

**Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia**

Letícia Muraro Wildner

**Isolamento e Identificação de Micobactérias Não-Tuberculosas  
em Laboratório e Hospital de Referência  
do Estado de Santa Catarina**

Florianópolis  
2012



Letícia Muraro Wildner

**Isolamento e Identificação de Micobactérias Não-Tuberculosas  
em Laboratório e Hospital de Referência  
do Estado de Santa Catarina**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia na área de concentração em Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Florianópolis  
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

W674i Wildner, Leticia Muraro  
Isolamento e identificação de micobactérias não-  
tuberculosas em laboratório e hospital de referência do  
estado de Santa Catarina [dissertação] / Leticia Muraro  
Wildner ; orientadora, Maria Luiza Bazzo. - Florianópolis,  
SC, 2012.  
150 p.: il., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Micobactérias. 3. Tuberculose. I. Bazzo,  
Maria Luiza. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12





*Dedico este trabalho à minha amiga Marilane Steffens.*

*Você estará sempre no meu coração.*





## AGRADECIMENTOS

À minha família. Aos meus pais, Leandro e Silvana, à minha madrinha Rosária e aos meus avós, Darcy, Maria, Genes e Isabel (*in memorian*), pela estrutura familiar, pelo exemplo de vida e pelo carinho, apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida. E aos meus irmãos, Leonardo e Eduardo, meus maiores companheiros.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo, pelo exemplo de profissionalismo, pelo incentivo e pelos ensinamentos nesses cinco anos de laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias e do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias, pela amizade e ajuda, dentro e fora do laboratório.

Ao LACEN/SC, em nome da Farmacêutica-Bioquímica Darcita Buerger Rovaris, pela oportunidade de estágio e pelo envio das amostras de MNT.

Ao Núcleo de Epidemiologia do Hospital Nereu Ramos, em nome das Enfermeiras Mônica Ferreira Gruner e Zuleide Amaral Minella, pelo auxílio e muito boa vontade, sempre, na coleta das amostras e dos dados dos pacientes.

Ao Laboratório de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário/UFSC, em nome da Farmacêutica-Bioquímica Clarice Iomara da Silva e do técnico Luiz Motta, pelo auxílio para obtenção de amostras no HU.

Às professoras Rosemeri Maurici da Silva e Thaís Sincero e à doutoranda Aline Schlindwein, pela colaboração científica.

À FAPESC, pelo suporte financeiro.

Ao PGFar/UFSC, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.



## RESUMO

**Introdução:** O gênero *Mycobacterium* compreende mais de 150 espécies, incluindo patogênicas, oportunistas e não patogênicas. As micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) são responsáveis por causar tuberculose (TB), enquanto as Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) podem causar micobacterioses. Embora sejam clinicamente indistinguíveis, micobacterioses e TB diferem em relação ao tratamento. O diagnóstico convencional das micobactérias apresenta limitações quanto ao tempo de execução e à operacionalidade, visto que o resultado pode levar até 60 dias para ser liberado. Entretanto, o diagnóstico rápido e a identificação da espécie são fundamentais para a adoção da terapia adequada e consequente controle da doença.

**Objetivos:** realizar a identificação de MNT e determinar a variabilidade das espécies isoladas no Laboratório de Referência do Estado de Santa Catarina, verificar a ocorrência de MNT em pacientes com diagnóstico de TB internados no Hospital de Referência para Tuberculose do Estado de Santa Catarina e avaliar o rendimento de técnicas moleculares para diagnóstico e identificação de micobactérias. **Métodos:** Oitenta e oito isolados de MNT, obtidos junto ao Laboratório de Referência do Estado de Santa Catarina, entre agosto de 2009 e agosto de 2011, foram identificados utilizando-se os métodos MMSA e PRA-*hsp65*. Amostras de escarro foram coletadas de 57 pacientes com diagnóstico de TB, internados no Hospital de Referência do Estado de Santa Catarina entre abril de 2010 e abril de 2011. A identificação das espécies foi realizada pelos métodos MMSA e PRA-*hsp65*. Estas amostras também foram utilizadas para a avaliação do rendimento das técnicas de PCR convencional, PCR em tempo real, PRA-*hsp65* e MMSA, diretamente da amostra clínica. **Resultados:** Dentre os isolados de MNT recebidos do Laboratório de Referência, *M. avium* foi a espécie de maior ocorrência (39,8% dos casos), seguida de *M. fortuitum* (14,8%), *M. abscessus* (12,5%) e *M. kansasii* (6,8%). O pulmão foi o principal sítio de isolamento (85,3% dos casos) e 61,4% das amostras eram procedentes das regiões da Grande Florianópolis e do Vale do Itajaí. Do total de isolados de MNT, 34,2% foram associados ao desenvolvimento de doença. O Complexo *M. avium* foi o principal agente identificado (65,4% dos casos) e o pulmão foi o sítio de infecção mais frequente (88,6% dos casos). Houve predomínio do gênero masculino e de pacientes HIV-soronegativos e a média de idade foi de  $46,1 \pm 14,6$  anos. Dos pacientes internados com diagnóstico de TB no Hospital de Referência, em apenas um foi identificada a presença de MNT. As

técnicas de PCR e PCR em tempo real, utilizadas para detecção de micobactérias diretamente de amostras de escarro, apresentaram sensibilidade de 91,2% e 100%, respectivamente, tomando-se como padrão áureo o cultivo em meio sólido. Os métodos MMSA e PRA-*hsp65* identificaram a espécie de micobactéria, diretamente de amostras de escarro, em 50,9% e 47,4% dos casos, respectivamente. Quando associados, possibilitaram a identificação em 75,4% das amostras.

**Conclusão:** O presente estudo permitiu uma avaliação da realidade epidemiológica das MNT no Estado de Santa Catarina, que até então não havia sido estudada. Além disso, permitiu a avaliação de técnicas moleculares que podem ser utilizadas como ferramentas para a agilização do diagnóstico e da identificação de micobactérias.

**Palavras-chave:** Micobactérias não-tuberculosas, identificação, diagnóstico molecular.

## ABSTRACT

### Isolation and Identification of Nontuberculous Mycobacteria at a Reference Laboratory and at a Reference Hospital in Santa Catarina State

**Background:** The genus *Mycobacterium* comprises more than 150 species. The *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTC) causes tuberculosis (TB), while the Nontuberculous Mycobacteria (NTM) can cause mycobacteriosis. These diseases are clinically indistinguishable, but require different therapeutic regimens. The conventional diagnosis of mycobacteria is time-consuming and may take up to 60 days. However, early diagnosis and identification followed by appropriate treatment are essential for an effective control of these diseases. **Objectives:** to identify and study the variability of NTM species isolated at the Reference Laboratory of Santa Catarina State, to find the occurrence of NTM among patients hospitalized with TB diagnosis in the Reference Hospital of Santa Catarina State and to estimate the yield of molecular techniques to early diagnosis and identification of mycobacteria. **Methods:** A total of 88 NTM isolates, obtained from Reference Laboratory between August 2009 and August 2011, were identified using MMSA and PRA-*hsp65* methods. Sputum samples were collected from 57 patients with TB diagnosis who were hospitalized in the Reference Hospital of Santa Catarina between April 2010 and April 2011. Species identification was performed using MMSA and PRA-*hsp65*. These samples were also used to estimate the yield of PCR of 16S rRNA gene, real time PCR, PRA-*hsp65* and MMSA, directly of the clinical samples. **Results:** Among the NTM isolates obtained from Reference Laboratory, *M. avium* was the most common species (39,8% of cases), followed by *M. fortuitum* (14,8%), *M. abscessus* (12,5%) and *M. kansasii* (6,8%). Pulmonary cases were more frequent (85,3% of cases) and 61.4% of the isolates were from Grande Florianópolis and Vale do Itajaí. Twenty six cases (34.2%) were characterized as mycobacteriosis. Of these cases, 65.4% were attributed to *M. avium* Complex and 88.6% were characterized as pulmonary disease. The mean age of patients was  $46,1 \pm 14,6$  years. Men and non-HIV patients were more affected by the disease. At the Reference Hospital, NTM was identified in only one patient with TB diagnosis. PCR and real time PCR showed sensitivity of 91.2% and 100%, respectively. MMSA and PRA-*hsp65* identified the species, directly of the sputum, in 50.9% and 47.4% of cases, respectively. When associated, these methods identified the species in 75,4% of samples. **Conclusions:** This study provided the

epidemiology of NTM of Santa Catarina State, that had not been studied yet. It also allowed the assessment of molecular techniques that can be used as tools for early diagnosis and identification of mycobacteria.

**Keywords:** Nontuberculous mycobacteria, identification, molecular diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Método PRA- <i>hsp65</i> . .....	52
<b>Figura 2.</b> Método MMSA.....	54
<b>Figura 3.</b> Fluxograma dos procedimentos realizados com amostras de cultura de micobactérias suspeitas de ser MNT, recebidas do LACEN/SC.....	62
<b>Figura 4.</b> Fluxograma dos procedimentos realizados no LBMM, com amostras de escarro recebidas do Hospital Nereu Ramos .....	64
<b>Figura 5.</b> Gel representativo da identificação dos isolados 1, 2 e 3, com a utilização do método PRA- <i>hsp65</i> . .....	73
<b>Figura 6.</b> Gel representativo da identificação do isolado 5, com a utilização do método MMSA. ....	74
<b>Figura 7.</b> Comparação dos resultados de identificação de micobactérias pelos métodos PRA- <i>hsp65</i> e MMSA. ....	75
<b>Figura 8.</b> Espécies de MNT isoladas no LACEN/SC.....	76
<b>Figura 9.</b> Distribuição dos isolados de MNT por região do Estado de Santa Catarina. ....	78
<b>Figura 10.</b> Gel de agarose representativo da amplificação do fragmento de 350pb da região 16S rRNA de eubactérias, de amostras de DNA extraídas diretamente do escarro. ....	83
<b>Figura 11.</b> Gel de agarose representativo da amplificação do fragmento de 1027pb da região 16S rRNA de micobactérias, de amostras de DNA extraídas diretamente do escarro. ....	84
<b>Figura 12.</b> Imagem representativa dos testes de sensibilidade da sonda <i>Mycobacterium-specific</i> para <i>M. tuberculosis</i> .....	86

<b>Figura 13.</b> Gel representativo da identificação das amostras clínicas 1 e 2 com a utilização do método MMSA .....	88
<b>Figura 14.</b> Gel representativo da identificação das amostras clínicas 1 e 2 com a utilização do método PRA- <i>hsp65</i> .....	90
<b>Figura 15.</b> Distribuição por faixa etária e gênero dos pacientes internados com diagnóstico de TB no Hospital Nereu Ramos. ....	93
<b>Figura 16.</b> Grau de escolaridade dos pacientes internados com TB no Hospital Nereu Ramos. ....	94
<b>Figura 17.</b> Formas extrapulmonares de TB ocorridas em pacientes internados no Hospital Nereu Ramos e coinfeção pelo HIV. ....	96
<b>Figura 18.</b> Comorbidades associadas à TB em pacientes internados no Hospital Nereu Ramos. ....	96
<b>Figura 19.</b> Tempo de internação por TB no Hospital Nereu Ramos. ...	98
<b>Figura 20.</b> Tempo mediano de internação por TB no Hospital Nereu Ramos, de acordo com o tipo de entrada. ....	99



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Classificação e patogenicidade das espécies de micobactérias.....	31
<b>Quadro 2.</b> Principais espécies de MNT e seus sítios de acometimento. .....	40
<b>Quadro 3.</b> Amostras de MNT com resultados de identificação discordantes entre MMSA e PRA- <i>hsp65</i> e confirmação da espécie por sequenciamento de DNA.....	75



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies de MNT identificadas, pelo método PRA- <i>hsp65</i> , em cada Complexo/Grupo.....	76
<b>Tabela 2.</b> Espécies de MNT identificadas, de acordo com o sítio de isolamento. ....	77
<b>Tabela 3.</b> Distribuição das espécies de MNT identificadas de acordo com a região do Estado. ....	79
<b>Tabela 4.</b> Isolados de MNT sem informações clínicas e casos de notificação de TB. ....	81
<b>Tabela 5.</b> Resultados da PCR convencional estratificados de acordo com os resultados da baciloscopia, tempo de tratamento e coinfeção pelo HIV.....	85
<b>Tabela 6.</b> Resultados da PCR em tempo real estratificados de acordo com os resultados da baciloscopia, tempo de tratamento e coinfeção pelo HIV.....	87
<b>Tabela 7.</b> Capacidade de identificação da espécie, diretamente de amostras de escarro, pelo MMSA, estratificada de acordo com os resultados da baciloscopia, tempo de tratamento e coinfeção pelo HIV. ....	89
<b>Tabela 8.</b> Capacidade de identificação da espécie, diretamente de amostras de escarro, pelo PRA- <i>hsp65</i> , estratificada de acordo com os resultados da baciloscopia, tempo de tratamento e coinfeção pelo HIV. ....	91
<b>Tabela 9.</b> Comparação entre os métodos PRA- <i>hsp65</i> e MMSA para identificação de espécie de micobactéria diretamente de amostras de escarro. ....	92
<b>Tabela 10.</b> Distribuição da forma clínica da TB de acordo com a sorologia para HIV.....	95
<b>Tabela 11.</b> Tipo de entrada para internação de pacientes com TB segundo a positividade para o HIV. ....	97



