. tuberculosis</i>

Fonte: FORBES *et al.*, 2018; OPLUSTIL *et al.*, 2020.

1.2 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Micobactérias não pertencentes ao CMTB já receberam diversas denominações: micobactérias atípicas, MOTT (micobactérias outras que não o bacilo da tuberculose, do inglês *Mycobacteria other than tuberculosis*), e hoje são mais frequentemente chamadas de Micobactérias Não Tuberculosas - MNT (FORBES *et al.*, 2018).

MNT são bactérias ubíquas e de vida livre, comumente isoladas de ambientes como água, solo e vegetação. Podem crescer em ambientes criados pelo homem, como sistemas urbanos de tratamento de água e esgoto, piscinas, banheiras quentes, bacia lava-pés de pedicure,

chuveiros, tintas de tatuagem, tanques de peixes, ou em dispositivos médicos, como endoscópios, máquinas de gelo usadas para refrigerar soluções cirúrgicas, e equipamentos ou soluções cirúrgicas inadequadamente esterilizadas (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012a; FALKINHAM, 2013; FORBES *et al.*, 2018).

Das aproximadamente 200 espécies de MNT identificadas, 95% são bactérias ambientais, sendo a maioria saprófitas ou não patogênicas para humanos e animais (FALKINHAM, 2015; JOHANSEN *et al.*, 2020).

A compreensão da fisiologia e das características estruturais das MNT, mostradas no quadro 2, é a chave para entender sua ecologia, rotas de transmissão e resistência a antimicrobianos e a desinfetantes. MNT possuem membrana externa, assim como as bactérias Gram-negativas. No entanto, diferentemente da membrana externa das bactérias Gram-negativas, a membrana externa das MNT é rica em ácidos graxos de cadeia longa (C₄₀-C₈₀, ácidos micólicos) e constitui aproximadamente 40% do peso do microrganismo (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; DAFFÉ & DRAPER, 1998; FALKINHAM, 2013).

Quadro 2 - Características estruturais e fisiológicas relevantes para a ecologia das MNT

Membrana externa rica em lipídios	Superfície celular hidrofóbica
	Fixação em superfície e formação de biofilme
	Impermeável aos nutrientes hidrofílicos
	Resistente a desinfetantes
	Resistente a antimicrobianos
	Crescimento lento (1 geração / dia)
	Degradação de hidrocarbonetos
1 ou 2 operons de rRNA	Crescimento lento, resistência antimicrobiana
Microaeróbica	Crescimento em 6–12% de oxigênio
Oligotrófica	Crescimento em baixas concentrações de carbono
Tolerância térmica	Sobrevive em aquecedores de água e sistemas de água quente
Resistência às amebas	Sobrevive em biofilmes povoados por amebas fagocíticas

Fonte: adaptado de FALKINHAM, 2013.

A membrana externa rica em lipídios resulta em células impermeáveis a nutrientes hidrofílicos e resistentes a metais pesados, desinfetantes e antimicrobianos. Além disso, é extremamente hidrofóbica, preferindo a fixação em superfícies formando biofilmes, em vez de crescer em suspensão. O crescimento em biofilmes aumenta ainda mais a resistência a antimicrobianos e desinfetantes (RASTOGI *et al.*, 1981; BRENNAN & NIKAIDO, 1995; STEED *et al.*, 2006; FALKINHAM, 2007; FALKINHAM, 2013).

É provável que a capacidade de algumas espécies de MNT de utilizar hidrocarbonetos se deva à sua membrana externa hidrofóbica. A combinação da membrana externa impermeável

e o baixo número de operons de RNA ribossômico (rRNA) contribui para o crescimento lento (uma geração por dia). Muitas espécies de MNT são relativamente resistentes a altas temperaturas, embora as bases genéticas e moleculares da resistência térmica não tenham sido elucidadas, esse é um fator determinante da sua ecologia (PARKER *et al.*, 1983; BERCOVIER *et al.*, 1986; SCHULZE-RÖBBECKE & BUCHOLTZ, 1992; FALKINHAM, 2011).

MNT pertencem à categoria de microrganismos resistentes às amebas, podendo sobreviver à fagocitose por amebas e protozoários de vida livre. MNT, amebas e protozoários ocupam os mesmos habitats, principalmente biofilmes em sistemas de distribuição de água potável e encanamento doméstico. De fato, as amebas têm um papel importante na regulação do número de bactérias em biofilmes (THOMAS *et al.*, 2006; FALKINHAM, 2013).

Os ambientes de preocupação com a transmissão de MNT incluem aqueles que têm capacidade comprovada de crescimento destas bactérias, aqueles a quem os humanos são expostos regularmente e aqueles capazes de aerossolizar partículas em tamanho respirável. Isso inclui tubulações de água potável, torneiras de pia, chuveiros, banheiras de hidromassagem, umidificadores, máquinas de CPAP (*Continuous positive airway pressure*), piscinas de natação, solos de jardins naturais e adquiridos comercialmente, além de poeira doméstica (DAWSON, 1971; IIVANAINEN *et al.*, 1997; COVERT *et al.*, 1999; IIVANAINEN *et al.*, 1999; MANGIONE *et al.*, 2001; DE GROOTE *et al.*, 2006; ASSI *et al.*, 2007; FALKINHAM *et al.*, 2008; FEAZEL *et al.*, 2009; TORVINEM *et al.*, 2010; FALKINHAM, 2013; THOMSON *et al.*, 2013a; THOMSON *et al.*, 2013b; DONOHUE *et al.*, 2015; LANDE, 2018).

As MNT podem ser encontradas em sistemas municipais de água, pois são resistentes à maioria dos desinfetantes, incluindo cloro e cloramina, e podem sobreviver e proliferar com baixos níveis de nutrientes devido ao seu crescimento lento. Além disso, estão associadas à turbidez da água e a maior concentração de carbono orgânico. Aderem-se ao material particulado na água e aos biofilmes do encanamento, colonizando as superfícies internas dos tubos e torneiras. A sobrevivência das MNT nos sistemas de distribuição de água depende de uma interação complexa entre a fonte de água, tempo de trânsito, estagnação, superfície do tubo, níveis de nutrientes, temperatura, turbidez, tipo e desinfetante utilizado (BENDINGER *et al.*, 1993; STELMACK *et al.*, 1999; FALKINHAM *et al.*, 2001; MULLIS *et al.*, 2013; LANDE, 2018).

São relativamente resistentes ao calor, com crescimento ideal entre 28°C e 37°C. Devido à sua preferência por água morna foram detectadas no ar ou na água em 72% dos locais de

piscinas de água quente ou de hidroterapia testados. A resistência ao calor em relação a outros microrganismos da água potável, provavelmente contribui para o alto número de MNT em prédios de apartamentos e condomínios, ou hospitais com sistemas de água quente com recirculação (DU MOULIN *et al.*, 1988; PELLETIER *et al.*, 1988; FALKINHAM *et al.*, 2001; GLAZER *et al.*, 2007; TICHENOR *et al.*, 2012; LANDE, 2018).

Também foram isolados de poeiras domésticas, bem como de solos naturais e comerciais. As poeiras aerossolizadas do solo natural ou vasos contêm alto número de MNT, até um milhão de organismos por grama de solo, e a exposição e a jardinagem do solo foram correlacionadas com o risco de infecção (ICHIYAMA *et al.*, 1988; DE GROOTE *et al.*, 2006; REED *et al.*, 2006; TORVINEM *et al.*, 2010; LANDE, 2018).

Espécies diferentes de MNT podem ter preferências por diferentes nichos ambientais. *M. avium* e *M. chimaera* são encontrados na água, *M. intracellulare* não, mas tem sido associado ao solo, poeira doméstica, adubos e turfa. *M. chimaera* tem sido responsável por relatos de contaminação de unidades aquecedoras e resfriadores usadas durante cirurgia cardíaca (REZNIKOV *et al.*, 1971; CAYER *et al.*, 2007; WALLACE *et al.*, 2013; LANDE *et al.*, 2015; PERKINS *et al.*, 2016; SOMMERSTEIN *et al.*, 2016; LANDE, 2018).

As razões para essas diferenças não são claras. Elas podem estar relacionadas a condições favoráveis a cada espécie em relação à composição do solo, fonte de água, temperatura, umidade, atividades industriais que resultam em aerossolização. Além disso, os hábitos e hobbies de um indivíduo suscetível podem influenciar significativamente no seu risco de infecção e no tipo de espécie que eles adquirem (ADJEMIAN *et al.*, 2012; LANDE, 2018).

A transmissão de MNT no ambiente da saúde geralmente ocorre por meio da exposição de sítios anatômicos vulneráveis e feridas a materiais contaminados, ou por meio de aerossóis ou fômites (FALKINHAM, 2009; HRUSKA & KAEVSKA, 2012; SHAKOOR *et al.*, 2019).

As infecções por MNT na área da saúde podem ser observadas em uma ampla gama de ambientes, com uma epidemiologia muito diversa. Foram observadas infecções em clínicas odontológicas, espaços de fisioterapia e hidroterapia, bem como pós-cirurgias plásticas. O quadro 3 apresenta diferentes fontes de MNT descritas em ambientes de saúde (FALKINHAM, 1996; SHAKOOR *et al.*, 2019).

Quadro 3 - Fontes de MNT em ambientes nosocomiais, possíveis rotas de transmissão e fatores de risco em ambientes de saúde

Principais fontes de transmissão de MNT nosocomial
Água
Chuveiros
Dispositivos de aquecimento e resfriamento
Bebedouro de água e máquinas de gelo
Frascos para medicamentos multidose
Implantes de silicone
Injeções intra-articulares/epidurais
Dispositivos protéticos contaminados
Vias de transmissão de micobactérias não tuberculosas nosocomiais
Inoculação direta
Gotas de aerossolização por água, dispositivos de aquecimento e resfriamento ou umidificadores de ar
Fatores de risco para infecções por micobactérias não tuberculosas nosocomiais
Cirurgia/ferida operatória
Uso de esteroides
Dispositivos protéticos
Cateteres intravasculares
Cirurgia cardíaca
Acupuntura
Cirurgia de rejuvenescimento / enxerto de gordura ou lipoaspiração

Fonte: adaptado de SHAKOOR *et al.*, 2019.

Um estudo brasileiro sobre a caracterização dos surtos causados pelo Complexo *M. abscessus*, no qual foram revisados 44 artigos sobre o tema, concluiu ao classificar os surtos em internacionais e nacionais, que foram relacionados com procedimentos médicos distintos. Dos 12 surtos internacionais, 11 foram relacionados a procedimentos médicos, como acupuntura e aplicações de diversas substâncias, sendo a fonte de infecção mais comum a utilização de água proveniente de rede de abastecimento para a limpeza dos equipamentos utilizados nos procedimentos. Já os surtos nacionais descreveram infecções nosocomiais relacionadas a procedimentos médicos invasivos, sendo a principal fonte de infecção a utilização de desinfetantes ineficientes para a espécie na desinfecção dos equipamentos utilizados (CARVALHO, 2012).

As possíveis rotas de infecção por MNT de seus reservatórios incluem (1) ingestão de solo ou água por crianças causando linfadenite cervical, (2) inalação de aerossóis carregados de MNT por adultos causando infecção pulmonar, (3) inalação de poeiras de solos de vasos que levam à doença pulmonar; (4) aspiração para o pulmão devido a refluxo gástrico causando infecção pulmonar; e (5) ingestão oral de MNT em água por pacientes com profunda imunodeficiência e redução da normalidade da função da barreira do trato gastrointestinal (FALKINHAM, 2013).

As formas cutâneas mais comuns de infecção envolvem inoculação direta por trauma, infecções pós-cirúrgicas ou aquisição iatrogênica com dispositivos médicos de permanência, cirurgia plástica ou implantes protéticos. As micobactérias podem se propagar pela pele e tecidos moles durante a disseminação sistêmica em indivíduos imunossuprimidos (GRIFFITH *et al.*, 2007; AITKEN *et al.*, 2012; BRYANT *et al.*, 2013; WANG & PANCHOLI, 2014; WU & HOLLAND, 2015; WALLACE *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2018).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

O número de casos de micobacterioses vêm aumentando em todo o mundo. As MNT têm sido cada vez mais identificadas como agentes causadores de doença, principalmente pulmonar (LAI *et al.*, 2011; WEISS *et al.*, 2012).

É provável que o aumento de infecções por MNT seja multifatorial, incluindo uma crescente coorte de populações em risco, juntamente com a melhoria contínua da capacidade de diagnóstico (AHMED *et al.*, 2020).

Embora as espécies de MNT sejam ubíquas no ambiente, com distribuição mundial, doenças associadas à MNT (predominantemente pulmonares) são notificadas principalmente em países desenvolvidos com taxas muito baixas de tuberculose (TB), sendo raramente relatadas em países em desenvolvimento com altas taxas de TB endêmica (PREVOTS & MARRAS *et al.*, 2015; FONG, 2020).

As infecções por MNT ainda são consideradas raras (1,0 a 1,8 casos/100.000 habitantes), no entanto, nos EUA a prevalência anual passou de 20 casos/100.000 habitantes em 1997 para 47 casos/100.000 habitantes em 2007. Foram encontradas taxas menores de incidência na Nova Zelândia (1,92/100.000 habitantes) em 2004, e no Canadá (6,7/100.000 habitantes) em 2006. Também foi relatado aumento na prevalência de casos de micobacterioses em estudo realizado no Reino Unido com evolução dos casos reportados de 0,9 casos/100.000 habitantes para 2,9 casos/100.000 habitantes no período de 1995 a 2006. Na América do Sul, África e Oriente Médio, as culturas de escarro para investigação de suspeita de TB relataram desenvolvimento de MNT em 4-20% das amostras analisadas. (GRIFFITH, *et al.*, 2007; FREEMAN *et al.*, 2007, HERNÁNDEZ-GARDUÑO *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2010; ADJEMIAN *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2018).

Relatos de séries de casos em diversos países têm evidenciado que a distribuição das espécies de MNT isoladas de amostras clínicas difere fortemente segundo a região geográfica avaliada. Isso pode ser reflexo, pelo menos em parte, da ocorrência de infecções clínicas relevantes por espécies específicas. O conhecimento da distribuição regional das diferentes espécies associadas à infecção tem forte relevância clínica, pois fornece informações sobre possíveis reservatórios ambientais, diferenças de suscetibilidade do hospedeiro entre diferentes regiões e pistas sobre as rotas de transmissão (LIU *et al.*, 2016; ZWEIJPFENNING *et al.*, 2018).

Estudo que contou com amostras respiratórias de 20.182 pacientes, em 62 laboratórios de 30 países em seis continentes, mostrou diferenças na distribuição das espécies entre os continentes e entre os diferentes países. O estudo relatou que bactérias do Complexo *M. avium* foram predominantes na maioria dos países, seguido por *M. gordonae* e *M. xenopi*, no entanto, diferenças importantes foram observadas na distribuição geográfica das espécies do Complexo *M. avium*, *M. xenopi* e *M. kansasii* (HOEFSLOOT *et al.*, 2013).

Da mesma forma, entre as espécies de crescimento rápido, *M. abscessus* e o Complexo *M. fortuitum* foram as mais comumente isoladas, mas diferenças também foram observadas na distribuição geográfica. Esses diferentes padrões de isolamento, refletem provavelmente, os diferentes nichos ambientais específicos entre as espécies de MNT, variando de acordo com a região e o país estudado (HOEFSLOOT *et al.*, 2013; KWON *et al.*, 2016).

A maioria dos dados para pacientes infectados com MNT na América do Sul foram coletados no Brasil, geralmente em pacientes com suspeita de TB (WAGNER *et al.*, 2018).

Nos estados do Pará, Piauí, Bahia e Rondônia, entre 9% e 25% dos espécimes positivos nas culturas para micobactérias foram identificados como MNT. A porcentagem de pacientes com amostras positivas para MNT foi menor (8-14%), indicando positividade repetitiva das culturas em um mesmo paciente. Em São Paulo, por exemplo, diferentes estudos com amostras respiratórias coletadas entre 1995 a 2010 para diagnóstico de TB, relataram crescimento de MNT em aproximadamente um quinto das culturas (17-24%). As espécies isoladas diferiram substancialmente entre estudos e entre regiões, com uma alta porcentagem de micobactérias de crescimento rápido sendo relatadas em Rondônia e Bahia, enquanto as micobactérias de crescimento lento do Complexo *M. avium* e *M. kansasii* foram predominantes no Pará, Rio de Janeiro e São Paulo (CHIMARA *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2004; DA SILVEIRA *et al.*, 2008; ZAMARIOLI *et al.*, 2008; BONA *et al.*, 2011; DA COSTA *et al.*, 2012; BENSI *et al.*, 2013;

DA COSTA *et al.*, 2013; DE MELLO *et al.*, 2013; MENDES DE LIMA *et al.*, 2013; WAGNER *et al.*, 2018).

Um compilado de estudos clínicos e epidemiológicos nacionais sobre micobacterioses pulmonares pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 - Estudos clínicos e epidemiológicos sobre doença pulmonar por MNT no Brasil

Estudo	Estado	Período	Pacientes (n)	Sexo masculino (%)	Média de idade (anos)	Espécies predominantes
MATOS <i>et al.</i> , 2004	Bahia	1998-2003	19	68,4	48,8	<i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , MAC, <i>M. kansasii</i>
FUSCO DA COSTA <i>et al.</i> , 2013	Pará	2010-2011	38	27,6	52	<i>M. massiliense</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i>
MENDES DE LIMA <i>et al.</i> , 2013	Rondônia	2008-2010	45	64,5	50	<i>M. abscessus</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. fortuitum</i>
DE MELLO <i>et al.</i> , 2013	Rio de Janeiro	1993-2011	174	72,1	55	<i>M. kansasii</i> , MAC, <i>M. abscessus</i>
CARNEIRO <i>et al.</i> , 2018	Rio Grande do Sul	2003-2013	100	51,0	54,6	MAC, <i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i>
MARQUES <i>et al.</i> , 2019	São Paulo	2011-2014	448	-	-	<i>M. avium</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. intracellulare</i>

Fonte: adaptado de CARNEIRO *et al.*, 2018. MAC: Complexo *M. avium*

Dados epidemiológicos sobre a prevalência de MNT pulmonar e extrapulmonar no Brasil são escassos e o aumento da compreensão dessa diversidade é importante, pois pode fornecer pistas sobre o impacto das diferenças geográficas ou climáticas na distribuição das MNT e as discrepâncias observadas na relevância clínica (MARRAS *et al.*, 2002; VAN INGEN *et al.*, 2009a; WEISS *et al.*, 2012; PUGA *et al.*, 2018).

Em diversos países, incluindo o Brasil, os casos de micobacterioses não são de notificação obrigatória. Um dos argumentos apresentados contra a notificação de isolados laboratoriais de MNT de amostras pulmonares é a incapacidade de determinar se a doença está presente ou se os isolados representam contaminação ou colonização. A dificuldade em separar as notificações significativas das não significativas, impede a vigilância apropriada. Quase 90% dos casos que atendem aos critérios microbiológicos da Sociedade Torácica Americana/ Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (ATS/IDSA) para doença significativa com

MNT, também atendem a todos os critérios clínicos e radiológicos. Portanto, com os relatórios eletrônicos e os avanços na comunicação entre agências de vigilância em saúde e laboratórios públicos e particulares, é relativamente simples determinar o número provável de casos significativos. Essa metodologia foi validada tanto em Oregon nos Estados Unidos, quanto em Ontário no Canadá (MARRAS *et al.*, 2010; WINTHROP *et al.*, 2010; THOMSON *et al.*, 2017; WINTHROP *et al.*, 2017).

Devido à ausência de notificação e produção de relatórios epidemiológicos detalhados, a verdadeira prevalência de MNT do Brasil permanece desconhecida e a diversidade geográfica não foi amplamente estudada. Faltam também infraestrutura laboratorial e testes acessíveis e acurados que possam assegurar um diagnóstico preciso. O diagnóstico correto das micobacterioses é necessário para realização do monitoramento dessas infecções, incluindo informações sobre sua distribuição regional, as principais espécies envolvidas, condições coexistentes associadas e respostas ao tratamento (DE MELLO *et al.*, 2013).

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Infecções por MNT como causa de doença pulmonar humana foram descritas pela primeira vez em 1954, quando pacientes com doença pulmonar por TB apresentaram micobactérias atípicas que não eram *M. tuberculosis*. Desde então, em torno de 200 espécies de micobactérias foram identificadas, e os esforços para caracterizar a prevalência, incidência, custo e fatores de risco associados a essas micobactérias aumentaram (TIMPE & RUNYON, 1954; FALKINHAM, 2015; DANIEL-WAYMAN *et al.*, 2018).

As infecções causadas por MNT diferem da epidemiologia clássica da tuberculose em vários pontos: (1) A tuberculose clássica é generalizada em todo o mundo; as infecções por MNT são caracterizadas por uma ocorrência endêmica distinta; (2) a fonte de infecção humana na tuberculose clássica é uma pessoa doente ou um animal infectado; enquanto os reservatórios de MNT são ambientais; (3) a via de transmissão da tuberculose é direta a partir de outro indivíduo infectado, raramente indireta a partir de alimentos contaminados, e o mecanismo de transferência é conhecido; as rotas de transmissão da maioria das doenças por MNT representam um problema a ser esclarecido e os mecanismos envolvidos ainda não foram adequadamente explicados (WINTHROP *et al.*, 2010; PORVAZNIK *et al.*, 2016).

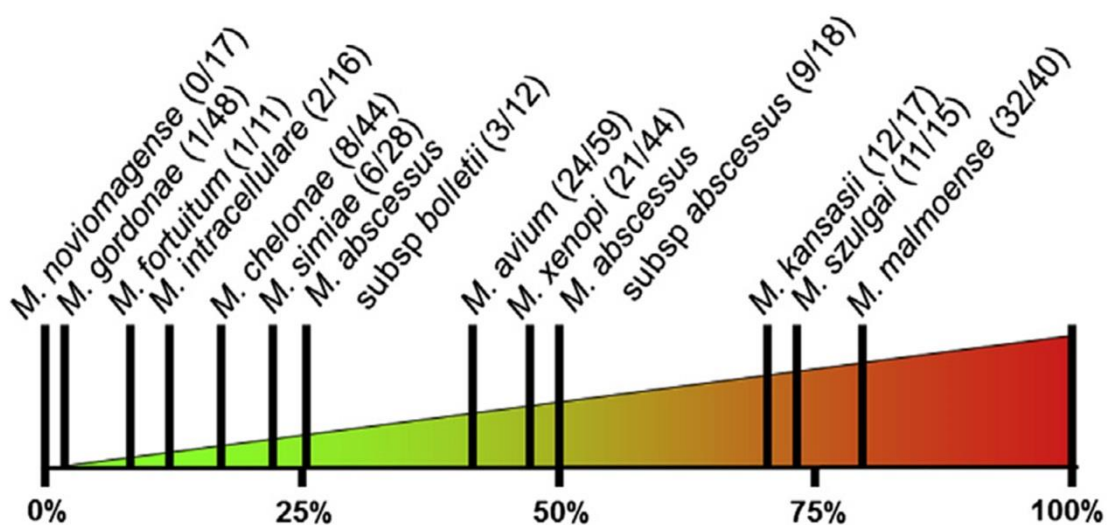
A patogenicidade das espécies de MNT varia significativamente, microrganismos como o *M. gordonae* raramente causam doenças em humanos, enquanto *M. kansasii* geralmente é considerado patogênico (VAN INGEN *et al.*, 2009a).

A doença humana causada por MNT é classificada em quatro síndromes clínicas distintas: doença pulmonar crônica, linfadenite, doença cutânea e doença disseminada (GRIFFITH *et al.*, 2007; KOH, 2017).

A doença pulmonar é a manifestação clínica mais comum, sendo *M. avium* e *M. intracellulare* as principais espécies, dentro do complexo, associadas a infecções pulmonares. *M. kansasii* é outra espécie de crescimento lento frequentemente associada à infecção pulmonar. Entre as micobactérias de crescimento rápido destaca-se o Complexo *M. abscessus*, que abrange as subespécies *abscessus*, *bolletii* e *massiliense*. Outras espécies de MNT, como *M. fortuitum*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. chelonae* e *M. szulgai*, são causas menos comuns de doença pulmonar (ESTEBAN & GARCÍA-COCA, 2018; SADIKOT, 2019).

Nos Países Baixos, a relevância clínica das espécies de MNT mais frequentemente isoladas em amostras respiratórias foi quantificada em estudos retrospectivos. A relevância foi expressa como a porcentagem de pacientes com uma cultura de amostra respiratória positiva, que ao final da investigação foi considerada doença pulmonar. A representação desses casos é observada na figura 2.

Figura 2 - Relevância clínica de MNT isoladas de amostras respiratórias



Fonte: adaptado de VAN INGEN, 2015). A figura representa dados de estudos realizados nos Países Baixos (VAN INGEN *et al.*, 2008(a, b, c); VAN INGEN *et al.*, 2009(a, b); HOEFSLOOT *et al.*, 2009).

As infecções por MNT são fenotipicamente diversas, com manifestações distintas, afetando quase todos os órgãos (quadro 4). O Complexo *M. avium* (MAC) e *M. abscessus* também podem causar infecções sistêmicas e/ou disseminadas. É importante ressaltar que *M. marinum* e *M. ulcerans* são duas espécies importantes e verdadeiramente patogênicas, responsáveis por infecções cutâneas graves. *M. marinum* e *M. abscessus* têm sido identificados como as espécies mais comuns responsáveis por infecções de pele e *M. chimaera* e *M. abscessus* como espécies mais comuns responsáveis por infecções envolvendo tecidos moles. *M. abscessus* infecta pacientes sem fatores de risco subjacentes, além de pacientes com histórico de distúrbios pulmonares, como fibrose cística e bronquiectasia, sendo a primeira MCR a ser isolada nesse contexto (FALKINHAM, 2003; GRIFFITH *et al.*, 2007; FLOTO *et al.*, 2016; MISCH *et al.*, 2018; SWENSON *et al.*, 2018; MEI *et al.*, 2019; JOHANSEN *et al.*, 2020).

A doença pulmonar por MNT normalmente ocorre no cenário de comorbidades preexistentes, como fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), deficiência de alfa-1 antitripsina, TB pulmonar prévia, câncer de pulmão e bronquiectasia. A bronquiectasia pode ser adquirida - por exemplo, bronquiectasia decorrente de infecções anteriores não relacionadas (enfisema relacionado ao tabagismo e pneumoconiose) ou resultado de distúrbios genético-hereditários que resultam em anormalidades estruturais e/ou imunológicas do pulmão. Infecções extrapulmonares viscerais/disseminadas geralmente ocorrem em indivíduos francamente imunocomprometidos (Aids ou o uso de antagonistas do TNF- α), ou são de origem genética/hereditária (ROSENZWEIG *et al.*, 1979; SONNENBERG *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2009; TAIWO & GLASSROTH, 2010; MIRSAEIDI *et al.*, 2014; AXSON *et al.*, 2018; CHAN *et al.*, 2018).

Condições e terapias imunossupressoras podem resultar em infecções profundas localizadas ou disseminadas, principalmente aquelas associadas à imunidade celular prejudicada ou função das células T. Isso inclui o uso de esteroides, fármacos imunomoduladores e produtos biológicos usados no transplante de órgãos, doenças reumáticas, autoimunes e cânceres. Antes do advento da terapia antirretroviral (TARV), MAC disseminado era frequentemente encontrado em pacientes com Aids na América do Norte e Europa. Esta condição atualmente é rara devido à TARV universal precoce, uma vez que o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é realizado com maior frequência. Relatos de isolados de pacientes com MNT disseminada sem imunossupressão reconhecida,

provavelmente representam indivíduos com imunidade celular comprometida não detectada, como defeitos nas vias de interferon- γ ou interleucina-12, o que requer investigação especial (CHETCHOTISAKD *et al.*, 2000; ROSENZWEIG *et al.*, 2005; FONG, 2020).

Quadro 4 - Exemplos de espécies de MNT e infecções associadas

MNT	Doença e/ou órgão afetado
Crescimento rápido	
Complexo <i>M. abscessus</i>	Pulmão, disseminada, outras
<i>M. chelonae</i>	Pele/tecidos moles, disseminada
Complexo <i>M. fortuitum</i>	Pele/tecidos moles, disseminada
<i>M. marinum</i>	Pele/tecidos moles
<i>M. mucogenicum</i>	Bacteremia por catéter
Crescimento lento	
Complexo <i>M. avium</i>	Pulmão, disseminada, linfadenite
<i>M. kansasii</i>	Pulmão, linfadenite
<i>M. xenopi</i>	Pulmão
<i>M. simiae</i>	Pulmão
<i>M. scrofulaceum</i>	Linfadenite
<i>M. szulgai</i>	Pulmão
<i>M. malmoense</i>	Linfadenite, Pulmão
<i>M. haemophilum</i>	Linfadenite, disseminada
<i>M. genavense</i>	Disseminada
<i>M. terrae</i>	Disseminada

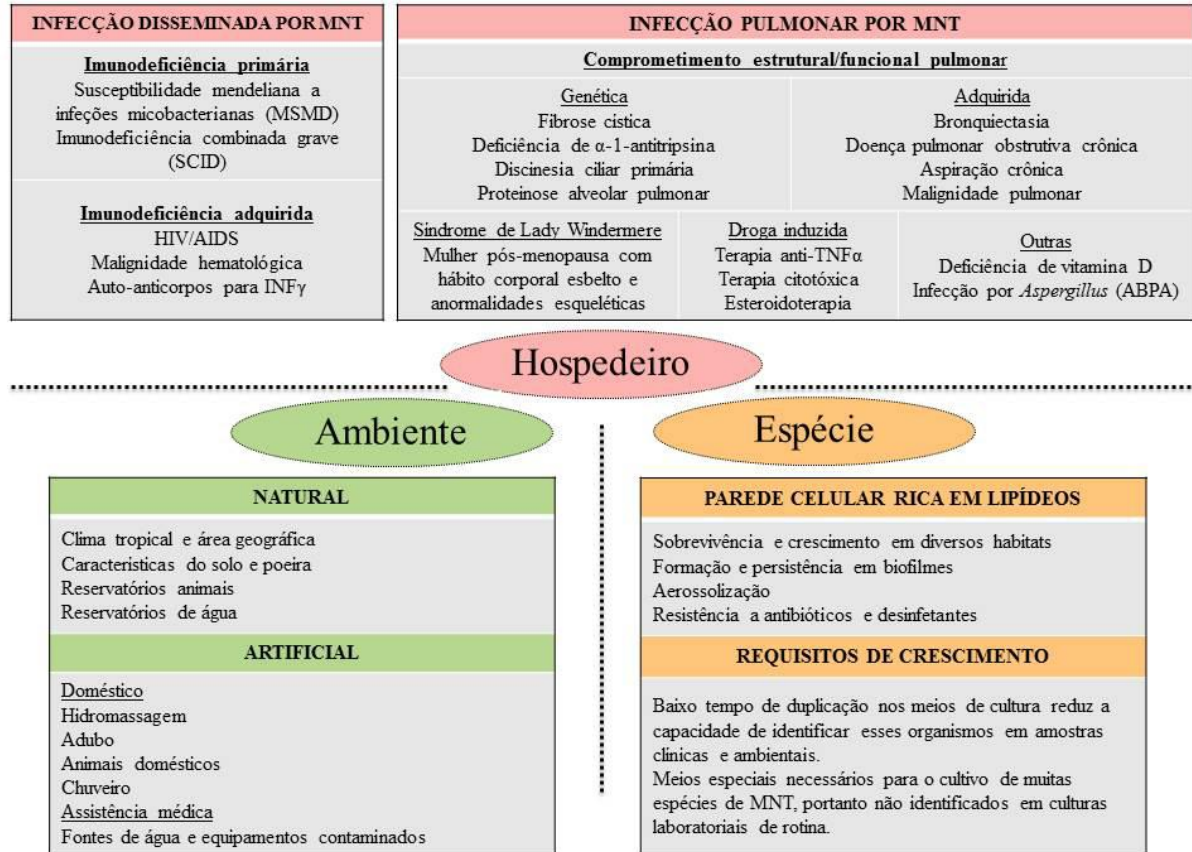
Fonte: adaptado de FONG, 2020

Pacientes com supressão imunológica devido a síndromes de deficiência imunológica primária, como a suscetibilidade mendeliana a infecções micobacterianas (MSDM) associada a anormalidades nos receptores IL12-p40, IL12, IFN γ e deformidades genéticas (IFN γ R1, IFN γ R2, IL12RB1, IL12B, STAT1, IKBKG, CYBB, ISG15, IRF8, GATA2), apresentam alto risco de infecção por MNT (SEXTON & HARRISON, 2008; LEE *et al.*, 2011; LAKE *et al.*, 2016; RATNATUNGA *et al.*, 2020).

Pacientes com neoplasias hematológicas, em particular leucemia de células ciliadas, também são identificados como suscetíveis à infecção por MNT. Esse grupo geralmente desenvolve infecção disseminada ao invés de infecção pulmonar isolada. Outros estados adquiridos de deficiência imunológica, como os decorrentes de transplantes de células-tronco hematopoiéticas e transplantes de órgãos sólidos, também estão predispostos à infecção por MNT (BAIRD & THOMSON, 2018; HENKLE & WINTHROP, 2019; RATNATUNGA *et al.*, 2020).

Os principais fatores de risco associados à propensão de infecção por MNT estão esquematizados na figura 3.

Figura 3 - Fatores de risco combinados em relação ao hospedeiro, ao ambiente e às espécies, que contribuem para o desenvolvimento de doença por MNT



Fonte: adaptado de RATNATUNGA *et al.*, 2020.

Os avanços na terapêutica em todos os campos da medicina viram surgir suscetibilidades inesperadas de doença por MNT, o que representa um desafio em termos de atendimento ao paciente, mas também fornece informações sobre a patologia da doença. A suscetibilidade de pacientes com artrite reumatoide em terapia anti-TNF (infliximabe, adalimumabe, golimumabe e certolizumabe) às infecções por MNT é um excelente exemplo. (WALLIS, 2011; HENKLE & WINTHROP, 2015; LIAO *et al.*, 2016; RATNATUNGA *et al.*, 2020).

Outro grupo de pacientes propensos são mulheres brancas idosas na pós-menopausa que se apresentam classicamente com infecção do lobo médio ou lingular do pulmão por MNT. Descritos como “síndrome de Lady Windermere”, essas pacientes costumam ter um fenótipo físico distinto de constituição esbelta, pectus excavatum (deformidade em depressão do esterno e cartilagens costais inferiores) ou escoliose e prolapso da válvula mitral, embora, notadamente,

não apresentem disfunção imunológica conhecida (SEXTON & HARRISON, 2008; MIRSAEIDI *et al.*, 2014; HOLT *et al.*, 2019; RATNATUNGA *et al.*, 2020).

Doença do refluxo gastroesofágico, deficiência de vitamina D, artrite reumatoide e baixo índice de massa corporal (IMC) também são risco para o desenvolvimento de doença pulmonar por MNT (WINTHROP & ISEMAN, 2013; YEH *et al.*, 2014; LIAO *et al.*, 2016; HAWORTH *et al.*, 2017; RATNATUNGA *et al.*, 2020).

1.4.1 Doença pulmonar

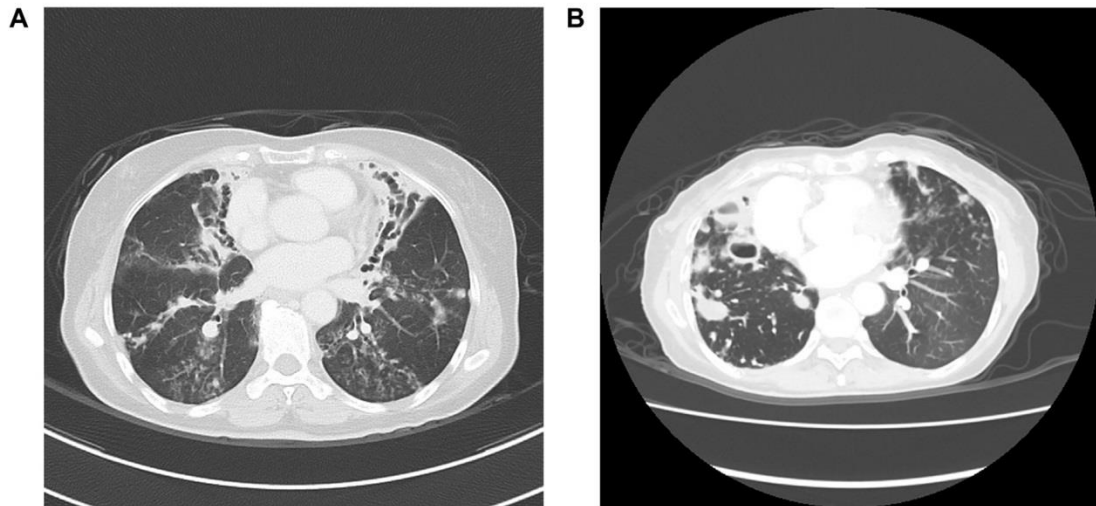
A doença pulmonar crônica é a manifestação clínica mais comum de infecção por MNT. Os sintomas são inespecíficos, ocorrendo também em indivíduos com doenças respiratórias pré-existentes como bronquiectasias ou DPOC, sendo desafiador realizar o diagnóstico diferencial. Tem sido sugerido que a doença pulmonar por MNT deva ser considerada em qualquer paciente com doença pulmonar estrutural cujos sintomas não respondam ao tratamento de sua condição subjacente (WOLINSKY, 1979; O'BRIEN *et al.*, 1987; FALKINHAM, 1996; FIELD & COWIE, 2006; GRIFFITH *et al.*, 2007; CLAIN & AKSAMIT, 2018; FENG *et al.*, 2020).

Os sintomas relatados por alguns estudos variaram consideravelmente: tosse (21% - 100%) e produção de escarro (12% - 100%). Outros sintomas menos comuns são febre (11% - 58%), hemoptise (11% - 37%) e perda de peso (4% - 38%). Os pacientes podem apresentar também dispneia progressiva, dor no peito, fadiga e suores noturnos (GRIFFITH *et al.*, 1993; FIELD & COWIE, 2006; HAYASHI *et al.*, 2012; HWANG *et al.*, 2017; FENG *et al.*, 2020).

A doença pulmonar por MNT geralmente se apresenta em três grandes fenótipos clínicos: (1) fibrocavitária, (2) forma bronquiectásica nodular e (3) pneumonite por hipersensibilidade. A associação aumentada de MNT com doenças pulmonares preexistentes está sendo mais frequentemente reconhecida devido ao uso da tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) (figura 4) e de abordagens moleculares aprimoradas para diagnóstico (HOLLAND, 2001; GRIFFITH & AKSAMIT, 2012; HONDA *et al.*, 2015; PORVAZNIK *et al.*, 2017; SADIKOT, 2019).

Radiograficamente, as características principais da doença pulmonar por MNT são lesões fibrocavitárias, regiões de bronquiectasia, infiltrados nodulares, consolidação pulmonar e opacidades ramificadas que caracterizam o padrão de árvore em brotamento (GRIFFITH *et al.*, 2007; CLAIN & AKSAMIT, 2018).

Figura 4 - Sinais em tomografia computadorizada da doença pulmonar por MNT



Fonte: adaptado de FENG *et al.*, 2020. Dois principais tipos de sinais visualizados radiologicamente da micobacteriose pulmonar: A) doença bronquiectásica nodular causada pelo Complexo *M. avium*; B) doença fibrocavitária causada por *M. kansasii*.

Os estudos radiológicos mostram dois tipos de infecção pulmonar por MAC: fibrocavitária e bronquiectásica nodular. A forma fibrocavitária progride rapidamente e geralmente está associada a uma doença pulmonar subjacente. É mais comum em homens entre 40 e 50 anos com histórico de tabagismo. Na forma bronquiectásica nodular, as bronquiectasias bilaterais e os infiltrados nodulares (aparência de árvore em brotamento) são vistos nas imagens de TCAR. Tem uma progressão lenta e geralmente ocorre em mulheres no pós-menopausa, não fumantes, brancas (DALEY, 2017; PARK *et al.*, 2017; NASIRI *et al.*, 2020).

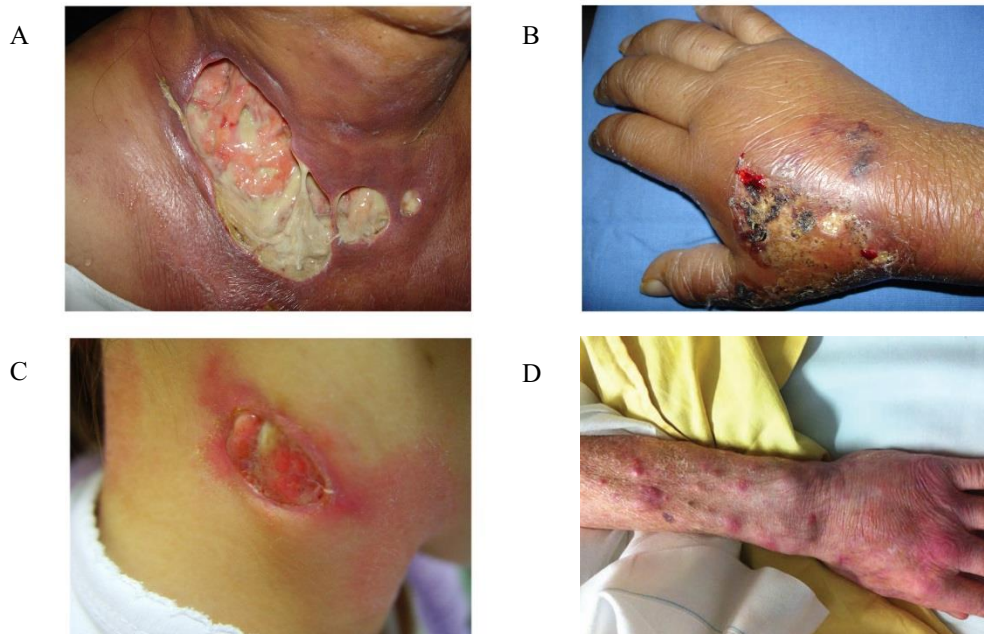
1.4.2 Doença extrapulmonar

A doença extrapulmonar representa a minoria dos casos de micobacterioses. Estudos retrospectivos recentes de registros laboratoriais de vários países concluem que 20 a 30% dos isolados de MNT são de origem extrapulmonar (LAI *et al.*, 2010; VAN INGEN *et al.*, 2010b; SMITH *et al.*, 2016; HERMANSEN *et al.*, 2017; HOLT & KASPENBAUER, 2018).

As doenças extrapulmonares por MNT incluem infecções de pele e tecidos moles (mais comum), infecções musculoesqueléticas, linfadenite e doença disseminada. A infecção ocular

por MNT é rara, mas potencialmente devastadora (GRIFFITH *et al.*, 2007; PIERSIMONI & SCARPARO, 2009; HOLT & KASPENBAUER, 2018; WI, 2019).

Figura 5 – Manifestações clínicas da doença extrapulmonar por MNT



Fonte: adaptado de LINDEBOOM *et al.*, 2011; McCALLUM *et al.*, 2016; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2018). A) Infecção por *M. abscessus* apresentando-se como escrofuloderma B) Edema grave nas mãos e lesões linfangíticas nodulares causadas por infecção por *M. marinum*. C) Ferida ulcerosa aberta como resultado de uma infecção cervicofacial por *M. haemophilum*. D) Antebraço esquerdo com nódulos cutâneos associados à infecção por *M. chelonae*, neste caso o paciente estava em uso de infliximabe e prednisona para colite ulcerosa.

As infecções cutâneas por MNT se manifestam com lesões que evoluem lentamente ao longo de semanas a meses, assumindo várias formas, incluindo abscessos, úlceras, nódulos, pápulas e erupções cutâneas. As mãos e os antebraços são os locais mais afetados e a dor é o sintoma mais comum, embora alguns se queixem de prurido e inchaço. As espécies causadoras mais frequentes são *M. marinum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* (USLAN *et al.*, 2006; DODIUK-GAD *et al.*, 2007; WENTWORTH *et al.*, 2013; CLAIN & AKSAMIT, 2018).

M. marinum está associado a um quadro clínico padrão distinto conhecido como “granuloma do aquário”. *M. fortuitum* geralmente causa um único nódulo no local do trauma ou cirurgia, sendo os pacientes jovens e imunocompetentes, responsivos a muitos antimicrobianos orais. *M. abscessus* e *M. chelonae* são mais frequentes em idosos e em pacientes imunossuprimidos, apresentando múltiplos nódulos ou abscessos, e são mais difíceis de tratar. (BENDL & ONGLEY, 1978; GONZALES-SANTIAGO & DRAGE, 2015).

As infecções cutâneas por MNT são transmitidas por inoculação direta por meio de rupturas da barreira cutânea, que podem ocorrer durante trauma, procedimentos cirúrgicos, cirurgia plástica (incluindo lipoaspiração), injeções, tatuagens, acupuntura e piercings corporais. Procedimentos estéticos, como mesoterapia (injeções múltiplas de produtos farmacêuticos, extratos vegetais, substâncias homeopáticas, vitaminas ou outros compostos na gordura subcutânea), estão envolvidos na transmissão de MCR (WANG & PANCHOLI *et al.*, 2014; MOUGARI *et al.*, 2016; FORBES *et al.*, 2018; FRANCO PAREDES *et al.*, 2018).

A apresentação clínica das infecções ósseas e articulares das MNT varia de acordo com o *status* imunológico do paciente. A osteomielite por MNT em indivíduos imunossuprimidos geralmente é um componente da doença disseminada e se manifesta como lesões multifocais, com envolvimento vertebral. As doenças ósseas e articulares em paciente imunocompetente geralmente são focais e ocorrem devido à inoculação direta ou extensão da infecção cutânea aos tecidos profundos. Os sintomas comuns incluem dor localizada, secreção purulenta e inchaço nas articulações. As espécies mais comumente identificadas são *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. marinum* (PARK *et al.*, 2014; IZAWA & KITADA, 2016; KOBAYASHI *et al.*, 2016; HOLT & KASPENBAUER, 2018).

A linfadenite é a forma mais comum de doença por MNT em crianças. As crianças afetadas são geralmente imunocompetentes e com idade menor que cinco anos. Na ausência de infecção pelo HIV, a linfadenite por MNT raramente afeta adultos (HAVERKAMP *et al.*, 2004; WI, 2019).

Bactérias do MAC são a causa mais comum de linfadenite cervical por MNT. Outras espécies associadas a esta infecção são *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. kansasii* e *M. lentiflavum* que emergiu como um importante agente etiológico dessas infecções (KOH, 2017; FONG, 2020; MUÑOZ-EGEA *et al.*, 2020).

As altas taxas de incidência de MAC entre as crianças podem refletir a infecção direta pela mucosa da garganta, pois as crianças têm maior probabilidade de apresentar contato direto frequente com fontes de MAC (sujeira, solo e água). Além disso, uma imunidade celular mais imatura em crianças pode ser parte da explicação (NYLEN *et al.*, 2000; WAGNER & YOUNG, 2004; HERMANSEN *et al.*, 2017).

A apresentação clínica de linfadenite por MNT é geralmente uma adenite cervical, mais frequentemente na região submandibular de cor púrpura e consistência firme ou flutuante. A adenite faz parte de um aglomerado de nódulos palpáveis com 2 a 3 cm de tamanho, geralmente

progride em volume pelo período de várias semanas. A adenite é fria, persistente ou dolorida antes da ruptura, o que ocorre com relativa frequência (ERIKSSON *et al.*, 2001; LARSSON *et al.*, 2018).

A doença disseminada ocorre principalmente em pacientes com Aids. Na maioria dos casos, afeta especialmente órgãos do sistema retículoendotelial (como o fígado, baço e medula óssea) e aparelho gastrointestinal. Os sintomas não são específicos e, na maioria dos casos, se assemelham aos observados na TB disseminada. Isso inclui febre intermitente ou persistente, suores noturnos, perda de peso, fadiga, mal-estar e anorexia (NIGHTINGALE *et al.*, 1992; KARAKOUSIS *et al.*, 2004; CARRASCO *et al.*, 2014; GONZALEZ-SANTIAGO & DRAGE, 2015).

A doença disseminada em pacientes sem HIV é rara e é vista em situações de imunossupressão significativa (por exemplo, pessoas transplantadas, uso crônico de corticosteroide, leucemia). Pode ocorrer disseminação sistêmica por meio de infecção cutânea primária por MNT. Na maioria dos casos, a doença disseminada apresenta lesões cutâneas disseminadas (GONZALEZ-SANTIAGO & DRAGE, 2015).

1.5 TRATAMENTO

O primeiro elemento essencial no tratamento de pacientes com MNT é o suporte laboratorial adequado. Todas as decisões de manejo do tratamento dos pacientes requerem identificação acurada da espécie de MNT que está causando a infecção e resultados de testes de sensibilidade *in vitro* (GRIFFITH *et al.*, 2007; AKSAMIT & GRIFFITH, 2018).

O tratamento da doença pulmonar por MNT varia de acordo com a espécie (em alguns casos subespécies), extensão da doença, resultado de sensibilidade a medicamentos, e comorbidades subjacentes. Os regimes terapêuticos requerem o uso de múltiplos antimicrobianos, que geralmente estão associados a reações adversas clinicamente significativas e devem ser administrados por períodos prolongados. Mesmo assim, os resultados do tratamento geralmente são inferiores ao ideal e a reinfeção com outra cepa ou espécie é comum (DALEY *et al.*, 2020).

O tratamento das micobacterioses é particularmente desafiador, com opções terapêuticas limitadas, consistindo na utilização de uma combinação de pelo menos três antimicrobianos (BENTO *et al.*, 2020).

Tabela 2 - Esquemas de tratamento recomendados para doença pulmonar pelo Complexo *Mycobacterium avium*, *M. kansasii* e *M. xenopi*

Espécie	Número de medicamentos	Regime de medicamentos preferido*	Frequência de dosagem
Complexo <i>M. avium</i>			
Bronquiectasia nodular	3	- Azitromicina (claritromicina) - Rifampicina (rifabutina) - Etambutol	3 vezes por semana
Cavitária	≥ 3	- Azitromicina (claritromicina) - Rifampicina (rifabutina) - Etambutol - Amicacina IV (estreptomicina) [#]	Diariamente (3 vezes por semana podem ser usados aminoglicosídeos)
Refratária ⁺	≥ 4	- Azitromicina (claritromicina) - Rifampicina (rifabutina) - Etambutol - Suspensão inalatória de amicacina lipossomal ou amicacina IV (estreptomicina) [#]	Diariamente (3 vezes por semana podem ser usados aminoglicosídeos)
	3	- Azitromicina (claritromicina) - Rifampicina (rifabutina) - Etambutol	Diariamente
<i>M. kansasii</i>			
	3	- Azitromicina (claritromicina) - Rifampicina (rifabutina) - Etambutol	3 vezes por semana
	3	- Isoniazida - Rifampicina (rifabutina) - Etambutol	Diariamente
<i>M. xenopi</i>			
	≥ 3	- Azitromicina (claritromicina) e/ou moxifloxacino - Rifampicina (rifabutina) - Etambutol - Amicacina [#]	Diariamente (3 vezes por semana podem ser usados aminoglicosídeos)

*: Medicamentos alternativos para pacientes intolerantes ou cujo isolado é resistente a medicamentos de primeira linha incluem clofazimina, moxifloxacino e linezolida. Alguns especialistas consideram bedaquilina ou tedizolida. #: considerar para doença cavitária, bronquiectasia nodular extensa ou MAC resistente a macrolídeos. Amicacina ou estreptomicina podem ser administradas três vezes por semana. +: doença refratária é definida como positiva para a cultura de escarro após seis meses de terapia baseada em diretrizes. Foi demonstrado que a suspensão inalatória de amicacina lipossomal favorece a conversão da cultura quando adicionada à terapia baseada em diretrizes no tratamento de pacientes refratários com doença pulmonar por MAC.

Fonte: adaptado de DALEY *et al.*, 2020

Conforme recomendado pela ATS/IDSA, o manejo é amplamente empírico. Apesar da significativa variabilidade interespecie de MNT na sensibilidade a medicamentos, o tratamento geralmente é agrupado. Regimes terapêuticos personalizados, para espécies específicas estão disponíveis apenas para alguns patógenos comumente encontrados, incluindo, por exemplo,

MAC, *M. kansasii* e *M. xenopi*, como apresentado na tabela 2 (GRIFFITH *et al.*, 2007; HAWORTH *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2018).

A identificação das espécies de MNT nem sempre leva ao início do tratamento. A decisão de iniciá-lo deve basear-se na apresentação clínica, no curso esperado, na progressão da doença e nos fatores de risco individuais, como doença pulmonar preexistente, condições genéticas ou iatrogenéticas (GRIFFITH *et al.*, 2007; THOMSON & YEW, 2009; LARSSON *et al.*, 2018).

Uma avaliação cuidadosa da patogenicidade do organismo, riscos e benefícios da terapia, o desejo e a capacidade do paciente de receber tratamento, bem como os objetivos da terapia, devem ser discutidos com o mesmo antes de iniciar o tratamento. Em alguns casos, o acompanhamento do paciente pode ser o curso de ação preferido (DALEY *et al.*, 2020).

Um dos desafios importantes na escolha de um tratamento eficiente para a infecção por MNT, tem sido a falta de estudos correlacionando os padrões de sensibilidade *in vitro* e a resposta clínica. Isso contribuiu para atrasos na execução de diretrizes apropriadas, levando à falha do tratamento e desenvolvimento de resistência. Não há recomendações de tratamento baseadas em evidências para grande parte das espécies e os médicos avaliam as decisões caso a caso (GRIFFITH *et al.*, 2007; BENTO *et al.*, 2020).

Alguns dos possíveis obstáculos ao sucesso da terapia pulmonar estão listados no quadro 5.

Quadro 5 - Impedimentos à terapia eficaz para tratamento da doença pulmonar por MNT

Terapia de longa duração
Utilização de vários antimicrobianos
Presença ubíqua de MNT no ambiente, resultando em exposição contínua
Mecanismos inatos de resistência a antimicrobianos
Fraca correlação entre sensibilidade <i>in vitro</i> e clínica (<i>in vivo</i>)
Resistência adquirida a antimicrobianos
Fraca correlação entre farmacocinética/farmacodinâmica e resposta clínica
Comorbidades (bronquiectasia / DPOC)
Sintomas clínicos inespecíficos
Predisposição para reinfecção com exposição contínua
Até o momento, fatores não identificados inibem a resposta terapêutica

Fonte: adaptado de AKSAMIT & GRIFFITH, 2018

A base de todos os tratamentos atuais para infecções por MNT são os macrolídeos (inibem a síntese de proteínas nas bactérias, ligando-se à subunidade ribossômica 50S e impedindo o alongamento da cadeia peptídica nascente). Esses antimicrobianos têm a melhor

correlação entre os resultados de sensibilidade *in vitro* e a resposta clínica. Claritromicina ou azitromicina são as opções usuais, sem diferenças significativas na resposta entre os dois. A claritromicina foi estudada mais extensivamente e é frequentemente a escolha preferida. No entanto, interfere com as enzimas do CYP450, o que pode resultar em interações indesejáveis com outros medicamentos. Para evitar esse efeito, a azitromicina pode ser uma boa opção (GRIFFITH, *et al.*, 2007; BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012a; EGELUND *et al.*, 2015; GRIFFITH, 2018b; BENTO *et al.*, 2020).

Os genes *erm* (eritromicina ribossomo metilase) estão associados à resistência induzida aos macrolídeos, e foram identificados em várias micobactérias de crescimento rápido clinicamente relevantes, incluindo *M. abscessus*. Nesse sentido, o *status* taxonômico dessa espécie tem implicações importantes em relação à sensibilidade antimicrobiana, porque as subespécies *abscessus* e *bolletii* geralmente possuem uma metilase *erm* (41), que pode conferir resistência a esses antimicrobianos, enquanto a subespécie *massiliense* não possui essa enzima funcional. Por esse motivo, é desejável a identificação a nível de subespécie. Além disso, como outros mecanismos de resistência aos macrolídeos podem ser desenvolvidos sob tratamento, é aconselhável evitar a monoterapia com esses antimicrobianos. O tratamento da doença pulmonar por *M. abscessus* deve incluir no regime inicial antimicrobianos intravenosos e orais, seguido de um regime de continuação incluindo antimicrobianos inalatórios e/ou orais (ESTEBAN *et al.*, 2009; NASH *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010; MAURER *et al.*, 2012; BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2019; MUÑOZ-EGEA *et al.*, 2020).

Os medicamentos de segunda linha são de extrema importância em casos específicos, como doenças severamente disseminadas ou recalcitrantes, e são essenciais nos casos de MAC resistente a macrolídeos. Os aminoglicosídeos (inibidores da síntese de proteínas), como a amicacina ou a estreptomicina são mais frequentemente utilizados nesses casos. A suspensão por inalação de amicacina lipossomal (ALIS) é uma nova alternativa promissora para essas infecções. As fluoroquinolonas (inibidores diretos da síntese de DNA), como o moxifloxacino, foram incluídas na terapia de doenças pulmonares causadas por MAC resistente a macrolídeos. A utilização de fluoroquinolonas como medicamentos de primeira linha, bem como em um regime de macrolídeos/fluoroquinolonas, é desaconselhável devido ao risco do surgimento de resistência e toxicidade cardíaca. No entanto, as fluoroquinolonas têm atividade significativa contra o *M. kansasii* e são de extrema importância nos casos de *M. kansasii* resistente à rifampicina (GRIFFITH *et al.*, 2007; BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012a; EGELUND *et al.*,

2015; PHILLEY & GRIFFITH, 2015; HAWORTH *et al.*, 2017; GRIFFITH *et al.*, 2018c; PHILLEY & GRIFFITH, 2019; BENTO *et al.*, 2020).

A tabela 3 mostra os principais medicamentos utilizados no tratamento de micobacterioses pulmonares.

O uso de terapias adjuvantes, como fisioterapia, além de antimicrobianos, deve fazer parte do tratamento. Os pacientes devem desempenhar um papel fundamental no manejo diário da doença e devem estar cientes de que a cessação do tabagismo é importante para melhorar a função das vias aéreas. Um programa de treinamento físico individual em estreita cooperação com um fisioterapeuta é essencial para o bem-estar dos pacientes e ajuda a preservar sua capacidade física (LARSSON *et al.*, 2018).

Além da terapia antimicrobiana, é necessário evitar fontes potenciais de exposição (por exemplo, água em aerossol, solo e biofilmes) para impedir a reinfecção. (FLUDE *et al.*, 2012; SADIKOT, 2019).

Tabela 3 - Diretrizes de dosagens para medicamentos utilizados no tratamento da doença pulmonar por MNT

Medicamento	Dosagem diária	3 vezes na semana	Comprometimento hepático	Comprometimento renal
Oral				
Azitromicina	250-500mg/dia	500mg/dia	N/A	N/A
Ciprofloxacino	500-750mg 2 vezes/dia	N/A	N/A	250–500mg em intervalos de acordo com a CICr
Claritromicina	500mg 2 vezes/dia	500mg 2 vezes/dia	N/A	Reduza a dose em 50% se CICr <30 mL·min ⁻¹
Clofazimina*	100-200mg/dia	N/A	Cuidado com insuficiência hepática grave	N/A
Doxiciclina	100mg 1-2 vezes/dia	N/A	N/A	N/A
Etambutol	15mg.kg ⁻¹ /dia	25mg.kg ⁻¹ /dia	N/A	Aumentar o intervalo de dosagem (ex., 15-25mg.kg ⁻¹ , 3 vezes/semana)
Isoniazida	5 mg.kg ⁻¹ até 300mg/dia	N/A	Cuidado	N/A
Linezolid	600mg 1-2 vezes/dia [#]	N/A	N/A	N/A
Moxifloxacino	400mg/dia	N/A	N/A	N/A
Sulfametoxazol + trimetoprima	800mg/160mg 2 vezes/dia	N/A	Cuidado	Reduza a dose em 50% se CICr 15–30mL·min ⁻¹

Rifabutina	150–300 mg/dia (150mg/dia com claritromicina)	300mg/dia	Cuidado	Reduza a dose em 50% se ClCr <30 mL·min ⁻¹
Rifampicina	10mg·kg ⁻¹ (450 ou 600mg/dia)	600mg/dia	Cuidado	N/A
Parenteral				
Amicacina IV	10–15mg·kg ⁻¹ /dia ⁺ , ajustado de acordo com monitoramento do nível de drogas	15–25mg·kg ⁻¹ /dia ⁺ ajustado de acordo com monitoramento do nível de drogas	N/A	Reduza a dose ou aumente o intervalo de dosagem (ex., 15 mg·kg ⁻¹ 2-3 vezes/semana)
Cefoxitina IV	2-4g 2-3 vezes/dia (a dose diária máxima é 12g/dia)	N/A	N/A	Reduza a dose ou aumente o intervalo de dosagem
Estreptomicina (IV ou IM)	10–15mg·kg ⁻¹ /dia, ajustado de acordo com monitoramento do nível de drogas [§]	15-25mg·kg ⁻¹ /dia, ajustado de acordo com monitoramento do nível de drogas [§]	N/A	Reduza a dose ou aumente o intervalo de dosagem (ex., 15 mg·kg ⁻¹ , 2-3 vezes/semana)
Imipenem IV	500-1000mg 2-3vezes/dia	N/A	N/A	Reduza a dose ou aumente o intervalo de dosagem
Tigeciclina	25-50mg 1-2 vezes/dia [#]	N/A	25mg 1-2 vezes/dia em insuficiência hepática	N/A
Inalação				
Suspensão inalatória amicacina lipossomal	de	590mg/dia	N/A	N/A
Amicacina, formulação parenteral		250-500mg/dia	N/A	N/A

ClCr: depuração da creatinina; IM: intramuscular; IV: intravenoso; N/A: não aplicável. *: a disponibilidade de clofazimina varia de acordo com o país. Nos Estados Unidos, é necessária uma aplicação experimental do novo medicamento. #: a maioria dos especialistas recomenda a administração de linezolida e tigeciclina uma vez ao dia, devido à alta taxa de reações adversas relacionadas ao medicamento associadas à administração duas vezes ao dia. +: o uso dos regimes descritos por 15 semanas foi associado à ototoxicidade permanente em aproximadamente um terço dos pacientes e o risco foi associado à idade e à dose cumulativa (PELOQUIN *et al.*, 2004). Dadas às altas taxas de ototoxicidade, riscos e benefícios devem ser cuidadosamente considerados à luz dos objetivos da terapia. Os médicos devem considerar faixas de doses mais baixas e provavelmente confiar em doses intermitentes quando for empregada terapia mais prolongada. §: monitoramento do nível de droga: considere <5 mg·L⁻¹; pico com dosagem diária de 35 a 45 µg·mL⁻¹; pico com dosagem intermitente 65–80 µg·mL⁻¹ (PELOQUIN *et al.*, 2004).

Fonte: adaptado de DALEY *et al.*, 2020

Embora o progresso considerável na identificação de novos antimicrobianos para o tratamento (bedaquilina, delamanid, tedizolida, omadaciclina, evaraciclina) e novas abordagens de tratamento, ainda não temos novos regimes para MNT. Existe necessidade de futuras terapias

combinadas para melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade em relação aos fármacos disponíveis (HOFFNER & ORDWAY, 2019; MUÑOZ-EGEA *et al.*, 2020).

O tratamento da micobacteriose pulmonar requer terapia medicamentosa prolongada, geralmente de 12 a 18 meses (PHILLEY & GRIFFITH, 2015; RATNATUNGA *et al.*, 2020).

O MAC tem sido o isolado mais comum de micobacteriose pulmonar. A taxa atual de tratamento bem-sucedido para a doença pulmonar por MAC é insatisfatória devido a várias razões, incluindo falta de aderência às diretrizes atuais, duração prolongada do tratamento, e desafios no desenvolvimento de novos antibióticos. A maioria dos laboratórios de microbiologia não faz distinção entre as diferentes espécies de MAC, porque os regimes de tratamento e os resultados clínicos são semelhantes (PHILLEY & GRIFFITH, 2019; NASIRI *et al.*, 2020).

Os princípios gerais da terapia, conforme delineados para doenças pulmonares, geralmente se aplicam à doença extrapulmonar por MNT, embora frequentemente com duração mais curta do que o recomendado para a doença pulmonar (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Quadro 6 - Antibimicrobianos sugeridos para pacientes com micobacteriose extrapulmonar *

Espécie	Regime Sugerido [#]
<i>M. abscessus</i> Resistente a macrolídeos	Grave (inicial): amicacina + cefoxitina/imipenem + tigeciclina Grave (continuação) ou leve: 3-5 dos seguintes antibióticos: clofazimina, linezolida, minociclina, moxifloxacino, cotrimoxazol
<i>M. abscessus</i> / <i>M. massiliense</i> Sensível a macrolídeos	Inicial grave: amicacina + cefoxitina/imipenem + azitromicina/claritromicina Grave (continuação) ou leve: azitromicina/claritromicina + 2-4 dos seguintes antibióticos: clofazimina, linezolida, minociclina, moxifloxacino, cotrimoxazol
<i>M. chelonae</i>	Grave (inicial): azitromicina/claritromicina + tobramicina ± imipenem Grave (continuação) ou leve: azitromicina/claritromicina + doxiciclina ou clofazimina ou linezolida
<i>M. fortuitum</i>	Grave (inicial): amicacina + quinolona + minociclina Grave (continuação) ou leve: quinolona + minociclina
<i>M. marinum</i>	Grave (inicial): amicacina + azitromicina/claritromicina + rifampicina + etambutol Grave (continuação) ou leve: azitromicina/claritromicina + rifampicina + etambutol
Complexo <i>M. avium</i> Sensível a macrolídeos	Grave (inicial): amicacina/estreptomicina + rifampicina + etambutol + azitromicina/claritromicina Grave (continuação) ou leve: rifampicina + etambutol + azitromicina / claritromicina

Fonte: adaptado de WI, 2019. *GRIFFITH *et al.*, 2007. # Testes de sensibilidade a medicamentos *in vitro* devem ser realizados o mais rápido possível após a identificação da espécie.

Nas infecções de pele e tecidos moles, infecções musculoesqueléticas, o tratamento prolongado com combinações de antimicrobianos é eficaz, sendo a cirurgia uma importante

ferramenta complementar. A duração recomendada da terapia para infecções de pele e tecidos moles é geralmente de dois a quatro meses para doença leve e de seis meses para doença grave, enquanto o tratamento da micobacteriose musculoesquelética geralmente requer pelo menos seis a doze meses. As opções de tratamento da linfadenite por MNT incluem intervenção cirúrgica, terapia médica e/ou observação. O tratamento da doença disseminada por MNT geralmente requer seis a doze meses após a restauração imune. No entanto, apesar de um aumento considerável no conhecimento sobre doenças com MNT, determinar abordagens ótimas de tratamento continua sendo uma tarefa complexa e desafiadora (WI, 2019).

1.5.1 Prognóstico

O tratamento da doença pulmonar por MNT pode ser decepcionante. O prognóstico está relacionado à resposta ao tratamento. A melhora clínica sustentada e a conversão da cultura não são alcançáveis para todos os pacientes. Os piores resultados de sobrevida são observados em pacientes do sexo masculino, na presença de doença fibrocavitária e comorbidades graves (HAYASHI *et al.*, 2012; DIEHL *et al.*, 2018; LARSSON *et al.*, 2018).

A cura é geralmente definida como conversão sustentada da cultura doze meses após o tratamento. As taxas de cura diferem por espécie, gravidade da doença e linha de tratamento (primeira linha, recaída/reinfecção) e variam de 30% a 50% para infecções pelo Complexo *M. abscessus* e de 50% a 70% pelo MAC. A infecção por um isolado resistente a macrolídeos ou a aquisição de resistência a macrolídeos durante o tratamento dificulta o sucesso terapêutico e é um fator prognóstico negativo (GRIFFITH *et al.*, 2007; VAN INGEN *et al.*, 2012; LARSSON *et al.*, 2018).

Estudo com 481 pacientes com DPOC, que receberam mais de doze meses de tratamento com antimicrobianos, mostrou que pacientes sem doença fibrocavitária tiveram maior probabilidade de resultado favorável (88%) em comparação com aqueles com fibrocavitações (76%), ou aqueles com uma mistura de doença fibrocavitária e bronquiectásica (78%). O estudo enfatizou a importância da reinfecção nessa população de pacientes, pois 29% foram reinfecados ou recidivados após o tratamento, com a genotipagem mostrando que 74% dos casos foram devidos a reinfecção (KOH *et al.*, 2017; CHALMERS *et al.*, 2018).

1.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das micobacterioses continua sendo um dilema clínico, como MNT são microrganismos ambientais, o seu isolamento em um sítio anatômico não estéril pode ser reflexo de uma contaminação ambiental. Portanto, a comunicação entre médicos e laboratórios é muito importante (VARMA-BASIL & BOSE, 2019).

Os critérios diagnósticos de micobacteriose pulmonar mais comumente utilizados são as diretrizes da ATS/IDSA publicada em 2007 e a orientação da Sociedade Torácica Britânica (BTS) publicada em 2017, apresentadas no quadro 7. De acordo com essas diretrizes, a doença pulmonar por MNT pode ser diagnosticada somente quando todos os critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos forem atendidos e outros diagnósticos tiverem sido descartados (GRIFFITH *et al.*, 2007; HAWORTH *et al.*, 2017; FENG *et al.*, 2020).

Quadro 7 - Critérios para o diagnóstico de doença pulmonar por MNT*

Clínico	Sintomas pulmonares ou sistêmicos	
Radiológico	Opacidades nodulares ou cavitárias na radiografia de tórax ou tomografia computadorizada de alta resolução que mostra bronquiectasias com múltiplos nódulos pequenos	Critérios clínicos e radiológicos exigidos
E	Exclusão adequada de outros diagnósticos	
Microbiológico[#]	1) Resultados positivos da cultura de pelo menos duas amostras de escarro separadas. Se os resultados não forem diagnósticos, considere repetir esfregaços e culturas de BAAR do escarro. ou 2) Cultura positiva resultante de pelo menos um lavado broncoalveolar 3) Biópsia transbrônquica ou outra pulmonar com características histológicas micobacterianas (inflamação granulomatosa ou BAAR) e um ou mais escarro ou lavado broncoalveolar com cultura positiva para MNT	
Fonte: adaptado de DALEY <i>et al.</i> , 2020. Diretriz da ATS/IDSA (Griffith <i>et al.</i> , 2007). *: a consulta aos especialistas deve ser feita quando são isoladas espécies de MNT infrequentes ou que geralmente representam contaminação ambiental. Paciente com suspeita de doença pulmonar por MNT, mas que não atende aos critérios diagnósticos deve ser acompanhado até que o diagnóstico seja firmemente estabelecido ou excluído. O diagnóstico da doença pulmonar por MNT não exige, por si só, a instituição da terapia, que é uma decisão baseada nos riscos e benefícios potenciais da terapia para pacientes individuais. #: quando duas culturas positivas são obtidas, os isolados devem ser da mesma espécie de MNT (ou subespécie no caso de <i>M. abscessus</i>) para atender aos critérios da doença.		