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS	American Thoracic Society
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DFC	Dose fixa combinada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNR	Hospital Nereu Ramos
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IFN- $\gamma$	Interferon gama
LACEN/SC	Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina
LBMM/CCS/UFSC	Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Santa Catarina
LJ	Löwenstein-Jensen
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MCR	Micobactérias de crescimento rápido
	<i>Mycobacteria Mobility Shift Assay</i> – Ensaio da Mobilidade Eletroforética de Fitas Heteroduplas de DNA
MNT	Micobactérias Não-Tuberculosas

mRNA	RNA mensageiro
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NALC	N-acetil-L-cisteína
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PNB	Ácido $\rho$ -nitrobenzóico
PRA- <i>hsp65</i>	<i>Polymorphism Restriction Analysis of hsp65 gene</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose Multirresistente
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	29
<b>2.1 Micobactérias.....</b>	<b>29</b>
<i>2.1.1 Taxonomia e classificação.....</i>	<i>30</i>
<i>2.1.2 Complexo Mycobacterium tuberculosis.....</i>	<i>31</i>
<i>2.1.2.1 Tuberculose.....</i>	<i>32</i>
<i>2.1.2.1.1 Manifestações clínicas.....</i>	<i>34</i>
<i>2.1.2.1.2 Epidemiologia.....</i>	<i>34</i>
<i>2.1.2.1.3 Tratamento.....</i>	<i>36</i>
<i>2.1.3 Micobactérias Não-Tuberculosas.....</i>	<i>36</i>
<i>2.1.3.1 Micobacterioses.....</i>	<i>38</i>
<i>2.1.3.1.1 Manifestações clínicas.....</i>	<i>41</i>
<i>2.1.3.1.2 Epidemiologia.....</i>	<i>42</i>
<i>2.1.3.1.3 Tratamento.....</i>	<i>43</i>
<i>2.1.4 Diagnóstico laboratorial de micobactérias.....</i>	<i>44</i>
<i>2.1.4.1 Diagnóstico microbiológico.....</i>	<i>44</i>
<i>2.1.4.1.1 Baciloscopia.....</i>	<i>44</i>
<i>2.1.4.1.2 Cultura.....</i>	<i>45</i>
<i>2.1.4.1.3 Identificação fenotípica.....</i>	<i>46</i>
<i>2.1.4.2 Diagnóstico molecular.....</i>	<i>49</i>
<i>2.1.4.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</i>	<i>50</i>
<i>2.1.4.2.2 PCR seguida de análise de restrição – PCR PRA-hsp65..</i>	<i>52</i>
<i>2.1.4.2.3 MMSA – Mycobacteria Mobility Shift Assay.....</i>	<i>53</i>
<i>2.1.4.2.4 Sequenciamento de DNA.....</i>	<i>55</i>
<i>2.1.4.3 Diagnóstico imunológico.....</i>	<i>56</i>
3 JUSTIFICATIVA.....	57

4 OBJETIVOS.....	59
4.1 Objetivo geral.....	59
4.2 Objetivos específicos.....	59
5 METODOLOGIA.....	61
5.1 Aspectos éticos.....	61
5.2 Amostragem e critérios de inclusão.....	61
5.2.1 Laboratório de Referência.....	61
5.2.2 Hospital de Referência.....	62
5.3 Baciloscopia.....	64
5.4 Cultura para micobactérias.....	65
5.5 Extração de DNA.....	65
5.6 PCR para controle da qualidade do DNA.....	66
5.7 PCR convencional 16S rRNA.....	67
5.8 PCR em tempo real.....	67
5.9 Quantificação de DNA.....	68
5.10 MMSA.....	68
5.11 PCR seguida de análise de restrição – PRA- <i>hsp65</i> .....	69
5.12 Sequenciamento de DNA.....	70
5.13 Análise estatística.....	71
6 RESULTADOS.....	73
6.1 Laboratório de Referência.....	73
6.1.1 Micobacterioses.....	79
6.1.2 Contaminação ou colonização.....	80
6.1.3 Isolados sem informações.....	81
6.2 Hospital de Referência.....	81
6.2.1 Avaliação de técnicas diagnósticas.....	82
6.2.1.1 Baciloscopia.....	82



6.2.1.2 PCR controle.....	82
6.2.1.3 PCR convencional 16S rRNA.....	83
6.2.1.4 PCR em tempo real.....	85
6.2.1.5 MMSA.....	88
6.2.1.6 PRA-hsp65.....	89
<b>6.2.2 Determinação da ocorrência de doença pulmonar causada por MNT em pacientes internados com diagnóstico de TB.....</b>	<b>92</b>
<b>6.2.3 Perfil dos pacientes internados com diagnóstico de infecção por micobactérias.....</b>	<b>93</b>
6.2.3.1 Perfil dos pacientes internados com diagnóstico de TB.....	93
6.2.3.2 Perfil dos pacientes internados com diagnóstico de micobacteriose.....	99
7 DISCUSSÃO.....	101
<b>7.1 Laboratório de Referência.....</b>	<b>101</b>
<b>7.2 Hospital de Referência.....</b>	<b>106</b>
7.2.1 Avaliação de técnicas diagnósticas.....	106
<b>7.2.2 Determinação da ocorrência de doença pulmonar causada por MNT em pacientes internados com diagnóstico de TB.....</b>	<b>114</b>
7.2.3 Perfil dos pacientes internados com diagnóstico de TB.....	115
7.2.4 Perfil dos pacientes internados com micobacteriose.....	120
8 CONCLUSÃO.....	123
REFERÊNCIAS.....	125
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	149



## 1 INTRODUÇÃO

As micobactérias compreendem um grupo de mais de 150 espécies de bactérias, incluindo patogênicas, oportunistas e não patogênicas. Aquelas pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) são responsáveis por causar Tuberculose (TB), enquanto as Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) podem causar micobacterioses (BROSCH et al., 2002; McGRATH et al., 2010).

A TB é uma doença infecto-contagiosa que acomete principalmente os pulmões, podendo atingir outros sítios anatômicos ou ocorrer de maneira disseminada. Sua transmissão se dá pela inalação de aerossóis produzidos pela pessoa infectada e portadora de TB pulmonar bacilífera, por meio de tosse, espirro ou fala (BROSCH et al., 2002; CAMPOS, 2006).

Aproximadamente a terça parte da população mundial abriga o bacilo da TB. Em 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a ocorrência de 8,8 milhões de novos casos e cerca de 1,4 milhões de óbitos devido à doença (WHO, 2011a). A expansão global da TB determinou o lançamento, pela Organização Mundial da Saúde, do Plano Global Stop TB 2006-2015, visando reverter a incidência da TB até 2015, por meio da expansão da Estratégia do Tratamento Supervisionado da Tuberculose (DOTS), da detecção de resistência aos tuberculostáticos, em ações de grupos de trabalho na coinfeção TB/HIV e no desenvolvimento e avaliação de novas metodologias diagnósticas (WHO, 2006).

As MNT constituem um grupo muito heterogêneo de bactérias. Sua importância vem aumentando progressivamente, com o isolamento de diferentes espécies em laboratórios de diagnóstico (TORTOLI, 2003; WINTHROP, 2010). Estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser isoladas de diversos sítios do corpo humano, como saprófitas ou causando infecções oportunistas (KATOCH, 2004; FALKINHAM, 2009). Clinicamente, causam doença indistinguível da TB; entretanto, diferem em relação ao tratamento, uma vez que cada espécie de MNT apresenta um perfil específico de susceptibilidade aos antimicrobianos. Por isso, a identificação da espécie de micobactéria é fundamental sob o ponto de vista clínico, visando a adoção da conduta terapêutica adequada (GRIFFITH et al., 2007; TORTOLI, 2009).

O diagnóstico inicial da doença micobacteriana é baseado em dados clínicos. Entretanto, o diagnóstico definitivo depende do

isolamento e da identificação laboratorial da micobactéria. Devido ao lento crescimento das micobactérias, o isolamento, a identificação e os testes de sensibilidade podem demorar seis semanas ou mais, sendo recomendada a inclusão de testes moleculares nas rotinas laboratoriais. Estas observações reforçam a importância da pesquisa para o desenvolvimento e avaliação de técnicas rápidas para diagnóstico e identificação das diferentes micobactérias causadoras de doença, especialmente as técnicas capazes de detectar o bacilo diretamente de amostras clínicas (SOINI & MUSSER, 2001; CONDE et al., 2009; WILSON, 2011).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Micobactérias

As micobactérias são microrganismos que apresentam forma bacilar com dimensões que variam de  $0,2\mu\text{m}$  a  $0,6\mu\text{m}$  de largura e  $1\mu\text{m}$  a  $10\mu\text{m}$  de comprimento. São bacilos delgados, retos ou ligeiramente curvos, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e incapazes de formar esporos, conídeos ou cápsulas. O tempo de multiplicação é, geralmente, lento (em média de 18 a 20 horas) e apresenta grande variação dentro do gênero, o que permite dividi-las em micobactérias de crescimento rápido (MCR - crescimento visível em menos de sete dias) e em micobactérias de crescimento lento (crescimento visível em mais de sete dias) (LEÃO et al., 2004; BARRERA, 2007).

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

Esta característica tintorial deve-se ao alto teor de lipídeos – cerca de 60% do seu peso seco – que integra a sua parede celular, composta basicamente por uma membrana citoplasmática recoberta por espessa camada de peptidoglicano (ácido N-glicililmurâmico), o qual se encontra covalentemente ligado às cadeias de arabinogalactano que, por sua vez, estão esterificadas na sua extremidade com ácidos graxos de cadeia longa, os ácidos micólicos. Estes são os principais responsáveis por conferir às micobactérias resistência à descoloração por álcool-ácido, assim como a resistência à ação de diversos agentes químicos e antimicrobianos e a capacidade de formar aerossóis e biofilmes (BARRERA, 2007; COOK et al., 2009; FALKINHAM, 2009).

### 2.1.1 Taxonomia e classificação

Em 1896, Lehmann e Neumann propuseram a criação do gênero *Mycobacterium*, visando a inclusão dos bacilos da tuberculose e da hanseníase, até então classificados como *Bacterium tuberculosis* e *Bacterium leprae*. Este gênero faz parte da família *Mycobacteriaceae* e está posicionado taxonomicamente na subordem *Corynebacterineae*, que pertence à ordem *Actinomycetales*, da subclasse *Actinobacteridae*, da classe e do filo *Actinobacteria*, do domínio *Bacteria*. Esta taxonomia baseia-se em três critérios: resistência à descoloração por álcool-ácido, síntese de ácidos micólicos e porcentagem de citosina e guanina (C+G) do DNA genômico compreendida entre 61mol% e 71mol% (LEÃO et al., 2004; BARRERA, 2007; EUZÉBY, 2011).

O gênero *Mycobacterium* tem sofrido atualizações constantes. A ele pertencem, atualmente, 154 espécies e 13 subespécies (EUZÉBY, 2011). É constituído pelo *M. leprae*, por espécies que compõem o Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e outras micobactérias denominadas Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) (BROSCH et al., 2002; McGRATH et al., 2010).

Conforme sua patogenicidade em seres humanos, as micobactérias foram classificadas, por Kazda, em três grupos: estritamente patogênicas, potencialmente patogênicas e raramente patogênicas ou saprófitas. As espécies estritamente patogênicas incluem as do CMTB e *M. leprae*, e as classificadas como potencialmente patogênicas e patógenos raros compreendem as MNT (Quadro 1) (BRASIL, 2008a).

**Quadro 1.** Classificação da patogenicidade das espécies de micobactérias

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

Fonte: BRASIL, 2008a.

### 2.1.2 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, principal agente da tuberculose (TB) humana; *M. bovis*, principal agente da TB bovina e também agente da TB humana; *M. bovis*-BCG (*Bacille Calmette-Guérin*), cepa atenuada utilizada na vacinação antituberculosa; *M. africanum*, agente da TB humana encontrado mais frequentemente no continente Africano; *M. caprae*, causador de TB em caprinos e humanos; *M. microti*, que causa

TB em roedores e em humanos; *M. pinnipedii*, agente da TB em leões marinhos e humanos; *M. canettii*, variante de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália; e *M. mungi*, espécie descrita recentemente como causadora de TB em mangustos listrados (*Mungos mungo*) em Botsuana (BROSCH et al., 2002; BARRERA, 2007; ALEXANDER et al., 2010). As espécies deste complexo são consideradas estritamente patogênicas; não conseguem sobreviver no meio ambiente por longo período e, por isso, causam infecção no homem e/ou animais (ROSEMBERG & TARANTINO, 2002).

O CMTB é caracterizado por apresentar 99,9% de similaridade genética entre as espécies e compartilhar a mesma sequência da região 16S rRNA. No entanto, as espécies apresentam diferenças quanto aos reservatórios naturais, à patogenicidade e às características fenotípicas e epidemiológicas (NIEMANN, RICHTER & RÜSCH-GERDES, 2000; BROSCH et al., 2002; MOSTOWY & BEHR, 2005).