Segundo as diretrizes, para o diagnóstico microbiológico, o paciente deve ter pelo menos duas ou mais amostras de escarros, ou uma amostra de lavado broncoalveolar com cultura positiva para MNT. Outro critério aceito seria amostra de biópsia transbrônquica (ou

outro tipo de biópsia pulmonar) demonstrando inflamação granulomatosa ou presença de BAAR (bacilos álcool-ácido resistentes), juntamente com uma amostra de escarro, cultura de biópsia ou lavado broncoalveolar positivo (GRIFFITH *et al.*, 2007; HAWORTH *et al.*, 2017; VARMA-BASIL & BOSE, 2019).

Embora os critérios sirvam de guia para o diagnóstico de todas as doenças pulmonares por MNT, é imprescindível considerar cuidadosamente a espécie de MNT isolada para determinar o diagnóstico de doença pulmonar, mesmo uma única cultura de escarro positiva com crescimento de microrganismos particularmente virulentos, como *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. malmoense* deve ser considerada. Felizmente, a maioria dos casos apresenta um curso indolente da doença, permitindo tempo suficiente para estabelecer um diagnóstico microbiológico com várias amostras (PLOTINSKY *et al.*, 2013; CLAIN & AKSAMIT, 2018; VAN INGEN *et al.*, 2009b; PHILLEY *et al.*, 2016; CLAIN & AKSAMIT, 2018).

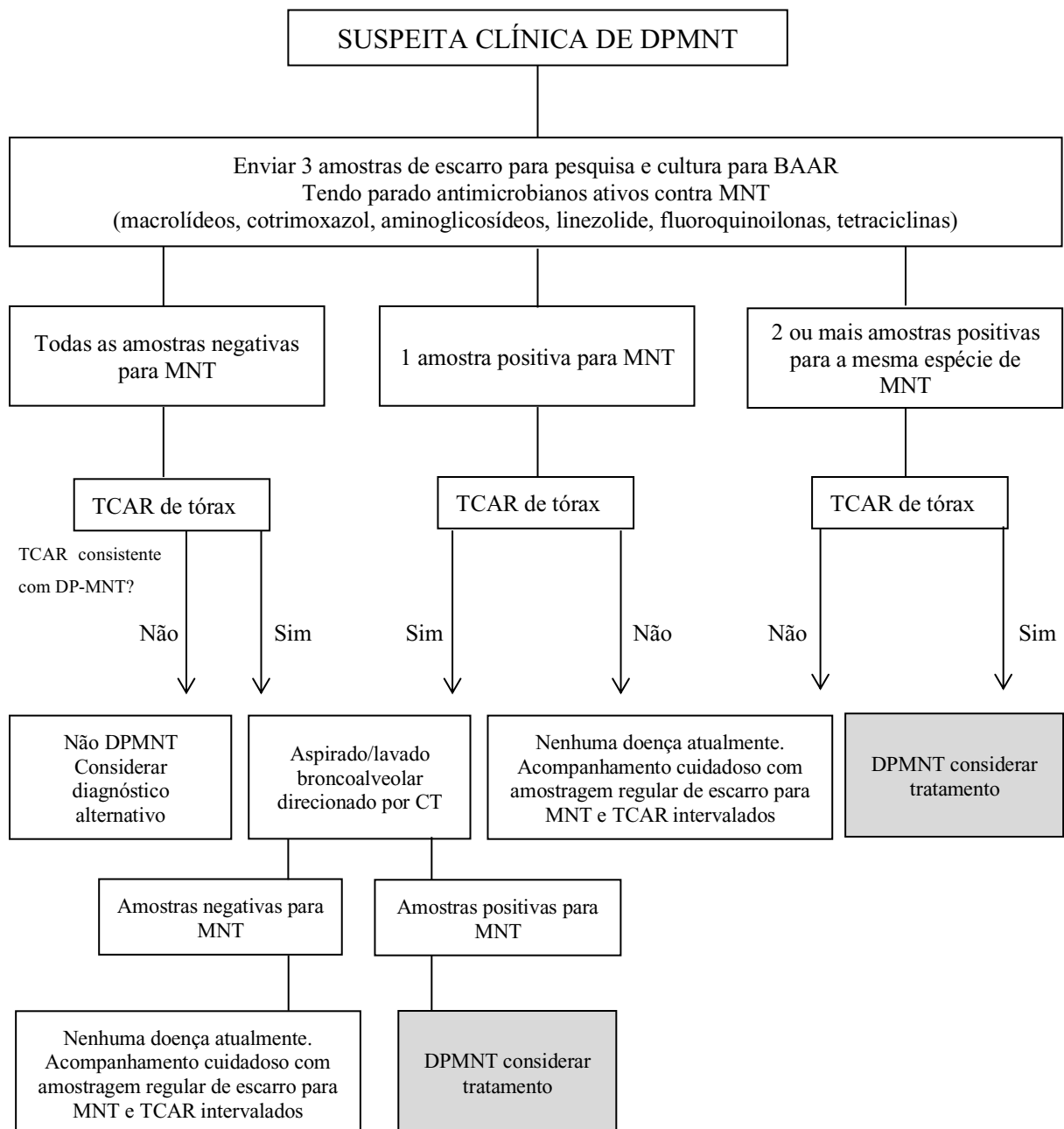
Para a investigação de casos de micobacteriose pulmonar a BTS publicou um algoritmo de investigação para casos suspeitos de infecção pulmonar (figura 6).

O diagnóstico de infecções por micobactérias na pele e tecidos moles requer atenção na suspeita, dado o amplo espectro de apresentações clínicas potenciais. A confirmação do diagnóstico de infecções micobacterianas cutâneas exige avaliar a presença de BAAR e/ou o crescimento em culturas de amostras de tecido ou material obtido a partir de drenagem de lesões (GRIFFITH *et al.*, 2007; FORBES *et al.*, 2018; FRANCO-PAREDES *et al.*, 2018).

Para o diagnóstico microbiológico é necessário primeiramente distinguir o CMTB das MNT. Os testes de amplificação de ácido nucleico (NAAT) são excelentes ferramentas para esse fim e podem ser usados diretamente nas amostras clínicas de pacientes com suspeita de doença micobacteriana, permitindo resultados no mesmo dia. Como exemplo estão o *MTD amplificado* (Hologic Inc., EUA) e *Xpert MTB/RIF* (Cepheid, EUA). Embora o NAAT seja um método rápido para detectar TB, pode haver resultados falso-negativos, dependendo da qualidade da amostra, do teste específico utilizado e da carga bacteriana na amostra. Além disso, a maioria dos NAAT não detecta MNT, assim, um resultado negativo para TB e um esfregaço positivo de BAAR são bons indicadores da presença de MNT. No entanto, esses testes geralmente são avaliados principalmente com amostras respiratórias e informações adequadas sobre seu desempenho em amostras não respiratórias são escassos (SOMOSKOVI & SALFINGER, 2014; FORBES *et al.*, 2018).

A pesquisa direta em esfregaço corado e a cultura para BAAR devem sempre ser realizados. Um resultado de esfregaço positivo para BAAR fornece aos profissionais de saúde informações valiosas. A cultura é mais sensível e ainda é o padrão ouro para a detecção dessas bactérias (FORBES *et al.*, 2018).

Figura 6 - Algoritmo para investigação de indivíduos com suspeita clínica de doença pulmonar por MNT



Fonte: adaptado de FLOTO *et al.*, 2016; HAWORTH *et al.*, 2017. (BAAR, bacilo álcool-ácido resistente; TCAR, Tomografia computadorizada de alta resolução; DPMNT, doença pulmonar por micobactéria não tuberculosa).

É importante observar que espécies de MNT podem ser frequentemente isoladas em indivíduos com TB pulmonar. Isso não é surpreendente, considerando que os pacientes com TB têm doença pulmonar, portanto, a colonização ou infecção por organismos ambientais é possível. Os indivíduos com TB também costumam ter várias amostras de escarro coletadas, algumas das quais podem ficar contaminadas com MNT. Na presença de coisolamento de MNT com TB, o isolado de TB deve ter prioridade nas considerações de diagnóstico e tratamento. Entre os indivíduos em terapia para TB comprovada, cujas amostras subsequentemente são positivas para MNT, a terapia adequada para TB continua sendo a prioridade. (PUBLIC HEALTH ONTARIO, 2017).

1.6.1 Amostras

Amostras para identificação de micobactérias e testes de sensibilidade podem ser coletadas em praticamente qualquer área do corpo. A coleta de todas as amostras deve evitar fontes potenciais de contaminação, principalmente água da torneira. Para fins de diagnóstico, pode ser necessário coletar várias amostras respiratórias em dias separados. Para estabelecer o diagnóstico de doença pulmonar por MNT, é preferida a coleta de três amostras pela manhã em dias diferentes (GRIFFITH *et al.*, 2007).

As amostras pulmonares podem incluir expectoração produzida espontaneamente ou induzida, lavagem gástrica ou aspirações broncoscópicas. Pus de abscesso deve ser enviado em quantidade suficiente. A coleta por swabs deve ser evitada, pois geralmente a quantidade de amostra é insuficiente e tende a secar. Na impossibilidade de coleta por aspiração do material purulento, a utilização do swab deve buscar saturar bem o dispositivo com a amostra. Para lesões cutâneas, a pele deve ser bem limpa com álcool antes da aspiração do material para uma seringa. Os fluidos corporais devem ser coletados assepticamente por aspiração com agulha e seringa estéreis. As amostras de biópsia de tecido podem ser imersas em soro fisiológico estéril para evitar a dessecação. Hemocultura positiva está sempre associada à doença clínica. O sangue deve ser coletado para cultura de micobactérias com anticoagulantes adicionados, como polianetol sulfonato de sódio ou heparina. Sistemas automatizados especializados para culturas de micobactérias, como o *BactecMGIT960* (BD, EUA) ou o *BacTec* (BD, EUA) podem ser utilizados para isolamento de MNT (VARMA-BASIL & BOSE, 2019).

1.6.2 Identificação

Tradicionalmente, a identificação de MNT no laboratório depende das características fenotípicas, como taxa de crescimento, pigmentação, morfologia das colônias e testes bioquímicos (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2012b; VAN INGEN, 2013; MISCH *et al.*, 2018).

A identificação das espécies do gênero *Mycobacterium* baseada nas características bioquímicas fenotípicas é demorada e os resultados geralmente são duvidosos. Por esse motivo, as técnicas de identificação fenotípicas estão sendo substituídas por métodos moleculares e de espectrometria de massa, garantindo mais agilidade e melhor poder discriminatório na identificação das espécies de MNT (SAIFI *et al.*, 2013; CHOE *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015).

As ferramentas de diagnóstico recentes incluem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e testes de diagnóstico molecular. Hibridação de DNA-DNA, sequenciamento de DNA do gene 16S rRNA (e outras regiões gênicas como *hsp65*, *rpoB*, ou genoma total) permitiram a identificação de muitas espécies novas (SPRINGER *et al.*, 1996; MISCH *et al.*, 2018).

Os métodos moleculares e outros, são agora rotineiramente usados em laboratórios de referência e centros acadêmicos e revolucionaram a avaliação microbiológica das MNT, incluindo métodos rápidos e precisos para identificação clínica de isolados, investigações de epidemiologia molecular e descoberta de mecanismos de resistência inatos. A Tabela 4 resume essas importantes novas ferramentas comerciais para diagnóstico de infecções por MNT (NASH *et al.*, 2009; VAN INGEN *et al.*, 2012, VAN INGEN *et al.*, 2017; GRIFFITH *et al.*, 2018a).

1.6.2.1 Identificação fenotípica

A identificação fenotípica consiste em métodos convencionais como a baciloscopia, a determinação da velocidade de crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) em meios específicos, a observação da produção de pigmentos pelas micobactérias, o crescimento em diferentes temperaturas (25°C, 37°C e 45°C) e a realização de testes bioquímicos. Os testes

convencionais são simples de executar, porém são muito demorados, atrasando a identificação (OLIVEIRA, 2015; VELAYATI *et al.*, 2019).

Tabela 4 - Métodos moleculares para a identificação de MNT

Nome ou tipo de ensaio	RNA/DNA alvo e métodos	Espécies identificadas	Vantagens e desvantagens
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM (Hain Lifescience, Alemanha)	Alvo: fragmento de 230 pb do gene 23S rRNA Método: PCR de uma região do gene 23S rRNA, seguido por hibridização reversa e tecnologia de sonda de linha	> 20 espécies e <i>M. tuberculosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Requer crescimento na cultura • 37 espécies identificáveis. • A <i>Tsukamurella</i> pode ser identificada erroneamente como <i>Mycobacterium spp.</i> • <i>M. chimaera</i> identificada incorretamente como <i>M. intracellulare</i>
GenoType <i>Mycobacterium</i> AS (Hain Lifescience, Alemanha)	Mesmo que <i>Mycobacterium</i> CM	19 espécies menos comuns	<ul style="list-style-type: none"> • <i>M. terrae</i> e <i>M. nonchromogenicum</i> não cobertos • Comercialmente disponível • Altamente sensível e específico
GenoType NTM-DR (Hain Lifescience, Alemanha)	Identificação de espécies: igual ao <i>Mycobacterium</i> CM e alvos de resistência a medicamentos: <i>erm41</i> , <i>rpl</i> e <i>rrs</i>	Detecta <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. chimaera</i> , <i>M. chelonae</i> e subespécies de <i>M. abscessus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Requer crescimento na cultura • Distingue <i>M. chimaera</i> de <i>M. intracellulare</i> • Detecta mutações de resistência a medicamentos: Macrolídeos (genes <i>erm (41)</i>, <i>rpl</i>). Amicacina/tobramicina (gene <i>rrs</i>) • Sensibilidade: 79% para resistência à claritromicina, 71% para resistência aos Aminoglicosídeos
Genotype CMdirect (Hain Lifescience, Alemanha)	Ensaio de sonda de linha de hibridização reversa (DNA)	> 20 espécies e <i>M. tuberculosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Pode ser usado diretamente na expectoração descontaminada • Comercialmente disponível
Gen-Probe AccuProbe® (Hologic, EUA)	Alvo: rRNA A sonda de DNA de fita simples hibridiza com um alvo de RNA ribossômico	Ensaio individual para cada espécie: <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. gordonae</i> e <i>M. kansasii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Requer crescimento na cultura • Menor sensibilidade para detecção de cepas de <i>M. fortuitum</i> do que GenoType • Comercialmente disponível • Não multiplexado
INNO LiPA® <i>Mycobacteria</i> v2 (Fujirebio, Japão)	Alvo: Ensaio de sonda de linha de hibridização de DNA do espaçador intergênico (ITS) do gene 16S – 23S rRNA	16 espécies de MNT	<ul style="list-style-type: none"> • Requer crescimento na cultura • 87–100% de sensibilidade; 100% de especificidade • Comercialmente disponível
Análise de padrão de restrição de enzima (gene <i>hsp65</i>)	Alvo: segmento do gene da proteína de choque térmico de 65 kDa (<i>hsp65</i>). O segmento de DNA é amplificado por PCR e o produto é digerido por enzimas de restrição, sendo os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose. Os padrões de restrição resultantes são analisados por comparação com aqueles de cepas de referência conhecidas	Frequentemente usado para comparar muitas espécies	<ul style="list-style-type: none"> • Requer crescimento na cultura • O gene <i>hsp</i> codifica sequências que são únicas e comuns - algumas espécies podem não ter padrões de restrição exclusivos • Método demorado, de laboratório de pesquisa ou de referência.
Plataforma comercial de sequenciamento dos genes 16S rRNA, <i>rpoB</i> ou <i>hsp65</i> : sistema de identificação microbiana MicroSeq 500 16S rDNA (Applied Biosystems, EUA)	Alvo molecular: genes <i>hsp65</i> , 16S rRNA O segmento de DNA é amplificado e sequenciado usando iniciadores de ampla gama, aplicáveis a todas as espécies de micobactérias. As sequências de nucleotídeos são comparadas ao banco de dados público (GenBank ou outros *)	<ul style="list-style-type: none"> • Em teoria, muitas espécies são individualmente identificáveis • Na prática, espécies intimamente relacionadas podem não ser claramente distinguidas devido às diferenças de sequência muito pequenas 	<ul style="list-style-type: none"> • Pode ser feito na amostra direta do paciente, se estéril. • Disponível em centros de referência.

Método Multiplex SNaPshot	<p>Alvo: sítios polimórficos nos genes 16S rRNA e <i>hsp65</i>. Os primers específicos do gênero amplificam o fragmento de 354pb de <i>hsp65</i> e um fragmento de 436pb do 16S rRNA. Iniciadores de extensão direta ou reversa são projetados para hibridizar adjacentes a locais polimórficos no gene 16S rRNA (posições 125, 141, 231, 264, 471) ou no gene <i>hsp65</i> (posições 163, 235, 265) presente nos produtos de PCR. Reações de extensão de base única com ddNTPs marcados com fluorescência são realizadas para vários locais SNP simultaneamente. Os fragmentos resultantes são resolucionados por eletroforese e os alelos SNP são identificados por emissão de fluorescência (vermelho, verde, azul, preto) após a excitação do laser.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Análise simultânea de 8 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes 16S rRNA e <i>hsp65</i> permitindo a discriminação de 5 espécies de MNT (<i>M. avium</i>, <i>M. intracellulare</i>, <i>M. chelonae</i>, <i>M. kansasii</i>, <i>M. goodii</i>) e <i>M. tuberculosis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Requer crescimento na cultura • Método de pesquisa, mas utiliza kit comercialmente disponível (ABI Prism SNaPshot Multiplex Kit), eletroforese capilar em um analisador genético ABI Prism 3130 × 1 (Applied Biosystems) e análise genética usando software comercial (GeneMapper, versão 4.0, software, Applied Biosystems)
Cromatografia líquida desnaturante de alto desempenho (DHPLC)	Região ITS ou 16S rRNA do gene 16S–23S rRNA	Muitas espécies de MNT	<ul style="list-style-type: none"> • A amplificação da região ITS do 16S – 23S rRNA permite diferenciação de <i>M. chimaera</i> de <i>M. intracellulare</i> • Aplicável às configurações de surto de <i>M. chimaera</i> • Requer crescimento na cultura • Rápido, alto rendimento • Não amplamente disponível
Espectrometria de massa de tempo de voo por ionização de dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS)	<p>Culturas de micobactérias são tratadas com ácido fórmico e acetonitrila para quebrar as paredes celulares e extrair proteínas. As amostras resultantes (analitos) são aplicadas a uma placa alvo de aço e revestidas com uma solução de matriz (por exemplo, ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico). A placa é irradiada com laser pulsado e a energia é transferida da matriz para o analito, que sofre dessorção (remoção para a fase gasosa) e ionização. As partículas ionizadas são submetidas a um potencial elétrico que as impulsiona através de um tubo de voo até o espectrômetro de massa, onde são separadas por massa e carga. Diferentes espécies bacterianas exibem impressões digitais espectrais distintas (padrão estereotipado de picos) e são identificadas por referência a um grande banco de dados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Em teoria, ilimitado • Na prática, limitado pelo tamanho da biblioteca espectral 	<ul style="list-style-type: none"> • Requer crescimento na cultura • Método rápido • As subespécies de <i>M. abscessus</i> podem não ser bem separadas • <i>M. chimaera</i> e <i>M. intracellulare</i> podem ser identificados conjuntamente. <p>No entanto, uma publicação distingue <i>M. chimaera</i> e <i>M. intracellulare</i>.</p>

Fonte: adaptado de MISCH *et al.*, 2018. * Outros bancos de dados incluem o DNA Data Bank of Japan (DDBJ), o European Molecular Biology Laboratory (EMBL), e o Ribosomal Differentiation of Medical Microsystems database (RIDOM) (HALL *et al.*, 2003; TORTOLI *et al.*, 2003b; RICHTER *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2006; SCHWEICKERT *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010; GARCIA-AGUDO *et al.*, 2011; ARNOLD *et al.*, 2012; MURRAY *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013a; SINGHAL *et al.*, 2015; MOUGARI *et al.*, 2017; PRANADA *et al.*, 2017).

Para a baciloscopia, as lâminas devem ser coradas com colorações como fluorocromo, Ziehl-Neelsen ou Kinyoun. Deve-se ter em mente que um esfregaço negativo não significa necessariamente ausência de MNT na amostra clínica, por isso a realização de cultura para BAAR torna-se obrigatória (VARMA-BASIL & BOSE, 2019).

Os meios de cultura mais utilizados para o crescimento de micobactérias são o Lowenstein-Jensen e o Ogawa-Kudoh, que são meios solidificados à base de ovo que contêm glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio. Outros meios solidificados à base de ágar, como o 7H10 e 7H11 de Middlebrook, também podem ser utilizados. Ao contrário do meio líquido ou caldo, um meio sólido permite a observação das características das colônias, contagens de colônias, observação de culturas mistas e análise da taxa de crescimento (VARMA-BASIL & BOSE, 2019; RATNATUNGA *et al.*, 2020).

A temperatura ideal para a maioria das culturas para MNT está entre 28°C e 37°C. As micobactérias de crescimento lento mais clinicamente significativas crescem bem entre de 35°C e 37°C (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Além da análise macroscópica da morfologia colonial, produção de pigmento e determinação do tempo de crescimento, a diferenciação fenotípica das espécies de MNT é comumente realizada com testes bioquímicos como: crescimento na presença de inibidores (ácido ρ -nitrobenzôico; hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico), teste da niacina, teste da redução de nitrato, teste da catalase, teste semiquantitativo da catalase, hidrólise do tween 80, teste da urease, teste da arilsulfatase três e quatorze dias, teste de preferência do oxigênio, utilização de citrato, captação de ferro, β -galactosidase, crescimento na presença de NaCl 5%, crescimento em ágar MacConkey sem cristal violeta, redução do telurito de potássio e teste da pirazinamidase (BAHLA *et al.*, 2018; VELAYATI *et al.*, 2019).

As principais limitações dos métodos fenotípicos incluem: a demora para obtenção de resultados, a dificuldade de diferenciação entre diversas espécies, a difícil reprodutibilidade e os resultados duvidosos nos testes fenotípicos (NEONAKIS *et al.*, 2008; NGAN *et al.*, 2011).

1.6.2.2 Identificação genotípica

1.6.2.2.1 Sequenciamento

O sequenciamento completo é considerado o padrão ouro para a identificação de espécies bacterianas, mas a metodologia ainda não está disponível para a maioria dos laboratórios de referência, sendo o sequenciamento de genes uma metodologia mais acessível para laboratórios com um pouco mais de infraestrutura. O gene 16S rRNA é o mais comumente estudado para identificação. No entanto, este gene tem sequências altamente similares em diferentes espécies de *Mycobacterium*, não possibilitando a distinção de espécies aparentadas. Para superar essa limitação, esforços têm se concentrado na busca de alvos ideais para identificação acurada das espécies de MNT. Entre os alvos mais promissores descritos, podemos citar os genes *hsp65* e *rpoB*, cujo sequenciamento tem possibilitado a identificação de MNT em espécies e subespécies (CLARRIDGE *et al.*, 2004; KIM & SHIN, 2017; DALEY *et al.*, 2020).

A sequência na extremidade 5' (final) do gene 16S rRNA, que compreende aproximadamente 500pb, contém mais informações sobre a diferenciação das espécies de micobactérias e, portanto, permite a identificação taxonômica das MCL e das MCR. Uma grande desvantagem do método de sequenciamento parcial de 500 pb é que ele não pode diferenciar algumas espécies, como *M. marinum* e *M. ulcerans*; *M. kansasii* e *M. gastri*; *M. genavense* e *M. simiae*; *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. franklinii*; *M. goodii* e *M. smegmatis* (TORTOLI, 2003a; HUANG *et al.*, 2020).

O gene *hsp65* que codifica uma proteína de 65 KDa está presente em todas as espécies de micobactérias e contém epítomos que são únicos e comuns a várias espécies. É menos conservado entre as espécies de micobactérias e, portanto, mostra mais polimorfismos interespecies e intraespecies em comparação com o observado nas sequências do gene 16S rRNA. Essa variabilidade foi explorada na identificação de espécies estreitamente relacionadas de MNT utilizando uma sequência de 441pb conhecida como fragmento Telenti. Este gene permite a diferenciação de várias espécies de MCR não identificadas pelo sequenciamento parcial do 16S rRNA, incluindo *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. houstonense*, *M. fortuitum*, *M. porcinum* e *M. senegalense*. Também em contraste com o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, *M. chelonae* e *M. abscessus* podem ser facilmente discriminados com base em diferenças de quase 30pb no segmento de 441pb, assim como as três subespécies de *M. abscessus*. Além disso, entre as MCL, *M. marinum* é diferenciado de *M. ulcerans*, *M. kansasii* de *M. gastri* e, subespécies de *M. avium* podem ser discernidas (TELENTI *et al.*, 1993; RINGUET *et al.*, 1999; TURENNE *et al.*, 2006; BROWN-ELLIOTT, 2018a).

O gene *rpoB* é um gene com quase 3.600pb e codifica a subunidade β da RNA polimerase. Esse gene foi recomendado para uso como alvo de segunda linha na identificação de espécies de MNT para compensar a falta de poder discriminatório entre grupos de MNT estreitamente relacionados, especialmente MCR, ao sequenciar o gene 16S rRNA. Um estudo demonstrou que, diferentemente do INNOLiPA/16S rRNA, o sequenciamento gênico do *rpoB* pode identificar um número maior de espécies conhecidas e menos comuns de MNT, além de ter a capacidade de identificar espécies de MCL e MCR (ADÉKAMBI *et al.*, 2003; TORTOLI, 2012; DE ZWAAN *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2020).

Os problemas do sequenciamento do gene *rpoB* incluem o fato de várias regiões terem sido propostas em diferentes estudos e a falta de bancos de dados sequenciais de cepas de referência, que pode resultar em alinhamento e identificação incorretos (KIM *et al.*, 1999; CLSI, 2018; HUANG *et al.*, 2020).

1.6.2.2.2 Sondas genéticas

Os testes de sonda de linha estão disponíveis para certas espécies de MNT. Tais testes incluem o teste INNO-LiPA Mycobacteria v2 assay (Fujirebio Europe, Bélgica), GenoType CMdirect, GenoType NTM-DR, GenoType *Mycobacterium* CM, GenoType *Mycobacterium* AS (Hain Lifescience, Alemanha), Speed-oligo Mycobacteria (Granada, Espanha) e kit de detecção GENOSCHOLAR™ NTM+MDRTB II (Nipro, Japão) (FORBES *et al.*, 2018).

Os ensaios baseados em sonda são mais fáceis de executar e implementar, mas não possuem poder discriminatório elevado, levando à identificação incorreta e a uma visão simplificada da filogenia e epidemiologia das MNT (TORTOLI *et al.*, 2010; VAN INGEN *et al.*, 2010a; DALEY *et al.*, 2020).

1.6.2.2.3 PCR seguida de análise de restrição – PCR-PRA_{hsp65}

A análise de fragmentos de restrição, conforme descrito por Telenti e colaboradores (1993) e posteriormente modificado por Steingrube e colaboradores (1995), é um método de diagnóstico diferencial para micobactérias, designado PCR-PRA_{hsp65}. Baseado na amplificação pela técnica de PCR de 441pb do gene *hsp65*, seguido de digestão do produto

amplificado com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* (TELENTI *et al.*, 1993; STEINGRUBE *et al.*, 1995; SIMNER *et al.*, 2015; BROWN-ELLIOTT, 2019).

Os padrões obtidos são comparados com os algoritmos de identificação de espécies propostos por Kim e colaboradores e bancos de dados online (KIM *et al.*, 2004; SHEN *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2020).

Além dos padrões descritos na literatura, foi criada a base de dados eletrônica PRASITE: Identification of Mycobacteria (<http://app.chuv.ch/prasite>) para auxiliar na interpretação dos resultados (RODRIGUES, 2011).

É a metodologia molecular frequentemente utilizada para identificação de MNT pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina (LACEN/SC), referência estadual na área. É considerado um método fácil, rápido e barato para identificar espécies de micobactérias. A técnica PCR-PRAhsp65 exibe melhor custo-benefício quando comparada aos testes comercialmente disponíveis como as sondas genéticas (sistemas AccuProbe e INNO-LiPA), podendo ser utilizada em laboratórios com menor orçamento. A metodologia requer instalações básicas para extração e amplificação de DNA, bem como, para realização de eletroforese em gel e é capaz de identificar um amplo espectro de micobactérias (ONG *et al.*, 2010; VARMA-BASIL *et al.*, 2013).

Entretanto, não é capaz de distinguir as espécies do CMTB, alguns perfis de restrição são compartilhados por mais de uma espécie de MNT e, ainda, é possível verificar que uma mesma espécie pode apresentar mais de um perfil de restrição. Pode-se encontrar, também, perfis que ainda não foram descritos na literatura (CHIMARA *et al.*, 2008; WILDNER, 2012).

1.6.2.2.4 MALDI-TOF MS

A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), utilizada na rotina de muitos laboratórios de microbiologia clínica, é outro método que vem apresentando resultados promissores para a identificação de espécies de MNT. É uma técnica de ionização branda utilizada em espectrometria de massa para analisar biomoléculas grandes, como as proteínas ribossomais bacterianas e permite a identificação bacteriana em espécie e subespécie. Utiliza uma matriz polimérica própria que absorve o laser irradiado, convertendo-o em energia térmica, promovendo a ionização das moléculas por doação de prótons da matriz, com formação de íons de diferentes tamanhos, que são guiados

por um campo elétrico para um tubo de vácuo, no qual ocorre a separação das moléculas de acordo com sua massa. Um detector, no final do tubo de vácuo, registra a passagem de cada molécula ionizada (TOF: *time of flight*), formando picos ou espectros de massa, correspondentes a diferentes proteínas. Os espectros gerados são comparados a uma base algorítmica (banco de dados) resultando na identificação do microrganismo (BALADA-LLASAT *et al.*, 2013; BISWAS & ROLAIN, 2013; QUINLAN *et al.*, 2015).

O poder discriminatório do MALDI-TOF MS para MNT aumentou com as recentes melhorias nos protocolos de extração de proteínas e nos bancos de dados, mas nem todas as espécies e subespécies podem ser diferenciadas com esta abordagem (CLARK *et al.*, 2013).

A precisão do MALDI-TOF MS depende da obtenção de espectros de qualidade, o que pode ser desafiador, devido às complexas paredes celulares das micobactérias. Uma das principais vantagens desse método é sua velocidade na identificação bacteriana tradicional, demora cerca de 90 minutos para obter um resultado comparado à demora para identificações baseadas em sequenciamento de genes. No entanto, para as micobactérias, é necessário um procedimento prévio de extração, geralmente envolvendo batimento de esferas ou vórtice com a utilização de ácido fórmico, etanol e acetonitrila, o que aumenta o tempo de execução (RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2016; FORBES *et al.*, 2018; BROWN-ELLIOTT, 2019).

Vários estudos demonstraram a capacidade do MALDI-TOF MS de identificar MCR clinicamente relevantes, incluindo *M. immunogenum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. No entanto, as subespécies de *M. abscessus* não podem ser diferenciadas. Entre as MCL, podem ser identificadas com segurança por MALDI-TOF MS o *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum* e várias outras espécies clinicamente relevantes (LOTZ *et al.*, 2010; SALEEB *et al.*, 2011; BALADA-LLASAT *et al.*, 2013; BUCHAN *et al.*, 2014; MATHER *et al.*, 2014; FORBES *et al.*, 2018).

Como em todos os métodos de identificação, o resultado também deve ser correlacionado com características fenotípicas conhecidas, incluindo tempo de crescimento, pigmentação e morfologia das colônias. O consenso entre os especialistas é que as identificações de organismos não familiares ao laboratório devam ser confirmadas utilizando as características fenotípicas essenciais. Se nenhuma identificação for alcançada com um espectro de boa qualidade, isso pode significar que o organismo não está representado no banco de dados que está sendo aplicado. Por outro lado, se o padrão espectral for ruim, a pureza da cultura deve ser investigada, havendo possibilidade de cultura mista. Em quase todas as falhas,

o primeiro passo da ação é repetir a análise. A maioria dos especialistas recomenda métodos suplementares baseados em biologia molecular ou o encaminhamento a um laboratório de referência qualificado, para discriminar entre espécies intimamente relacionadas, sempre que o isolado for considerado clinicamente significativo (FORBES *et al.*, 2018).

Uma grande preocupação para os laboratórios que implementam o MALDI-TOF MS é a despesa inicial com o equipamento (quase o dobro do preço de um analisador genético), embora algum custo possa ser compensado por materiais de consumo mais baratos e tempo de resposta mais rápido (DUARTE *et al.*, 2009; HOLMES *et al.*, 2002; BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2018b).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes metodologias laboratoriais para identificação de micobactérias não tuberculosas isoladas de amostras clínicas no Estado de Santa Catarina

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mapear as espécies de MNT identificadas no Estado de Santa Catarina entre 2010 e 2019;
- Identificar os isolados de MNT por PCR-PRAhsp65;
- Identificar os isolados de MNT por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS);
- Identificar os isolados de MNT pelo sequenciamento parcial do gene *hsp65* e do gene *rpoB*;
- Comparar e avaliar os resultados de identificação obtidos pelas diferentes técnicas quanto ao poder discriminatório.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em 3 de maio de 2019, sob parecer nº 3.300.125, CAAE: 10950919.5.0000.0121.

3.2 AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A primeira etapa do presente estudo incluiu a realização de um levantamento nos setores de tuberculose e biologia molecular do LACEN/SC dos isolados de MNT identificados nos últimos 10 anos (2010 a 2019). Dados que resultaram no artigo em anexo (Apêndice I).

O trabalho de avaliação de técnicas para identificação de MNT inclui 58 isolados bacterianos viáveis, obtidos entre 2010 e 2019 pelo LACEN/SC e que compõem parte do banco de MNT do Estado de Santa Catarina. A maior parte das bactérias isoladas foram obtidas a partir de amostras de pacientes tratados ou em tratamento para micobacterioses no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis (HNR) (44/58), previamente identificados como MNT no LACEN/SC.

Os critérios de inclusão utilizados foram: bactérias obtidas a partir de amostras clínicas e que cresceram após o cultivo no meio de cultura Ogawa-Kudoh (Laborclin, Brasil). Os isolados que não foram recuperados do banco de bactérias do LACEN foram excluídos das análises.

Após o cultivo, os isolados viáveis foram analisados por três metodologias distintas para identificação de espécies de MNT: PCR seguida de análise de restrição – PCR-PRA_{hsp65}, Espectrometria de massa MALDI-TOF e Sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*.

3.3 CULTURA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

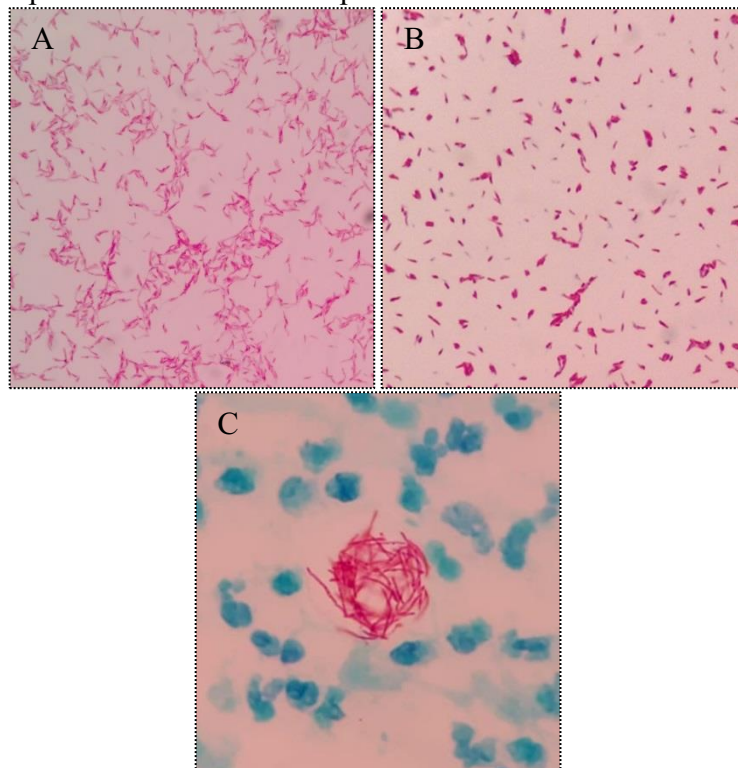
No período entre abril e setembro de 2019, alíquotas de 58 isolados bacterianos congelados do banco de MNT do Estado, foram separadas em tubo eppendorf 2 ml e

transportadas em condições de segurança ao Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia – LBMMS/UFSC.

Os microrganismos foram subcultivados em meio Ogawa-Kudoh (Laborclin, Brasil). As alíquotas contendo cada isolado foram transferidas com pipeta de transferência estéreis para meio de Ogawa-Kudoh e estriadas utilizando alça plástica de 10 μ L. Os meios foram incubados em estufa microbiológica a 35 \pm 2 $^{\circ}$ C e inspecionados a cada dois dias até o crescimento das colônias. As colônias foram fotografadas. Também foram realizados esfregaços corados por coloração de Gram e Ziehl-Neelsen. A coloração de Ziehl-Neelsen (figura 7), permitiu confirmar que o isolado era um bacilo álcool-ácido resistente e a coloração de Gram descartou a hipótese de contaminação da amostra. As colônias cultivadas foram submetidas à extração do DNA para as técnicas moleculares e de proteínas para espectrometria de massa.

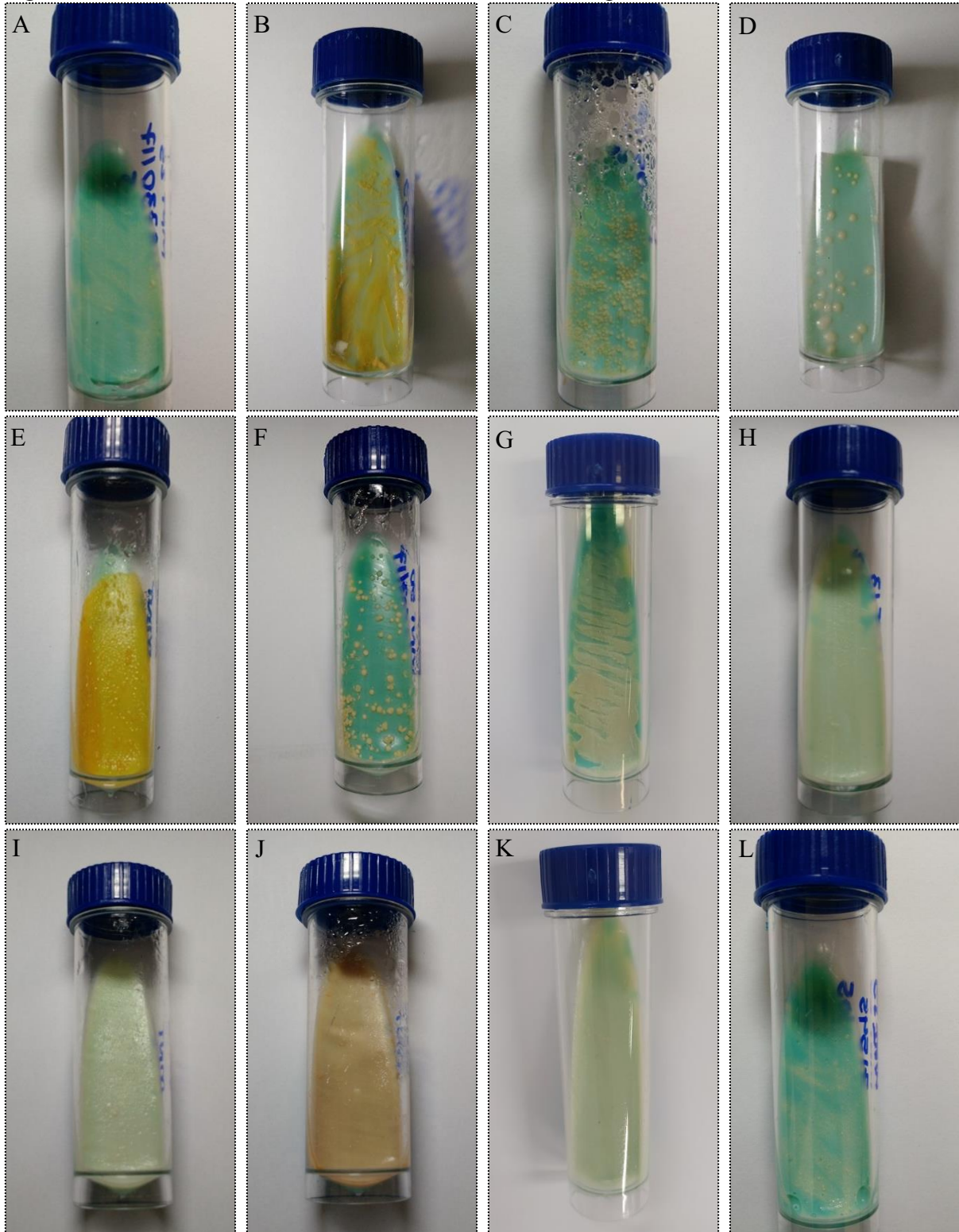
A figura 8 apresenta diferentes morfologias coloniais no meio de Ogawa-Kudoh observadas para diferentes espécies de MNT do estudo. Podem ser observadas diferenças na pigmentação e aspecto (colônias lisas, rugosas e gomosas).

Figura 7 - Microscopias de lâminas coradas por Ziehl-Neelsen



Fonte: autor. A e B - lâminas realizadas a partir de colônias de MNT em meio Ogawa-Kudoh. C - lâmina realizada a partir de amostra clínica com presença de MNT.

Figura 8 - Colônias de diferentes micobactérias em meio Ogawa-Kudoh



Fonte: autor. A. *Mycobacterium avium*; B. *Mycobacterium marinum*; C. *Mycobacterium chelonae*; D. *Mycobacterium fortuitum*; E. *Mycobacterium gordonae*; F. *Mycobacterium kansasii*; G. *Mycobacterium abscessus* subespécie *abscessus*; H. *Mycobacterium peregrinum*; I. *Mycobacterium mucogenicum*; J. *Mycobacterium porcinum*; K. *Mycobacterium senegalense*; L. *Mycobacterium intracellulare*.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA PARA A REALIZAÇÃO DE PCR-PRAhsp65 E SEQUENCIAMENTO

A extração de DNA foi realizada pela técnica de CTAB (brometo de cetilmetilamônio), descrita por Van Soolingen e colaboradores (1994).

Utilizando alça de 10 μ L, foram transferidas colônias ou massa bacteriana, para tubo eppendorf 1,5ml contendo 400 μ L de tampão Tris-EDTA pH 7,4 (Tris pH 6,4 0,1M: EDTA pH 8,0 0,2M). A mistura foi incubada em termobloco (Loccus biotecnologia D3H-S) a 90°C por 30 minutos e posteriormente resfriada à temperatura ambiente. Foram adicionados 50 μ l de lisozima (10mg/mL), para a digestão de carboidratos de alto peso molecular e destruição do esqueleto glicosídico do peptidoglicano.

Após a adição da lisozima as amostras foram agitadas em vortex e incubadas por 24 horas em termobloco a 37°C.

No segundo dia de extração foram adicionados 75 μ l da mistura de SDS / Proteinase K (70 μ L de SDS 10% e 5 μ L de proteinase K 10%), com posterior agitação em vortex e incubação por 90 minutos em termobloco a 65°C. A proteinase K atua digerindo as proteínas contaminantes e inativando as nucleases.

Após a incubação foram adicionados 100 μ L de solução NaCl 5M e 100 μ L de solução CTAB/NaCl. As amostras foram agitadas em vortex e incubadas por 10 minutos em termobloco a 65°C. Após, foram adicionados 750 μ L de solução Clorofórmio/Álcool Isoamílico 24:1 para a extração das substâncias não polares. As amostras foram homogeneizadas por inversão, agitadas em vortex e centrifugadas à temperatura ambiente por 5 minutos a 14000 xg em centrífuga (Eppendorf 5430).

Após a centrifugação o sobrenadante aquoso (aproximadamente 600 μ L) contendo o DNA foi transferido com cuidado para um novo tubo eppendorf 1,5ml. Foram adicionados ao sobrenadante aquoso 600 μ L de isopropanol e homogeneizado por inversão para a precipitação dos ácidos nucleicos. A mistura foi incubada a -20°C por 24 horas.

No terceiro dia as amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente por 15 minutos a 14000 xg. O sobrenadante foi desprezado e deixado uma gota sobre o pellet. Foi adicionado 1 ml de etanol 70% a frio e homogeneizado por inversão delicadamente. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 14000 xg. Desprezou-se o sobrenadante, e o pellet foi deixado

secar em termobloco a 37°C por 2 horas. O sedimento foi ressuspenso com 50 µL de tampão Tris-EDTA pH 7,4 (Tris pH 6,4 0,1M: EDTA pH 8,0 0,2M).

O DNA extraído foi armazenado a 4°C durante 24 horas. Após esse tempo o DNA extraído foi armazenado à temperatura de -20°C até a utilização nas análises.

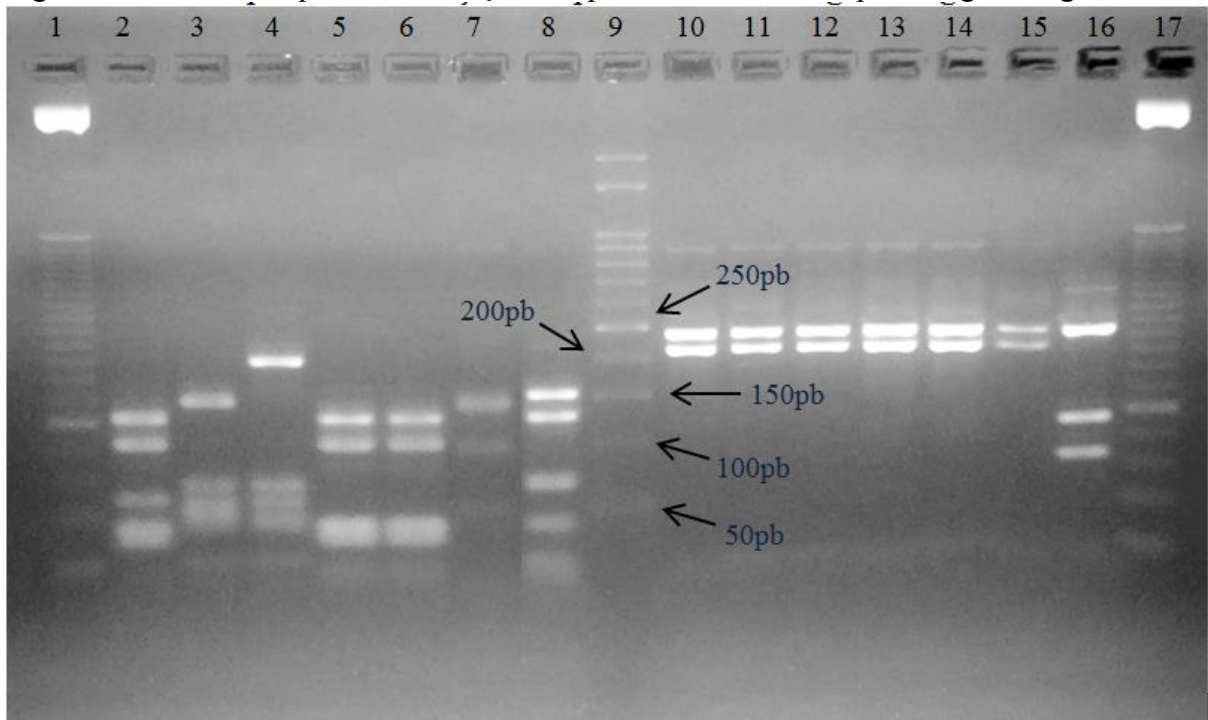
3.5 IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE PCR-PRAhsp65

Para a realização do método PCR-PRAhsp65, foi realizada a amplificação de um fragmento de 441pb do gene *hsp65*, por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') (TELENTI *et al.*, 1993). O volume final da reação foi de 50µL, contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 25 pmoles de cada iniciador, 10% glicerol, tampão de reação 1X (Tris-HCl pH8,4 200 mM: KCl 500 mM), 1,5U de Taq DNA polimerase recombinante e 3 µL de DNA extraído. As condições de amplificação foram: 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de 72°C por 10 minutos. As reações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems 2720 (Thermo Fisher Scientific, EUA), com reagentes Invitrogen (EUA). O produto amplificado foi submetido à ação das enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* (Promega, EUA).

Para a digestão com *BstEII*, foram utilizados 20µL do produto de PCR, 6U da enzima em tampão 1X com incubação a 60°C durante 90 minutos. Para a digestão com *HaeIII*, foram utilizados 20µL do produto de PCR, 6U da enzima em tampão 1X com incubação a 37°C durante 60 minutos (TELENTI *et al.*, 1993; CHIMARA *et al.*, 2008). A análise dos produtos fragmentados foi realizada em gel de agarose 3% (80V/10 min, 100V/1h, 150V/1h), corado por brometo de etídio e com a utilização de marcadores de tamanho molecular de 25pb (Promega, EUA) e 50pb (Ludwig Biotec, Brasil). Os géis foram visualizados em transiluminador ECX-20.M (Vilber Lourmat, França), e fotografados utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, EUA). Como controle positivo foi utilizada a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618).

As imagens dos produtos clivados (figura 9), foram analisadas comparando os padrões de bandas obtidos na digestão enzimática com aqueles já existentes no banco de espécies do programa PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>).

Figura 9 - Análise dos perfis de restrição dos padrões PCR-PRA_{hsp65} em gel de agarose



Fonte: autor. Gel de agarose 3%, DNA fracionado por eletroforese e corado com brometo de etídio. As linhas 1 e 17 correspondem ao padrão de tamanho molecular de 25pb. A linha 9 corresponde ao padrão de tamanho molecular de 50pb, as setas indicam a localização dos tamanhos moleculares de 50, 100, 150, 200 e 250pb. As linhas 2 a 8 correspondem ao perfil de fragmentação PRA após digestão com a enzima *HaeIII*. As linhas 10 a 16 correspondem ao perfil de fragmentação PRA após digestão com a enzima *BstEII*. Amostra 1 (linhas 2 e 10): *Mycobacterium avium*. Amostra 2 (linhas 3 e 11): *Mycobacterium abscessus* subespécie *abscessus*. Amostra 3 (linhas 4 e 12): *Mycobacterium abscessus* subespécie *bolletii*. Amostra 4 (linhas 5 e 13): *Mycobacterium avium*. Amostra 5 (linhas 6 e 14): *Mycobacterium avium*. Amostra 6 (linhas 7 e 15): *Mycobacterium peregrinum*. Controle positivo (linhas 8 e 16): *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

3.6 IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE MALDI-TOF MS

Os isolados foram subcultivados em Ogawa-Kudoh, colônias de crescimento recente foram utilizadas para extração de proteínas e em seguida foi realizada a identificação da bactéria por espectrometria de massa no equipamento MALDI-TOF VITEK MS-DS (BioMérieux, França).

A extração das proteínas para identificação das MNT foi realizada utilizando o kit VITEK® MS *MYCOBACTERIUM/NOCARDIA* (BioMérieux, França).

Alça descartável de 1 µL preenchida com colônias foi utilizada para transferir a massa de bactérias para um tubo contendo esferas de vidro e 0,5 mL de etanol 70%. A mistura foi

agitada em vortex por 15 minutos e posteriormente incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos para inativação.

Após o período de incubação a mistura foi novamente misturada em vortex durante 10 segundos e a suspensão foi transferida imediatamente para um tubo de fundo redondo vazio utilizando uma pipeta, evitando transferir as esferas de vidro. A amostra foi centrifugada durante 2 minutos a 14000 xg. Após a centrifugação foi eliminado todo o sobrenadante.

Foram adicionados 10 μ L de ácido fórmico 70% no sedimento. O sedimento foi ressuspensionado por aspiração utilizando pipeta até estar uniformemente disperso. Foram adicionados 10 μ L de acetonitrila e novamente misturado utilizando vortex. A mistura foi centrifugada durante 2 minutos a 14000 xg. Para cada microrganismo a testar, foi transferido, imediatamente, 1 μ L do sobrenadante para os poços do *slide* alvo (figura 10). Cada amostra foi repetida em quadruplicata.

Figura 10 – Aplicação das amostras extraídas no *slide* alvo



Fonte: autor

Após secagem da amostra, 1 μ L de matriz CHCA (BioMérieux, França) foi aplicado em cada poço. Após a secagem completa, o *slide* alvo, que pode identificar até 48 isolados bacterianos simultaneamente, foi inserido no equipamento. Cada *slide* alvo é subdividido em

três seções, cada seção contém um poço central utilizado para calibração do laser, no qual é depositada uma colônia de *E. coli* ATCC 8739 (figura 10).

No equipamento, após a calibração da seção, os poços contendo as proteínas dos microrganismos são irradiados por um laser que gera íons, que são guiados para um tubo a vácuo, sendo separados conforme sua massa.

Um detector, no final do tubo de vácuo, registra a passagem das moléculas ionizadas, gerando picos ou espectros que são comparados a uma base algorítmica (banco de dados) resultando na identificação do microrganismo.

O equipamento utilizado para as análises foi o MALDI-TOF VITEK MS (BioMérieux, França). O laser utilizado pelo aparelho para as identificações foi de 200 hertz e a faixa de detecção de massas variou de 2000 a 20000 daltons. Para a comparação dos espectros de massas obtidos foi utilizado o banco de dados VITEK MS Knowledge Base V3.2.

3.7 IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO

Os dois alvos selecionados para a identificação das MNT foram os genes *hsp65* e *rpoB*. O sequenciamento parcial desses genes é amplamente utilizado para a identificação de espécies de micobactérias (BROWN-ELLIOTT & PHILLEY, 2017).

O gene *rpoB* apresenta 3516pb, é codificador da subunidade β da RNA polimerase. Neste trabalho foi sequenciado um fragmento de 764pb, capaz de diferenciar espécies de MNT (ADÉKAMBI *et al.*, 2003).

O gene *hsp65* é codificador da proteína de choque térmico de 65KDa e apresenta 1620pb. Para a diferenciação das espécies de micobactérias foi realizado o sequenciamento de um fragmento de 441pb (TELENTI *et al.*, 1993).

3.7.1 PCR para a obtenção dos amplicons

Para a amplificação foi utilizado DNA previamente extraído por CTAB (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1994).

Para a amplificação do gene *rpoB*, foram utilizados os iniciadores MycoF (5'-GGCAAGGTCACCCCGAAGGG-3') e MycoR (5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3'). O volume final da reação foi de 50 μ L, contendo 2,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 10 mmol de

cada iniciador, 5 µL de tampão de reação 10X (Tris-HCl pH8,4 200 mM: KCl 500 mM), 1U de Taq DNA polimerase recombinante (Promega, EUA) e 2 µL de DNA. As condições de amplificação foram: 1 min a 95°C para desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por 30s e 72°C por 90s, seguidos de 72°C por 5 minutos.

Para a amplificação do gene *hsp65*, foram utilizados os iniciadores Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT-3'). O volume final da reação foi de 50 µL, contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 25 pmoles de cada iniciador, 10% glicerol, tampão de reação 1X (Tris-HCl pH8,4 200 mM: KCl 500 mM), 1,5U de Taq DNA polimerase recombinante e 2 µL de DNA. As condições de amplificação foram: 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de 72°C por 10 minutos.

As reações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems 2720 (Thermo Fisher Scientific, EUA), com reagentes Invitrogen (EUA) e IDT (EUA).

3.7.2 Purificação dos produtos das PCR

A purificação dos produtos das PCR foi realizada através do Kit de purificação PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, EUA).

Foram misturados 200 µL de tampão contendo isopropanol com 50 µL do produto da PCR. A mistura foi transferida para o centro da coluna de purificação com posterior incubação em temperatura ambiente por 1 minuto. A coluna foi centrifugada em temperatura ambiente a 10000 xg por 1 minuto. O fluxo do tubo de coleta foi descartado ficando apenas com a coluna de purificação. Foram adicionados 650 µL de tampão de lavagem contendo etanol 100% à coluna de purificação, com posterior centrifugação em temperatura ambiente a 10.000 xg por 1 minuto. O fluxo do tubo de coleta foi novamente descartado. A coluna de purificação foi novamente centrifugada na velocidade máxima em temperatura ambiente por 2 minutos para remoção de qualquer tampão de lavagem residual e descartou-se o tubo de coleta. A coluna de purificação foi colocada em tubo de eluição de 1,7 mL e foram adicionados 50 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) no centro da coluna. A coluna foi incubada em temperatura ambiente por 1 minuto e posteriormente centrifugada à velocidade máxima por 2 minutos. Após a centrifugação a coluna de purificação foi descartada e o produto de eluição (~ 48 µL) foi armazenado à -20 ° C até a realização do sequenciamento.

3.7.3 Sequenciamento dos genes *hsp65* e *rpoB*

Os amplicons purificados foram posteriormente submetidos ao sequenciamento utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA). A reação de sequenciamento foi realizada para um volume final de 10 µL contendo 0,5 µL de Big Dye® Terminator v.3.1., 1,5 µL de tampão 5X, 1 µL de cada primer de acordo com o gene sequenciado (5pmol/µL), 4 µL de água ultrapura e 3 µL de DNA purificado. As condições da reação foram: 1 min a 96°C para desnaturação inicial, seguidos de 40 ciclos de 96°C por 10s, 50°C por 10s e 60°C por 4min. Em seguida, o produto da reação foi precipitado pelo protocolo de etanol/ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) recomendado pelo guia de química da Applied Biosystems. O aparelho utilizado para o sequenciamento foi o Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA).

As sequências obtidas foram analisadas no programa DNASTAR Lasergene 15. A análise comparativa foi realizada comparando as sequências obtidas com as sequências de nucleotídeos depositadas na base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com a aplicação do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – NCBI/Blast) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Nos casos de ambiguidades na identificação de espécies e subespécies, para melhor robustez dos resultados, as sequências obtidas foram comparadas com sequências referência do banco de dados de sequências do gene *hsp65* disponível em <http://msis.mycobacteria.info> (DAI et al., 2011). Para a análise filogenética foi utilizando o programa MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/home>) versão 7.0.26. Para o alinhamento múltiplo de sequências foi utilizada a ferramenta ClustalW nas configurações padrão. O modelo de substituição de nucleotídeos escolhido foi o Tamura-3 parâmetros (T92), proposto pelo programa. A análise comparativa foi realizada utilizando o modelo estatístico de Máxima Verossimilhança, com valores de bootstrap para 1.000 replicatas.

4 RESULTADOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE PCR-PRA_{hsp65}

A metodologia de PCR-PRA_{hsp65} identificou todas as 58 amostras do presente estudo (100%). A análise do perfil de restrição dos amplicons de 441 pb do gene *hsp65*, após clivagem com as enzimas *BstEII* e *HaeIII* identificou em nível de espécie 42 (72,4%) das 58 amostras da coleção. Para 16 isolados (27,6%), a análise do perfil de restrição gerou a possibilidade de classificação de mais do que uma espécie.

Os padrões de restrição e sua respectiva interpretação estão apresentados na Tabela 5. Das 58 amostras analisadas pela PCR-PRA_{hsp65}, 42 foram identificadas em nível de espécie: dez *M. abscessus*, dos quais em sete foi possível a distinção da subespécie *abscessus* (tipo 1) e em três isolados não foi possível distinguir entre as subespécies *abscessus* (tipo 2), *bolletii* (tipo 1) e *massiliense* (tipo 1); sete *M. avium* (tipo 1), dois *M. chelonae* (tipo 1), oito *M. fortuitum* (tipo 1), dois *M. gordonae* (tipo 3), um *M. kansasii* (tipo 1), três *M. kansasii* (tipo 2), um *M. lentiflavum* (tipo 1), um *M. lentiflavum* (tipo 2), um *M. mucogenicum* (tipo 1), um *M. nonchromogenicum* (tipo 1), três *M. peregrinum* (tipo 1), um *M. peregrinum* (tipo 3) e um *M. phlei*.

Tabela 5 - Espécies de micobactérias identificadas pelo método PCR-PRA_{hsp65}

Número de amostras	Padrões PRA		Espécies identificadas
	<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	
7	235/210	145/70/60/55	<i>M. abscessus sub. abscessus (tipo 1)</i>
3	235/210	200/70/60/50	<i>M. abscessus sub. abscessus (tipo 2)</i>
			<i>M. abscessus sub. bolletii (tipo 1)</i>
			<i>M. abscessus sub. massiliense (tipo 1)</i>
3	235/210	145/130	<i>M. avium (complexo)</i>
7	235/210	130/105	<i>M. avium (tipo 1)</i>
3	235/210	130/105/60	<i>M. avium (tipo 2)</i>
			<i>M. colombiense (tipo 1)</i>
2	320/130	200/60/55/50	<i>M. chelonae (tipo 1)</i>
8	235/120/85	145/120/60/55	<i>M. fortuitum (tipo 1)</i>
2	235/120/100	130/115	<i>M. gordonae (tipo 3)</i>
8	235/120/100	145/130/60	<i>M. intracellulare (tipo 1)</i>
			<i>M. chimaera (tipo 1)</i>
1	235/210	130/105/80	<i>M. kansasii (tipo 1)</i>
3	235/130/85	130/105	<i>M. kansasii (tipo 2)</i>
1	440	145/130	<i>M. lentiflavum (tipo 1)</i>
1	320/115	145/130	<i>M. lentiflavum (tipo 2)</i>

1	235/210	145/105/80 145/110/80	<i>M. marinum</i> (tipo 1) <i>M. pseudoshottsii</i> (tipo 1)
1	320/130	140/65/60	<i>M. mucogenicum</i> (tipo 1)
1	235/120/85	145/60/55	<i>M. nonchromogenicum</i> (tipo 1)
3	235/210	145/140/100/50	<i>M. peregrinum</i> (tipo 1)
1	235/130/85	145/140/100/60	<i>M. peregrinum</i> (tipo 3)
1	235/210	140/125/100/50	<i>M. peregrinum</i> (tipo 2) <i>M. porcinum</i> (tipo 1) <i>M. septicum</i> (tipo 1)
1	235/210	140/80/60/50	<i>M. phlei</i> (tipo 1)

Para 16 isolados, o perfil de restrição gerado não possibilitou a definição da espécie (padrões de restrição do gene *hsp65* idênticos): três isolados indefinidos entre as espécies *M. colombiense* (tipo 1) / *M. avium* (tipo 2); oito entre *M. intracellulare* (tipo 1) / *M. chimaera* (tipo 1) e para três isolados não foi possível distinguir entre as espécies do MAC.

Em uma das amostras foi encontrado um perfil de restrição que inclui três espécies: *M. malmoense* (tipo 2), *M. marinum* (tipo 1) e *M. ulcerans* (tipo 1), que é muito semelhante ao perfil de restrição de outra espécie, o *M. pseudoshottsii* (tipo 1). A distinção entre *M. malmoense*, *M. marinum* e *M. ulcerans* é realizada com base na classificação de Runyon, uma vez que apenas o *M. marinum* é fotocromogênico. Como esta característica também pertence ao *M. pseudoshottsii* outro método é necessário para diferenciá-los.

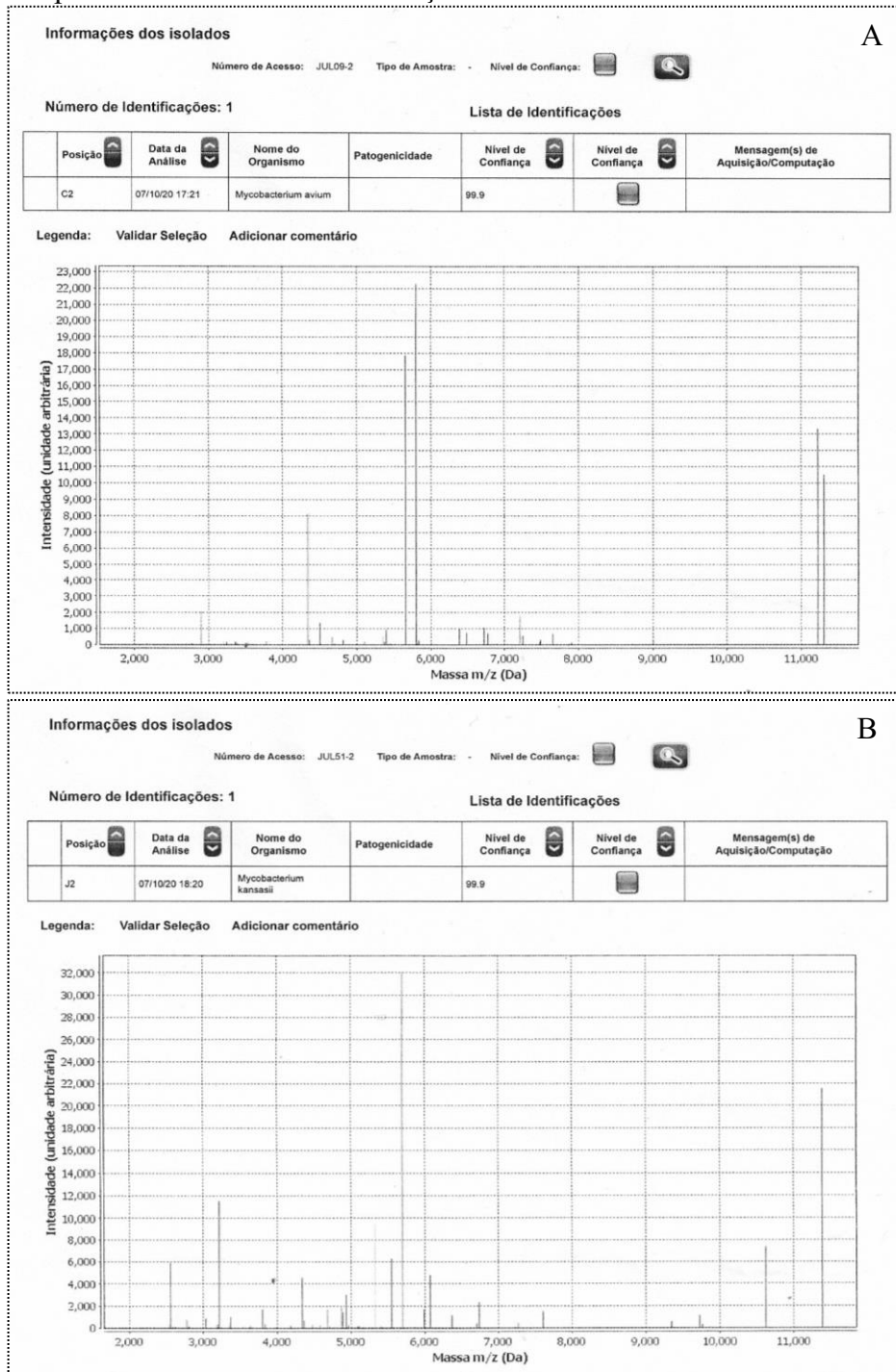
Por fim, para um isolado não foi possível a distinção entre as espécies *M. peregrinum* (tipo 2), *M. porcinum* (tipo 1) e *M. septicum* (tipo 1), todas do Complexo *M. fortuitum*.

4.2 IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE MALDI-TOF MS

A metodologia de espectrometria de massa por MALDI-TOF identificou 52/58 (89,7%) das amostras do estudo. Para seis isolados (10,3%) não foi possível obter resultados de identificações das espécies após repetições da extração de proteínas e análises em quadruplicata no equipamento. Os espectros de massa obtidos para a identificação das espécies tiveram nível de confiança de 99,9% para todas as amostras quando comparados com o banco de dados do equipamento.

Dois exemplos do resultado de identificação com o espectro de massa obtido pelo aparelho MALDI-TOF VITEK MS-DS (BioMérieux, França), podem ser observados na figura 11.

Figura 11 – Espectros de massa de identificação de micobactérias do MALDI-TOF MS



Fonte: autor. Espectros de massas. A. *Mycobacterium avium* B. *Mycobacterium kansasii*

Esta metodologia permitiu identificar em nível de espécie 73,1% (38/52) das amostras identificadas.

Para quatorze isolados (26,9% das identificações), o resultado se limitou ao nível do Complexo *M. fortuitum*, não sendo possível a distinção entre espécies do complexo.

Dez isolados foram identificados como *M. abscessus*, oito como *M. avium*, oito como *M. intracellulare*, três como *M. kansasii*, dois como *M. chelonae*, dois como *M. gordonae*, dois como *M. mucogenicum*, um como *M. arupense*, um como *M. lentiflavum* e um como *M. marinum*.

4.3 IDENTIFICAÇÃO PELA METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS GENES *hsp65* E *rpoB*

O sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB* foi considerado padrão ouro/referência nas análises comparativas entre as metodologias.

As sequências dos organismos foram ordenadas de acordo com a porcentagem de identidade mais alta, assim como preconiza o documento MM18-A do CLSI (Tabela 6) (PETTI *et al.*, 2008).