### 2.1.2.1 Tuberculose

A TB é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica, causada pelas espécies de micobactérias que compõem o CMTB. Acomete principalmente os pulmões (TB pulmonar), podendo também atingir outros sítios anatômicos (TB extrapulmonar) ou ocorrer de maneira disseminada (TB miliar) (WHO, 2011a).

A transmissão se dá por via aérea, pela inalação de aerossóis produzidos pela pessoa infectada e portadora da TB pulmonar ativa, por meio de tosse, espirro ou fala. Os bacilos presentes nestas secreções são atomizados em partículas (gotículas de *Flügge*) que, após sofrerem evaporação, permanecem em suspensão no ar, na forma de um núcleo infeccioso (núcleo de *Wells*), de 2 a 10 µm de diâmetro, composto de 1 ou 2 bacilos. Após a inalação, os bacilos são levados até a árvore brônquica e atingem os alvéolos, onde iniciarão o processo patológico da doença, caso consigam ultrapassar os mecanismos de defesa inespecíficos e multiplicar-se dentro do macrófago alveolar. Se isso ocorrer, será gerada uma reação inflamatória local que levará à formação de um foco pulmonar. A partir deste foco ocorrerá a disseminação linfática até o gânglio satélite (foco ganglionar), de onde poderá haver disseminação hematogênica para todo o organismo, podendo resultar em formas extrapulmonares e TB disseminada (CAMPOS, 2006; PANDOLFI et al., 2007; PHILIPS & ERNST, 2011).



O pulmão é o primeiro órgão a ser atingido pelos bacilos, além de possibilitar condições ideais para o seu crescimento; assim, em 90% das vezes a doença aí se localiza. A transmissão é plena enquanto o paciente estiver eliminando bacilos e não tiver iniciado o tratamento. Com o esquema terapêutico recomendado, a infectividade é reduzida, gradativamente, a níveis insignificantes, ao fim de poucos dias ou semanas. A transmissibilidade inter-humana ocorre apenas na forma pulmonar e na forma laríngea, portanto, as formas extrapulmonares não são transmissíveis por via aerógena (ROSEMBERG & TARANTINO, 2002; CAMPOS, 2006; PANDOLFI et al., 2007; BRASIL, 2010a).

A instalação de uma lesão progressiva está diretamente ligada ao grau da lesão pulmonar que, por sua vez, é proporcional à quantidade do inóculo do bacilo e à virulência da cepa e inversamente proporcional à resistência natural e adquirida do hospedeiro. Aproximadamente 5% dos indivíduos infectados pela TB desenvolverão a doença num período de dois a cinco anos (TB primária) e, no restante da população infectada, o bacilo ficará dormente, podendo reativar-se tardiamente conforme as condições imunitárias do hospedeiro (CAMPOS, 2006; PHILIPS & ERNST, 2011).

A pandemia pelo HIV, devido ao desenvolvimento da imunodeficiência, favoreceu o aumento de novos casos de TB. Uma complexa interação entre *M. tuberculosis* e HIV ocorre em pacientes coinfectados, o que resulta em um sinergismo que leva ao agravamento de ambas as infecções: a imunodeficiência causada pelo HIV promove a progressão da TB latente para TB doença, enquanto *M. tuberculosis* favorece o aumento da replicação e acelera a evolução natural do HIV (PALMERO, 2007; KWAN & ERNST, 2011). Estudos demonstraram que pacientes HIV-soropositivos coinfectados com TB apresentam 21-34 vezes mais chances de desenvolver TB doença em relação a pacientes HIV-soronegativos (WHO, 2011a). Assim, a infecção pelo HIV é considerada o maior fator de risco para TB, e suas altas taxas de prevalência são significativamente correlacionadas com altas taxas de incidência de TB (KWAN & ERNST, 2011). Isto causa impacto no controle da TB e também no aumento da frequência das formas graves, extrapulmonares e disseminadas na manifestação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) (LOPES et al., 2006; RAGHAVAN et al., 2011).

A TB também é a maior causa de morte em pacientes coinfectados pelo HIV (KWAN & ERNST, 2011). Em virtude das elevadas taxas de morbidade e mortalidade por TB em indivíduos HIV-soropositivos, a detecção, o tratamento e a prevenção da TB tornaram-se

prioridades nos programas nacionais de controle da infecção pelo HIV e Aids (WHO, 2009).

#### 2.1.2.1.1 Manifestações clínicas

Alguns pacientes com TB pulmonar não demonstram nenhum indício da doença e outros apresentam sintomas aparentemente simples, que são ignorados durante alguns meses ou anos. Na maioria dos casos, os sinais e sintomas mais frequentes são tosse seca e contínua no início, seguida por presença de secreção por mais de três semanas, astenia, febre baixa, geralmente vespertina, sudorese noturna, inapetência, palidez, emagrecimento acentuado e prostração. Nos casos graves, os pacientes podem apresentar dispneia, hemoptise maciça e empiema pleural (GUTIERREZ et al., 2001).

As formas extrapulmonares podem ocorrer isoladamente ou concomitantes com a TB pulmonar. Dentre as mais frequentes, estão: pleural, linfática, osteoarticular, peritoneal, pericárdica, ganglionar, geniturinária, meníngea, oftálmica, cutânea e intestinal, embora praticamente qualquer local do organismo possa ser afetado pela doença (GUTIERREZ et al., 2001; LOPES et al., 2006). Com o advento da Aids, estas formas tiveram grande aumento na sua incidência, acometendo cerca de 50% dos pacientes coinfectados pela TB/HIV (SHARMA & MOHAN, 2004; GOLDEN et al., 2005).

#### 2.1.2.1.2 Epidemiologia

Estima-se que aproximadamente a terça parte da população mundial abrigue o bacilo da TB. Em 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a ocorrência de 8,8 milhões de novos casos de TB (média de 128 casos por 100.000 habitantes), dos quais 6,2 milhões foram notificados e 13% ocorreram em pacientes HIV-soropositivos. Também foram estimados cerca de 1,4 milhões de óbitos devido à TB neste mesmo ano, sendo 1,1 milhões em pacientes HIV-soronegativos e 0,35 milhões em HIV-soropositivos (WHO, 2011a).

A OMS classifica os países com alta carga de TB pelo número absoluto de novos casos da doença, sendo Índia, China, África do Sul, Indonésia e Paquistão os cinco primeiros da lista. O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB

no mundo (High-Burden Countries – HBCs), com uma média de 43 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2011a).

No Brasil, as maiores incidências no ano de 2010 deram-se nos Estados do Rio de Janeiro (69,8 casos/100.000 habitantes), Amazonas (65,8 casos/100.000 habitantes), Pernambuco (46,0 casos/ 100.000 habitantes), Pará (46,0 casos/ 100.000 habitantes) e Rio Grande do Sul (44,8 casos/ 100.000 habitantes) (BRASIL, 2011a). Embora o tratamento da TB seja praticamente ambulatorial, a doença é a nona causa de hospitalização (BOMBARDA, 2009) e a terceira de mortalidade por doenças infecciosas no país (BRASIL, 2011a).

Em Santa Catarina, foram notificados, no ano de 2009, 1.700 casos novos de TB. O Estado encontra-se entre aqueles com as mais baixas taxas de incidência da doença (27,8/100.000 habitantes), porém, a distribuição dos casos é heterogênea. Alguns municípios apresentam taxas iguais e/ou superiores às do Brasil e de outros países nos quais a situação da TB é muito grave, como por exemplo, Itajaí e Florianópolis, com 78,6 e 42,4 casos/100.000 habitantes, respectivamente. A taxa de coinfeção com HIV é de 21% (DIVE, 2009).

A expansão global da TB determinou o lançamento, pela OMS, do Plano Global Stop TB 2006-2015, que pretende reverter a incidência da TB até 2015, por meio da expansão da Estratégia do Tratamento Supervisionado da Tuberculose (DOTS), da detecção de resistência aos tuberculostáticos, de ações de grupos de trabalho na coinfeção TB/HIV e no desenvolvimento e avaliação de novas técnicas diagnósticas. Seus principais objetivos são reduzir as taxas de prevalência da TB e de óbitos devido à doença em 50%, em comparação às taxas de 1990, até 2015, e reduzir a incidência anual global de TB ativa para <1 caso por 1 milhão de habitantes até 2050 (WHO, 2006).

Dados da OMS demonstraram que os números absolutos de casos novos de TB estão sendo reduzidos desde 2006 e que as taxas de incidência da doença vêm diminuindo desde 2002, a uma taxa de 1,3% ao ano. Ainda, as taxas de mortalidade também estão diminuindo. Caso essa tendência seja mantida, as metas da OMS em relação à mortalidade da TB poderão ser atingidas até 2015, com exceção do continente Africano. Entretanto, é improvável que as metas direcionadas à redução da prevalência da doença sejam atingidas até 2015, embora seus índices também apresentem queda ao longo dos anos (WHO, 2011a).

### 2.1.2.1.3 Tratamento

O tratamento da TB é baseado em quimioterapia e visa eliminar o foco da infecção e interromper a cadeia de transmissão. A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os meios para evitar a persistência bacteriana e a seleção de cepas resistentes aos fármacos (BRASIL, 2002).

Em outubro de 2009, foi implantado no Brasil um novo esquema de tratamento da TB, chamado DFC (dose fixa combinada), que combina quatro fármacos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) em um único comprimido. Esta combinação compõe o primeiro esquema de tratamento e o uso desta medicação está preconizado para os primeiros 60 dias de terapia; o restante do tratamento (quatro meses) é feito com rifampicina e isoniazida, também em um único comprimido (BRASIL, 2010a).

Em casos de monorresistência (resistência a rifampicina ou isoniazida) e polirresistência (resistência a rifampicina ou isoniazida e mais outro fármaco), devem ser adotados protocolos de acordo com o fármaco ao qual há a resistência. Em casos de TB multirresistente (TBMR - resistência a rifampicina e isoniazida ou estes e outros fármacos de primeira linha), é utilizado o esquema SELZT (estreptomicina, etambutol, levofloxacina, rifampicina e terizidona), com duração de 18 meses. Já nos casos de TB extensivamente resistente (XDR), há resistência a rifampicina, isoniazida, qualquer fluoroquinolona e mais um dos três fármacos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina e capreomicina), e o tratamento deve ser individualizado com fármacos de reserva e avaliado por profissionais experientes no manejo deste tipo de paciente (BRASIL, 2010a).

### **2.1.3 *Micobactérias Não-Tuberculosas***

O grupo das MNT inclui as espécies de micobactérias que não são *M. leprae* nem os membros do CMTB. Inicialmente chamadas de micobactérias atípicas, receberam várias denominações, como ambientais, oportunistas, micobactérias que não o bacilo da tuberculose (*Mycobacteria other than tubercle bacilli* – MOTT) e micobactérias não-tuberculosas (MNT), sendo esta denominação a mais utilizada e aceita na atualidade (CHEMLAL & PORTAELS, 2003; KATOCH, 2004). Este é um grupo muito heterogêneo, que apresenta bactérias com

grande variação em relação ao tempo de crescimento, morfologia de colônias, sensibilidade a antibióticos e agentes desinfetantes, virulência e carreamento de plasmídeos (PRIMM et al., 2004).

Ao contrário do CMTB, as MNT estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em água (encanada e de reservatórios naturais), solo, pedras, aerossóis, protozoários e em muitas espécies animais. Também podem ser isoladas de diversos sítios do corpo humano, como saprófitas ou causando infecções oportunistas (KATOCH, 2004; PRIMM et al., 2004; FALKINHAM, 2009).

A maioria das MNT é capaz de multiplicar-se mesmo em condições de escassez nutricional, altas temperaturas e extremos de pH. Além disso, devido à hidrofobicidade de sua parede celular, são resistentes ao glutaraldeído e aos processos de cloração utilizados para o tratamento de água e, ainda, possuem a capacidade de formar biofilme como um mecanismo de sobrevivência (GROOTE & HUITT, 2006; FALKINHAM, 2009; TAIWO & GLASSROTH, 2010). O impacto destas características pode ser observado, por exemplo, em estudos que demonstraram o isolamento de MNT, principalmente *M. avium*, em redes de fornecimento de água tratada para consumo humano, que se tornam fonte de infecção dessas micobactérias (PRIMM et al., 2004; FALKINHAM, 2009).

Runyon, em 1954, foi o primeiro a propor uma classificação para as MNT, baseando-se na velocidade do crescimento colonial *in vitro* e na produção de pigmento, dependente ou não de exposição à luz. Com base nesses critérios, foram criados quatro grupos: três de crescimento lento (Grupos I, II e III, que requerem de duas a seis semanas de incubação para apresentar crescimento colonial visível) e um de crescimento rápido (Grupo IV). O Grupo I engloba as micobactérias fotocromógenas, que produzem pigmento somente após a exposição à luz. São exemplos deste grupo *M. kansasii* e *M. marinum*. No Grupo II, encontram-se as micobactérias escotocromógenas, que produzem pigmento tanto na presença quanto na ausência de luz, como *M. scrofulaceum*, *M. gordonae* e *M. szulgai*. No Grupo III, estão as micobactérias acromógenas, que geralmente apresentam crescimento extremamente lento, como *M. avium*, *M. malmoense* e *M. terrae*. O Grupo IV abrange as espécies que possuem a capacidade de crescer em dois a sete dias. Suas colônias são geralmente lisas e podem ser pigmentadas, como *M. vaccae* e *M. parafortuitum*, ou não pigmentadas, como *M. fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae* (GENTRY, 2005; JARZEMBOWSKI & YOUNG, 2008).