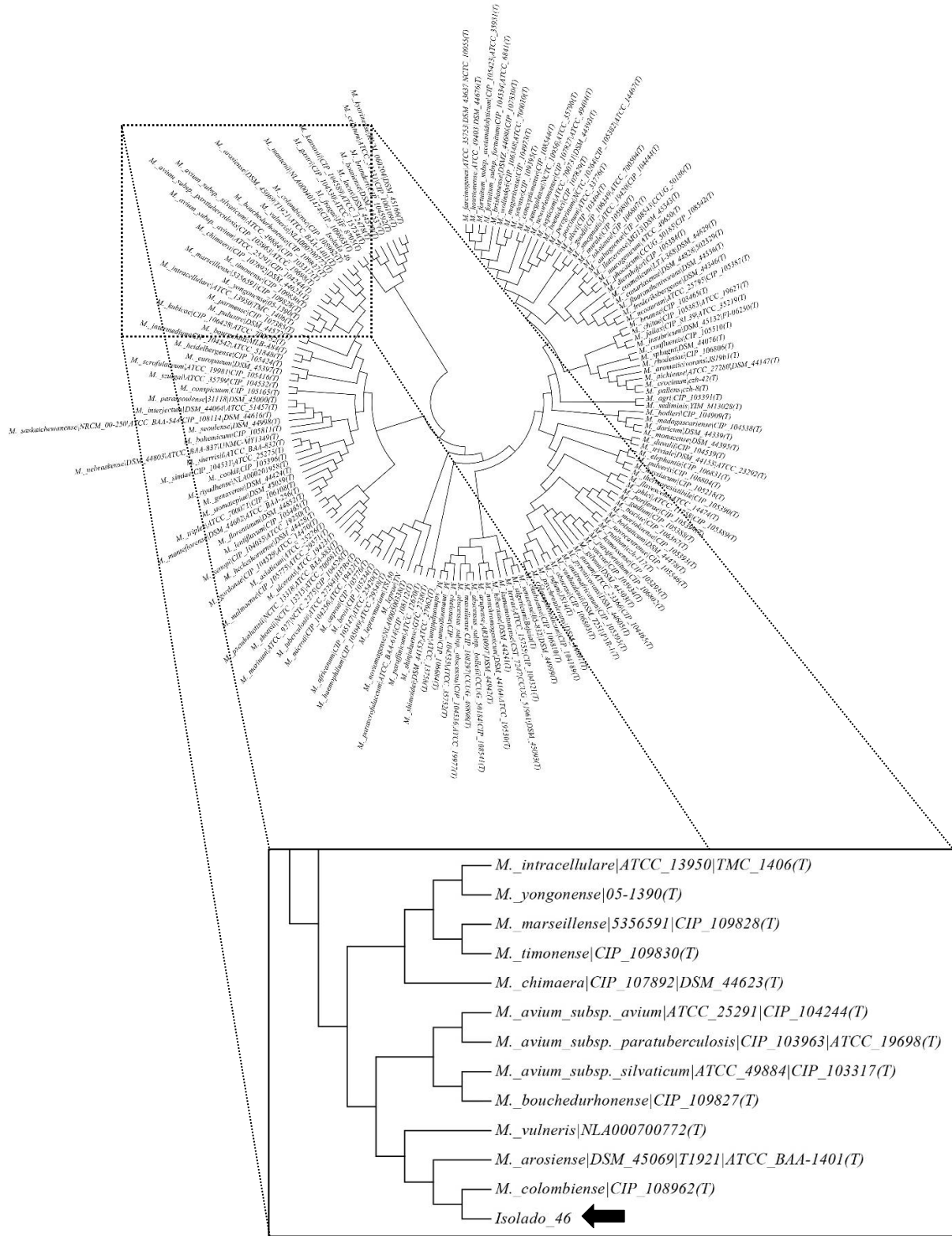
A utilização concomitante do sequenciamento parcial dos dois genes escolhidos permitiu identificar em nível de espécie 89,66% (52/58) dos isolados do estudo pela análise comparativa com as sequências de nucleotídeos depositadas na base de dados do GenBank e a aplicação do programa BLAST.

Para seis isolados (10,34%), o sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB* não foi suficiente para a identificação em nível de espécie. Foi utilizado o programa MEGA7 versão 7.0.26 para a análise filogenética com sequências referência para maior robustez dos resultados (figura 12). Após essa análise, foi possível identificar em nível de espécie 98,28% (57/58) dos isolados. Em apenas um caso não foi possível a distinção em uma única espécie, sendo o isolado classificado apenas como Complexo *M. terrae*.

Através da análise filogenética também foi possível identificar a subespécie de *M. abscessus* de três isolados no qual o sequenciamento parcial dos genes não foi suficiente.

O sequenciamento parcial do gene *hsp65* teve melhor desempenho geral na distinção das espécies, após comparação no programa BLAST.

Figura 12 – Análise filogenética



Fonte: autor. Identificação pela análise filogenética utilizando banco de dados de seqüências referência para o gene *hsp65*. No exemplo o isolado 46 foi identificado como *Mycobacterium colombiense*.

A análise das sequências do gene *hsp65* permitiu identificar 86,21% (50/58) dos isolados em nível da espécie. A porcentagem de identidade em comparação com as sequências depositadas no GenBank variou entre 93,62% e 100% com mediana de 100%.

A análise das sequências do gene *rpoB* permitiu identificar 74,14% (43/58) dos isolados em nível da espécie. A porcentagem de identidade em comparação com as sequências depositadas no GenBank variou entre 89,93% e 100% com mediana de 99,71%.

No geral, a análise do sequenciamento parcial do gene *hsp65* se mostrou a melhor ferramenta para a distinção das espécies do Complexo *M. fortuitum*. Já o sequenciamento parcial do gene *rpoB* teve o melhor desempenho na distinção das subespécies de *M. abscessus*.

Tabela 6 – Resultado das análises do sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB* utilizando o programa BLAST

Amostra	Seq. <i>hsp65</i>	Porc. Ident. (%)	Seq. <i>rpoB</i>	Porc. Ident. (%)	Seq. <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i>
1	<i>M. abs sub. abscessus</i>	100	<i>M. abs sub. abscessus</i>	99,15	<i>M. abs sub. abscessus</i>
2	<i>M. abs sub. abscessus</i>	100	Baixa qualidade da sequência	-	<i>M. abs sub. abscessus</i>
3	<i>M. abs sub. abscessus</i>	100	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. abs sub. abscessus</i> *
4	<i>M. abs sub. abscessus</i>	100	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. abs sub. abscessus</i>
5	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. abs sub. abscessus</i>	100	<i>M. abs sub. abscessus</i>
6	<i>M. abs sub. abscessus</i>	100	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. abs sub. abscessus</i> *
7	<i>M. abs sub. abscessus</i>	100	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. abs sub. abscessus</i> *
8	<i>M. abs sub. bolletii</i>	100	<i>M. abs sub. bolletii</i>	99,52	<i>M. abs sub. bolletii</i>
9	<i>M. abs sub. bolletii</i>	99,69	<i>M. abs sub. bolletii</i>	100	<i>M. abs sub. bolletii</i>
10	<i>M. abs sub. bolletii</i>	100	<i>M. abs sub. bolletii</i>	100	<i>M. abs sub. bolletii</i>
11	<i>M. chelonae</i>	100	<i>M. chelonae</i>	100	<i>M. chelonae</i>
12	<i>M. chelonae</i>	100	<i>M. chelonae</i>	100	<i>M. chelonae</i>
13	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>

14	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>
15	<i>M. fortuitum</i>	99,71	<i>M. fortuitum</i>	99,71	<i>M. fortuitum</i>
16	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>
17	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>
18	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>
19	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>
20	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	99,83	<i>M. fortuitum</i>
21	<i>M. peregrinum</i>	100	<i>M. peregrinum</i>	100	<i>M. peregrinum</i>
22	<i>M. peregrinum</i>	99,71	<i>M. peregrinum</i>	99,54	<i>M. peregrinum</i>
23	<i>M. peregrinum</i>	99,71	<i>M. alvei</i> <i>M. peregrinum</i>	98,58	<i>M. peregrinum</i>
24	<i>M. peregrinum</i>	99,71	<i>M. alvei</i> <i>M. peregrinum</i>	98,31	<i>M. peregrinum</i>
25	<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i>	97,39	<i>M. porcinum</i>	100	<i>M. porcinum</i>
26	<i>M. avium</i>	100	<i>M. confluentis</i> <i>M. senegalense</i>	93,17	<i>M. senegalense*</i>
27	<i>M. mucogenicum</i>	99,71	<i>M. mucogenicum</i>	98,43	<i>M. mucogenicum</i>
28	<i>M. mucogenicum</i>	93,62	<i>M. mucogenicum</i>	100	<i>M. mucogenicum</i>
29	<i>M. gordonae</i>	100	<i>M. gordonae</i>	99,68	<i>M. gordonae</i>
30	<i>M. gordonae</i>	100	<i>M. gordonae</i>	99,66	<i>M. gordonae</i>
31	<i>M. kansasii</i>	99,71	<i>M. kansasii</i>	100	<i>M. kansasii</i>
32	<i>M. kansasii</i>	99,71	<i>M. kansasii</i>	100	<i>M. kansasii</i>
33	<i>M. kansasii</i>	99,71	<i>M. kansasii</i>	100	<i>M. kansasii</i>
34	<i>M. fortuitum</i>	98,53	<i>M. kansasii</i>	100	<i>M. kansasii</i> #
35	<i>M. lentiflavum</i>	100	<i>M. lentiflavum</i>	99,68	<i>M. lentiflavum</i>

36	<i>M. lentiflavum</i>	98,48	<i>M. lentiflavum</i>	99,71	<i>M. lentiflavum</i>
37	<i>M. avium</i>	97,68	<i>M. avium</i>	99,84	<i>M. avium</i>
38	<i>M. avium</i>	100	<i>M. avium</i>	100	<i>M. avium</i>
39	<i>M. avium</i>	100	<i>M. avium</i>	99,83	<i>M. avium</i>
40	<i>M. avium</i>	99,15	<i>M. avium</i>	99,42	<i>M. avium</i>
41	<i>M. avium</i>	99,12	<i>Comp. M. avium</i>	97,21	<i>M. avium</i>
42	<i>M. avium</i>	100	<i>M. avium</i>	99,65	<i>M. avium</i>
43	<i>M. abscessus</i>	100	<i>M. avium</i>	99,84	<i>M. avium</i>
44	<i>M. fortuitum</i>	100	<i>M. avium</i>	98,85	<i>M. avium</i>
45	<i>M. avium</i>	100	<i>M. avium</i>	99,68	<i>M. avium</i>
46	<i>M. colombiense</i>	99,44	<i>Comp. M. avium</i>	97,21	<i>M. colombiense*</i>
47	<i>M. colombiense</i>	99,71	<i>M. colombiense</i>	99,69	<i>M. colombiense</i>
48	<i>Comp. M. avium</i>	99,13	<i>M. mantenii</i>	96,30	<i>M. colombiense*</i>
49	<i>Comp. M. avium</i>	99,13	<i>M. mantenii</i>	96,62	<i>M. colombiense*</i>
50	<i>M. intracellulare</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	99,84	<i>M. intracellulare #</i>
51	<i>M. intracellulare</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	98,37	<i>M. intracellulare #</i>
52	<i>M. intracellulare</i>	100	<i>M. fortuitum</i>	98,86	<i>M. intracellulare #</i>
53	<i>M. intracellulare</i>	100	<i>M. intracellulare</i>	99,66	<i>M. intracellulare</i>
54	<i>M. intracellulare</i>	99,42	<i>M. chimaera</i>	99,84	<i>M. intracellulare*</i>
55	<i>M. intracellulare</i>	100	<i>M. intracellulare</i>	99,52	<i>M. intracellulare</i>
56	<i>M. intracellulare</i>	99,71	<i>M. fortuitum</i>	98,92	<i>M. intracellulare #</i>
57	<i>M. marinum</i>	100	<i>M. ulcerans</i>	99,84	<i>M. marinum</i> <i>M. pseudoshottisii</i> <i>M. ulcerans</i>

58	<i>Comp. M. terrae</i>	96,76	<i>Comp. M. terrae</i>	96,37	<i>Comp. M. terrae*</i>
----	------------------------	-------	------------------------	-------	-------------------------

* Resultado após análise filogenética; # Espécie identificada com o auxílio das características fenotípicas do isolado; abs.: abscessus; Comp.: Complexo; Porc. Ident.: Porcentagem de identidade; Seq: sequenciamento

4.4 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE MNT UTILIZADAS NO ESTUDO

O resultado comparativo entre as três metodologias utilizadas neste estudo, além dos detalhes referentes a cada isolado estão detalhados no Apêndice II.

Comparando as espécies identificadas pelo método PCR-PRAhsp65 e MALDI-TOF MS, observou-se uma concordância de 94,23% (49/52) entre as espécies ou complexos. Em 5,76% (3/52) houve discordância de identificação entre os métodos, detalhadas na tabela 7.

Entre as espécies identificadas do Complexo *M. abscessus*, houve concordância de 100% (10/52) das amostras analisadas pelos dois métodos.

Entre as espécies identificadas do MAC, houve concordância de 100% (16/52) das amostras.

Entre os quatorze isolados identificados como Complexo *M. fortuitum* pela espectrometria de massa, houve concordância de 92,9%. Entre esses isolados, uma amostra foi identificada como *M. phlei* pela PCR-PRAhsp65.

Uma amostra identificada como *M. intracellulare* / *M. chimaera* pela PCR-PRAhsp65 foi identificada como *M. arupense* pelo MALDI-TOF MS. Uma amostra identificada como *M. nonchromogenicum* pela PCR-PRAhsp65 foi identificada como *M. mucogenicum* pelo MALDI-TOF MS.

Houve concordância em todas as amostras identificadas como *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum* e *M. marinum*.

Quando foi comparado o resultado do sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB* com o método PCR-PRAhsp65, observou-se uma concordância de 94,82% (55/58) das espécies identificadas. Em três ocasiões ocorreram discrepâncias de identificação entre a PCR-PRAhsp65 e o padrão ouro. Uma amostra foi identificada com *M. senegalense* pelo sequenciamento e como *M. phlei* pela PCR-PRAhsp5. Uma amostra foi identificada como *M. mucogenicum* pelo sequenciamento e como *M. nonchromogenicum* pela PCR-PRAhsp65. Uma amostra foi identificada como Complexo *M. terrae* pelo sequenciamento e como *M. intracellulare* / *M. chimaera* pela PCR-PRAhsp65.

Tabela 7 – Identificações discordantes entre a PCR-PRAhsp65 e MALDI-TOF MS

Amostra	Método	
	PCR-PRAhsp65	MALDI-TOF MS
26	<i>M. phlei</i>	Complexo <i>M. fortuitum</i>
28	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>
58	<i>M. intracellulare</i> / <i>M. chimaera</i>	<i>M. arupense</i>

Na comparação do sequenciamento com o MALDI-TOF MS houve concordância de 96,15% (50/52) nas identificações das espécies que puderam ser identificadas. Lembrando que em seis isolados de crescimento lento o MALDI-TOF MS não conseguiu identificar nenhuma espécie.

A lista de amostras discordantes entre a PCR-PRAhsp65, MALDI-TOF e o sequenciamento podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8 – Identificações discordantes entre o Sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*, PCR-PRAhsp65 e MALDI-TOF MS

Amostra	Método		
	Sequenciamento	PCR-PRAhsp65	MALDI-TOF MS
26	<i>M. senegalense</i>	<i>M. phlei</i>	Complexo <i>M. fortuitum</i>
28	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>
46	<i>M. colombiense</i>	Complexo <i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
47	<i>M. colombiense</i>	Complexo <i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>
58	Complexo <i>M. terrae</i>	<i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i>	<i>M. arupense</i>

Em destaque as identificações discordantes

5 DISCUSSÃO

Infecções por MNT representam um crescente problema de saúde global, complicado pela exposição ambiental às espécies de micobactérias, compreensão incompleta da suscetibilidade imunológica à doença, número crescente de pacientes imunocomprometidos, testes de diagnóstico complicados (sem testes prognósticos) e esquemas caros de tratamento com múltiplos medicamentos, que variam entre as espécies, e que muitas vezes falham em curar (RATNATUNGA *et al.*, 2020).

O tratamento de infecções por MNT depende significativamente da identificação das espécies. O aumento constante no relato de espécies novas de micobactérias, o uso de técnicas laboriosas e a falta de métodos de identificação padronizados tornam o cumprimento dessa meta um grande desafio. O diagnóstico realizado de forma imprecisa pode levar a abordagens terapêuticas inadequadas. Os membros do gênero *Mycobacterium* são geneticamente próximos uns dos outros, tornando a identificação uma tarefa difícil e desafiadora (TORTOLI, 2003a; JOÃO *et al.*, 2014).

Também é importante distinguir as espécies entre patógenos humanos e contaminantes na amostra. Para as micobactérias patogênicas é fundamental discriminar as espécies para iniciar uma terapia antibacteriana adequada (KOH *et al.*, 2002; GRIFFITH *et al.*, 2007; NASH *et al.*, 2009; VAN INGEN *et al.*, 2010a; JOÃO *et al.*, 2014).

Identificar precisamente as MNT é um processo demorado e laborioso e, muitas vezes, não é possível devido ao aumento do relato de novas espécies com sobreposição de características fenotípicas. Procedimentos bioquímicos convencionais não são capazes de distinguir em torno de 200 espécies de micobactérias conhecidas.

Deve-se levar em conta que a falha no diagnóstico causa atraso na identificação da verdadeira doença, acarretando ao doente sofrimento físico, psicológico, econômico e social. Com o tratamento inadequado, as cepas podem se tornar resistentes, prolongando o tratamento e em muitos casos resultando em doença crônica, levando o paciente a inúmeras internações e tratamentos sem sucesso, aumentando as chances de causar danos hepáticos e mortalidade (CASTELO *et al.*, 2004; RIELLO, 2015).

Um baixo nível de suspeita de infecção por MNT, conhecimento limitado e escassez de laboratórios especializados frequentemente levam a atrasos no diagnóstico. O tempo médio para

o diagnóstico pode chegar a dois anos ou mais. O atraso resulta em aumento da gravidade da doença, e a perda da capacidade funcional não é incomum (AHMED *et al.*, 2020).

Testes moleculares como a PCR-PRA_{hsp65} e a espectrometria de massas como o MALDI-TOF, começaram a ser utilizados para fornecer identificação rápida, precisa e mais econômica de uma ampla gama de micobactérias. Neste estudo foram avaliados os métodos PCR-PRA_{hsp65} e espectrometria de massas por MALDI-TOF MS para a identificação de espécies de MNT através da comparação com os resultados de sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*, tomado como padrão ouro.

Os resultados do presente estudo mostraram que as três metodologias utilizadas (PCR-PRA_{hsp65}, MALDI-TOF MS e Sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*) são eficazes para a identificação de MNT ao nível de espécie ou complexo no qual as espécies pertencem. PCR-PRA_{hsp65} e MALDI-TOF obtiveram resultados muito semelhantes, com porcentagem de concordância entre si de 94,23%. Quando comparadas ao sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*, a PCR-PRA_{hsp65} obteve porcentagem de identificação correta de 94,82% e o MALDI-TOF MS de 96,15%.

As metodologias de análise molecular e de espectrometria de massa utilizadas neste estudo apresentam como vantagem, em relação às demais técnicas comerciais e descritas na literatura para a identificação de MNT (Tabela 4), a possibilidade de distinção de uma variedade maior de espécies. Enquanto as técnicas de *multiplex*-PCR, PCR em tempo real e técnicas de hibridização em tiras necessitam de iniciadores e/ou sondas específicas, o método PCR-PRA_{hsp65} é capaz de realizar a identificação de diversas espécies de acordo com o padrão de bandas obtido na eletroforese, e o método de MALDI-TOF MS, consegue realizar o trabalho apenas com extração das proteínas e análise rápida de forma não laboriosa.

O método PCR-PRA_{hsp65} tem sido utilizado em muitos laboratórios de referência nacionais, sendo de grande importância na diferenciação de muitas espécies de MNT, apresentando boa correlação com os resultados de identificação fenotípica, reconhecimento de espécies que não eram identificadas anteriormente devido à limitação dos métodos fenotípicos, bem como a redução no tempo necessário desta identificação (SILVA *et al.*, 2001; SILVA ROCHA *et al.*, 2002; HÄFNER *et al.*, 2004; BRITO, 2008; CHIMARA *et al.*, 2008; SENNA *et al.*, 2008; SENNA *et al.*, 2011; CARDOSO, 2012).

A identificação de algumas espécies utilizando a metodologia PCR-PRA pode ser dificultada por pequenas diferenças no tamanho dos fragmentos de bandas entre as espécies, o

aparecimento de padrões novos e a necessidade de usar algoritmos elaborados para identificar as espécies. A inexistência de padrões PRA para as novas espécies emergentes, também torna difícil a correta identificação delas (WONG *et al.*, 2001; HAFNER *et al.*, 2004; RODRIGUES, 2011; VARMA-BASIL & BOSE, 2019).

Os resultados do presente estudo demonstram que a metodologia PCR-PRA_{hsp65} é eficiente para distinção de espécies de micobactérias. Embora 27,6% dos isolados não tenham sido identificados ao nível de espécie, as espécies identificadas nesses casos pertencem a um mesmo complexo, não acarretando em dúvidas no manejo e escolha do esquema terapêutico segundo as diretrizes publicadas por Griffith e colaboradores (2007) e revisadas por Daley e colaboradores (2020). Essa ambiguidade de espécies se dá, pois, um mesmo padrão PRA pode ser originado por espécies diferentes, independentemente da sua sequência do gene *hsp65* (440 pb) ser ou não diferente, desde que partilhem os mesmos locais de restrição. Um padrão PRA semelhante pode resultar da digestão de sequências diferentes com locais de restrição distintos, para uma ou ambas as enzimas, que originam fragmentos com tamanhos semelhantes, assim como já relatado por Rodrigues (2011).

Quando comparada a PCR-PRA_{hsp65} ao padrão ouro observou-se uma concordância de 94,82% das espécies identificadas. Levando em consideração as espécies patogênicas mais comuns isoladas em Santa Catarina (Complexo *M. abscessus*, MAC, Complexo *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. kansasii*) a PCR-PRA_{hsp65} identificou corretamente 100% dos isolados.

Em comparação com outros estudos que avaliaram a PCR-PRA_{hsp65}, os resultados foram semelhantes. ONG e colaboradores (2010) descreveram que a técnica conseguiu identificar 92,2% das espécies de um total de 90 isolados. Chimara e colaboradores (2008) descreveram a identificação correta das espécies por essa metodologia em 90,3% dos isolados. Os pesquisadores avaliaram 434 isolados de MNT provenientes de amostras clínicas. Em relação às espécies patogênicas mais comuns, a PCR-PRA_{hsp65} identificou corretamente 98,8% dos isolados. O estudo de Chimara e colaboradores também comparou os métodos fenotípicos usualmente utilizados e a PCR-PRA_{hsp65}, demonstrando a diminuição do tempo do diagnóstico microbiológico pelo método molecular em relação à análise fenotípica. A PCR-PRA_{hsp65} tem o potencial de fornecer aos médicos informações mais oportunas, precisas e, em última instância, mais úteis, portanto, merece consideração por qualquer laboratório de microbiologia clínica (CHIMARA *et al.*, 2008).

Além disso, a PCR-PRAhsp65 pode distinguir as subespécies do Complexo *M. abscessus*. No presente estudo essa distinção foi possível em 70% (7/10) dos isolados identificados como *M. abscessus sub. abscessus*, o que não ocorreu utilizando a metodologia por MALDI-TOF MS, na qual não foi possível a distinção das subespécies.

Assim, embora os dois métodos apresentem uma boa acurácia, a PCR-PRAhsp65 tem a vantagem de oferecer resultado de maior significado clínico/epidemiológico (BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012b).

Em relação às três espécies identificadas incorretamente pela PCR-PRAhsp65 (3/58; 5,17%), algumas observações devem ser feitas. Um isolado de *M. mucogenicum* proveniente de escarro foi identificado incorretamente como *M. nonchromogenicum* pela PCR-PRAhsp65. *M. nonchromogenicum* raramente causa doença humana e particularmente, a doença pulmonar é extremamente rara. *M. nonchromogenicum* faz parte do Complexo *M. terrae*. A terapia antimicrobiana ideal para o Complexo *M. terrae* não foi estabelecida, embora seja sugerido o uso de um macrolídeo, mais etambutol ou outro agente, com base em resultados de sensibilidade *in vitro*. Estudos publicados relatam que as espécies do Complexo *M. terrae* são sensíveis ao ciprofloxacino, sulfonamidas e linezolida (SMITH *et al.*, 2000; BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2003; SAWAI *et al.*, 2006; GRIFFITH *et al.*, 2007).

A recuperação em amostra clínica de *M. mucogenicum* da pele, ferida ou hemoculturas é mais frequentemente associada à doença clínica. Em contraste, uma única cultura de escarro positiva quase nunca foi clinicamente significativa. O raro isolamento de *M. mucogenicum* de espécimes respiratórios também pode ser devido, em parte, ao pré-tratamento com mucolíticos e hidróxido de sódio e à adição de antibióticos ao meio de cultura que podem inativar este organismo mais do que outras MCR por causa de sua célula mucóide e baixa resistência a antibimicrobianos. Outras espécies, como *M. peregrinum*, *M. mucogenicum* ou *M. mageritense* são geralmente sensíveis a vários antibimicrobianos. *M. mucogenicum* é sensível à cefoxitina, claritromicina, imipenem e sulfametoxazol + trimetropima. A maioria das cepas é sensível a ciprofloxacino e também pode ser utilizada a doxiciclina. (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012a; ESTEBAN *et al.*, 2012; ALCAIDE *et al.*, 2017; ESTEBAN & NAVAS, 2018).

Em outro caso do presente estudo, de identificação incorreta pela PCR-PRAhsp65, um isolado proveniente de amostra de escarro foi identificado pelo sequenciamento como Complexo *M. terrae* e como *M. intracellulare/M. chimaera* (espécies pertencentes ao MAC) pela PCR-PRAhsp65. Neste caso a ambiguidade de resultados é importante, pois as espécies

do Complexo *M. terrae* não possuem a mesma relevância clínica que as espécies do MAC. Para esse isolado clínico, o MALDI-TOF MS identificou a espécie como *M. arupense*, uma micobactéria pertencente ao Complexo *M. terrae*. Um estudo retrospectivo publicado por Al Hamal e colaboradores (2016), mostrou que não há benefício claro no tratamento de *M. arupense*, especialmente quando ele é recuperado de amostras respiratórias.

Outra espécie identificada incorretamente pela PCR-PRAhsp65 foi *M. phlei* em uma amostra de secreção de mama. O resultado do sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB* identificou a amostra como *M. senegalense*, uma micobactéria do Complexo *M. fortuitum*.

M. phlei é conhecido por ser uma MNT não patogênica que raramente causa doenças em humanos. Alguns casos de infecções por *M. phlei* são descritos na literatura, porém não relacionados à infecção de mama (TANAKA *et al.*, 2019; NOGUERA ORTEGA *et al.*, 2020).

M. senegalense é uma micobactéria de crescimento rápido que pertence ao Complexo *M. fortuitum*. Esses patógenos oportunistas causam infecções pós-traumáticas da pele e tecidos moles, incluindo infecções pós-cirúrgicas. Há relatos na literatura de infecção de mama causada por *M. senegalense*. O Complexo *M. fortuitum* raramente causa doença pulmonar, exceto em casos de pneumonia lipóide, distúrbios gastroesofágicos ou doenças disseminadas. Infecções de pele e tecidos moles são comuns após mamoplastia e intervenções de cirurgia plástica ou cirurgia cardíaca (infecções da ferida esternal). As bactérias do Complexo *M. fortuitum* são as mais frequentes em infecções de mama relatadas no presente estudo (PFYFFER, 2015; FORBES *et al.*, 2018; CARRETERO *et al.*, 2020).

As infecções por Complexo *M. fortuitum* geralmente podem ser tratadas com um regime de dois medicamentos com base em testes de sensibilidade *in vitro*. Este regime pode incluir fluoroquinolona, doxiciclina, amicacina ou sulfonamidas. Embora a maioria dos isolados de *M. fortuitum* apresentem resistência à claritromicina, certos membros do Complexo *M. fortuitum*, como por exemplo, *M. peregrinum* e *M. senegalense*, não contêm um gene *erm* metilase induzível que confere resistência a macrolídeos (BROWN-ELLIOTT & PHILLEY, 2017; FORBES *et al.*, 2018).

A identificação incorreta de *M. phlei* ao invés de *M. senegalense* pode mudar a conduta terapêutica e confundir o clínico em relação à escolha ou não da antibioticoterapia.

A metodologia por MALDI-TOF MS é descrita como um método rápido e barato para a identificação de micobactérias. Nos últimos anos, demonstrou identificar com precisão

bactérias isoladas rotineiramente em laboratório de microbiologia clínica (LU *et al.*, 2000; BIZZINI *et al.*, 2010; CARBONNELLE *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2018).

Dois sistemas foram aprovados para uso clínico, o MALDI Biotyper CA (Bruker Daltonics) e o VITEK MS (bioMérieux). Resultados promissores foram relatados com taxas de identificação bem-sucedidas de 80 a 98%, embora os resultados quando usados com meios líquidos tenham sido menos impressionantes (VAN ECK *et al.*, 2016; COWMAN & LOEBINGER, 2018).

Estudos compararam o desempenho desses dois sistemas para identificação de micobactérias e apresentaram resultados variáveis. Uma meta-análise mostrou que, em geral, a taxa de precisão de identificação do VITEK MS foi ligeiramente superior à do MALDI Biotyper, embora resultados opostos tenham sido obtidos na identificação de várias espécies de MNT, como *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. marinum* e *M. terrae* (CHEN *et al.*, 2013b; MATHER *et al.*, 2014; LEVESQUE *et al.*, 2015; WILEN *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2018. HUH *et al.*, 2018).

A velocidade, robustez e custos mínimos de preparação e medição da amostra o tornam excepcionalmente adequado para uso de rotina e de alto rendimento. Ele reduz o tempo de resposta e pode ter um impacto potencial no benefício para o manejo dos pacientes. Ambos os sistemas usam algoritmos diferentes para a identificação de espectros de proteínas microbiana, entretanto estudos prévios mostraram desempenho semelhante para a identificação de MNT (BUCHAN *et al.*, 2014; MATHER *et al.*, 2014).

A expansão regular do banco de dados e a eficiência da identificação podem ser aprimorados. Para uso rotineiro, a facilidade de uso é uma consideração importante em um laboratório clínico (HUANG *et al.*, 2018).

A metodologia por MALDI-TOF MS é barata (se não incluirmos o custo da máquina e da manutenção anual), mostrando 84 a 98,8% de identificação correta em nível de espécie, incluindo bactérias apenas identificáveis no sequenciamento do gene 16S rRNA. Estudos mostraram que a identificação exigia apenas US\$ 0,50 em reagentes e constituía uma alternativa promissora para identificação bacteriana em países em desenvolvimento (MELLMANN *et al.*, 2009; SENG *et al.*, 2009; FANGOUS *et al.*, 2014; SAMB-BA *et al.*, 2014; FORBES *et al.*, 2018).

O poder discriminatório do MALDI-TOF MS para MNT aumentou com as melhorias recentes nos protocolos de extração de proteínas e bancos de dados, mas nem todas as espécies

e subespécies podem ser diferenciadas com esta abordagem (BUCHAN *et al.*, 2014; ALCAIDE *et al.*, 2018; DALEY *et al.*, 2020).

A identificação precisa de espécies relacionadas dentro de um determinado complexo (por exemplo, subespécies de *M. abscessus*, espécies do Complexo *M. avium* ou Complexo *M. fortuitum*) é um problema recorrente (FANGOUS *et al.*, 2014).

No presente estudo, o equipamento utilizado, o MALDI-TOF VITEK MS (BioMérieux, França) com a base de dados VITEK MS Knowledge Base V3.2, foi capaz de identificar corretamente 89,7% das amostras. Seis isolados de micobactérias de crescimento lento não puderam ser identificados.

Entre as amostras identificadas o MALDI-TOF MS conseguiu distinguir ao nível de espécie 73,1% dos isolados. Apenas as micobactérias do Complexo *M. fortuitum* não puderam ser identificadas por espécie nesta metodologia. No geral, entre as espécies identificadas o MALDI-TOF MS obteve 96,15% de concordância com o sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*.

Resultados de Mather e colaboradores (2014) utilizando o Vitek MS encontraram 94,4% de identificações de MNT corretas ao nível de espécie. A concordância no estudo de Luo e colaboradores (2018) foi de 93,9% e de Buckwalter e colaboradores (2016) de 88%.

Em estudo de Body e colaboradores (2018), no qual foram identificados 663 isolados, os resultados obtidos foram semelhantes aos do presente estudo. Foi possível a distinção ao nível de espécie e ao nível de complexo em 69% e 24% dos isolados, respectivamente. Em 6% dos isolados não foi possível a identificação mesmo após repetição.

Em relação à impossibilidade de identificação de qualquer espécie ou complexo de seis isolados pelo MALDI-TOF MS nos isolados do presente estudo, algumas observações podem ser feitas: ao contrário das bactérias e leveduras, as micobactérias têm paredes celulares mais espessas e, portanto, requerem um procedimento adicional de extração de proteínas para garantir uma identificação eficaz. Embora muitos métodos tenham sido descritos e efeitos de inativação perfeitos tenham sido obtidos, ainda faltam procedimentos uniformes. Devido à presença de ácidos micólicos e à patogenicidade das micobactérias, protocolos confiáveis de inativação e extração reprodutível de amostras apresentam grandes desafios, o que pode explicar em parte as grandes variações nos achados entre os pesquisadores (LUO *et al.*, 2018).

O protocolo de extração de proteínas utilizado neste estudo é do kit comercial do próprio fabricante do equipamento e se baseia na utilização de esferas de vidro, acetonitrila,

ácido fórmico e álcool 70%. As amostras cuja identificação não foi possível foram repetidas seguindo o mesmo protocolo.

A idade das colônias também pode influenciar nas análises. Mather e colaboradores (2014) concluíram que a idade das colônias usadas para o teste deve ser muito parecida com a idade das colônias usadas para a criação do banco de dados. Também foi observado no presente estudo que o desempenho de identificação foi melhorado utilizando colônias mais jovens.

Os bancos de dados ainda estão em desenvolvimento e surgem novas versões que incorporam mais espécies e, portanto, melhoram a precisão da identificação. Semelhante ao sequenciamento de rRNA, a precisão de MALDI-TOF depende tanto da robustez do banco de dados quanto da qualidade dos espectros obtidos (VAN INGEN, 2015; RODRIGUEZ-GRANGER *et al.*, 2018).

Outros problemas relatados no processamento dos isolados são a interferência do meio de cultura à base de ovo na placa alvo, possivelmente como supressor de ionização de material. E também a mistura de mais de uma espécie no crescimento do meio de cultura (ANNESLEY, 2003; KODANA *et al.*, 2016).

No processamento dos isolados teve-se o cuidado de retirar apenas as colônias com a alça plástica de 1 µL para a extração das proteínas, evitando a retirada do meio Ogawa-Kudoh. Também foi realizada coloração de Ziehl-Neelsen e Gram, além da observação da uniformidade das colônias para evitar a análise de uma mistura de espécies. Concluímos que a razão de não termos identificado seis isolados pelo método MALDI-TOF MS não foi pela mistura de espécies com o meio de cultura, nem pela presença concomitante de mais de uma espécie na amostra.

As limitações do MALDI-TOF-MS para a identificação de MNT incluem a falta de discriminação com algumas espécies e subespécies estreitamente relacionadas clinicamente importantes, incluindo *M. abscessus* sub. *abscessus*, *M. abscessus* sub. *massiliense* e *M. abscessus* sub. *bolletii*; *M. avium*, *M. avium* sub. *avium*, *M. avium* sub. *paratuberculosis* e *M. avium* sub. *silvaticum*; *M. intracellulare* e *M. chimaera*; *M. mucogenicum* e *M. phocaicum* e o Complexo *M. fortuitum* (LEFMANN *et al.*, 2004; HETTICK *et al.*, 2006; LOTZ *et al.*, 2010; SALEEB *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2016; BROWN-ELLIOTT, 2018a).

No presente estudo, todas as espécies do Complexo *M. avium* foram identificadas em nível de espécie pelo MALDI-TOF MS, incluindo *M. avium* e *M. intracellulare*. Dois isolados identificados como *M. colombiense* (um proveniente de escarro e outro de aspirado de

linfonodo) pelo sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*, foi identificado incorretamente com *M. intracellulare* pelo MALDI-TOF MS. *M. colombiense* e *M. intracellulare* são espécies estreitamente relacionadas, e clinicamente segundo as diretrizes da ATS/IDSA, o tratamento farmacológico para as micobactérias pertencentes ao Complexo *M. avium* é idêntico. A título de manejo clínico, a identificação equivocada como ocorreu para estes dois isolados, não interfere na conduta terapêutica.

As espécies *M. chelonae*, *M. mucogenicum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum* e *M. marinum* foram identificadas corretamente pelo MALDI-TOF MS comparando o resultado com o sequenciamento.

Não foi possível a distinção das espécies dos quatorze isolados referentes ao Complexo *M. fortuitum*. Assim como relatado por Luo e colaboradores (2018), as espécies *M. peregrinum* e *M. senegalense*, foram identificadas como o Complexo *M. fortuitum*, ao qual pertencem.

Todos os dez isolados referentes à espécie *M. abscessus* foram corretamente identificadas. Também foi possível a distinção dos dois isolados referentes a *M. chelonae*, já que *M. abscessus* e *M. chelonae* são espécies estreitamente relacionadas.

Ainda em relação a *M. abscessus*, não foi possível a identificação ao nível das subespécies pelo MALDI-TOF MS. As versões dos bancos de dados atuais identificam os isolados ao nível Complexo *M. abscessus*, mas não separa *M. abscessus* sub. *abscessus*, *M. abscessus* sub. *massiliense* e *M. abscessus* sub. *bolletii* (SALEEB *et al.*, 2011; KEHRMANN *et al.*, 2016).

Estudo realizado por Kehrmann e colaboradores (2016), mostrou diferenças nos picos dos espectros obtidos na identificação por MALDI-TOF MS, capaz de distinguir *M. massiliense* das outras subespécies do Complexo *M. abscessus*. Essas subespécies são particularmente preocupantes, pois podem variar em seus níveis de resistência aos macrolídeos devido à presença ou ausência de um gene *erm* funcional. Os autores concluem que se os picos discriminantes encontrados no estudo forem incluídos nos atuais bancos de dados, podem ajudar a distinguir isolados de *M. massiliense* em diagnósticos microbiológicos de rotina.

No geral a metodologia MALDI-TOF MS tem como limitações: necessidade de um pré-tratamento dos isolados (extração), é necessário biomassa adequada e crescimento puro para a identificação, resultados podem variar de acordo com as condições de crescimento (idade das colônias), alto custo de investimento inicial, e validação completa necessária. Como vantagens: possui identificação rápida em relação com outras técnicas, potencial diferenciação das

subespécies de *M. abscessus* em banco de dados futuros, e as metodologias de extração de proteínas estão se aperfeiçoando rapidamente (NUNES-COSTA *et al.*, 2016).

Com o número crescente de MNT sendo descritas e a necessidade de identificação precisa em nível de espécie, a análise de sequências de genes é atualmente considerada o padrão ouro para a identificação taxonômica de espécies (FORBES *et al.*, 2018).

A identificação com base em um único *locus* não é valiosa para a separação confiável, e a combinação de vários *loci* melhora significativamente a capacidade da identificação baseada na sequência. O sequenciamento de um único gene não é suficientemente discriminatório, devido às frequentes transferências horizontais de genes entre subespécies. A tipagem de sequências multilocus melhora significativamente a capacidade da identificação. Porém o sequenciamento multilocus é complicado e caro (HASHEMI-SHAHRAKI *et al.*, 2013; MATHER *et al.*, 2014).

Para o presente estudo foram escolhidos o sequenciamento dos genes *hsp65* e *rpoB* pois segundo Van Ingen e colaboradores (2010a), Lefmann e colaboradores (2014) e Daley e colaboradores (2020), esses genes oferecem um poder discriminatório em espécie e subespécie superior ao sequenciamento do gene 16S rRNA isolado.

A análise dos dados da sequência envolve a avaliação da qualidade da sequência, seguida pela comparação da sequência com sequências conhecidas depositadas em bancos de dados públicos ou comerciais. Os bancos de dados públicos contêm uma representação diversa de dados de sequência, mas carecem de supervisão das sequências depositadas e podem existir entradas incorretas. Ao usar bancos de dados públicos, as sequências de referência devem ser sempre revisadas cuidadosamente (CLSI, 2018; HUH *et al.*, 2018).

A comparação com um banco de dados público, comercial ou validado internamente é uma etapa importante. Para não ser superenfaticado, a integridade do banco de dados depende da qualidade das sequências adicionadas à biblioteca. Cada banco de dados deve ser monitorado constantemente e deve incluir novos dados assim que estiverem disponíveis. O controle de qualidade rigoroso e a curadoria de cada inscrição são essenciais. Como acontece com qualquer outro método de identificação, os resultados do sequenciamento devem se correlacionar com as principais características fenotípicas (BROWN-ELLIOTT, 2018a).

Sequências de alta qualidade em bancos de dados públicos são ideais, mas muitas vezes faltam para algumas espécies de MNT. A integridade do banco de dados depende da qualidade dos envios permitidos no banco de dados. Bancos de dados não comerciais, como

GenBank/EMBL, devem ser consultados com cautela, uma vez que as entradas de dados não são supervisionadas com rigor. Vários problemas, incluindo erros de base, designações de base ambíguas, sequências incompletas e submissões rotuladas simplesmente como “espécies de *Mycobacterium*”, ilustram a necessidade de bancos de dados precisos e atualizados para avaliar as sequências de MNT. Comparar uma sequência com outras sequências em um banco de dados de nucleotídeos é fundamental para a interpretação da sequência. BLAST é um programa bem conhecido que é frequentemente usado para localizar sequências semelhantes no banco de dados (TURENNE *et al.*, 2006; BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012b).

Alguns cuidados foram tomados, como recomendados pelo CLSI, ao realizar as análises das sequências obtidas neste estudo, como por exemplo: comparação com cepas referência, foi observado o ano da publicação da cepa referência, foi observada a presença de múltiplas sequências para a mesma espécie, foi observada as referências bibliográficas e no programa BLAST foi selecionada a coluna de identidade máxima ordenando as sequências pela pontuação de similaridade.

No presente estudo um total de 58 sequências para cada gene dos isolados foram analisados no programa BLAST. Para o gene *hsp65* o intervalo de porcentagem de identidade com as cepas mais próximas variou entre 93,62% e 100% (com mediana de 100%). Para oito isolados não foi possível identificação ao nível de espécie. Portanto, a taxa de identificação final utilizando o gene *hsp65* foi de 86,21% (50/58).

Em estudo realizado por João e colaboradores (2014) o sequenciamento parcial do gene *hsp65* rendeu uma taxa de identificação de 88,9%. Rodrigues (2011) analisou 54 sequências de 440 pb do gene *hsp65* permitindo identificar de forma direta 76% dos isolados. No estudo de Kim & Shin (2017), 73,85% dos isolados clínicos puderam ser identificados em nível de espécie por sequenciamento parcial do gene *hsp65*.

Para o gene *rpoB* o intervalo de porcentagem de identidade com as cepas mais próximas variou entre 89,93% e 100% (com mediana de 99,71%). Para quinze isolados não foi possível a identificação ao nível de espécie. Portanto, a taxa de identificação final utilizando o gene *rpoB* foi de 74,14% (43/58).

Em estudo de Kim & Shin (2017), 72,82% dos isolados clínicos puderam ser identificados em nível de espécie por sequenciamento do gene *rpoB*. No estudo publicado por Simmon e colaboradores (2010), 84% dos isolados foram identificados como espécies únicas.

O gene *hsp65* permite a diferenciação de várias espécies de MCR intimamente relacionadas incluindo *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. houstonense*, *M. fortuitum*, *M. porcinum* e *M. senegalense*. *M. chelonae* e *M. abscessus* que podem ser facilmente discriminados, assim como as três subespécies de *M. abscessus*. Além disso, entre as MNT de crescimento lento, *M. marinum* é diferenciado de *M. ulcerans* e *M. kansasii* de *M. gastri* (TURENNE *et al.*, 2006; BROWN-ELLIOTT, 2018a).

Assim como observado por Turenne e colaboradores (2006) e Brown-Elliott (2018a), no presente estudo o sequenciamento parcial do gene *hsp65* conseguiu distinguir, na maioria das vezes, as espécies do Complexo *M. fortuitum* e as subespécies do Complexo *M. abscessus*.

O sequenciamento do gene *rpoB* é capaz de identificar espécies mais conhecidas, como por exemplo entre o MAC (*M. vulneris*, *M. colombiense*, *M. timonense* e *M. yongonense*) e entre o Complexo *M. fortuitum* (*M. porcinum*, *M. houstonense*, *M. septicum*, *M. peregrinum*, e *M. setense*). Também identifica espécies menos comuns, incluindo *M. mantanii*, *M. heidelbergense* e *M. novocastrense*. Curiosamente algumas espécies mostraram semelhanças mútuas discutíveis, incluindo *M. intracellulare* e *M. chimaera*, *M. fortuitum* e *M. houstonense*, *M. peregrinum* e *M. alvei* (DE ZWAAN *et al.*, 2014; BROWN-ELLIOTT, 2018a).

A análise das sequências parciais do gene *rpoB* dos 58 isolados mostrou ser uma ferramenta importante na distinção das subespécies do Complexo *M. abscessus*. Para fins epidemiológicos foi notado também a capacidade da identificação ao nível de subespécie de *M. avium*.

Para seis isolados nos quais a análise conjunta dos genes no programa BLAST não possibilitou identificar os isolados ao nível de espécie, foi realizada a análise filogenética no programa MEGA. Segundo Escobar-Escamilla e colaboradores (2014), a análise filogenética usando o fragmento de 440bp do gene *hsp65* é uma técnica útil para estabelecer a identificação de espécies de MNT. Este método permite a identificação de isolados clínicos com resultados ambíguos pela análise da PCR-PRA_{hsp65} e BLAST de sequências de DNA, complementando o diagnóstico molecular (importante para o tratamento adequado) e a vigilância epidemiológica.

Com a análise filogenética foi possível identificar três isolados de *M. colombiense*, um isolado de *M. intracellulare* e um isolado de *M. senegalense*. Para apenas um isolado não foi possível a identificação da espécie mesmo com a análise filogenética, sendo distinguido apenas como Complexo *M. terrae*. A análise filogenética também foi útil para identificar ao nível de subespécie três isolados de *M. abscessus* como *M. abscessus* sub. *abscessus*.

No presente estudo o sequenciamento parcial do gene *hsp65* mostrou-se mais eficaz na diferenciação de espécies e subespécies de MNT. Porém o sequenciamento isolado deste gene não é indicado. Assim como relatado por Liu e colaboradores (2016) o sequenciamento do gene *rpoB* se torna uma ferramenta auxiliar na identificação de MNT por sequenciamento gênico.

Quando analisados conjuntamente, os genes *hsp65* e *rpoB* conseguiram distinguir ao nível de espécie, 98,28% (57/58) dos isolados, utilizando o programa BLAST e a análise filogenética do gene *hsp65*. Em estudo realizado por Rodrigues (2011) a análise conjunta de genes rendeu 94% de identificação. Já em estudo publicado por Kim e Shin (2017), a taxa de identificação de espécies foi de 97,25%.

No geral, fazendo uma comparação entre as metodologias utilizadas no estudo algumas observações podem ser feitas:

Sob o ponto de vista clínico, o presente estudo mostrou que os resultados incompatíveis das espécies obtidas com a metodologia MALDI-TOF MS não alterariam a conduta terapêutica para o paciente levando-se em consideração o diagnóstico microbiológico. Já para PCR-PRA_{hsp65}, os dois casos de incompatibilidade comparando-os com o sequenciamento, induziriam o clínico ao manejo incorreto da infecção.

Quanto aos custos para a realização da metodologia, o MALDI-TOF MS apesar de ter um investimento inicial para a aquisição do equipamento e manutenção anual, utiliza insumos mais baratos quando comparados aos utilizados na PCR-PRA_{hsp65} e no sequenciamento. O sequenciamento ainda é a técnica mais cara, necessitando insumos para extração de DNA, para as PCR, para purificação de DNA, termociclador e sequenciador. Os gastos e lixo gerados necessários para a extração de DNA para as metodologias PCR-PRA_{hsp65} e sequenciamento são maiores do que para a extração de proteínas do MALDI-TOF MS.

A metodologia MALDI-TOF MS se mostrou mais rápida, de maior facilidade de execução, diminuindo as possibilidades de erros analíticos. Após as colônias crescidas em meio sólido, a extração de proteínas do MALDI-TOF-MS leva em torno de trinta minutos, tempo esse bem menor que a técnica de CTAB para a extração de DNA utilizada para PCR-PRA_{hsp65} e sequenciamento, que é laboriosa e pode demorar até três dias para execução. MALDI-TOF se mostrou mais rápido também quando comparado os tempos totais de execução dos testes. O tempo total do método de MALDI-TOF MS foi de uma hora entre o começo da extração de proteínas e o resultado do espectro. Já a PCR-PRA_{hsp65} e o sequenciamento demoraram três

e cinco dias, respectivamente, entre o início da extração de DNA e o fim da análise dos resultados.

Em resumo, aparentemente a metodologia MALDI-TOF apresenta melhor custo-benefício, especialmente para aqueles laboratórios que já possuem o equipamento para a rotina de microbiologia. O sequenciamento, embora ainda represente custos mais elevados, vem se mostrando, no cenário internacional, como uma metodologia a ser incorporada no laboratório de microbiologia e pode ser uma ferramenta útil para a identificação rotineira das MNT. Embora um pouco inferior aos outros dois métodos avaliados, a PCR-PRAhsp65 se mostrou ferramenta útil para a identificação de MNT especialmente para os laboratórios com menos recursos financeiros. Sob o ponto de vista do Estado de Santa Catarina, minimamente o emprego da PCR-PRAhsp65 deve ser rotina para auxiliar os clínicos na conduta dos casos de infecção/doença por MNT.

6 CONCLUSÃO

Estudo com o cenário das espécies de MNT que circulam em Santa Catarina entre 2010 e 2019 são apresentados no artigo em anexo.

PCR-PRA_{hsp65}, MALDI-TOF MS e Sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB* mostraram elevado poder discriminatório de espécies de micobactérias não tuberculosas isoladas de amostras clínicas.

Os métodos PCR-PRA_{hsp65} e MALDI-TOF MS apresentaram concordância de 94,23% entre si. Quando comparados com o sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*, observou-se que a PCR-PRA_{hsp65} identificou corretamente 94,82% dos isolados e o MALDI-TOF MS, 96,15%.

Em relação à conduta terapêutica, os resultados incompatíveis das espécies realizadas pelo MALDI-TOF MS não alterariam a conduta terapêutica para o paciente levando em consideração o diagnóstico microbiológico. No entanto esta técnica, não conseguiu para alguns isolados, identificar as espécies do MAC, *M. kansasii* e *M. lentiflavum*, podendo ser corrigido pelo desenvolvimento na técnica de extração de proteínas e, melhorias e atualizações no banco de dados.

O método de identificação de espécies de micobactérias não tuberculosas por MALDI-TOF MS se mostrou mais rápido, de mais fácil execução e com ótimo poder discriminatório, sendo recomendada sua implantação em laboratórios de rotina de microbiologia clínica entre as metodologias analisadas.

REFERÊNCIAS

- ADÉKAMBI, T.; COLSON, P.; DRANCOURT, M. RpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 12, p. 5699-708, dez. 2003.
- ADJEMIAN, J. *et al.* Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 185, n. 8, p. 881-6, abr. 2012.
- AHMED, I. *et al.* Nontuberculous Mycobacterial Infections – a neglected and emerging problem. **Int J Infect Dis**, v. 92, p. 46-50, mar. 2020.
- AITKEN, M. L. *et al.* Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies *massiliense* in a lung transplant and cystic fibrosis center. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 185, n. 2, p. 231–232, jan. 2012.
- AKSAMIT, T. R.; GRIFFITH, D. E. Nontuberculous Mycobacterial Disease Management Principles. *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease: A Comprehensive Approach to Diagnosis and Management**. Cham: Editora Respiratory Medicine, 2018. p. 271–299.
- AL HAMAL, Z. *et al.* *Mycobacterium arupense* in Cancer Patients. **Medicine**, v. 95, n. 14, p. 2691–, abr. 2016.
- ALCAIDE, F. *et al.* Methods for determining the antimicrobial susceptibility of mycobacteria. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 35, n. 8, p. 529–35, out. 2017.
- ALCAIDE, F. *et al.* How to: identify non-tuberculous *Mycobacterium* species using MALDI-TOF mass spectrometry. **Clin Microbiol Infect**, v. 24, n. 6, p. 599–603, jun. 2018.
- ANNESLEY, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. **Clin Chem**, v. 49, n. 7, p. 1041-4, jul. 2003.
- ARNOLD, C. *et al.* The use of rpoB sequence analysis in the differentiation of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*: a critical judgement in cystic fibrosis?. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 5, p. 131-3, mai. 2012.
- ASSI, M. A. *et al.* *Mycobacterium gordonae* pulmonary disease associated with a continuous positive airway pressure device. **Transpl Infect Dis**, v. 9, n. 3, p. 249-52, set. 2007.
- AXSON, E. L. *et al.* Risk factors and secondary care utilisation in a primary care population with non-tuberculous mycobacterial disease in the UK. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 38, n. 1, p. 117-24, out. 2018.
- BAIRD, T. M.; THOMSON, R. Diagnosis, classification and epidemiology of pulmonary non-tuberculous mycobacterial disease. *In*: CHALMERS, J. D.; POLVERINO, E.; ALIBERTI, S.

Bronchiectasis (ERS Monograph). Lausanne: Editora European Respiratory Society, 2018. cap. 12, p. 209-221.

BALADA-LLASAT, J. M.; KAMBOJ, K.; PANCHOLI, P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 9, p. 2875–2879, set. 2013.

BENDINGER, B. *et al.* Physicochemical cell surface and adhesive properties of Coryneform Bacteria related to the presence and chain length of Mycolic acids. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, n. 11, p. 3973-7, nov. 1993.

BENDL, B. J.; ONGLEY, R. C. Cutaneous nontuberculous mycobacterial infections. **Can Fam Physician**, v. 24, p. 269-73, mar. 1978.

BENSI, E. P. A.; PANUNTO, P. C.; RAMOS, M. C. Incidence of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, differentiated by multiplex PCR, in clinical specimens of a large general hospital. **Clin Sao Paulo Braz**, v. 68, n. 2, p. 179–84, 2013.

BENTO, C. M.; GOMES, M. S.; SILVA, T. Looking beyond Typical Treatments for Atypical Mycobacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, jan. 2020.

BERCOVIER, H.; KAFRI, O.; SELA, S. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 136, n. 3, p. 1136-1141, mai. 1986.

BHALLA, G. S. *et al.* Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria. **Prac Lab Med**, jul. 2018.

BISWAS, S.; ROLAIN, J. M. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. **J Microbiol Methods**, v. 92, n. 1, p. 14–24, jan. 2013.

BIZZINI, A. *et al.* Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1549-54, mai. 2010.

BODY, B. A. *et al.* Evaluation of the Vitek MS v3.0 matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system for identification of *Mycobacterium* and *Nocardia* species. **J Clin Microbiol**, v. 56, n. 6, mai. 2018.

BONA, M. G. M. *et al.* Restriction enzyme analysis of the hsp65 gene in clinical isolates from patients suspected of having pulmonary tuberculosis in Teresina, Brazil. **J Bras Pneumol**, v. 37, n. 5, p. 628–635, 2011.

BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The envelope of Mycobacteria. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 29-63, 1995.

BRITO, A. C. **Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em Saúde Pública**. 2008. 87 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

BROWN-ELLIOTT, B. A. *et al.* In vitro activity of linezolid against slowly growing nontuberculous mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 5, p. 1736–1738, mai. 2003.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; NASH, K. A.; WALLACE, R. J. J. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 3, p. 545–582, jul. 2012a.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. J. Enhancement of conventional phenotypic methods with molecular-based methods for the more definitive identification of nontuberculous Mycobacteria. **Clin Microbiol Newsl**, v. 34, n. 14, p. 109–15, jul. 2012b.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; PHILLEY, J. V. Rapidly growing mycobacteria. **Microbiol Spectr**, v. 5, n. 1, jan. 2017.

BROWN-ELLIOTT, B. A. Laboratory Diagnosis and Antimicrobial Susceptibility Testing of Nontuberculous Mycobacteria. **Respir Med**, v. 57, n. 10, p. 15–59, out. 2018a.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Healthcare-Associated Outbreaks and Pseudo-Outbreaks of Nontuberculous Mycobacteria. *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease: A Comprehensive Approach to Diagnosis and Management**. Cham: Editora Respiratory Medicine, 2018b. p. 483–503.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WOODS, G. L. Antimycobacterial susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. **J Clin Microbiol**, v. 57, n. 10, p. 1-9, out. 2019.

BRYANT, J. M. *et al.* Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. **Lancet**, v. 381, n. 9877, p. 1551–1560, mai. 2013.

BRYANT, J. M. *et al.* Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. **Science**, v. 354, n. 6313, p. 751-757, nov. 2016.

BUCHAN, B. W. *et al.* Comparison of MALDI-TOF MS with HPLC and nucleic acid sequencing for the identification of *Mycobacterium* species in cultures using solid medium and broth. **Am J Clin Pathol**, v. 141, n. 1, p. 25–34, jan. 2014.

BUCKWALTER, S. P. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and other aerobic actinomycetes. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 2, p. 376–384, fev. 2016.

CAO, Y. *et al.* Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of mycobacteria: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 4131, mar. 2018.

CARBONNELLE, E. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clin Biochem**, v. 44, n. 1, p. 104-9, jan. 2011.

CARDOSO, C. M. **Avaliação de técnicas moleculares para identificação de micobactérias não causadoras de tuberculose**. 2012. 73 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, 2012

CARNEIRO, M. S. *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung disease in a high tuberculosis incidence setting in Brazil. **J Bras Pneumol**, v. 44, n. 2, p. 106–111, mar/abr. 2018.

CARRASCO, J. *et al.* Infección Pulmonar por *Mycobacterium avium* en paciente VIH/SIDA: primer reporte en Perú. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 31, n. 1, p. 156- 159, jan. 2014.

CARRETERO, O. *et al.* *Mycobacterium senegalense* Infection after Implant-Based Breast Reconstruction, Spain. **Emerg Infect Dis**, v. 26, n. 3, p. 611-613, mar. 2020.

CARVALHO, N. F. G. *et al.* Caracterização dos surtos causados pelo grupo *Mycobacterium abscessus*. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 228-36, 2012.

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

CAYER, M. P. *et al.* Identification of mycobacteria in peat moss processing plants: application of molecular biology approaches. **Can J Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 92–9, jan. 2007.

CHALMERS, J. D. *et al.* Non-tuberculous mycobacterial pulmonary infections. **Pulmonology**, v. 24, n. 2, p. 120–131, mar/abr. 2018.

CHAN, E. D. Vulnerability to Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease or Systemic Infection Due to Genetic/Heritable Disorders. *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease: A Comprehensive Approach to Diagnosis and Management**. Cham: Editora Respiratory Medicine, 2018. p. 89–110.

CHEN R. *et al.* Combination of multiplex PCR with denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection of *Mycobacterium* genus and simultaneous identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 77, n. 1, p. 53–7, set. 2013a.

CHEN, J. H. *et al.* Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 12, p. 3981–3987, dez. 2013b.

CHETCHOTISAKD, P. *et al.* Disseminated infection due to rapid growing mycobacteria in immunocompetent hosts presenting with chronic lymphadenopathy: a previously unrecognized clinical entity. **Clin Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 29–34, jan. 2000.

CHIMARA, E. *et al.* Molecular characterization of *Mycobacterium kansasii* isolates in the State of São Paulo between 1995- 1998. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, p. 739–43, nov. 2004.

CHIMARA, E. *et al.* Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)- hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 48, p. 1-12, mar. 2008.

CHOE, W. *et al.* Performance evaluation of Anyplex plus MTB/NTM and AdvanSure TB/NTM for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria. **Ann Clin Microbiol**, v. 18, n. 2, p. 44-51, jan. 2015.

CLAIN, J. M.; AKSAMIT, T. R. Diagnosis of NTM Disease: Pulmonary and Extrapulmonary. *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease: A Comprehensive Approach to Diagnosis and Management**. Cham: Editora Respiratory Medicine, 2018. p. 261–270.

CLARK, A. E. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 3, p. 547–603, jul. 2013.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 4, p. 840–862, out. 2004.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: approved guideline, 2 nd ed, CLSI document MM18**. Wayne: CLSI, 2018.

CORSARO, D. *et al.* Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. **Int J Hyg Environ Health**, v. 213, n. 3, p. 158-66, jun. 2010.

COVERT, T. *et al.* Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 6, p.2492–6, jun. 1999.

COWMAN, S.; LOEBINGER, M. Diagnosis of Nontuberculous Mycobacteria Lung Disease. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 39, n. 3, p. 343–350, jun. 2018.

DA COSTA, A. R. F. *et al.* Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections in the state of para, an endemic region for tuberculosis in North of Brazil. **Amer Pulmonary Infection**, cap. 3, p. 37-54, 2012.

DA COSTA, A. R. F. *et al.* Occurrence of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection in an Endemic Area of Tuberculosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. 2340, jul. 2013.

DA SILVEIRA, P. P. *et al.* Nontuberculous mycobacteria isolated in São José do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 11, p. 950–5, nov. 2008.

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

DAI, J.; CHEN, Y.; LAUZARDO, M. Web-accessible database of hsp65 sequences from *Mycobacterium* reference strains. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 6, p. 2296-2303, jun. 2011.

DALEY, C. L. *Mycobacterium avium* complex disease. **Microbiol Spectr**, v. 5, n. 2, 2017.

DALEY, C. L. *et al.* Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. **Eur Respir J**, v. 56, n. 1, p. 1-43, jul. 2020.

DANIEL-WAYMAN, S.; ADJEMIAN, J.; PREVOTS, R. D. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease (NTM PD) in the USA. *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease: A Comprehensive Approach to Diagnosis and Management**. Cham: Editora Respiratory Medicine, 2018. p. 145-161.

DAWSON, D. Potential pathogens among strains of mycobacteria isolated from house-dusts. **Med J Aust**, v. 1, n. 13, p. 679-81, mar. 1971.

DE GROOTE, M. A. Relationships between *Mycobacterium* isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soils. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 12, p. 7602-6, dez. 2006.

DE MELLO, K. G. C. *et al.* Clinical and therapeutic features of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Brazil, 1993-2011. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 3, p. 393-9, mar. 2013.

DE ZWAAN, R.; VAN INGEN, J.; VAN SOOLINGEN, D. Utility of rpoB gene sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria in The Netherlands. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 7, p. 2544-51, jul. 2014.

DIEL, R.; LIPMAN, M.; HOEFSLOOT, W. High mortality in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease: a systematic review. **BMC Infect Dis**, v. 18, n. 1, p. 206, mai. 2018.

DODIUK-GAD, R. *et al.* Nontuberculous mycobacterial infections of the skin: a retrospective study of 25 cases. **J Am Acad Dermatol**, v. 57, n. 3, p. 413-20, set. 2007.

DONOHUE, M. J. *et al.* Increased frequency of nontuberculous mycobacteria detection at potable water taps within the United States. **Environ Sci Technol**, v. 49, n. 10, p. 6127-33, abr. 2015.

DU MOULIN, G. C. *et al.* Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. **JAMA**, v. 260, n. 11, p. 1599-601, set. 1988.

DUARTE, R. S. *et al.* Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 7, p. 2149-55, jul. 2019.

EGELUND, E. F.; FENNELLY, K. P.; PELOQUIN, C. A. Medications and monitoring in nontuberculous mycobacteria infections. **Clin Chest Med**, v. 36, n. 1, p. 55-66, mar. 2015.

ERIKSSON, M.; BENNET, R.; DANIELSSON, N. Non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis in healthy children: another “lifestyle disease”? **Acta Paediatrica**, v. 90, n. 11, p. 1340–1342, nov. 2001.

ESCOBAR-ESCAMILLA, N. *et al.* Hsp65 Phylogenetic Assay for Molecular Diagnosis of Nontuberculous Mycobacteria Isolated in Mexico. **Arch Med Res**, v. 45, n. 1, p. 90–97, jan. 2014

ESTEBAN, J. *et al.* Prevalence of erm methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, n. 10, p. 919–923, out. 2009.

ESTEBAN, J. *et al.* Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. **Expert Opin Pharmacother**, v. 13, n. 7, p. 967–86, mai. 2012.

ESTEBAN, J.; GARCÍA-COCA, M. *Mycobacterium* biofilms. **Front Microbiol**, v. 8, p. 2651, jan. 2018.

ESTEBAN, J.; NAVAS, E. Treatment of infections caused by nontuberculous mycobacteria. **Enferm infec microbiol clin**, v. 36, n. 9, p. 586-592, nov. 2018.

FALKINHAM, J. O. III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 2, p. 177-215, abr. 1996.

FALKINHAM, J. O. III.; NORTON, C. D.; LECHEVALLIER, M. W. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 3, p. 1225–31, mar. 2001.

FALKINHAM, J. O. III. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. **Can J Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. 281–286, set/out. 2003.

FALKINHAM, J. O. III. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. **J Med Microbiol**, v. 56, n. 2, p. 250–254, fev. 2007.

FALKINHAM, J. O. III. *et al.* *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. **J Water Health**, v. 6, n. 2, p. 209–13, jun. 2008.

FALKINHAM, J. O. III. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. **J Appl Microbiol**, v. 107, n. 2, p. 356-67, ago. 2009.

FALKINHAM, J. O. III. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. 419–424, mar. 2011.

FALKINHAM, J. O. III. Ecology of nontuberculous mycobacteriae where do human infections come from? **Semin Respir Crit Care Med**, v. 34, n. 1, p. 95-102, fev. 2013.

FALKINHAM, J. O. III. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. **Clin Chest Med**, v. 36, n. 1, p. 35–41, nov. 2015.

FANGOUS, M. S. *et al.* Classification Algorithm for Subspecies Identification within the *Mycobacterium abscessus* species, Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **J. Clin Microbiol**, v. 52, n. 9, p. 3362–3369, set. 2014.

FEAZEL, L. *et al.* Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 38, p. 16393–9, set. 2009.

FENG, J. Y. *et al.* Clinical relevance and diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in populations at risk. **J Formos Med Assoc**, v. 119, n. 1, p. 23–31, jun. 2020.

FIELD, S. K.; COWIE, R. L. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. **Chest**, v. 129, n. 6, p. 1653–72, jun. 2006.

FLOTO, R. A. *et al.* US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of nontuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary. **Thorax**, v. 71, n. 1, p. 88–90, jan. 2016.

FLUDE, L. J.; AGENT, P.; BILTON, D. Chest Physiotherapy Techniques in Bronchiectasis. **Clin Chest Med**, v. 33, n. 2, p. 351–361, jun. 2012.

FONG I. W. Emerging and Difficult to Treat Nontuberculous Mycobacteria Infections. *In: Current Trends and Concerns in Infectious Diseases*. Editora: Springer, 2020. p. 289–317.

FORBES, B. A. *et al.* Practice Guidelines for Clinical Microbiology. **Clin Microbiol Rev**, v. 31, n. 2, p. 1–66, jan. 2018.

FRANCO-PAREDES, C. *et al.* Cutaneous Mycobacterial Infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 32, n. 1, p. 1–29, nov. 2018.

FREEMAN, J. Incidence of nontuberculous mycobacterial disease in New Zealand. **N Z Med J**, v. 120, p. 1256, jun. 2007.

FUSCO DA COSTA, A. R. *et al.* Occurrence of nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in an endemic area of tuberculosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. 2340, jul. 2013.

GARCIA-AGUDO, L. *et al.* Evaluation of INNO-LiPA mycobacteria v2 assay for identification of rapidly growing mycobacteria. **Braz J Microbiol**. v. 42, n. 3, p. 1220–6, jul/set. 2011.

GLAZER, C. S.; MARTYNY, J. W.; LEE, B. Nontuberculous mycobacteria in aerosol droplets and bulk water samples from therapy pools and hot tubs. **J Occup Environ Hyg**, v. 4, n. 11, p. 831–40, nov. 2007.

GONZALEZ-SANTIAGO, T. M.; DRAGE, L. A. Nontuberculous Mycobacteria: skin and soft tissue infections. **Dermatol Clin**, v. 33, n. 3, p. 563–577, jul. 2015

GRIFFITH, D. E.; GIRARD, W. M.; WALLACE, R. J. J. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. **Am Rev Respir Dis**, v. 147, n. 5, p. 1271-8, mai. 1993.

GRIFFITH, D. E. *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, p. 367– 416, 2007.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T. R. Bronchiectasis and nontuberculous mycobacterial disease. **Clin Chest Med**, v. 33, n. 2, p. 283-95, jun. 2012.

GRIFFITH, D. E. Nontuberculous Mycobacterial Disease: An Introduction and Historical Perspective. *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease: A Comprehensive Approach to Diagnosis and Management**. Cham: Editora Respiratory Medicine, 2018a. p. 1–14.

GRIFFITH, D. E. Treatment of *Mycobacterium avium* Complex (MAC). **Semin Respir Crit Care Med**, v. 39, n. 3, p. 351-361, 2018b.

GRIFFITH, D. E. *et al.* Amikacin Liposome Inhalation Suspension for Treatment- Refractory Lung Disease Caused by *Mycobacterium avium* Complex (CONVERT). A Prospective, Open-Label, Randomized Study. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 198, n. 12, p. 1559-1569, dez. 2018c.

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. **Front Microbiol**, v. 9, p. 67, fev. 2018.

HAFNER, B. *et al.* Different molecular methods for the identification of rarely isolated nontuberculous mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. **Mol Cell Probes**, v. 18, n. 1, p. 59–65, fev. 2004.

HALL, L. *et al.* Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 1447– 53, abr. 2003.

HASHEMI-SHAHRAKI, A. *et al.* Species spectrum of nontuberculous mycobacteria isolated from suspected tuberculosis patients, identification by multi locus sequence analysis. **Infect Genet Evol**, v. 20, p. 312–324, dez. 2013.

HAVERKAMP, M. H. *et al.* Nontuberculous mycobacterial infection in children: a 2-year prospective surveillance study in the Netherlands. **Clin Infect Dis**, v. 39, n. 4, p. 450-6, ago. 2004.

HAWORTH C. S. *et al.* British thoracic society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). **Thorax**, v. 72, n. 2, p. 1–64, nov. 2017.

HAYASHI, M. *et al.* Prognostic factors of 634 HIV-negative patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 185, n. 5, p. 575-83, mar. 2012.

HENKLE, E.; WINTHROP, K. L. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. **Clin Chest Med**, v. 36, n. 1, p. 91–9, mar. 2015.

HENKLE, E.; WINTHROP, K. L. Immune dysfunction and nontuberculous mycobacterial disease. *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease: A Comprehensive Approach to Diagnosis and Management**. Cham: Editora Respiratory Medicine. 2019. p. 895–910.

HERMANSEN, T. S. *et al.* Nontuberculous mycobacteria in Denmark, incidence and clinical importance during the last quarter-century. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 6696, jul. 2017.

HERNÁNDEZ-GARDUÑO, E.; RODRIGUES, M.; ELWOOD, R. K. The incidence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in British Columbia, Canada. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 13, n. 9, p. 1086-93, set. 2009.

HETTICK, J. M. *et al.* Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. **Proteomics**, v. 6, n. 24, p. 6416–25, dez. 2006.

HOEFSLOOT, W. *et al.* Clinical relevance of *Mycobacterium malmoense* isolation in the Netherlands. **Eur Respir J**, v. 34, n. 4, p. 926–31, out. 2009.

HOEFSLOOT, W. *et al.* The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. **Eur Respir J**, v. 42, n. 6, p. 1604-13, dez. 2013.

HOFFNER, S.; ORDWAY, D. Future Nontuberculous Mycobacteria DST and Therapeutic Interventions. *In*: VELAYATI, A. A.; FARNIA, P. **Nontuberculous Mycobacteria (NTM)**. Teerã: Editora Academic Press, 2019. cap. 4, p. 85–100.

HOLLAND, S. M. Nontuberculous mycobacteria. **Am J Med Sci**, v. 321, n. 1, p. 49-55, jan. 2001.