Devido a similaridades fenotípicas, relação de antígenos citoplasmáticos e homologia do DNA, algumas espécies de MNT também podem ser agrupadas em complexos. Pode-se citar o Complexo *M. avium* (MAC), que agrupa *M. avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*, e o Complexo *M. terrae*, que agrupa *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale* (BRASIL, 2008a).

Determinadas espécies de crescimento rápido foram reunidas em três grupos: Grupo *M. fortuitum*, Grupo *M. smegmatis* e Grupo *M. chelonae-abscessus*. Neste caso, o termo grupo é mais bem aceito do que o termo complexo em virtude dos fatores considerados para esta classificação: os aspectos clínicos da doença causada e a sensibilidade aos antimicrobianos. O Grupo *M. fortuitum* compreende as espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense*, *M. boenickei* e *M. conceptionense*, espécies usualmente sensíveis a fluorquinolonas, doxiciclina, amicacina, imipenem, linezolida e sulfametoxazol. O Grupo *M. smegmatis* inclui as espécies *M. smegmatis*, *M. goodii* e *M. wolinskyi*, resistentes à claritromicina e sensíveis a quinolonas, amicacina, imipenem, linezolida e sulfametoxazol. O Grupo *M. chelonae-abscessus* abrange as espécies *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. immunogenum*, frequentemente resistentes a fluorquinolonas, sulfametoxazol, doxiciclina e sensíveis a claritromicina, amicacina, tigeciclina e imipenem (BOWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002; BRASIL, 2009a).

### 2.1.3.1 Micobacterioses

As MNT podem causar uma variedade de doenças, chamadas micobacterioses, que podem afetar humanos e animais e que diferem em gravidade e importância para saúde pública de acordo com sua virulência. Este grupo é responsável por um amplo espectro de manifestações, que incluem infecções de pele e tecidos moles, infecções pulmonares crônicas e progressivas, infecções gastrointestinais, linfadenites em crianças e, especialmente em pacientes imunodeprimidos, infecções disseminadas (KATOCH, 2004; JHONSON et al., 2008; SALEEB & OLIVIER, 2010).

As MNT não são patógenos obrigatórios e sua transmissão interpessoal nunca foi demonstrada. Portanto, as micobacterioses não

são consideradas doenças contagiosas. Em consequência da distribuição ubíqua das MNT, as infecções ocorrem de forma oportunista e, assim, as fontes ambientais têm grande importância na sua transmissão (FALKINHAM, 2009; McGRATH, 2010).

Apesar de descritas mais de 140 espécies de MNT, grande parte delas ainda não foi associada como causadora de infecções em humanos. Devido ao amplo espectro de virulência deste grupo, as espécies associadas com doença podem ser consideradas desde patógenos primários, como por exemplo, *M. kansasii*, capaz de causar infecções em indivíduos saudáveis; causadores de doença em indivíduos com fatores predisponentes, como *M. avium*; até espécies raramente associadas com doença, como por exemplo, *M. gordonae* (AREND, van SOOLINGEN & OTTENHOFF, 2009). O quadro 2 apresenta as principais MNT associadas a infecções em humanos e seus sítios mais e menos comuns de acometimento (GENTRY, 2005).

Diversos fatores podem levar a um aumento na susceptibilidade à infecção por MNT. Dentre eles, destacam-se doenças pulmonares preexistentes, imunossupressão e defeitos genéticos relacionados à imunidade celular (KATOCH, 2004; AREND, van SOOLINGEN & OTTENHOFF, 2009; ALVAREZ-URIA, 2010).

O pulmão é o órgão mais frequentemente acometido pelas MNT. A doença pulmonar ocorre pela inalação de aerossóis contendo os bacilos, geralmente em pacientes com doença pulmonar pré-existente, como por exemplo, fibrose cística, bronquiectasia, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e pneumoconiose. As principais espécies relacionadas à doença pulmonar são aquelas pertencentes ao MAC, além de *M. kansasii*, *M. xenopi* e *M. malmoense*, sendo as duas últimas mais frequentes na Europa (KATOCH, 2004; AREND, van SOOLINGEN & OTTENHOFF, 2009; TORTOLI, 2009; ALVAREZ-URIA, 2010; GRIFFITH, 2010).

A doença disseminada, que pode apresentar acometimento pulmonar ou não, está normalmente relacionada a distúrbios no sistema imune celular, tais como infecção pelo HIV (em pacientes com contagem de CD4 inferior a 100 células/ $\mu$ L), doenças genéticas relacionadas a mutações em interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-12 (IL-12) e uso de fármacos imunossupressores. Geralmente, esta é associada a espécies de crescimento lento, principalmente *M. avium*, MNT que foi um dos primeiros agentes relatados como causador de infecção disseminada em pacientes com Aids (GENTRY, 2005; AREND, van SOOLINGEN & OTTENHOFF, 2009; TORTOLI, 2009).

**Quadro 2.** Principais espécies de MNT e seus sítios de acometimento.

<b>MNT (crescimento lento)</b>	<b>Sítios mais comuns</b>	<b>Sítios menos comuns</b>
Complexo <i>M. avium</i>	Pulmões, linfonodos, infecção disseminada <sup>1</sup>	Pele
<i>M. genavense</i>	Gastrointestinal <sup>1</sup> , infecção disseminada <sup>1</sup>	Pulmões <sup>1</sup>
<i>M. haemophilum</i>	Linfonodos (cervicais), pele, pulmões, ossos, articulações, infecção disseminada <sup>1</sup>	Intraocular
<i>M. kansasii</i>	Pulmões, infecção disseminada <sup>1</sup>	Pele, linfonodos
<i>M. leprae</i>	Pele, linfonodos	
<i>M. malmoeense</i>	Pulmões	Linfonodos, pele, ossos, articulações, infecção disseminada <sup>1</sup>
<i>M. marinum</i>	Pele	Linfonodos, espaço articular, infecção disseminada <sup>1</sup>
<i>M. scrofulaceum</i>	Linfonodos (cervicais)	Pulmões, pele, infecção disseminada <sup>1</sup>
<i>M. ulcerans</i>	Pele	Infecção disseminada <sup>1</sup>
<i>M. xenopi</i>	Pulmões	Linfonodos, espaço articular, infecção disseminada <sup>1</sup>
<b>MNT (crescimento rápido)</b>	<b>Sítios mais comuns</b>	<b>Sítios menos comuns</b>
<i>M. chelonae</i>	Pele, cateter, infecção disseminada <sup>1</sup>	Pulmões
<i>M. abscessus</i>	Pele, ossos, articulações, cateter, infecção disseminada	Pulmões
<i>M. fortuitum</i>	Pele, cateter	Pulmões, linfonodos, ossos, articulações, olhos
<i>M. massiliense</i>	Pele, articulações	Pulmões

<sup>1</sup> Infecção oportunista com imunocomprometimento severo.

Fonte: GENTRY, 2005.

Além da inalação de aerossóis, outra forma de transmissão das MNT é a inoculação pós-traumática. A habilidade das MNT de sobreviver e multiplicar-se em fluidos aquosos e em alguns desinfetantes (como o glutaraldeído) as torna potenciais agentes de infecções hospitalares e causadoras de surtos e pseudo-surtos importantes. Falhas nos procedimentos de limpeza, desinfecção e esterilização de instrumentos ou equipamentos cirúrgicos têm sido apontadas como principais fatores desencadeantes do processo infeccioso. Com isso, pode ocorrer infecção por quebra da barreira corneana, cutânea ou mucosa, decorrente de procedimentos médicos para fins terapêuticos (cirurgias laparoscópicas e endoscopia, por



exemplo) ou para fins estéticos (cirurgias plásticas e implantes). Este tipo de infecção acomete a pele e outros tecidos moles e está normalmente associado às MCR (principalmente *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*), mas pode também ser causado por micobactérias de crescimento lento, como *M. avium* e *M. xenopi* (GENTRY, 2005; DUARTE et al., 2009; COOK, 2010).

#### 2.1.3.1.1 Manifestações clínicas

Na doença pulmonar, dois quadros distintos podem ocorrer. No primeiro, em pacientes HIV-soronegativos, a doença normalmente é indistinguível da TB e é caracterizada por uma progressão lenta. Suas manifestações podem variar desde a ausência de sinais e/ou sintomas até a presença de cavitações pulmonares e o raio-X pode revelar lesões como fibrose, cavitação em lobo superior, opacidade nodular ou parenquimatosa e espessamento da pleura. Os sinais e sintomas incluem tosse, febre, perda de peso, fraqueza e insuficiência respiratória. A população mais afetada, nesse caso, é de pacientes idosos e com doença pulmonar pré-existente. O segundo quadro ocorre em pacientes com Aids, nos quais os dados radiográficos frequentemente são normais e a progressão ocorre rapidamente, com sintomas como tosse, febre e perda de peso (TORTOLI, 2009).

As micobacterioses extrapulmonares podem ocorrer na forma de adenopatias, nódulos, abscessos, ulcerações, bursites, lesões geniturinárias, meningite e lesões disseminadas (ROSEMBERG & TARANTINO, 2002).

Na pele, normalmente, a infecção ocorre por inoculação traumática, cirúrgica ou não. O período de incubação pode variar de 2 semanas a 12 meses. A infecção manifesta-se por lesões nodulares próximas ao local do trauma ou pelo aparecimento de secreção serosa na deiscência ou na cicatriz. Evolui com aspecto inflamatório crônico e granulomatoso, podendo formar abscessos. Geralmente não há febre, sendo o sinal mais comum o aparecimento de secreção no local da incisão. A lesão poderá estar restrita à epiderme e à derme, estar presente em todo o trajeto cirúrgico, inclusive com implantação em parede abdominal, articulações ou em outras cavidades e, em casos de baixa imunidade, acometer tecidos mais profundos (GUTIERREZ et al., 2001; ROSEMBERG & TARANTINO, 2002; TORTOLI, 2009).

### 2.1.3.1.2 Epidemiologia

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

Em países desenvolvidos, nos quais a incidência de TB encontra-se em decréscimo e em fase de estabilização, os índices de infecção por MNT estão muito próximos ou até já ultrapassam aqueles de TB (AREND, van SOOLINGEN & OTTENHOFF, 2009; COOK, 2010). Marras e colaboradores (2007) reportaram um aumento no número de isolados de MNT de origem pulmonar em Ontário, Canadá, de 9,1/100.000 habitantes em 1997 para 14,1/100.000 habitantes em 2003. Durante o mesmo período, a prevalência de TB apresentou redução nos seus valores. Já em países em desenvolvimento, onde os índices de TB são maiores, as doenças causadas por MNT têm menor reconhecimento, principalmente devido às altas taxas de TB. Entretanto, também podem ser encontradas em ascensão desde que devidamente investigadas (COOK, 2010).

As espécies de MNT causadoras de doença pulmonar podem variar de acordo com a região geográfica, o que ocorre, possivelmente, devido a condições ambientais que podem favorecer seu predomínio. As espécies pertencentes ao MAC são os patógenos predominantes em grande parte das regiões. Outras importantes espécies causadoras de doença apresentam diferentes distribuições: *M. kansasii*, por exemplo, é comumente relatado nos Estados Unidos e no Reino Unido; *M. xenopi*, nos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e algumas regiões da Europa; já *M. malmoense* é comum no Reino Unido e na Europa, mas incomum nos Estados Unidos (COOK et al., 2010).

As MCR, como citado anteriormente no item 2.1.3.1, são responsáveis principalmente por infecções de pele e outros tecidos moles. No Brasil, surtos causados por esse tipo de MNT têm sido relatados desde 1998 (DUARTE et al., 2009). No período de 2000 a 2008, foram notificados 2.128 casos de infecção por MCR no país, relatados principalmente nos Estados do Rio de Janeiro (1.105 casos), Pará (321 casos), Espírito Santo (293 casos), Rio Grande do Sul (101 casos) e Goiás (70 casos) (RENISS, 2009). O agente etiológico mais comum foi *M. massiliense* (nomenclatura substituída por *M. abscessus subsp. bolletii* – LEÃO et al., 2011), com exceção dos casos de infecção secundários a mamoplastias, nos quais *M. fortuitum* foi mais frequente. Em 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou em Nota Técnica a notificação compulsória das infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido, decorrentes de procedimentos invasivos (cirúrgicos ou cosméticos) realizados em serviços de saúde do Brasil, sejam eles públicos ou privados (BRASIL, 2009a).

#### 2.1.3.1.3 Tratamento

O tratamento das micobacterioses é bastante complexo, uma vez que as MNT são naturalmente resistentes ou têm pouca sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento da TB. Esta sensibilidade ainda difere entre as espécies e entre cepas de uma mesma espécie. Por esta razão, para um tratamento eficiente, é necessário, inicialmente, fazer a identificação do agente causal, para que, de acordo com a sua sensibilidade, sejam escolhidos os fármacos a serem utilizados (GUTIERREZ et al., 2001; ROSEMBERG & TARANTINO, 2002; GRIFFITH et al., 2007).

Assim como no tratamento da TB, devem ser combinados pelo menos dois fármacos, visando evitar a seleção de cepas resistentes. Muitos são os esquemas utilizados para o tratamento das MNT, entretanto, ainda são poucos os estudos randomizados relacionados a este tema para grande parte das espécies. Sabe-se que para alguns fármacos e espécies, não há correlação da susceptibilidade *in vitro* com a resposta efetiva aos antibióticos *in vivo* (GRIFFITH, 2010).

Visando facilitar a conduta terapêutica, a *American Thoracic Society* (ATS/USA) e a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA/USA) elaboraram, em 2007, diretrizes referentes ao diagnóstico,

tratamento e prevenção de doenças causadas por MNT (*An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases*). Em relação ao tratamento, propõem esquemas para as principais espécies relatadas como causadoras de doença; trazem recomendações para a escolha da execução de testes de sensibilidade *in vitro*, principalmente devido à falta de correlação *in vitro* e *in vivo* de alguns fármacos e espécies; e trazem recomendações para o monitoramento e a duração do tratamento, que deve ser continuado por no mínimo 12 meses após a obtenção de resultado negativo na cultura (GRIFFITH et al., 2007).

#### **2.1.4 Diagnóstico laboratorial de micobactérias**

No Brasil, o diagnóstico laboratorial das micobactérias é da competência do serviço público de saúde, sendo coordenado em cada Estado pelos Laboratórios de Referência Estadual – Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN). Seus principais objetivos são: detectar casos de TB pulmonar, monitorar a evolução do tratamento e documentar a cura no fim do tratamento. Realizado de forma adequada, o diagnóstico seguido do tratamento dos pacientes bacilíferos é um dos principais meios de interromper a transmissão da TB (BRASIL, 2008a).

##### **2.1.4.1 Diagnóstico microbiológico**

Os métodos microbiológicos de baciloscopia e cultura são as técnicas empregadas na rede de laboratórios para o diagnóstico das micobactérias no Brasil. Também é realizada a identificação fenotípica da espécie de micobactéria através de testes bioquímicos e características de crescimento (BRASIL, 2008a).

###### **2.1.4.1.1 Baciloscopia**

A baciloscopia, exame básico para o achado laboratorial das micobactérias em espécimes biológicos, consiste na pesquisa direta de BAAR, geralmente pela coloração de Ziehl-Neelsen, apesar da coloração com auramina O ser a mais recomendada pela OMS. Por ser uma metodologia de execução rápida, fácil, de baixo custo e que permite

estimar o número de bacilos presentes na amostra clínica, favorece a ampla cobertura diagnóstica. Assim, identifica, no caso da TB, a principal fonte de infecção (pacientes bacilíferos), permitindo a pronta atuação na interrupção da cadeia de transmissão. Além disso, é muito importante para o acompanhamento da eficácia do tratamento (RAMACHADRAN & PARAMASIVAN, 2003; GRIFFITH et al., 2007; BRASIL, 2008a).

Sua principal desvantagem é a sensibilidade limitada, já que são necessários de 5.000 a 10.000 bacilos por mL de amostra para a obtenção de um resultado positivo. Estudos demonstraram que a sensibilidade da baciloscopia pode variar de 20 a 80%, com média de 70% em amostras pulmonares. Apresenta menores taxas de positividade em amostras paucibacilares, como por exemplo, de pacientes HIV-soropositivos, crianças e amostras extrapulmonares (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; RAMACHADRAN & PARAMASIVAN, 2003; STEINGART, RAMSAY & PAI, 2007; BENTO et al., 2011; PARSONS et al., 2011).

#### 2.1.4.1.2 Cultura

A cultura é o método bacteriológico disponível mais sensível para o diagnóstico das infecções por micobactérias, capaz de detectar a partir de 10 bacilos/mL de amostra. É considerada o padrão áureo para o diagnóstico de micobactérias e, no Brasil, é realizada quando o paciente apresenta sintomatologia sugestiva, porém baciloscopia negativa, em pacientes HIV-soropositivos, crianças e em amostras extrapulmonares. Também é realizada quando, após o início do tratamento, o paciente não apresenta resposta terapêutica adequada ou para acompanhamento do tratamento em casos de resistência aos fármacos tuberculostáticos. A partir da cultura, também é possível a identificação da espécie da micobactéria isolada e a realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (RAMACHADRAN & PARAMASIVAN, 2003; BRASIL, 2008a; PARSONS et al., 2011).

As amostras clínicas utilizadas para o isolamento de micobactérias podem ser provenientes de cavidades fechadas, como o líquido, sendo considerados amostras não contaminadas, ou apresentar flora microbiana associada, como escarro, lavados, aspirados, urina e material de cavidade ou ferida aberta. Os microorganismos contaminantes, por se desenvolverem muito mais rapidamente do que as

micobactérias, impedem sua multiplicação. Por isso, devem ser eliminados dos espécimes contaminados pelo tratamento com agentes químicos aos quais as micobactérias são conhecidamente mais resistentes. Já para as amostras não contaminadas, este tratamento não é necessário, desde que tenham sido colhidas assepticamente e armazenadas em frasco estéril (BRASIL, 2008a).

Para a maioria das micobactérias, a temperatura ótima de crescimento varia de 35 a 37°C. Para seu crescimento, podem ser utilizados meios de cultura sólidos, como Löwenstein-Jensen (LJ) e suas variações (como o meio Ogawa-Kudoh), Middlebrook 7H10 e 7H11, e meios de cultura líquidos, como Kirchner e caldo Middlebrook 7H9 (RAMACHADRAN & PARAMASIVAN, 2003; BRASIL, 2008a; PARSONS et al., 2011).

Nos meios sólidos, a morfologia colonial é variável, podendo ser lisa ou rugosa – mesmo em isolados da mesma espécie –, pigmentada ou não pigmentada. Esse pigmento, usualmente não difusível, pode variar do amarelo ao alaranjado, sendo normalmente decorrente da síntese de betacarotenos (LEÃO et al., 2004). As leituras devem ser realizadas 48 horas após a semeadura e incubação (para verificação da presença de contaminantes) e, posteriormente, de sete em sete dias até completar oito semanas (BRASIL, 2008a).

Como o tempo de crescimento bacilar varia de duas a seis semanas, a cultura apresenta como desvantagem o tempo necessário para a liberação do resultado, principalmente com o uso dos meios sólidos. Por isso, foram desenvolvidos sistemas semiautomáticos e automatizados, que reduzem o tempo de emissão do resultado para uma a quatro semanas. Esses sistemas utilizam ensaios radiométricos e/ou colorimétricos para a detecção de CO<sub>2</sub> produzido ou O<sub>2</sub> consumido durante o crescimento bacilar em meio líquido. Como exemplo, pode-se citar os sistemas MGIT™ (Becton, Dickinson and Company), MB/BacT Alert® (BioMérieux) e VersaTREK® (Trek Diagnostic Systems) (RAMACHADRAN & PARAMASIVAN, 2003; PARSONS et al., 2011).

#### 2.1.4.1.3 Identificação fenotípica

A identificação fenotípica da espécie de micobactéria é baseada em testes bioquímicos e características de crescimento. É feita a partir do primo-cultivo, que deve estar em crescimento ativo de três a quatro

semanas. A sequência de métodos para identificação é composta por: testes para separação do CMTB das MNT, diferenciação das espécies do CMTB e identificação das MNT (BRASIL, 2008a).

A separação das espécies do CMTB das MNT é feita pelos seguintes testes: análise microscópica e macroscópica da cultura, inibição do crescimento em meio contendo ácido *p*-nitrobenzóico (PNB) e teste de produção de niacina. A análise microscópica é útil na avaliação da pureza da cultura, da presença de BAAR e da presença de fator corda (as espécies do CMTB apresentam formação de corda, ao contrário da maioria das MNT). Em relação à análise macroscópica, as colônias do CMTB são acromógenas, geralmente de cor creme, e rugosas; já as colônias das MNT são pigmentadas ou acromógenas, lisas ou rugosas. O teste de inibição de crescimento em meio com PNB separa os membros do CMTB, que são sensíveis, das MNT, que são resistentes ao PNB, excetuando-se algumas cepas de *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. gordonae* e *M. marinum*. O teste da niacina baseia-se na detecção visual da produção de niacina pelas bactérias. Embora seja produzida por todas as micobactérias, somente algumas espécies do CMTB, como *M. tuberculosis* e *M. africanum* e raras espécies de MNT, produzem quantidades detectáveis por meio deste teste (BRASIL, 2008a).

Para a diferenciação das espécies do CMTB, podem ser realizados os seguintes testes: crescimento em meio LJ com glicerol e LJ com piruvato de sódio, inibição de crescimento em meio com TCH (hidrazida do ácido tiofeno 2-carboxílico), estreptomycin e clicoserina, preferência pelo oxigênio, pirazinamidase, urease, teste de redução de nitrato e teste de produção de niacina. Enquanto a identificação do CMTB é essencial para a confirmação do diagnóstico, a diferenciação das espécies desse complexo é necessária somente em algumas situações, como por exemplo, na suspeita de infecção por *M. bovis*, uma vez que essa espécie é naturalmente resistente à pirazinamida (BRASIL, 2008a).

A identificação da espécie de MNT pode ser feita pelos testes de produção de pigmento, crescimento a 45°C e a 25°C, determinação do tempo de crescimento em LJ, meio Sauton com ácido pícrico e em ágar comum, inibição de crescimento em meio com NaCl 5%, arilsulfatase, hidrólise do tween 20,  $\beta$ -galactosidase, redução do telurito de potássio, inibição do crescimento em meio contendo PNB, redução do nitrato, urease e pirazinamidase. Ainda, para MCR, são realizados os testes de captação do ferro, inibição de crescimento em meio contendo citrato de sódio, manitol e inositol (BRASIL, 2008a).

As principais limitações do método fenotípico consistem na demora para obtenção de resultados, na dificuldade de diferenciação de diversas espécies, na difícil reprodutibilidade e nos resultados duvidosos que podem ser apresentados por alguns testes bioquímicos, além de serem muito trabalhosos (BRASIL, 2008a; NEONAKIS et al., 2008; NGAN et al., 2011). Considerando estes aspectos, no Brasil, os laboratórios que realizam cultura para micobactérias devem realizar a separação as espécies do CMTB das MNT, ou encaminhar as culturas para um Laboratório de Referência que o faça. Já a identificação da espécie de MNT é realizada pelo Laboratório de Referência Nacional, o Centro de Referência Professor Hélio Fraga, no Rio de Janeiro (BRASIL, 2008a). Em Santa Catarina, a identificação também é realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias, na Universidade Federal de Santa Catarina (LBMM/CCS/UFSC), que utiliza métodos moleculares para este propósito.

A identificação da espécie é fundamental para a adoção de uma conduta terapêutica adequada e obtenção de êxito no tratamento. No caso das MNT, no entanto, deve-se ter cautela em atribuir-lhes a responsabilidade pela etiologia da doença, visto que, por serem ubíquas no ambiente, seu isolamento em cultura pode ser correspondente a uma contaminação ambiental ou colonização do hospedeiro, e não a uma infecção real (CHEMLAL & PORTAELS, 2003; TORTOLI, 2003; GRIFFITH et al., 2007; BRASIL, 2008a; WINTHROP, 2010). Para o diagnóstico da doença pulmonar causada por MNT, a ATS e a IDSA determinaram os seguintes critérios que devem ser cumpridos:

*Clínicos:*

1. Sinais e/ou sintomas pulmonares, opacidades nodulares ou cavitárias no raio X de tórax ou tomografia computadorizada de alta resolução apresentando bronquiectasias multifocais com pequenos e múltiplos nódulos;  
*e*
2. Exclusão de diagnóstico de outras causas de doença pulmonar.

*Microbiológicos:*

1. Cultura positiva em pelo menos duas amostras diferentes de escarro;  
*ou*



2. Cultura positiva em pelo menos uma amostra de lavado broncoalveolar;  
*ou*
3. Biópsia pulmonar com características histopatológicas de infecção por micobactérias (inflamação granulomatosa ou presença de BAAR) e cultura da biópsia positiva para MNT, ou biópsia pulmonar com características histopatológicas de infecção por micobactérias e pelo menos uma cultura positiva para MNT, de escarro ou lavado brônquico (GRIFFITH et al., 2007).

Outras recomendações importantes são: especialistas devem ser consultados quando a MNT isolada é encontrada de forma infrequente ou normalmente representa contaminação ambiental; pacientes suspeitos de doença pulmonar por MNT que não obedecem aos critérios acima devem ser acompanhados até a confirmação ou exclusão do diagnóstico; o diagnóstico de doença pulmonar por micobactérias, sozinho, não implica na instituição da terapia – esta deve ser iniciada de acordo com os potenciais riscos e benefícios para cada paciente (GRIFFITH et al., 2007).