HOLMES, G. P. A cluster of cases of *Mycobacterium szulgai* keratitis that occurred after laser-assisted in situ keratomileusis. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 8, p. 1039–46, abr. 2002.

HOLT, M.; KASPERBAUER, S. Management of Extrapulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infections. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 39, n. 3, p. 399–410, jun. 2018.

HOLT, M. R. Exploring immunomodulation by endocrine changes in lady windermere syndrome. **Clin Exp Immunol**, v. 196, n. 1, p. 28–38, abr. 2019.

HONDA, J. R.; KNIGHT, V.; CHEN, D. Pathogenesis and risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. **Clin Chest Med**, v. 36, n. 1, p. 1-11, mar. 2015.

HRUSKA, K.; KAEVSKA, M. Mycobacteria in water, soil, plants and air: a review. **Vet Med (Praha)**, v. 57, n. 12, p. 623-679, jan. 2012.

HUANG, T. S. *et al.* Rapid identification of mycobacteria from positive MGIT broths of primary cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1-15, fev. 2018.

HUANG, W. C.; YU, M. C.; HUANG, Y. W. Identification and drug susceptibility testing for nontuberculous mycobacteria. **J Formos Med Assoc**, v. 119, n. 1, p. 1-10, jun. 2020.

HUH, H. J. *et al.* Recent advances in molecular diagnostics and understanding mechanisms of drug resistance in nontuberculous mycobacterial diseases. *Infection, Genetics and Evolution*. **Infect Genet Evol**, v. 72, p. 169-182, out. 2018.

HWANG, J. A. *et al.* Natural history of *Mycobacterium avium* complex lung disease in untreated patients with stable course. **Eur Respir J**, v. 49, n. 3, p. 1-10, mar. 2017.

ICHIYAMA, S.; SHIMOKATA, K.; TSUKAMURA, M. The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water and dusts. **Microbiol Immunol**, v. 32, n. 7, p. 733-9, 1988.

IIVANAINEN E, *et al.* Mycobacteria in coniferous forest soils. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 23, n. 4, p. 325-32, ago. 1997.

IIVANAINEN E, *et al.* Isolation of mycobacteria from indoor swimming pools in Finland. **APMIS**, v. 107, n. 2, p. 193-200, fev. 1999.

IZAWA, K.; KITADA, S. Clinical analysis of osteoarticular nontuberculous mycobacterial infection. **Kekkaku**, v. 91, n. 1, p. 1-8, 2016.

JOAO, I. *et al.* Identification of nontuberculous mycobacteria by partial gene sequencing and public databases. **Int J Mycobacteriol**, v. 3, n. 2, p. 144-151, jun. 2014.

JOHANSEN, M. D.; HERRMANN, J.; KREMER, L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. **Nat Rev Microbiol**, v. 18, p. 392-407, jul. 2020.

KARAKOUSIS, P. C.; MOORE, R. D.; CHAISSON, R. E. *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 9, p. 557-565, set. 2004.

KEHRMANN, J. *et al.* Principal component analysis of MALDI TOF MS mass spectra separates *M. abscessus* (*sensu stricto*) from *M. massiliense* isolates. **BMC Microbiol**, v. 16, p. 24-30, mar. 2016.

KIM, B. J. *et al.* Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1714-20, jun. 1999.

KIM, B. J. *et al.* Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (rpoB). **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 3, p. 1308-12, mar. 2004.

KIM, Y. M. *et al.* Mycobacterial infections in coal workers' pneumoconiosis patients in South Korea. **Scand J Infect Dis**, v. 41, n. 9, p. 656–62, 2009.

KIM, H. Y. *et al.* *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (erm) and clarithromycin susceptibility patterns. **Microbiol Immunol**, v. 54, n. 6, p. 347–353, jun. 2010.

KIM, N. *et al.* Evaluation of dual-color fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria in clinical specimens. **Ann Lab Med**, v. 35, n. 5, p. 500-505, sep. 2015.

KIM, S. H.; SHIN, J. H. Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB. **J Clin Lab Anal**, v. 32, p. 1-6, fev. 2017.

KOBAYASHI, T. *et al.* Nontuberculous mycobacterial osteomyelitis in human immunodeficiency virus-negative patients: a case series. **Jpn J Infect Dis**, v. 69, n. 2, p. 149–150, 2016.

KODANA, M. *et al.* Utility of the MALDI-TOF MS method to identify nontuberculous mycobacteria. **J Infec Chemother**, v. 22, n. 1, p. 32–35, jan. 2016.

KOH W. J.; KWON, O. J.; LEE, K. S. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. **Korean J. Radiol**, v. 3, n. 3, p. 145–157, jul/set. 2002.

KOH, W. J. Nontuberculous mycobacteria - overview. **Microbiol Spectrum**, v. 5, n. 1, p. 1-7, jan. 2017.

KOH, W. J.; MOON, S. M.; KIM, S. Y. Outcomes of *Mycobacterium avium* complex lung disease based on clinical phenotype. **Eur Respir J**, 2017.

KWON, Y. S.; KOH, W. J. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. **J Korean Med Sci**, v. 31, n. 5, p. 649-659, mai. 2016.

LAI, C. C. *et al.* Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000–2008. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 294–6, dez. 2010.

LAI, C. C. *et al.* Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolates in elderly Taiwanese patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 6, p. 779-783, jun. 2011.

LAKE, M. A. *et al.* “Why me, why now?” using clinical immunology and epidemiology to explain who gets nontuberculous mycobacterial infection. **BMC Med**, v. 14, p. 54, mar. 2016.

LANDE, L. *et al.* Hot water heaters are serving as incubators for nontuberculous mycobacteria in the home environment. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 191, p. 5270. 2015.

LANDE, L. Environmental Niches for NTM and Their Impact on NTM Disease. *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease**. Editora: Respiratory Medicine. 2018. p. 131–144.

LARSSON, L. O. *et al.* Nontuberculous Mycobacterial Diseases in Humans. *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease**. Editora: Respiratory Medicine. 2018. p. 101–119.

LEE, W. I. *et al.* Immune defects in active mycobacterial diseases in patients with primary immunodeficiency diseases (PIDs). **J Formos Med Assoc**, v. 110, n. 12, p. 750–8, dez. 2011.

LEE, S. H, KIM SY, KIM HH, LEE EY, CHANG CL. Evaluation of peptide nucleic acid probe-based fluorescence in situ hybridization for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in clinical respiratory specimens. **Ann Clin Microbiol**, v. 18, n. 2, p. 37-43, jun. 2015.

LEFMANN, M. *et al.* Novel mass spectrometry-based tool for genotypic identification of mycobacteria. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 339–46, jan. 2004.

LEHMANN, K. B.; NEUMANN, R. O. **Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik**, 2. ed. Munique: 1899. 69 p.

LEVESQUE, S. *et al.* A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. 1-21, dez. 2015.

LIAO, T. L. *et al.* Risk factors and outcomes of nontuberculous mycobacterial disease among rheumatoid arthritis patients: a case-control study in a TB endemic area. **Sci Rep**, v. 6, p. 1-11, jul. 2016.

LINDEBOOM, J. A. *et al.* Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment of *Mycobacterium haemophilum* Infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 701–717, out. 2011.

LIU, H. *et al.* Identification of species of nontuberculous mycobacteria clinical isolates from 8 provinces of China. **BioMed Res Int**, v. 2016, p 1-10, 2016.

LOTZ, A, *et al.* Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 12, p. 4481– 4486, dez. 2010.

LU J. J. *et al.* Use of PCR with Universal Primers and Restriction Endonuclease Digestions for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 6, p. 2076-80, 2000.

LUO, L. *et al.* Evaluation of the VITEK MS knowledge base version 3.0 for the identification of clinically relevant *Mycobacterium* species. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p. 114, jul. 2018.

MANGIONE, E. J. *et al.* Nontuberculous mycobacterial disease following hot tub exposure. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 6, p. 1039-1042, no/dez. 2001.

MARQUES, L. R. M.; FERRAZOLI, L.; CHIMARA, E. Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: presumptive diagnosis based on the international microbiological criteria adopted in the state of São Paulo, Brazil, 2011-2014. **J bras pneumol**, v. 45, n. 2, p. 1-5, abr. 2019.

MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, M. A.; DAFFÉ, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. **Chem Biol**, v. 21, n. 1, p. 67–85, jan. 2014.

MARRAS, T. K.; DALEY, C. L. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. **Clin Chest Med**, v. 23, n. 3, p. 553-567, set. 2002.

MARRAS, T. K. *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung infections in Ontario, Canada: clinical and microbiological characteristics. **Lung**, v. 188, n. 4, p. 289–299, ago. 2010.

MATHER, C. A.; RIVERA, S. F.; BUTLER-WU, S. M. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 130–138, jan. 2014.

MATOS, E. D. *et al.* Nontuberculosis mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference center in Bahia: clinical epidemiological aspects. **Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis**, v. 8, n. 4, p. 296–304, ago. 2004.

MAURER, F. P. *et al.* Acquisition of clarithromycin resistance mutations in the 23S rRNA gene of *Mycobacterium abscessus* in the presence of inducible erm(41). **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2606–2611, nov. 2012.

MCCALLUM, C.; JOHNSON, B. *Mycobacterium chelonae* bacteremia in a patient taking infliximab and prednisone. **CMAJ**, v. 188, n. 17-18, 2016.

MEI, Y. *et al.* Cutaneous tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections at a national specialized hospital in China. **Acta Derm Venereol**, v. 99, n. 11, p. 997-1003, dez. 2019.

MELLMANN, A. *et al.* High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. **J. Clin. Microbiol**, v. 47, n. 11, p. 3732–3734, nov. 2009.

MENDES DE LIMA, C. A. *et al.* Nontuberculous mycobacteria in respiratory samples from patients with pulmonary tuberculosis in the state of Rondônia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 457–62, jun. 2013.

MIRSAEIDI M. *et al.* Management of nontuberculous mycobacterial infection in the elderly. **Eur J Intern Med**, v. 25, n. 4, p. 356–363, abr. 2014.

MISCH, E. A.; SADDLER, C.; DAVIS, J. M. Skin and Soft Tissue Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. **Curr Infect Dis Rep**, v. 20, n. 4, p. 6, mar. 2018.

MOORE, J. E. *et al.* Increasing reports of nontuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. **BMC Public Health**, v. 10, n.1, p. 612, out. 2010.

MOUGARI, F. *et al.* Infections caused by *Mycobacterium abscessus*: epidemiology, diagnostic tools and treatment. **Expert Rev Anti-Infect Ther**, v. 14, n. 12, p. 1139–1154, dez. 2016.

MOUGARI, F. *et al.* Evaluation of the new GenoType NTM-DR kit for the molecular detection of antimicrobial resistance in non-tuberculous mycobacteria. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 6, p. 1669–77, jun. 2017.

MULLIS, S. N.; FALKINHAM, J. O. III. Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials. **J Appl Microbiol**, v. 115, n. 3, p. 908–14, set. 2013.

MUÑOZ-EGEA, M. C.; CARRASCO-ANTÓN, N.; ESTEBAN, J. State-of-the-art treatment strategies for nontuberculous mycobacteria infections. **Expert Opin Pharmacother**, v. 21, n. 8, p. 1–13, jun. 2020.

MURRAY, P. R. What is new in clinical microbiology—microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital symposium on molecular pathology. **J Mol Diagn**, v. 14, n. 5, p. 419–23, set. 2012.

NASH, K. A.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. JR. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 4, p. 1367–1376, abr. 2009.

NASIRI, M. J. *et al.* Antibiotic therapy success rate in pulmonary *Mycobacterium avium* complex: a systematic review and meta-analysis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 18, n. 3, p. 1–11, mar. 2020.

NEONAKIS, I. K. *et al.* Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. **J Microbiol Methods**, v. 75, n. 1, p. 1-11, set. 2008.

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

NIGHTINGALE, S. D. *et al.* Incidence of *Mycobacterium-avium-intracellulare* complex bacteremia in human-immunodeficiency-virus positive patients. **J Infect Dis**, v. 165, n. 6, p. 1082–5, jun. 1992.

NOGUERA-ORTEGA, E.; GUALLAR-GARRIDO, S.; JULIAN, E. Mycobacteria-Based Vaccines as Immunotherapy for Non-urological Cancers. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1802, jul. 2020.

NUNES-COSTA, D. *et al.* The looming tide of nontuberculous mycobacterial infections in Portugal and Brazil. **Tuberculosis**, v. 96, n. 1, p. 107–119, jan. 2016.

NYLEN, O.; BERG-KELLY, K.; ANDERSSON, B. Cervical lymph node infections with non-tuberculous mycobacteria in preschool children: interferon gamma deficiency as a possible cause of clinical infection. **Acta Paediatr**, v. 89, n. 11, p. 1322–1325, nov. 2000.

O'BRIEN, R. J.; GEITER, L. J.; SNIDER, D. E. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States: results from a national survey. **Am Rev Respir Dis**, v. 135, n. 5, p. 1007–1014, mai. 1987.

O'BRIEN, D. P.; CURRIE, B. J.; KRAUSE, V. L. Non-tuberculous mycobacterial disease in northern Australia: a case series and review of the literature. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 4, p. 958–967, out. 2000.

OLIVEIRA, A. S. **O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade**. 2015. 70 p. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de ciências da saúde, Universidade do Porto, Porto. 2015

OLSEN, G. J. *et al.* FastDNAmL: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. **Comput Appl Biosci**, v. 10, n. 1, p. 41-48, fev. 1994.

ONG, C. S. Evaluation of PCR–RFLP analysis targeting hsp65 and rpoB genes for the typing of mycobacterial isolates in Malaysia. **J Med Microbiol**, v. 59, n. 11, p. 1311–1316, nov. 2010.

OPLUSTIL, C. P. *et al.* **Procedimentos básicos de Microbiologia Clínica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2020. 742 p.

PARK, J. W. *et al.* Non-tuberculous mycobacterial infection of the musculoskeletal system: pattern of infection and efficacy of combined surgical/antimicrobial treatment. **Bone Joint J**, v. 96, n. 11, p. 1561–1565, nov. 2014.

PARK, T. Y. *et al.* Natural course of the nodular bronchiectatic form of *Mycobacterium avium* complex lung disease: Long-term radiologic change without treatment. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. 1-11, out. 2017.

PARKER, B.C. *et al.* Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. **Am Rev Respir Dis**, v. 128, n. 4, p. 652–656, out. 1983.

PELLETIER, P. A.; DU MOULIN G. C.; STOTTMEIER, K. D. Mycobacteria in public water supplies: comparative resistance to chlorine. **Microbiol Sci**, v. 5, n. 5, p. 147–148, mai. 1988.

PELOQUIN, C. A. *et al.* Aminoglycoside toxicity: daily versus thrice-weekly dosing for treatment of mycobacterial diseases. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 1538–1544, 2004.

PERKINS, K. M. *et al.* Notes from the field: *Mycobacterium chimaera* contamination of heater-cooler devices used in cardiac surgery – United States. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 40, p. 1117–8, out. 2016.

PETTI, C.A. *et al.* 2008. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: approved guideline. CLSI document MM18-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

PFYFFER, G. E. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: JORGENSEN, J. H. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. Washington: Editora: ASM Press, 2015. p. 536-569.

PHILLEY, J. V.; GRIFFITH, D. E. Treatment of slowly growing mycobacteria. **Clin Chest Med**, v. 36, n. 1, p. 79-90, mar. 2015.

PHILLEY, J. V. *et al.* Treatment of non-Tuberculous mycobacterial lung disease. **Curr Treat Options Infect Dis**, v. 8, n. 4, p. 275–96, dez. 2016.

PHILLEY, J. V.; GRIFFITH, D. E. Medical Management of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease. **Thorac Surg Clin**, v. 29, n. 1, p. 65-76, fev. 2019.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 9, p. 1351-1358, set. 2009.

PLOTINSKY, R. N.; TALBOT, E. A.; VON REYN, C. F. Proposed definitions for epidemiologic and clinical studies of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. **PLoS One**, v. 8, n. 11, nov. 2013.

PORVAZNIK, I.; SOLOVIČ, I.; MOKRÝ, J. Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. **Respiratory Treatment and Prevention**, v. 27, n. 1, p. 19–25, jul. 2016.

PORVAZNIK, I.; SOLOVIČ, I.; MOKRÝ, J. Non-tuberculous mycobacteria: classification, diagnostics, and therapy. **Adv Exp Med Biol**, v. 944, 19-25, jul. 2017.

PRANADA A. B. *et al.* Accurate differentiation of *Mycobacterium chimaera* from *Mycobacterium intracellulare* by MALDI-TOF MS analysis. **J Med Microbiol**, v. 66, n. 5, p. 670–677, mai. 2017.

PREVOTS, D. R.; MARRAS, T. K. Epidemiology of Human Pulmonary Infection with Non-Tuberculous Mycobacteria: A Review. **CLINICS IN CHEST MEDICINE**, v. 36, n. 1, p. 13-34, 2015.

PUBLIC HEALTH ONTARIO - Ontario Agency for Health Protection and Promotion. **Best Practices for Pulmonary Nontuberculous Mycobacteria**. Toronto: Queen's Printer for Ontario; 2017. Disponível em: <https://www.publichealthontario.ca/-/media/documents/B/2017/bp-pulmonary-ntm.pdf?la=en>. Acesso em: 15 jun. 2020.

PUGA, F. G. *et al.* HIV-negative pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria in Southern Brazil: clinical and microbiological characterization. **J Thorac Dis**, v. 10, n. 3, p. 1903-1911, mar. 2018.

QUINLAN, P.; PHELAN, E.; DOYLE, M. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDITOF) mass spectrometry (MS) for the identification of mycobacteria from MBBacT ALERT 3D liquid cultures and Lowenstein-Jensen (LJ) solid cultures. **J Clin Pathol**, v. 68, n. 3, p. 229–235, mar. 2015.

RASTOGI, N. *et al.* Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium*: is the wall architecture responsible for exclusion of antimicrobial agents? **Antimicrob Agents Chemother**, v. 20, n. 5, p. 666–677, nov. 1981.

RATNATUNGA, C. N. *et al.* The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. **Front Immunol**, v. 11 n. 303, p. 1-12, mar. 2020.

REED, C. *et al.* Environmental risk factors for infection with *Mycobacterium avium* complex. **Am J Epidemiol**, v. 164, n. 1, p. 32–40, jul. 2006.

REZNIKOV, M.; LEGGO, J. H.; DAWSON, D. J. Investigation by seroagglutination of strains of the *Mycobacterium intracellulare*-*M. scrofulaceum* group from house dusts and sputum in Southeastern Queensland. **Am Rev Respir Dis**, v. 104, n. 6, p. 951–953, dez. 1971.

RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S.; HILLEMANN, D. Evaluation of the GenoType *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species from cultures. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 5, p. 1769–75, mai. 2006.

RIELLO, F. N. **Identificação molecular de espécies de micobactérias por PCR-RFLP hsp65 e implicações clínicas do diagnóstico convencional**. 2015. 88 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015

RINDI, L.; GARZELLI, C. Increase in non-tuberculous mycobacteria isolated from humans in Tuscany, Italy, from 2004 to 2014. **BMC Infect Dis**, v. 16, n. 44, fev. 2016.

RINGUET, H. *et al.* hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 852–7, mar. 1999.

RODRIGUES, I. J. S. S. Validação de um algoritmo para identificação de *Mycobacterium* spp. no diagnóstico laboratorial. 2011. 168p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Microbiologia Clínica) – Faculdade de Medicina de Lisboa, Universidade de Lisboa, Porto. 2011.

RODRIGUEZ-GRANGER, J.; MENDIOLA, J. C.; MARTÍNEZ, L. A. Identification of Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry. In: COBO, F. **The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology**. Editora: Academic Press, 2018. cap. 30, p. 181-195.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. *et al.* Evaluation of MALDI biotyper mycobacterial library v3.0 for identification of nontuberculous mycobacteria. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 4, p. 1144–1147, abr. 2016.

ROSENZWEIG, D. Y. Pulmonary mycobacterial infections due to *Mycobacterium intracellulare-avium* complex. Clinical features and course in 100 consecutive cases. **Chest**, v. 75, n. 2, p. 115–119, fev. 1979.

ROSENZWEIG, S. D. HOLLAND, S. M. Defects in the interferon-gamma and interleukin pathways. **Immunol Rev**, v. 203, p. 29–34, fev, 2005.

RUSSO, C.; TORTOLI, E.; MENICHELLA, D. Evaluation of the new GenoType *mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 334–339, fev. 2006.

SADIKOT, R. T. Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. In: VELAYATI, A. A.; FARNIA, P. **Nontuberculous Mycobacteria (NTM)**. Teerã: Editora Academic Press, 2019. cap. 6, p. 121–132.

SAIFI, M. *et al.* HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 8, p. 723-728, ago. 2013.

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

SALEEB P, G. *et al.* Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 5, p. 1790–1794, mai. 2011.

SAMB-BA, B. *et al.* MALDI-TOF identification of the human Gut microbiome in people with and without diarrhea in Senegal. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. 1-12, mai. 2014.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, dez. 1977.

SAWAI, T. *et al.* A case of *Mycobacterium nonchromogenicum* pulmonary infection showing multiple nodular shadows in an immunocompetent patient. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 54, n. 4, p. 311-314, fev. 2006.

SCHULZE-RÖBBECKE, R.; BUCHHOLTZ, K. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 58, n. 6, p. 1869–1873, jun. 1992.

SCHWEICKERT, B.; GOLDENBERG, O. *et al.* Occurrence and clinical relevance of *Mycobacterium chimaera* sp. nov., Germany. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 9, p. 1443–6, set. 2008.

SENG, P. *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin. Infect. Dis**, v. 49, n. 4, p. 543–551, ago. 2009.

SENNA, S. G. *et al.* Sequencing of hsp65 Gene for Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Environmental and Clinical Sources in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 11, p. 3822–3825, nov. 2008.

SENNA, S. G. *et al.* Identificação de micobactérias não tuberculosas isoladas de sítios estéreis em pacientes em um hospital universitário na cidade do Rio de Janeiro. **J Bras Pneumol**, v. 37, n. 4, p. 521–526, jul/ago. 2011.

SEXTON, P.; HARRISON, A. C. Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. **Eur Respir J**, v. 31, n. 6, p. 1322–33, jun. 2008.

SHAKOOR, S. *et al.* Nosocomial and Healthcare-Associated NTM Infections and Their Control. *In*: VELAYATI, A. A.; FARNIA, P. **Nontuberculous Mycobacteria (NTM)**. Teerã: Editora Academic Press, 2019. cap. 9, p. 177–190.

SHEN, G. H. *et al.* Combining polymerase chain reaction restriction enzyme analysis with phenotypic characters for mycobacteria identification in Taiwan. **Int J Tubercul Lung Dis**, v. 13, n. 4, p. 472-9, abr. 2009.

SILVA, C. F. *et al.* Hsp 65 PCR – Restriction enzyme analysis (PRA) for identification of Mycobacteria in the clinical laboratory. **Rev Inst Med Trop**, v. 43, n. 1, p. 25-8, jan/fev. 2001.

SILVA ROCHA, A. *et al.* Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR restriction enzyme analysis of hsp65. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 11, p. 4191-6, nov. 2002.

SIMMON, K. E. *et al.* Simultaneous Sequence Analysis of the 16S rRNA and rpoB Genes by Use of RipSeq Software To Identify *Mycobacterium* Species. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 9, p. 3231–3235, set. 2010.

SIMNER, P. J. *et al.* *Mycobacterium*: clinical and laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. *In*: JORGENSEN, J. H. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. Washington: Editora: ASM Press. 2015. cap. 31.

SINGHAL, N. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Front Microbiol**, v. 6, n. 791, p. 1-16, ago. 2015.

SMITH, D. S. *et al.* *Mycobacterium terrae*: case reports, literature review, and in vitro antibiotic susceptibility testing. **Clin Infect Dis**, v. 30, n. 3, p. 444–453, mar. 2000.

SMITH, G. S. *et al.* Epidemiology of nontuberculous mycobacteria isolations among central North Carolina residents, 2006-2010. **J Infect**, v. 72, n. 6, p. 678–686, 2016.

SONG, S. A.; KIM, S. H.; KIM, C. K. *et al.* A nationwide multicenter survey for mycobacterial testing in Korea. **Ann Clin Microbiol**. v.18, n. 3, 69–75, set. 2015.

SONNENBERG, P. Risk factors for pulmonary disease due to culture-positive *M. tuberculosis* or non-tuberculous mycobacteria in South African gold miners. **Eur Respir J**, v. 15, n. 2, p. 291–6, fev. 2000.

SOMMERSTEIN, R.; RÜEGG, C.; KOHLER, P. Transmission of *Mycobacterium chimaera* from heater-cooler units during cardiac surgery despite an ultraclean air ventilation system. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 6, p. 1008–13, jun. 2016.

SOMOSKOVI, A.; SALFINGER, M. Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Infections. **Clin Lab Med**, v. 34, n. 2, p. 271–295, jun. 2014.

SPRINGER B, *et al.* Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 296–303, 1996.

STEED, K. A.; FALKINHAM J. O. III. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 6, p. 4007–4011, jun. 2006.

STEINGRUBE, V. A. *et al.* 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**, v. 33, n. 1, p. 149–53, jan. 1995.

STELMACK, P. L.; GRAY, M. R.; PICKARD, M. A. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 1, p. 163–8, 1999.

SWENSON, C.; ZERBE, C. S.; FENNELLY, K. Host variability in NTM disease: implications for research needs. *Front. Microbiol.* v. 9, n. 2901, p. 1-12, dez. 2018.

TAIWO, B.; GLASSROTH, J. Nontuberculous mycobacterial lung diseases. **Infect Dis Clin North Am**, v. 24, n. 3, p. 769–89, set. 2010.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 12, p. 2725-9, dez. 2013.

TAN, N. *et al.* Disseminated *Mycobacterium chimaera* infection after cardiothoracic surgery. **Open Forum Infect Dis**, v. 3, n. 3, p. 1-3, jun. 2016.

TANAKA, S. *et al.* Pathogenicity of *Mycobacterium phlei*, a non-pathogenic nontuberculous mycobacterium in an immunocompetent host carrying anti-interferon gamma autoantibodies: a case report. **BMC Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 454, mai. 2019.

TELENTI, A. *et al.* Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 2, p. 175–8, fev. 1993.

THOMAS, V. *et al.* Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 4, p. 2428–38 abr. 2006.

THOMSON, R. M.; YEW, W. W. When and how to treat pulmonary non-tuberculous mycobacterial diseases. **Respirology**, v. 14, n. 1, p. 12–26, jan. 2009.

THOMSON, R. *et al.* Isolation of NTM from household water and shower aerosols in patients with NTM pulmonary disease. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 9, p. 3006–11, set. 2013a.

THOMSON, R. *et al.* Factors associated with the isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from a large municipal water system in Brisbane, Australia. **BMC Microbiol**, v. 13, n. 89, p. 1–8, abr. 2013b.

THOMSON, R., DONNAN, E.; KONSTANTINOS, A. Notification of Nontuberculous Mycobacteria: An Australian Perspective. **Ann Am Thorac Soc**, v. 14, n. 3, p. 318–323, mar. 2017.

TICHENOR, W. S. *et al.* Nontuberculous mycobacteria in household plumbing as possible cause of chronic rhinosinusitis. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 10, p. 1612–7, out. 2012.

TIMPE, A.; RUNYON, E. H. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. **J Lab Clin Med**, v. 44, n. 2, p. 202–9, ago. 1954.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 2, p. 319–354, abr. 2003a.

TORTOLI, E.; MARIOTTINI, A.; MAZZARELLI, G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for Mycobacterial identification. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 9, p. 4418–20, abr. 2003b.

TORTOLI, E. *et al.* Commercial DNA probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 307–310, jan. 2010.

TORTOLI, E. Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: many doubts, few certainties. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 4, p. 827–831, jun. 2012.

TORTOLI, E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 727–752, out. 2014.

TORTOLI, E. The Taxonomy of the Genus *Mycobacterium*. In: VELAYATI, A. A.; FARNIA, P. **Nontuberculous Mycobacteria (NTM)**. Teerã: Editora Academic Press, 2019. cap. 1, p. 1–10.

TORVINEN, E.; TORKKO, P.; RINTALA, A. N. H. Real-time PCR detection of environmental mycobacteria in house dust. **J Microbiol Methods**, v. 82, n. 1, p. 78–84, jul. 2010.

TURENNE, C. Y. *et al.* Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 433–40, fev. 2006.

USLAN, D. Z. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: comparison of clinical features, treatment, and susceptibility. **Arch Dermatol**, v. 142, n. 10, p. 1287–92, out. 2006.

VAN ECK, K. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry fails to identify nontuberculous mycobacteria from primary cultures of respiratory samples. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 7, p. 1915–1917, jul. 2016.

VAN INGEN, J. *et al.* Clinical relevance of *Mycobacterium szulgai* in the Netherlands. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 8, p. 1200–5, abr. 2008a.

VAN INGEN, J. *et al.* *Mycobacterium xenopi* clinical relevance and determinants, the Netherlands. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 3, p. 385–9, mar. 2008b.

VAN INGEN, J. *et al.* Clinical relevance of *Mycobacterium simiae* in pulmonary samples. **Eur Respir J**, v. 31, n. 1, p. 106–9, jan. 2008c.

VAN INGEN, J. *et al.* Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. **Thorax**, v. 64, n. 6, p. 502–506, jun. 2009a.

VAN INGEN, J. *et al.* Clinical relevance of *Mycobacterium chelonae-abscessus* group isolation in 95 patients. **J Infect**, v. 59, n. 5, p. 324–31, nov. 2009b.

VAN INGEN, J. *et al.* Re-analysis of 178 previously unidentifiable *Mycobacterium* isolates in the Netherlands in 1999–2007. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, n. 9, p. 1470–1474, set. 2010a.

VAN INGEN, J. *et al.* The changing pattern of clinical *Mycobacterium avium* isolation in the Netherlands. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 14, n. 9, p. 1176–1180, set. 2010b.

VAN INGEN, J. *et al.* Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. **Drug Resist Updat**, v. 15, n. 3, p. 149–161, jun. 2012.

VAN INGEN, J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 34, n. 1, p. 103–9, fev. 2013.

VAN INGEN, J. Microbiological Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. **Clin Chest Med**, v. 36, n. 1, p. 43–54, mar. 2015.

VAN INGEN, J. *et al.* Global outbreak of severe *Mycobacterium chimaera* disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 10, p. 1033–41, out. 2017.

VAN SOOLINGEN, D. *et al.* DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods Enzymol**, v. 235, p. 196-205, 1994.

VARMA-BASIL, M. *et al.* Development of a Novel PCR Restriction Analysis of the hsp65 Gene as a Rapid Method To Screen for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Nontuberculous Mycobacteria in High-Burden Countries. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 1165-1170, abr. 2013.

VARMA-BASIL, M.; BOSE, M. Mapping the Footprints of Nontuberculous Mycobacteria. *In*: VELAYATI, A. A.; FARNIA, P. **Nontuberculous Mycobacteria (NTM)**. Teerã: Editora Academic Press, 2019. cap. 8, p. 155–175.

VELAYATI, A. A.; FARNIA, P.; SAIF, S. Identification of Nontuberculous *Mycobacterium*. *In*: VELAYATI, A. A.; FARNIA, P. **Nontuberculous Mycobacteria (NTM)**. Teerã: Editora Academic Press, 2019. cap. 2, p. 11–59.

VESTAL, A.; KUBICA, G. Differential colonial characteristics of mycobacteria on Middlebrook and Cohn 7H11 agar-base medium. **Am Rev Respir Dis**, v. 94, n. 2, p. 247-252, ago. 1966.

VINCENT, V. Les Mycobactéries: bacilles de la tuberculosis. *In*: FRENEY, J. *et al.* **Manuel de bactériologie clinique**. Paris: Editora Elsevier, 1994. p. 899-922.

WAGNER, D.; YOUNG, L. S. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. **Infection**, v. 32, n.5, p. 257–270, out. 2004.

WAGNER, D. Global Epidemiology of NTM Disease (Except Northern America). *In*: Griffith, D. E. **Nontuberculous Mycobacterial Disease**. Editora Respiratory Medicine, 2018, p. 163–260.

WALLACE, J. R. *et al.* Absence of *Mycobacterium intracellulare* and presence of *Mycobacterium chimaera* in household water and biofilm samples of patients in the United States with *Mycobacterium avium* complex respiratory disease. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 6, p. 1747–52, jun. 2013.

WALLACE, J. R. *et al.* *Mycobacterium ulcerans* low infectious dose and mechanical transmission support insect bites and puncturing injuries in the spread of Buruli ulcer. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 4, p. 1-16, abr. 2017.

WALLIS, R. S. Biologics and infections: lessons from tumor necrosis factor blocking agents. **Infect Dis Clin North Am**, v. 25, n. 4, p. 895–910, dez. 2011.

WANG, H. *et al.* Rapid method for identification of six common species of mycobacteria based on multiplex SNP analysis. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 247–50, jan. 2010.

WANG, S. H.; PANCHOLI, P. Mycobacterial skin and soft tissue infection. **Curr Infect Dis Rep**, v. 16, n. 438, p. 1-14, out. 2014.

WEISS CH, GLASSROTH J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. **Expert Rev Respir Med**, v. 6, n. 6, p. 597-612, dez. 2012.

WENTWORTH, A. B. *et al.*. Increased incidence of cutaneous nontuberculous mycobacterial infection, 1980 to 2009: a population-based study. **Mayo Clin Proc**, v. 88, n. 1, p. 38–45, jan. 2013.

Wi, Y. M. Treatment of Extrapulmonary Nontuberculous Mycobacterial Diseases. **Infect Chemother**, v. 51, n. 3, p. 245-255, set. 2019.

WILDNER, L. M. **Isolamento e Identificação de Micobactérias Não-Tuberculosas em Laboratório e Hospital de Referência do Estado de Santa Catarina**. 2012. 150 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012

WILEN, C. B.; MCMULLEN, A. R.; BURNHAM, C. A. Comparison of sample preparation methods, instrumentation platforms, and contemporary commercial databases for identification of clinically relevant mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 7, p. 2308–2315, jul. 2015.

WINTHROP, K. L. *et al.* Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 182, n. 7, p. 977–982, out. 2010.

WINTHROP, K. L.; ISEMAN M. Bedfellows: mycobacteria and rheumatoid arthritis in the era of biologic therapy. **Nat Rev Rheumatol**, v. 9, n. 9, p. 524–31, set. 2013.

WINTHROP, K. L. *et al.* On the Reportability of Nontuberculous Mycobacterial Disease to Public Health Authorities. **Ann Am Thorac Soc**, v. 14, n. 3, p. 314–317, mar. 2017.

WOLINSKY, E. State of the art: nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **Am Rev Respir Dis**, v. 119, n. 1, p.107–159, jan. 1979.

WONG, D. A. *et al.* Simple and rational approach to the identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex species, and other commonly isolated mycobacteria. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 10, p. 3768–3771, out. 2001.

WU, U.; HOLLAND, S. M. Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections. **Lancet Infect Dis**, v. 15, n. 8, p. 968–980, ago. 2015.

WU, M. L. *et al.* NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. **Drug Discov Today**, v. 23, n. 8, p. 1502–1519, ago. 2018.

YEH, J. J. *et al.* Rheumatoid arthritis increases the risk of nontuberculosis mycobacterial disease and active pulmonary tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1-8, out. 2014.

ZAMARIOLI, L. A. *et al.* Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 8, p. 590–4, 2008.