No Brasil, o Centro de Referência Professor Hélio Fraga emitiu, em 2009, uma nota técnica regulamentando o envio de cepas para identificação, com o propósito de confirmar os casos de micobacterioses. São considerados casos de infecção por MNT aqueles que apresentarem uma amostra com cultura positiva proveniente de sítio estéril ou duas ou mais amostras com cultura positiva, provenientes de sítio não-estéril. A nota ainda estabelece que a presença de uma ou duas colônias na cultura não permite o diagnóstico de micobacteriose, pois pode ser correspondente a uma contaminação ambiental e não a infecção real; por isso, é necessária uma cultura positiva com mais de 10 colônias em cada amostra do paciente (BRASIL, 2009b).

#### *2.1.4.2 Diagnóstico molecular*

A necessidade de um teste rápido e sensível para o diagnóstico laboratorial das micobactérias levou ao desenvolvimento dos métodos moleculares para detecção e identificação das espécies, diretamente de amostras clínicas ou a partir de colônias isoladas em cultivo. Dentre as

técnicas utilizadas para o diagnóstico, encontram-se principalmente aquelas que promovem a amplificação de ácidos nucleicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e suas variações (*Nested-PCR*, *Multiplex-PCR* e PCR em tempo real, por exemplo). Para a identificação das espécies, há as técnicas que empregam sondas genéticas (Sistemas *AccuProbe*® e INNO-LiPA, por exemplo), sequenciamento de DNA, análises com enzimas de restrição (como o PRA-*hsp65*) e o MMSA (*Mycobacteria Mobility Shift Assay* – Ensaio da Mobilidade Eletroforética de Fitas Heteroduplas) (WALÉRIA-ALEIXO et al., 2000; WILLIAMS et al., 2007; NEONAKI et al., 2008; WILSON, 2011).

#### 2.1.4.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR baseia-se na amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA. Esta metodologia permite a detecção de micobactérias diretamente da amostra clínica em um curto espaço de tempo (horas), e tem sido descrita em vários testes diagnósticos, tanto em métodos *in house* como em testes comerciais (ROSSETTI & SPERHACKE, 2006).

No caso das micobactérias, a sequência de DNA amplificada pode ser comum a todas as bactérias do gênero ou ser específica para uma espécie ou complexo. A maioria dos protocolos utiliza a amplificação da sequência de inserção *IS6110*, presente especificamente nas espécies do CMTB, em diferentes números de cópias e integradas em variados sítios cromossômicos. Por estar presente em várias cópias no genoma, este alvo molecular promove um aumento na sensibilidade da técnica, o que representa uma vantagem sobre os demais alvos (HERMANS et al., 1990; van SOOLINGEN et al., 1991; PIERSIMONI & SCARPARO, 2003; NEONAKIS et al., 2008; SCHERER et al., 2011). Entretanto, sua desvantagem está na existência de isolados de *M. tuberculosis* que perderam as sequências *IS6110*, o que tem sido observado principalmente na Ásia (YUEN et al., 1993a; CHAUHAN et al., 2007).

Quando a sequência amplificada é comum ao gênero, a região 16S do RNA ribossômico (16S rRNA) é um importante alvo. Essa região é altamente conservada no gênero *Mycobacterium* e contém diferenças na sequência de nucleotídeos que podem ser específicas de um grupo ou espécie. Por esta razão, seu produto amplificado também

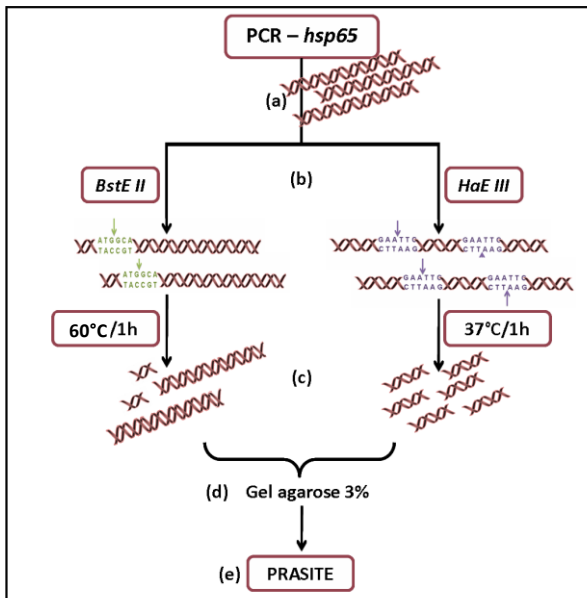
pode ser utilizado para posterior identificação molecular da espécie de micobactéria (HUGHES et al., 1993; KATOCH, 2004; WU et al., 2008).

Em relação às técnicas convencionais, a PCR apresenta como vantagens a redução do tempo de liberação do resultado, a alta especificidade e a mínima manipulação das bactérias, já que não há necessidade do cultivo de microorganismos, proporcionando maior segurança ao laboratório. Entretanto, sua sensibilidade ainda é inferior à da cultura, variando de acordo com o alvo, os iniciadores (*primers*) e o tipo de amostra utilizados (PIERSIMONI & SCARPARO, 2003; GRECO et al., 2006; WILSON, 2011). Em estudo de meta-análise, GRECO e colaboradores (2006) demonstraram que, em amostras com baciloscopia positiva, a sensibilidade de testes comerciais utilizando PCR é de cerca de 96%, enquanto em baciloscopia negativa, é de cerca de 66%. Ainda, a possibilidade de amplificação de material genético de microorganismo não viável desfavorece sua utilização no acompanhamento terapêutico (SOINI & MUSSER, 2001; KIRAZ et al., 2010).

Dentre os métodos moleculares comerciais, vem ganhando destaque no diagnóstico da TB o ensaio chamado Xpert MTB/RIF, que detecta simultaneamente a presença de *M. tuberculosis* e resistência à rifampicina, diretamente da amostra clínica. Desenvolvido na plataforma GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), o ensaio utiliza a metodologia de PCR em tempo real e necessita de processamento simples da amostra e dos testes, o que facilita sua implantação em Centros de Saúde. Em estudos multicêntricos, apresentou sensibilidade de 98,2% em amostras com baciloscopia positiva, 72,5% em amostras com baciloscopia negativa e especificidade de 99,2% (BOEHME et al., 2010; BOEHME et al., 2011). Em 2010, a OMS recomendou seu uso no diagnóstico da TB em Centros de Saúde, juntamente com a baciloscopia, principalmente em pacientes coinfectados pelo HIV e em suspeitos de TBMR (WHO, 2011b). No Brasil, a metodologia será testada, em 2012, nas cidades de Manaus e do Rio de Janeiro (cidades com os mais altos índices de TB no país), para análise de custo-efetividade.

2.1.4.2.2 PCR seguida de análise de restrição – PCR PRA-*hsp65*

Telenti e colaboradores descreveram, em 1993, o método PRA-*hsp65*, capaz de diferenciar a maioria das espécies de MNT, a partir de isolados de cultura sólida e líquida. Este método baseia-se na amplificação, pela PCR, de um fragmento de 441 pb do gene que codifica a *heat shock protein* de 65 kDa, que contém epítomos específicos comuns a várias espécies de micobactérias, com posterior digestão com enzimas de restrição, *BstE II* e *Hae III*. Os fragmentos obtidos são visualizados por eletroforese em gel de agarose. As diferentes espécies de micobactérias apresentam padrões de restrição diferentes e a definição da espécie é possível comparando-se esses padrões com um algoritmo (TELENTI et al., 1993; CHIMARA et al., 2008) (Figura 1). Este é um dos métodos utilizados pelo Laboratório de Referência Nacional para identificação das MNT a partir das culturas previamente identificadas como não pertencentes ao CMTB (BRASIL, 2008a).

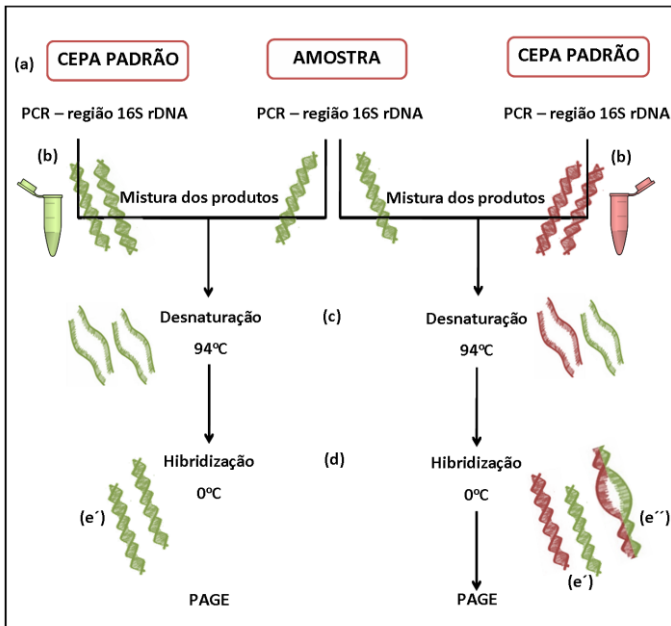


**Figura 1.** Método PRA-*hsp65*: amplificação por PCR do gene *hsp65* (a) e posterior utilização das enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III* (b) e (c). Os fragmentos de restrição, após submetidos a eletroforese em gel de agarose 3% (d), são analisados pela comparação com os padrões do banco de espécies do programa disponível no PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>) (e).

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

#### 2.1.4.2.3 MMSA – *Mycobacteria Mobility Shift Assay*

O MSA (*Mobility Shift Assay* – Ensaio da mobilidade eletroforética de fitas heteroduplas de DNA) baseia-se na detecção da micro-heterogeneidade de sequências nucleotídicas, pelo fato de que sequências de DNA com divergência de pares de bases podem, em gel de poliacrilamida (PAGE), apresentar diferenças de migração devido a diferenças conformacionais. Para sua realização, um fragmento de DNA, amplificado pela PCR, é misturado ao DNA amplificado de uma amostra padrão e submetido à desnaturação para separação das fitas. Os dois segmentos de DNA, idênticos ou não, são submetidos a um processo para que ocorra hibridização. Quando os fragmentos possuem a mesma sequência nucleotídica, o pareamento ocorrerá com 100% de complementariedade e haverá a revelação de apenas uma banda na corrida eletroforética. Já no caso de dois fragmentos não idênticos, a hibridização não será totalmente complementar, produzindo, assim, três diferentes fitas duplas: duas formadas por fitas 100% complementares (homoduplex), que representam apenas o reparamento das fitas de cada fragmento, e um par de fitas não idênticas, chamado heteroduplex. Este par heteroduplex, em razão da alça formada no local em que não há complementariedade das bases, apresenta menor mobilidade eletroforética (DELWART et al., 1994; WALÉRIA-ALEIXO et al., 2000; BAZZO, 2006) (Figura 2).



**Figura 2.** Método MMSA: Amplificação por PCR da região 16S rRNA da amostra e das cepas padrão (a). O produto amplificado da amostra é misturado com o produto amplificado de cada cepa padrão (b). Após desnaturação (c) e hibridização (d) das misturas de DNA, ocorre o pareamento das fitas, que pode ser visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). As fitas iguais apresentam perfeito pareamento e formam fitas homoduplas (e'), enquanto as fitas que apresentam divergência na sequência de nucleotídeos não pareiam perfeitamente, produzindo três diferentes fitas duplas: duas formadas por fitas 100% complementares (homoduplas) (e') e um par de fitas não-complementares (heteroduplas) (e'').

No MSA para identificação de espécies de micobactérias (MMSA), é amplificada, pela PCR, uma região gênica comum a todas as micobactérias, o 16S rRNA. Para a realização desta técnica, é necessária também a amplificação do DNA de cepas padrão de diferentes espécies de micobactérias. Cada padrão é misturado separadamente com a amostra teste a ser identificada e esta mistura é desnaturada e hibridizada. Após a corrida eletroforética em PAGE em condições desnaturantes, a formação de fitas homoduplas indica a complementariedade da amostra teste com a amostra padrão com a qual foi testada; fitas heteroduplas são formadas quando não há complementariedade entre as fitas pareadas, o que significa que a

amostra teste e o padrão não têm a mesma sequência de nucleotídeos (WALÉRIA-ALEIXO et al., 2000, BAZZO, 2006).

Este método é capaz de revelar divergências de 5% a 25% na sequência de nucleotídeos amplificada. Isto é, em sequências com menos de 5% de divergência não é possível observar a separação das bandas e, conseqüentemente, a formação dos heteroduplex; já naquelas com mais de 25% de divergência não há hibridização das fitas (DELWART et al., 1994; WALÉRIA-ALEIXO et al., 2000; BAZZO, 2006).

O MMSA é um método de execução rápida capaz de identificar as principais micobactérias patogênicas e vem sendo pesquisado e utilizado para identificação das espécies de micobactérias no estado de Santa Catarina (BAZZO, 2006). Apresenta como desvantagens a necessidade de ter diferentes espécies de micobactérias para serem utilizadas como padrão e o fato de que as amostras devem ser testadas com cada padrão separadamente. Quando a infecção é causada por mais de uma espécie de micobactérias, a identificação não é possível, visto que haverá formação de fitas heteroduplas em todas as reações (WALÉRIA-ALEIXO et al., 2000; BAZZO, 2006). Além disso, esta técnica não diferencia as espécies do CMTB, visto que apresentam 99,9% de similaridade genética e 100% de similaridade na região 16S rDNA (BÖDDINGHAUS et al., 1990; BROSCHE et al., 2002; WALÉRIA-ALEIXO et al., 2000; BAZZO, 2006).

#### 2.1.4.2.4 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA é considerado o método padrão áureo para a identificação da espécie de micobactéria. Baseia-se na identificação da sequência de nucleotídeos de um gene comum ao gênero *Mycobacterium* e posterior comparação com sequências de referência disponíveis em bancos de dados. Dentre os genes utilizados para este propósito, pode-se citar *hsp65*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, o gene que codifica uma proteína de 32 kDa e o 16S rRNA. Este último é o alvo mais utilizado, por ser altamente conservado e conter regiões hipervariáveis, o que o torna ideal para o sequenciamento com propósitos taxonômicos (CHEMLAL & PORTAELS, 2003; TORTOLI, 2003; WILLIAMS et al., 2007; NEONAKIS et al., 2008).

### 2.1.4.3 Diagnóstico imunológico

Os testes imunológicos são ensaios capazes de demonstrar a sensibilização prévia por micobactérias e confirmar uma infecção, sem a necessidade de detecção do bacilo na amostra clínica. Entretanto, não são suficientes para o diagnóstico da TB doença, pois podem indicar também TB latente (TEIXEIRA, ABRAMO & MUNK, 2007).

O teste PPD (*purified protein derivative*) baseia-se na observação da reação celular desenvolvida na pele, 48 a 96 horas após a inoculação intradérmica de um derivado protéico purificado de *M. tuberculosis* (PPD). Um endurecimento local de mais de 5-15 mm, dependendo dos fatores de risco do indivíduo, é considerado um resultado positivo e indica infecção. Tem uso na triagem de TB, mas apresenta sensibilidade e especificidade variáveis: tem sensibilidade reduzida em crianças e pacientes imunocomprometidos e pode apresentar resultados falso-positivos em pacientes vacinados com BCG e em pacientes sensibilizados com MNT, pois contém diversos antígenos compartilhados por diferentes espécies de micobactérias (TEIXEIRA, ABRAMO & MUNK, 2007; SIA & WIELAND, 2011).

Ensaio imunológicos específicos para MTB foram desenvolvidos na tentativa de substituir o PPD. Os testes imunológicos IGRAs (Interferon- $\gamma$  release assay) baseiam-se na detecção de IFN- $\gamma$  liberado por células T em resposta a antígenos presentes em *M. tuberculosis* e ausentes em BCG e em grande parte da MNT, tais como ESAT-6 (*Early-Secreted Antigenic Target 6*) e CFP-10 (*Culture Filtrate Protein 10*). O teste é realizado *ex vivo*, com o cultivo de células de sangue periférico do paciente em presença de antígenos de *M. tuberculosis* e posterior detecção de IFN- $\gamma$  secretado pelas células, utilizando-se ensaios imunoenzimáticos. Assim como no PPD, um resultado positivo (alta produção de IFN- $\gamma$ ) indica sensibilização prévia, mas não necessariamente doença ativa (TEIXEIRA ABRAMO & MUNK, 2007; SIA & WIELAND, 2011).

Ensaio imunológicos também foram desenvolvidos para a identificação de *M. tuberculosis*. O ensaio Capilia TB (Taans Laboratories, Japão) é um ensaio imunocromatográfico utilizado para identificação rápida do CMTB diretamente de cultura (líquida ou sólida). Baseia-se na detecção da proteína MPB64, secretada em cultura pelas bactérias pertencentes ao complexo e apresenta sensibilidade e especificidade superiores a 96% (NGAMLERT et al., 2009; PARSONS et al., 2011).



### 3 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos demonstraram que as doenças causadas por MNT não são incomuns, ao contrário do que era pensado há algumas décadas. Em países desenvolvidos, com a queda dos índices de TB, as MNT receberam maior visibilidade, tornando-se objetos de estudos e apresentando um aumento significativo no número de isolamentos ao longo dos anos.

No Brasil, existem poucos estudos acerca da ocorrência e da epidemiologia das MNT. Devido às altas taxas de TB, muitos casos de MNT são abordados como TB. Isto ocorre porque a cultura não é realizada em todos os casos, sendo o diagnóstico firmado, principalmente, pelo resultado da baciloscopia e pelo diagnóstico clínico. A maioria dos casos é tratada sem a confirmação da espécie de micobactéria, utilizando-se o tratamento preconizado para *M. tuberculosis*. Muitas vezes, somente após algumas semanas ou meses, quando detectada a ausência de resposta ao tratamento, é que se busca o auxílio do laboratório para cultivar, realizar testes de sensibilidade aos antimicrobianos e identificar a micobactéria causadora da doença. Nestes casos, a espécie pode ser corretamente identificada ou, ainda, ser considerada, de forma errônea, *M. tuberculosis* resistente a múltiplos fármacos (MDR).

No Estado de Santa Catarina, o Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias/ Centro de Ciências da Saúde/ Universidade Federal de Santa Catarina (LBMM/CCS/UFSC) vem, desde 2002, estudando métodos diagnósticos para a TB, com enfoque na ampliação da capacidade de detecção das micobactérias a partir do escarro e na identificação de espécies de micobactérias. Por meio de parceria estabelecida junto ao Laboratório de Referência do Estado (Setor de Tuberculose/LACEN/SC), é viabilizado aos pacientes dos SUS o acesso aos benefícios dos resultados dessas pesquisas. Dentre eles, encontra-se a identificação molecular de micobactérias, disponibilizada gratuitamente para todas as amostras suspeitas de MNT isoladas no Estado. Com base nesse serviço, verificou-se que o número de MNT isoladas de amostras clínicas vem aumentando, sem que tenha sido determinada, até o presente, qual sua importância epidemiológica.

Neste trabalho, foi realizada a identificação e avaliação de MNT isoladas no Laboratório de Referência de Santa Catarina; a pesquisa de MNT em pacientes internados com diagnóstico de TB no Hospital de

Referência de Santa Catarina; e a avaliação de técnicas moleculares que permitem agilização no diagnóstico e identificação de micobactérias.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Isolar e identificar Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) em Laboratório e Hospital de Referência para Micobactérias do Estado de Santa Catarina e avaliar técnicas moleculares rápidas para diagnóstico e identificação de micobactérias.

### 4.2 Objetivos específicos

- Amostras provenientes do Laboratório de Referência para Micobactérias do Estado de Santa Catarina (Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina – LACEN/SC):

- Identificar a espécie de micobactéria utilizando-se os métodos MMSA e PRA-*hsp65*, em isolados suspeitos de ser MNT;
- Comparar os resultados de identificação obtidos nos métodos MMSA e PRA-*hsp65* e, em casos de discordância, realizar o sequenciamento do DNA para confirmação da espécie;
- Determinar as principais espécies de MNT circulantes em Santa Catarina e a distribuição dos isolados por região do Estado;
- Identificar os principais sítios de isolamento de MNT e relacionar a espécie identificada com o local da infecção;
- Buscar informações referentes à correlação clínica para cada isolado de MNT.

- Amostras provenientes do Hospital de Referência para Micobactérias do Estado de Santa Catarina (Hospital Nereu Ramos):

- Isolar, identificar a espécie de micobactéria e determinar a ocorrência de doença pulmonar causada por MNT em pacientes internados com diagnóstico de TB pulmonar;
- Padronizar a técnica de PCR em tempo real para detecção de *Mycobacterium sp.*;
- Estimar o rendimento das técnicas moleculares PCR convencional, PCR em tempo real, MMSA e PRA-*hsp65*, diretamente do escarro, tomando-se como padrão áureo o isolamento em cultivo;

- Determinar o perfil dos pacientes internados com doença causada por micobactérias no Hospital de Referência do Estado de Santa Catarina.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Aspectos éticos

O presente trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina em 30 de outubro de 2007, sob número 168/07.

### 5.2 Amostragem e critérios de inclusão

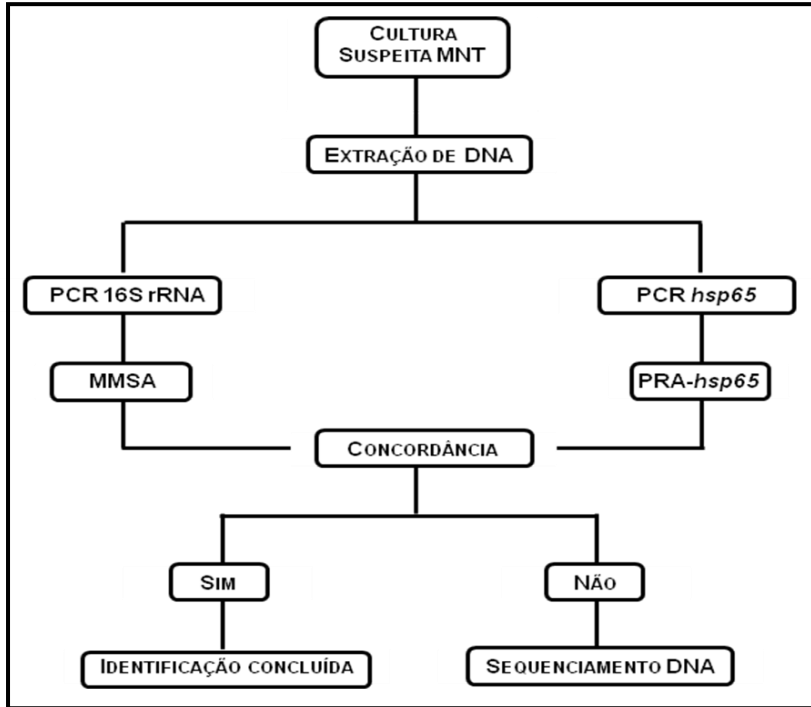
#### 5.2.1 Laboratório de Referência

No Estado de Santa Catarina, a cultura para micobactérias é realizada no Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC – referência para o diagnóstico de micobactérias), que utiliza o sistema MGIT™, nos Laboratórios Regionais localizados em São Miguel d'Oeste, Joaçaba, Tubarão, Criciúma, Joinville, São Francisco do Sul e Jaraguá do Sul e nos Laboratório Municipais de Itajaí e Florianópolis, que utilizam o meio sólido Ogawa-Kudoh. Quando há crescimento bacilar, as amostras são enviadas para o LACEN/SC para realização dos testes de sensibilidade e de identificação do CMTB. Assim, todas as amostras de cultura positivas do Estado são avaliadas pelo Laboratório de Referência.

No período de agosto de 2009 a agosto de 2011, foram recebidas, do LACEN/SC, todas as amostras de cultura de micobactérias que apresentaram resultados não compatíveis com o CMTB (fator corda negativo e/ou crescimento em meio de cultura contendo PNB), sendo consideradas suspeitas de ser MNT. Os seguintes procedimentos foram realizados para todas as amostras de cultura enviadas pelo LACEN/SC ao LBMM: extração de DNA, MMSA e PRA-*hsp65*. Em casos de discordância entre os dois métodos de identificação, foi realizado o sequenciamento do DNA da amostra para confirmação da espécie (Figura 3).

Para as amostras confirmadas como MNT, foram pesquisados os dados clínicos dos pacientes junto ao Núcleo de Epidemiologia do Hospital Nereu Ramos, para confirmação dos casos de micobacteriose. Também foi verificada a situação de cada paciente no SINAN (Sistema

de Informação de Agravos de Notificação), caso tenham sido notificados anteriormente para TB.



**Figura 3.** Fluxograma dos procedimentos realizados com amostras de cultura de micobactérias suspeitas de ser MNT, recebidas do LACEN/SC.