ZHANG, M.; FENG, M.; HE, J. Q. Disseminated *Mycobacterium kansasii* infection with cutaneous lesions in an immunocompetent patient. **Int J Infect Dis**, v. 62, p. 59–63, set. 2017.

ZIEHL, F. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. **DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 8, n. 33, p. 451, 1882.

ZOPF, W. Die Spaltpielz. 1. ed. Breslávia: Edward Trewendt, 1883. 100 p.

ZWEIJPFENNING, S.; HOEFSLOOT, W.; INGEN, J. Geographic Distribution of Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Clinical Specimens: A Systematic Review. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 39, n. 3, p. 336–342, jun. 2018.

APÊNDICE I

Dados não publicados

AUMENTO NO ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES IDENTIFICADAS EM AMOSTRAS CLÍNICAS EM SANTA CATARINA, BRASIL

Juliano dos Santos^{1,2,3}, Camilo Fernandes^{4,5}, Mara Cristina Scheffer^{2,3}, Darcita Buerger
Rovaris⁶, Sabrina Gonçalves⁶, Carlos Rodrigo Zárata-Bladés^{4,5}, Maria Luiza Bazzo^{1,2,3}

1 Departamento de Análises Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Farmácia -
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

2 Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, Universidade Federal de
Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

3 Laboratório de Biologia Molecular, Sorologia e Micobactérias, Departamento de
Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina,
Florianópolis, SC, Brasil

4 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas, Laboratório de Imunorregulação, iREG - Universidade
Federal de Santa Catarina, SC, Brasil

5 Hospital Nereu Ramos de Florianópolis, SC, Brasil

6 Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina, SC, Brasil

Resumo

Objetivo: As micobacterioses são causadas por micobactérias não tuberculosas (MNT). O objetivo do presente estudo foi determinar a variedade e frequência das espécies de MNT identificadas em amostras clínicas no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Métodos:** Foi utilizada uma análise retrospectiva dos dados de espécies isoladas de amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares de 575 indivíduos entre 2010 e 2019, identificadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Resultados:** Entre

as amostras analisadas as espécies mais frequentes foram do Complexo *Mycobacterium avium* (23,6%), Complexo *Mycobacterium fortuitum* (20%) e Complexo *Mycobacterium abscessus* (13,6%). As taxas de isolamento de espécies de MNT aumentaram de 0,4 isolados/100.000 habitantes em 2010 para 1,9 isolado/100.000 habitantes em 2019. **Conclusão:** O estudo aponta uma variedade de espécies de MNT isoladas de amostras pulmonares e extrapulmonares em Santa Catarina. Também é importante destacar o aumento do isolamento e identificação das espécies de MNT em um período de dez anos.

INTRODUÇÃO

Micobactérias não tuberculosas (MNT) são um grupo de espécies amplo e diversificado de bactérias, também conhecidas como micobactérias atípicas ou ambientais.¹ Sua associação com doenças é bem reconhecida e atualmente considerada um problema mundial crescente.² Em humanos as micobacterioses podem ser classificadas em quatro síndromes clínicas distintas: doença pulmonar, linfadenite, doença cutânea e doença disseminada.^{3,4} Os casos de infecções são predominantemente pulmonares, sendo notificados principalmente em países desenvolvidos nos quais a incidência de tuberculose é baixa.^{5,6}

O aumento na descrição do número de casos de infecções por MNT parece ser multifatorial, incluindo uma crescente coorte de populações com condições predisponentes, como fibrose cística, bronquiectasia, doença pulmonar obstrutiva crônica e infecção por HIV, juntamente com a melhoria contínua da capacidade de diagnóstico.^{2,7,8}

Mais de 200 espécies de MNT são atualmente reconhecidas, em uma lista em constante crescimento (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>). A impressionante ecologia adaptativa destes microrganismos é resultante de características biológicas relacionadas à parede celular hidrofóbica impermeável e rica em lipídios, regulação da transcrição gênica,

formação de biofilme e simbiose com protozoários.⁹ Tais características favorecem uma excelente adaptação a ambientes de engenharia humana, como sistemas de distribuição de água potável e encanamentos prediais, constituindo importante rota para transmissão de MNT.¹⁰

No Brasil a notificação de infecções por MNT não é obrigatória e relatórios epidemiológicos detalhados não estão disponíveis, assim, a prevalência de micobacterioses permanece desconhecida e a diversidade geográfica não tem sido amplamente estudada.

O objetivo do presente estudo foi identificar a frequência de isolamento de MNT, avaliando a variabilidade de espécies isoladas de amostras clínicas obtidas de pacientes sintomáticos respiratórios ou com a suspeita de micobacteriose extrapulmonar no Estado de Santa Catarina, região Sul do Brasil em um período de dez anos (2010 – 2019).

MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um estudo retrospectivo dos relatórios de identificação de isolados clínicos de MNT enviados ao Laboratório Central do Estado de Santa Catarina (LACEN/SC) entre janeiro de 2010 e dezembro de 2019 (10 anos). As taxas de isolamento de MNT foram calculadas dividindo o número de isolados (um isolado por paciente) pela população do Estado em 2010 e em 2019.

Pacientes e Amostras Clínicas

Foram avaliados isolados clínicos de 575 pacientes sintomáticos respiratórios ou com a suspeita de micobacteriose extrapulmonar, com crescimento de MNT em cultura de amostras respiratórias (escarro ou lavado broncoalveolar) ou de outros sítios anatômicos (sangue, linfonodo, líquido pleural, líquor, medula óssea, biópsia de partes moles, secreção intra-abdominal, de mama ou de abscessos, fragmento ósseo e urina). Os isolados foram provenientes

de laboratórios públicos e privados de diferentes municípios de Santa Catarina. Foi considerado somente um isolado por paciente.

Identificação Molecular

As espécies de MNT deste estudo foram identificadas por *PCR-restriction enzyme analysis* (PCR-PRAhsp65)¹¹, baseada na amplificação de um fragmento de 441 pb do gene hsp65 com posterior digestão com duas enzimas de restrição (*BstEII* e *HaeIII*). Os resultados do PCR-PRAhsp65 foram associados às características fenotípicas dos isolados.

Declaração de Ética

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos, CEPESH, da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE nº 10950919.5.0000.0121).

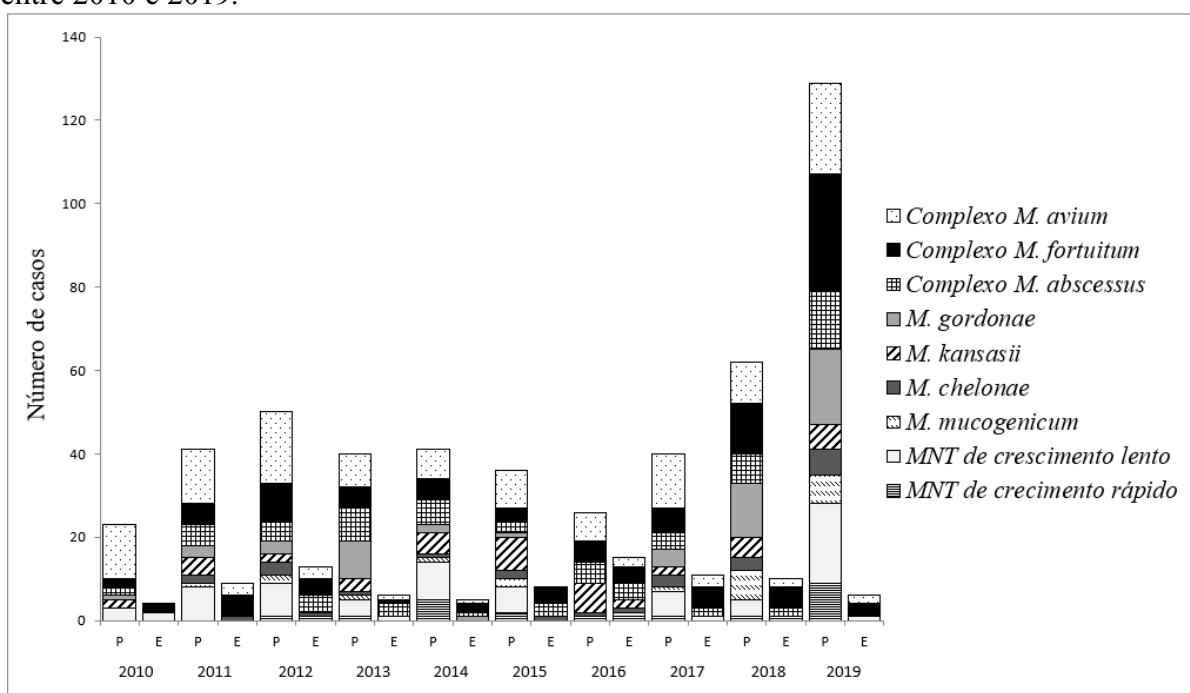
RESULTADOS

No período de 10 anos (2010 – 2019), isolados clínicos de 575 pacientes sintomáticos respiratórios ou com suspeita de micobacteriose extrapulmonar, provenientes de todo o Estado de Santa Catarina, foram identificados como MNT pelos setores de tuberculose e biologia molecular do LACEN/SC. No Estado, as taxas de isolamento de espécies de MNT aumentaram de 0,4 isolados/100.000 em 2010 para 1,9 isolado/100.000 em 2019. O aumento no isolamento foi constatado principalmente em amostras respiratórias, que passaram de 0,35 isolados/100.000 em 2010 para 1,8 isolados/100.000 em 2019, isolamento 5 vezes maior em um período de 10 anos.

Amostras respiratórias representaram 84,9% dos isolados, sendo que em 452 pacientes os isolados foram recuperados em amostras de escarro (92,6%) e 36 em lavado broncoalveolar (7,4%). Nos primeiros oito anos do estudo (2010 a 2017) foi observada uma pequena oscilação entre o número de isolados respiratórios anual, média 37,1 isolados/ano (23 – 50 isolados ano).

O número de isolados de MNT em amostras respiratórias subiu para 62 em 2018 e 129 em 2019. Cinco grupos/espécies de MNT representaram 73% de todos os isolados respiratórios, divididos em MNT de crescimento lento: Complexo *M. avium* (120/24,6%), *M. gordonae* (54/11,1%) e *M. kansasii* (43/8,8%); e MNT de crescimento rápido: Complexo *M. fortuitum* (80/16,4%) e Complexo *M. abscessus* (59/12,1%) (figura 1).

Figura 1: Número de isolados de micobactérias não tuberculosas por ano em Santa Catarina entre 2010 e 2019.



P. Amostra pulmonar; E. Amostra extrapulmonar;

Amostras extrapulmonares foram menos comuns, representando 15,1% do total de isolados de MNT no período do estudo. A média anual foi 8,7 isolados/ano, sendo 2010 o ano com menor número de isolados (4) e 2016 com maior número (15). Três grupos representaram 81,6% das MNT recuperadas de amostras extrapulmonares: Complexo *M. fortuitum* (35/40,2%), Complexo *M. abscessus* (19/21,8%), e Complexo *M. avium* (17/19,5%) (figura 1).

O sítio infeccioso extrapulmonar com maior número de isolados (38/43,7%) foi secreção de mama, no qual 60,5% dos isolados pertenciam ao Complexo *M. fortuitum* e 26,3%

ao Complexo *M. abscessus*. Todas as amostras desse sítio foram coletadas de infecção pós cirurgia estética.

Entre os demais sítios extrapulmonares, MNT foram isoladas principalmente em amostras de linfonodos (sete isolados, 71,4% pertencentes ao complexo *M. avium*); biópsias de pele e tecidos moles (sete isolados, 57,1% pertencentes ao complexo *M. abscessus*); líquido pleural (sete isolados, 42,8% *M. chelonae*, 28,6% Complexo *M. avium* e Complexo *M. abscessus*); aspirado de abscessos (sete isolados, 42,8% Complexo *M. fortuitum* e 28,6% Complexo *M. avium*); sangue (seis isolados, 66,7% Complexo *M. avium* e 33,3% Complexo *M. fortuitum*); e secreção intra-abdominal (seis isolados, 66,7% Complexo *M. fortuitum*).

DISCUSSÃO

Países desenvolvidos, com baixa carga de tuberculose, têm reportado aumento no número de casos de doença por MNT nas últimas décadas.¹² A taxa de isolamento laboratorial aumentou de 8,2 isolados/100.000 em 1994 para 16 isolados/ 100.000 em 2014 nos EUA; de 11,4 isolados/100.000 em 1998 para 22,22 isolados/100.000 em 2010 no Canadá; de 0,9 isolados/100.000 em 1995 para 2,9 isolados/100.000 em 2006 no Reino Unido.¹³⁻¹⁵ Santa Catarina está entre os Estados brasileiros considerados de baixa carga para tuberculose (23,7/100.000), no entanto, a capital e outras cidades do Estado apresentam incidências superiores à média nacional (46/100.000).¹⁶ Nesse contexto, o Estado registrou um aumento no isolamento de MNT de 4,75 vezes nos últimos 10 anos, passando de 0,4 isolados/100.000 em 2010 para 1,9 isolados/100.000 em 2019. Globalmente, o aumento no isolamento de espécies de MNT em amostras clínicas tem sido atribuído a um somatório de fatores, incluindo o aprimoramento das técnicas laboratoriais, a maior conscientização médica sobre infecções por

MNT e a recomendação nacional da realização de cultura para todos os casos suspeitos de tuberculose.

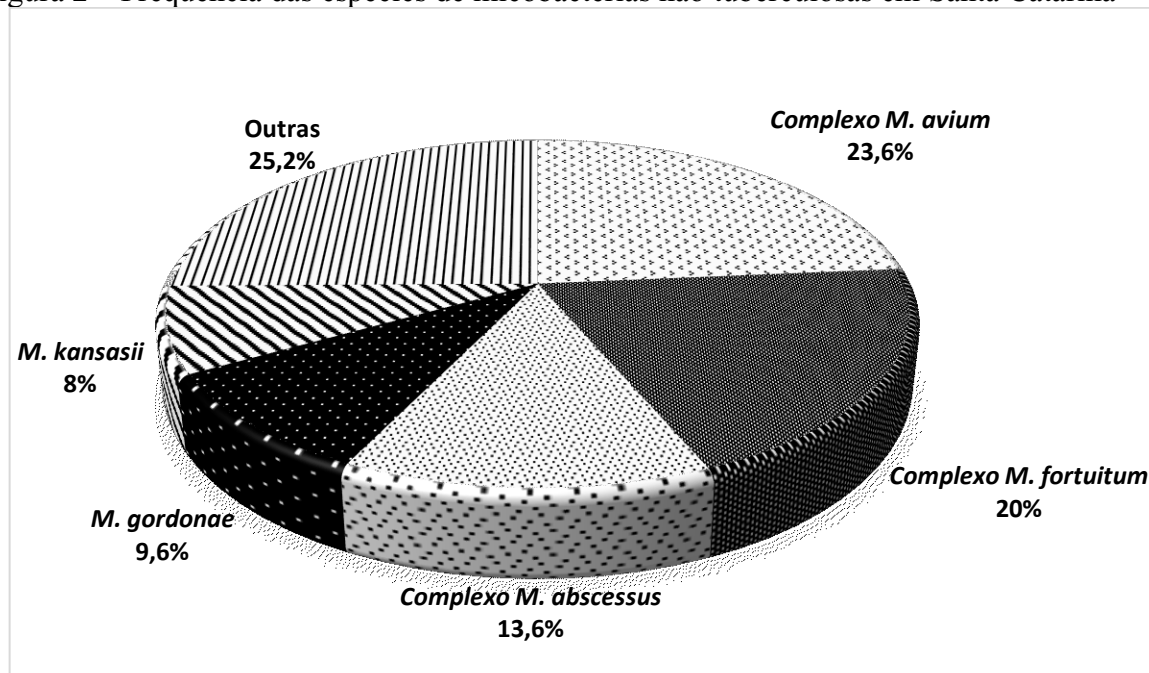
Outros importantes fatores também associados ao aumento no isolamento de MNT são, o número crescente de pacientes suscetíveis a infecção por diferentes fatores de risco, incluindo o envelhecimento da população. Além do aumento da exposição por atividades humanas associadas à água e solo, principais habitats de MNT. Aproximadamente 85% dos isolados do estudo foram recuperados de amostras respiratórias. A doença pulmonar é a manifestação clínica mais comum entre as micobacterioses, sendo a inalação umas das principais vias de exposição às MNT, presentes especialmente na água.¹⁷⁻¹⁸

As principais espécies de MNT isoladas de amostras clínicas diferem segundo a região geográfica avaliada, sendo influenciadas por características individuais como sexo, etnia, idade e fatores de risco associados.¹⁹⁻²⁰ Além disso, hábitos e hobbies de um indivíduo suscetível podem influenciar significativamente no risco de infecção e o tipo de espécie associada a esta infecção.²¹⁻²²

O Brasil é um país de dimensões continentais, com grande variedade de hábitos e cultura, além de diferentes nichos ambientais. No presente estudo, as MNT mais frequentemente isoladas foram o Complexo *M. avium* (23,6%) e Complexo *M. fortuitum* (20%) (figura 2). Estudos pontuais avaliando MNT em amostras clínicas têm mostrado ampla variação regional entre as principais espécies isoladas. Considerando apenas as duas principais espécies descritas em cada estudo, os Complexos *M. abscessus* e *M. avium* foram os mais frequentes em isolados da Bahia e de Rondônia;^{23,24} *M. kansasii* e Complexo *M. avium* em isolados do Rio de Janeiro e da Baixada Santista;^{25,26} *M. kansasii* e Complexo *M. abscessus* em isolados da cidade de São Paulo;²⁷ Complexo *M. avium* e *M. kansasii* em isolados do Rio Grande do Sul;²⁸ Complexo *M. avium* e *M. gordonae* em isolados de São José do Rio Preto;²⁹ *M. massiliense* e

Complexo *M. simiae* em isolados do Pará;³⁰ e os Complexos *M. avium* e *M. fortuitum* em isolados de Campinas.³¹

Figura 2 – Frequência das espécies de micobactérias não tuberculosas em Santa Catarina



Em Santa Catarina, o Complexo *M. avium* representou aproximadamente 25% das MNT identificadas no período do estudo, sendo o principal grupo encontrado nos isolados respiratórios (24,6%), assim como nas amostras de linfonodo (71,4%) e sangue (66,7%). Entre as espécies do complexo, *M. avium* e *M. intracellulare* são frequentemente associadas a doenças pulmonares que simulam tuberculose em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, e a doença disseminada em pacientes vivendo com HIV/Aids.^{13,32,33} As bactérias desse complexo são as MNT patogênicas predominantes na maioria dos países.³⁴ São microrganismos encontrados no ambiente, e isolados frequentemente em sistemas de água quente, tendo assim, alta probabilidade de aerossolização, o que aumenta a possibilidade de exposição por inalação e sua associação com infecções pulmonares.^{17,18}

Complexo *M. fortuitum*, grupo de MNT de crescimento rápido, foi o segundo mais isolado em amostras pulmonares (16,4%), e representou 20% de todos os isolados do estudo. O grupo se destacou principalmente em amostras de secreção de mama pós cirurgia estética (60,5%), apontando o complexo como importante agente de infecção relacionado a assistência à saúde. Foi o grupo mais frequente em abscessos (42,8%) e secreções intra-abdominais (66,7%). O Complexo *M. fortuitum* tem sido associado a contaminação de artigos médicos, por meio dos quais pode causar infecções pulmonares, de sítio cirúrgico, e doenças de pele e de tecidos em pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos.³⁵

O terceiro grupo mais frequente foi o Complexo *M. abscessus* (13,6%), também de crescimento rápido. O complexo se destacou entre amostras respiratórias (12,1%), secreções de mama (26,3%), e biópsias de pele e tecidos moles (57,1%). Os microrganismos do complexo *M. abscessus* são considerados verdadeiramente patogênicos, responsáveis por infecções cutâneas graves, sendo o grupo mais comum associado a infecções de pele e tecidos moles. Infectam pacientes sem fatores de risco subjacentes, além de pacientes com histórico de distúrbios pulmonares, como fibrose cística e bronquiectas.^{3,36-41} Infecções pelo complexo *M. abscessus* são consideradas um grave problema para o sistema de saúde, especialmente por causa dos altos níveis de resistência aos antimicrobianos.⁵

M. gordonae também foi um isolado frequente nas amostras respiratórias (9,6%), esta MNT de crescimento lento normalmente é considerada não patogênica, sendo um frequente contaminante laboratorial, especialmente em locais que utilizam meios de cultura líquidos.¹³ No entanto, em alguns casos podem causar doença, mesmo em pacientes imunocompetentes.⁴²

M. kansasii se destacou entre os isolados de amostras respiratórias, sendo o segundo isolado mais frequente neste sítio nos anos de 2015 e 2016. Durante o período do estudo, além dos isolados de amostras respiratórias o microrganismo foi recuperado em uma amostra de

líquido pleural e outra de infecção de corrente sanguínea relacionada a cateter. Esta espécie é de crescimento lento, e tem sido associada a doença pulmonar semelhante a tuberculose. É considerada uma espécie particularmente virulenta, devendo ser considerada mesmo quando isolada em uma única amostra de escarro. No entanto, a maioria dos casos apresenta doença com curso indolente, permitindo tempo suficiente para estabelecer o diagnóstico microbiológico com várias amostras.⁴³⁻⁴⁴

Aproximadamente 75% das espécies isoladas no estudo tem como principal reservatório ambiental a água, sugerindo como possíveis rotas de transmissão águas de abastecimento municipais, sistemas de distribuição de água potável, e/ou encanamentos domésticos, comerciais ou institucionais. Medidas para evitar a exposição, incluindo limpar chuveiros, torneiras e remover aeradores, têm sido recomendadas para espécies como *M. avium*, *M. abscessus* e *M. kansasii*, MNT fortemente associadas a formação de biofilme e a infecções respiratórias adquiridas por inalação de água e aerossóis domésticos.^{17,18,36,45}

A importância principal do presente estudo foi a descrição de um aumento significativo no isolamento de MNT no Estado de Santa Catarina nos últimos anos. Este foi o primeiro relatório sobre a distribuição das espécies de MNT recuperadas de amostras clínicas em Santa Catarina, tendo uma forte relevância epidemiológica na região, pois por meio da identificação das principais espécies isoladas, podemos inferir possíveis rotas de transmissão. Em contraste, a ausência de dados e seguimento clínico dos pacientes que possibilitariam uma caracterização dos isolados em relação a sua associação à infecção ou colonização, representa uma limitação do estudo. Além disso, praticamente não existem estudos brasileiros descrevendo a clínica dos casos de MNT em relação as espécies isoladas, que poderiam apontar características particulares dos mesmos e relação aos relatos de outras regiões do planeta, podendo servir como um guia mais preciso para o tratamento dos casos observados nas distintas regiões do país. Por

outro lado, e considerando que a identificação de fontes ambientais de disseminação é o caminho para a implementação de práticas que poderão limitar a exposição e consequente infecção por MNT, estudos futuros são necessários para confirmar as fontes ambientais de espécies associadas a essas infecções. Finalmente, a notificação e vigilância nacional dos casos de infecção por MNT, proporcionaria a compreensão da epidemiologia e do impacto dessas infecções no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. PARTE AC. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018, 68(6): 1825–1829.
2. AHMED I. *et al.* Nontuberculous Mycobacterial Infections – a neglected and emerging problem. *Int J Infect Dis.* 2020, 92: 46-50.
3. GRIFFITH DE. *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007, 175: 367– 416.
4. KOH WJ. Nontuberculous mycobacteria - overview. *Microbiol Spectrum.* 2017, 5(1): 1-7.
5. PREVOTS DR, MARRAS TK. Epidemiology of Human Pulmonary Infection with Non-Tuberculous Mycobacteria: A Review. *Clin chest med.* 2015, 36(1): 13-34.
6. FONG IW. Emerging and Difficult to Treat Nontuberculous Mycobacteria Infections. *In: FONG IW, Current Trends and Concerns in Infectious Diseases.* Cham: Springer; 2020. 289-317.
7. FAVERIO P. *et al.* Characterizing Non-Tuberculous Mycobacteria Infection in Bronchiectasis. *Int J Mol Sci.* 2016, 17(11): 1913.
8. RIVERO-LEZCANO OM, GONZÁLEZ-CORTÉS C, MIRSAEIDI M. The unexplained increase of nontuberculous mycobacteriosis. *Int J Mycobacteriol.* 2019, 8(1): 1-6.
9. PEREIRA AC. *et al.* Non-Tuberculous Mycobacteria: Molecular and Physiological Bases of Virulence and Adaptation to Ecological Niches. *Microorganisms.* 2020, 8: 1380.
10. FALKINHAM JO III. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2015, 36(1): 35–41.
11. TELENTI, A. *et al.* Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993, 31(2): 175–178.
12. DONOHUE MJ, WYMER L. Increasing Prevalence Rate of Nontuberculous Mycobacteria Infections in Five States, 2008-2013. *Ann Am Thorac Soc.* 2016, 13(12): 2143-2150.
13. MOORE JE. *et al.* Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Public Health.* 2010, 10: 612.
14. BRODE SK. *et al.* Pulmonary versus Nonpulmonary Nontuberculous Mycobacteria, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2017, 23(11): 1898–1901.
15. DONOHUE MJ. Increasing nontuberculous mycobacteria reporting rates and species diversity identified in clinical laboratory reports. *BMC Infect Dis.* 2018, 18(1):163–171.
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Boletim epidemiológico especial: Tuberculose 2020, Brasília, v. 1, n. 1, mar. 2020. Disponível em: www.saude.gov.br/bvs. Acesso em 11 jan. 2021.
17. THOMSON R. *et al.* Isolation of NTM from household water and shower aerosols in patients with NTM pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2013, 51(9): 3006–3011.
18. FALKINHAM, J. O. III. Current Epidemiologic Trends of the Nontuberculous Mycobacteria (NTM). *Curr Environ Health Rep,* v. 3, n. 2, p. 161-167, 2016.
19. ZWEIJPFENNING S, HOEFSLOOT W, INGEN J. Geographic Distribution of Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Clinical Specimens: A Systematic Review. *Semin Respir Crit Care Med.* 2018, 39(3): 336–342.
20. BENTO CM, GOMES MS, SILVA T. Looking beyond Typical Treatments for Atypical Mycobacteria. *Antibiotics.* 2020, 9(1).
21. ADJEMIAN J. *et al.* Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012, 185(8): 881-886.

22. LANDE L. Environmental Niches for NTM and Their Impact on NTM Disease. *In*: GRIFFITH DE, Nontuberculous Mycobacterial Disease. Cham: Respiratory Medicine; 2018. 131–144.
23. MATOS ED. *et al.* Nontuberculosis mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference center in Bahia: clinical epidemiological aspects. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* 2004, 8(4): 296–304.
24. MENDES DE LIMA CA. *et al.* Nontuberculous mycobacteria in respiratory samples from patients with pulmonary tuberculosis in the state of Rondônia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013, 108(4): 457–62.
25. DE MELLO KGC. *et al.* Clinical and therapeutic features of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Brazil, 1993–2011. *Emerg Infect Dis.* 2013, 19(3): 393–399.
26. ZAMARIOLI LA. *et al.* Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol.* 2008, 34(8): 590–594.
27. MARQUES LRM, FERRAZOLI L, CHIMARA, E. Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: presumptive diagnosis based on the international microbiological criteria adopted in the state of São Paulo, Brazil, 2011–2014. *J bras pneumol.* 2019, 45(2): 1–5.
28. CARNEIRO MS. *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung disease in a high tuberculosis incidence setting in Brazil. *J Bras Pneumol.* 2018, 44(2): 106–111.
29. PEDRO HSP. *et al.* Nontuberculous mycobacteria isolated in São José do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005. *J Bras Pneumol.* 2008, 34(11): 950–955.
30. DA COSTA ARF. *et al.* Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections in the state of Para, an endemic region for tuberculosis in North of Brazil. *Amer Pulmonary Infection.* 2012, 3:37–54.
31. BENSI EPA, PANUNTO PC, RAMOS MC. Incidence of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, differentiated by multiplex PCR, in clinical specimens of a large general hospital. *Clin Sao Paulo Braz.* 2013, 68(2):179–84.
32. ESTEBAN J, GARCÍA-COCA M. *Mycobacterium* biofilms. *Front Microbiol,* 2018, 8: 2651.
33. SADIKOT RT. Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *In*: VELAYATI, AA, FARNIA P. Nontuberculous Mycobacteria (NTM). Teerã: Academic Press; 2019. 121–132.
34. HOEFSLOOT W. *et al.* The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J.* 2013, 42(6): 1604–1613.
35. BLANCO RM. *et al.* Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2002, 61(2): 91–96.
36. FALKINHAM JO III. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *Can J Infect Dis.* 2003, 14(5): 281–286.
37. FLOTO RA. *et al.* US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of nontuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary. *Thorax.* 2016, 71(1): 88–90.
38. MISCH EA, SADDLER C, DAVIS JM. Skin and Soft Tissue Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. *Curr Infect Dis Rep.* 2018, 20(4): 6.
39. SWENSON C, ZERBE CS, FENNELLY K. Host variability in NTM disease: implications for research needs. *Front. Microbiol.* 2018, 9(2901): 1–12.
40. MEI Y. *et al.* Cutaneous tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections at a national specialized hospital in China. *Acta Derm Venereol.* 2019, 99(11): 997–1003.
41. JOHANSEN MD, HERRMANN J, KREMER L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol.* 2020, 18: 392–407.
42. RESCH B. *et al.* Pulmonary infection due to *Mycobacterium gordonae* in an adolescent immunocompetent patient. *Respiration.* 1997, 64: 300–303.
43. PHILLEY JV. *et al.* Treatment of non-Tuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2016, 8(4): 275–96.
44. CLAIN JM, AKSAMIT TR. Diagnosis of NTM Disease: Pulmonary and Extrapulmonary. *In*: Griffith DE, Nontuberculous Mycobacterial Disease: A Comprehensive Approach to Diagnosis and Management. Cham: Respiratory Medicine; 2018. 261–270.
45. MULLIS SN, FALKINHAM JO III. Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials. *J Appl Microbiol.* 2013, 115(3): 908–914.

Apêndice II

Resultado das identificações por Sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*, PCR-PRA*hsp65* e MALDI-TOF MS

Pac	Sexo	Idade	Amostra	Crescimento	Coloração da colônia	Resultado				
						Seq. <i>hsp65</i>	Seq. <i>rpoB</i>	Seq. <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i>	PCR-PRA <i>hsp65</i>	MALDI-TOF MS
1	M	45	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
2	F	68	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abs sub. abscessus</i>	Baixa qualidade da sequência	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
3	F	79	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i> *	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
4	F	68	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
5	M	53	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
6	F	66	Lav. Bronc.	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i> *	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
7	F	69	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i> *	<i>M. abs sub. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
8	F	62	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abs sub. bolletii</i>	<i>M. abs sub. bolletii</i>	<i>M. abs sub. bolletii</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i> <i>M. abs sub. bolletii</i> <i>M. abs sub. massiliense</i>	<i>M. abscessus</i>
9	F	56	Sec. de mama	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abs sub. bolletii</i>	<i>M. abs sub. bolletii</i>	<i>M. abs sub. bolletii</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i> <i>M. abs sub. bolletii</i> <i>M. abs sub. massiliense</i>	<i>M. abscessus</i>

10	M	22	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. abs sub. bolletii</i>	<i>M. abs sub. bolletii</i>	<i>M. abs sub. bolletii</i>	<i>M. abs sub. abscessus</i> <i>M. abs sub. bolletii</i> <i>M. abs sub. massiliense</i>	<i>M. abscessus</i>
11	F	67	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>
12	M	68	Biópsia de pele	Rápido	Não pigmentada	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>
13	F	24	Sec. de mama	Rápido	Não pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
14	F	67	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
15	F	65	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
16	M	59	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
17	M	45	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
18	F	24	Sec. de mama	Rápido	Não pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
19	F	39	Sec. de mama	Rápido	Não pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
20	F	24	Sec. de mama	Rápido	Não pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>

21	F	61	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
22	F	62	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
23	M	38	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. alvei</i> <i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
24	M	36	Sangue	Rápido	Não pigmentada	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. alvei</i> <i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
25	M	29	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. septicum</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
26	F	21	Sec. de mama	Rápido	Não pigmentada	<i>M. avium</i>	<i>M. confluentis</i> <i>M. senegalense</i>	<i>M. senegalense*</i>	<i>M. phlei</i>	<i>Comp. M. fortuitum</i>
27	M	54	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>
28	M	58	Escarro	Rápido	Não pigmentada	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>
29	M	53	Escarro	Lento	Pigmentada	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
30	F	70	Escarro	Lento	Pigmentada	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
31	F	59	Escarro	Lento	Pigmentada	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>

32	F	57	Escarro	Lento	Pigmentada	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>
33	F	58	Escarro	Lento	Pigmentada	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>
34	M	50	Escarro	Lento	Pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> #	<i>M. kansasii</i>	Não identificada
35	M	38	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>
36	F	32	Lav. Bronc.	Lento	Não pigmentada	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	Não identificada
37	F	65	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> <i>M. colombiense</i>	<i>M. avium</i>
38	F	87	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> <i>M. colombiense</i>	<i>M. avium</i>
39	M	46	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
40	F	45	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
41	M	20	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. avium</i>	<i>Comp. M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	Não identificada
42	F	49	Lav. Bronc.	Lento	Não pigmentada	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>

43	F	57	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. abscessus</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
44	M	64	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
45	M	23	Sangue	Lento	Não pigmentada	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
46	M	48	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. colombiense</i>	<i>Comp. M. avium</i>	<i>M. colombiense*</i>	<i>Comp. M. avium</i> <i>M. intermedium</i> <i>M. simiae</i>	<i>M. intracellulare</i>
47	M	42	Asp. de linf.	Lento	Não pigmentada	<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i>	<i>M. colombiense</i>	<i>M. avium</i> <i>M. colombiense</i>	<i>M. intracellulare</i>
48	M	52	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>Comp. M. avium</i>	<i>M. mantenii</i>	<i>M. colombiense*</i>	<i>M. avium</i> <i>M. colombiense</i>	Não identificada
49	M	53	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>Comp. M. avium</i>	<i>M. mantenii</i>	<i>M. colombiense*</i>	<i>M. avium</i> <i>M. colombiense</i>	Não identificada
50	M	65	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. intracellulare</i> #	<i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i>
51	M	70	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. intracellulare</i> #	<i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i>
52	M	63	Lav. Bronc.	Lento	Não pigmentada	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. intracellulare</i> #	<i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i>
53	F	72	Lav. Bronc.	Lento	Não pigmentada	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i>

54	M	51	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i> *	<i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i>
55	F	68	Vértebra	Lento	Não pigmentada	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i>
56	M	41	Lav. Bronc.	Lento	Não pigmentada	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. intracellulare</i> #	<i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i>	Não identificada
57	M	66	Biópsia de pele	Lento	Pigmentada	<i>M. marinum</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. marinum</i> <i>M. pseudoshottisii</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. marinum</i> <i>M. pseudoshottisii</i>	<i>M. marinum</i>
58	F	47	Escarro	Lento	Não pigmentada	<i>Comp. M. terrae</i>	<i>Comp. M. terrae</i>	<i>Comp. M. terrae</i> *	<i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i>	<i>M. arupense</i>

* Resultado após análise filogenética; # Espécie identificada com o auxílio das características fenotípicas do isolado; F: Sexo feminino; M: Sexo masculino; Abs: abscessus; Asp. de Linf.: Aspirado de linfonodo; Comp: Complexo; Lav. Bronc.: Lavado Broncoalveolar; Pac.: paciente; Sec.: Secreção; Seq: sequenciamento. As não identificações ou discordâncias com o padrão ouro foram colocadas em destaque.