### 5.2.2 Hospital de Referência

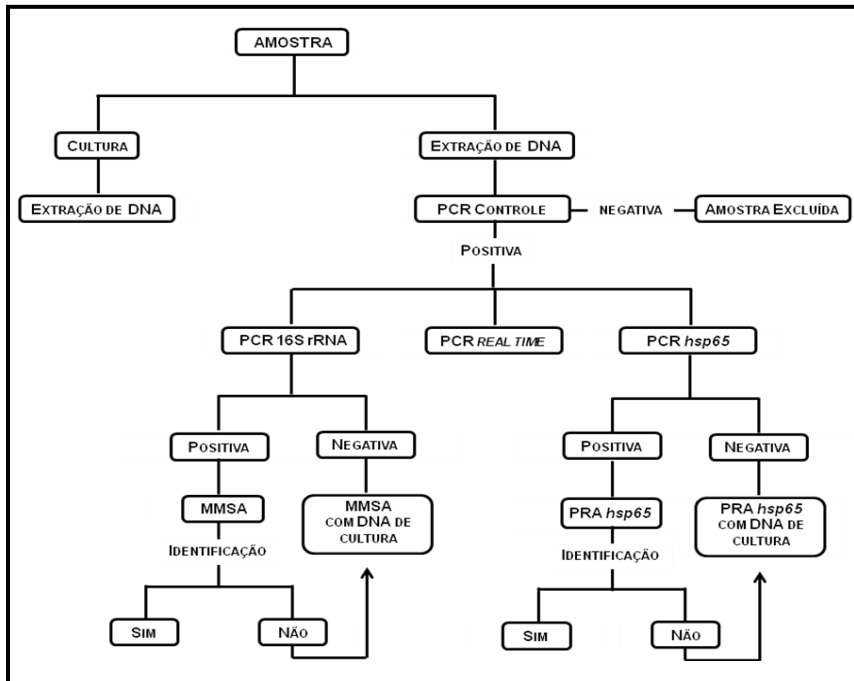
Para a determinação da ocorrência de doença pulmonar causada por MNT em pacientes internados com diagnóstico de TB em Hospital de Referência e para a avaliação de técnicas diagnósticas, foram coletadas amostras de escarro de todos os pacientes acima de 14 anos internados no Hospital Nereu Ramos (HNR – Florianópolis, Santa Catarina), no período de abril de 2010 a abril de 2011, com diagnóstico de doença pulmonar causada por micobactérias. Os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice A). Foram excluídos aqueles em tratamento com tuberculostáticos por um período maior que 15 dias.

As amostras foram coletadas, preferencialmente, pela manhã, em jejum e após lavagem vigorosa da boca com água. Em seguida, foram encaminhadas ao LBMM e ao LACEN/SC. No LACEN/SC, foram realizados a baciloscopia e o cultivo das amostras. No LBMM, foram realizados os seguintes procedimentos: cultura para micobactérias, extração de DNA, PCR para controle da qualidade do DNA extraído, PCR convencional, PCR em tempo real e identificação da espécie pelos métodos MMSA e PRA-*hsp65*. Todos os procedimentos foram realizados diretamente da amostra de escarro. Quando a identificação da espécie não foi possível diretamente da amostra clínica, esta foi realizada a partir de DNA extraído de colônias de micobactérias provenientes do cultivo da amostra (Figura 4).

Para auxiliar na padronização da metodologia de PCR em tempo real, foram coletadas, no Hospital Universitário/UFSC, 15 amostras de escarro de pacientes sem suspeita de TB, para servir como controle negativo. Para estas amostras, os procedimentos realizados foram: cultura para micobactérias, extração de DNA, PCR para controle da qualidade do DNA extraído e PCR em tempo real.

Para a análise do perfil dos pacientes internados com doença causada por micobactérias no HNR, foram coletados dados epidemiológicos e referentes à evolução da doença, de todos os pacientes internados com diagnóstico de infecção por micobactérias, também no período de abril de 2010 a abril de 2011. Os seguintes dados foram obtidos com base nos registros dos prontuários dos pacientes e do SINAN: gênero, idade, raça, escolaridade, município de residência, ocupação, tipo de entrada para internação, forma da doença, coinfeção pelo HIV, presença de outras comorbidades, tipo de tratamento instituído, tempo de internação e tipo de saída.



**Figura 4.** Fluxograma dos procedimentos realizados no LBMM, com amostras de escarro recebidas do Hospital Nereu Ramos.

### 5.3 Baciloscopia

A baciloscopia foi realizada pelo LACEN/SC, segundo recomendações descritas no Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e Outras Micobactérias (BRASIL, 2008a). Foi utilizada a coloração de Ziehl-Neelsen e a presença de bacilos, pesquisada com objetiva de 100X, foi expressa em cruces, da seguinte maneira: 3+ representam a presença de mais de 10 bacilos por campo, em 20 campos lidos; 2+ correspondem a 1 a 10 bacilos por campo, em 50 campos; 1+ corresponde a um total de 10 a 99 bacilos em 100 campos. A presença de 1 a 9 bacilos em 100 campos foi relatada com o número de exato de bacilos encontrados; já a ausência de bacilos em 100 campos representa um resultado negativo (BRASIL, 2008a).



## 5.4 Cultura para micobactérias

As amostras de escarro foram cultivadas em meio sólido Ogawa-Kudoh. Utilizou-se kit comercial contendo o meio de cultura acompanhado de solução descontaminante de NaOH 1N (Laborclin®, Brasil) e o procedimento foi realizado de acordo com instruções do fabricante. Mergulhou-se o swab estéril na região mais purulenta da amostra de escarro e, em seguida, em um tubo contendo a solução descontaminante. Após aguardar 2 minutos, o mesmo swab foi utilizado para semeadura por estriamento no meio de Ogawa-Kudoh, em duplicata. Os meios foram acondicionados em estufa 37°C e observados semanalmente para observação de crescimento bacilar até a oitava semana de incubação.

## 5.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o método da guanidina 5M não baseado em fenol, diretamente das amostras de escarro e a partir das colônias de micobactérias isoladas em meio de cultura (GERSTEIN, 2001).

Para as amostras de escarro, foi realizado um processo de fluidificação e lise física precedente à extração do DNA. Para tanto, adicionou-se cerca de 400 µL de escarro, retirados da região mais purulenta da amostra, a um tubo de vidro contendo pérolas de vidro de 1 e 2 mm de diâmetro. Em seguida, adicionou-se 200 µL de solução de N-acetil-L-cisteína (NALC) 10% e agitou-se em *vortex* por 2 minutos. Após, adicionou-se 400 µL de solução de NaOH:SDS (NaOH 0,2N: SDS 1%) e agitou-se em *vortex* por 3 minutos. Adicionou-se, então, 200 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e agitou-se em *vortex* por 1 minuto (KUBICA et al., 1963; NOGUEIRA et al., *in press*). Entre cada agitação, aguardou-se 15 minutos para a continuação dos procedimentos, a fim de evitar a expansão dos aerossóis formados. Após a adição do acetato de sódio, as pérolas de vidro foram retiradas e lavadas com solução de GTE (Glicose 50mM: EDTA pH 8,0 10mM: Tris-Cl pH 8,0 25mM). As amostras foram centrifugadas a 1.000 x g durante 15 minutos e após adicionou-se 200 µL do sedimento a um tubo contendo 1 mL de solução de guanidina 5M (isotiocianato de guanidina 5M: Tris-Cl pH 6,4 0,1M: EDTA pH 8,0 0,2M: Triton X-100 13%), para a extração de DNA.

Para a extração de DNA das culturas que apresentaram crescimento de micobactérias, foram transferidas colônias, utilizando-se palitos de madeira, a um tubo contendo 1 mL de solução de guanidina 5M.

Os tubos contendo solução de guanidina 5M e amostra (de escarro ou de colônias de micobactérias) foram submetidos à agitação contínua *overnight* em mesa agitadora orbital, em temperatura ambiente (20 a 25°C), para lise das membranas celulares. Após a lise, foram adicionados 50 µL de solução de dióxido de sílica acidificada. A mistura foi homogeneizada por inversão durante 5 minutos e, após, submetida à centrifugação a 1.600 x g/1 minuto. O sedimento foi lavado 2 vezes com 500 µL de solução de lavagem de guanidina 5M (isotiocianato de guanidina 5M: Tris pH 6,4 0,1M), 2 vezes com 500 µL de etanol 70% (p/p) e 1 vez com 500 µL de acetona P.A. Entre cada lavagem, foi realizada centrifugação a 1.600 x g/1 minuto. O sedimento foi submetido à secagem a 56°C/10 minutos em termobloco e re-hidratado com 35 µL de tampão Tris-EDTA pH 7,4 (Tris pH 6,4 0,1M: EDTA pH 8,0 0,2M) a 56°C/10 minutos. Após centrifugação de 10.000 x g/5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um microtubo livre de RNase e DNase.

## 5.6 PCR para controle da qualidade do DNA

A verificação da qualidade do DNA extraído de amostras clínicas e da presença de inibidores da reação de PCR foi realizada pela amplificação do gene 16S rRNA de eubactérias. Para isto, foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores F285 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e ZR244 (3'-CCCACTGCTGCCT-5'), que amplificam um produto de 350 pares de base (pb) (ROGALL et al., 1990).

As reações foram feitas em um volume final de 50 µL, contendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de cada iniciador, 1% DMSO, tampão de reação 1X (Tris-HCl pH8,4 200 mM: KCl 500 mM), 1,25 U de *Taq* DNA polimerase recombinante e 1 µL de DNA. As condições de amplificação foram: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos de 1 ciclo final de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 10 minutos. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Personal<sup>®</sup> (Eppendorf, Alemanha), com reagentes Invitrogen (Carlsbad, EUA).

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e corados por brometo de etídio (1µg/mL). Após, foram visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta (UV) de 320 nm (HOEFER-MacroBue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com marcadores de peso molecular (*ladder*) de 50 pb.

### 5.7 PCR convencional 16S rRNA

A PCR convencional foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) F285 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (ROGALL et al., 1990) e Myc264 (3'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-5') (BÖDDINGHAUS et al., 1990), que amplificam um produto de 1027 pb da região 16S rRNA do gênero *Mycobacterium* (WALÉRIA-ALEIXO et al., 2000). As reações foram feitas em um volume final de 20 µL, contendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de cada iniciador, 1% DMSO, tampão de reação 1X (Tris-HCl pH8,4 200 mM: KCl 500 mM), 1U de *Taq* DNA polimerase recombinante e 1 µL de DNA. As condições de amplificação foram: 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, seguidos de 1 ciclo final de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 10 minutos a 72°C. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Personal® (Eppendorf, Alemanha), com reagentes Invitrogen (Carlsbad, EUA).

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e corados por brometo de etídio (1µg/mL). Após, foram visualizados e fotografados sob iluminação UV de 320 nm (HOEFER-MacroBue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com marcadores de tamanho molecular (*ladder*) de 50 e 100 pb.

### 5.8 PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores RTF (5'-GGGGTGTGGTGTGGTTGAG-3') e RTR (5'-CTCCCACGTCCTTCATC-3'), que amplificam um produto da região intergênica (ITS) 16S - 23S rRNA do gênero

*Mycobacterium*, e a sonda *Mycobacterium-specific* (5'-FAM-TGGATAGTGGTTGCGAGCATC-Tamra-3'), do tipo *TaqMan*, também específica para o gênero *Mycobacterium* (BRUIJNESTEIJN van COPPENRAET et al., 2004). Em um volume final de 10 µL de reação, foram utilizados 300 mM de cada iniciador, 200 mM da sonda, 5 µL de *Platinum PCR® SuperMix* (Invitrogen, EUA) e 1 µL de DNA. As condições de amplificação foram padronizadas em 95°C por 3 minutos, seguidos de 50 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 30 segundos. As etapas de amplificação, detecção e análise dos resultados foram realizadas no termociclador Mastercycler® ep *realplex S4* (Eppendorf, Alemanha). As cepas referência *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium* ATCC25398, *M. fortuitum* ATCC6841, *M. kansasii* ATCC12498, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas para a padronização da técnica e para a avaliação da sensibilidade e especificidade analíticas. Todas as reações foram realizadas em duplicata. As reações para avaliação da sensibilidade analítica também foram repetidas em dois dias diferentes.

## 5.9 Quantificação de DNA

Os DNAs das cepas referência *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium* ATCC25398, *M. fortuitum* ATCC6841 e *M. kansasii* ATCC12498 foram quantificados, para posterior utilização na avaliação da sensibilidade analítica da PCR convencional do gene 16S rRNA e da PCR em tempo real.

A dosagem do DNA foi realizada em espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf, Alemanha), com leitura em 260 nm.

## 5.10 MMSA

O MMSA foi realizado conforme Waléria-Aleixo e colaboradores (2000) e modificações de Bazzo (2006), a partir de produtos de PCR de 1027 pb amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores F285 e Myc264 (item 5.7). As reações foram preparadas com a mistura de 6 µL do produto de PCR de cada amostra clínica (escarro ou cultura do escarro), 6µL do produto da amplificação de amostras-padrão de espécie conhecida e 1,2 µL de tampão de pareamento (*Annealing buffer* – NaCl 1 mM: Tris-Cl pH 8,0 100 mM: EDTA pH 8,0 20mM). As misturas

foram incubadas a 94°C durante 3 minutos, sendo em seguida resfriadas a 0°C por 3 minutos. A separação eletroforética dos fragmentos foi realizada em PAGE 5% (acrilamida 30: bisacrilamida 0,8) em condições desnaturantes (uréia 3%) (200V/55 minutos). O gel foi corado em solução contendo 1,0 µg/mL de brometo de etídio e fotografado sob iluminação UV de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems). As cepas utilizadas como amostras padrão foram *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium* ATCC25398, *M. fortuitum* ATCC6841, *M. gordonae* ATCC00161, *M. kansasii* ATCC12498, *M. abscessus* e *M. terrae* (as duas últimas da coleção do Setor de Tuberculose do LACEN/SC com identificação realizada pelo Centro de Referência Nacional), que foram escolhidas com base na frequência das MNT identificadas em anos anteriores nas amostras do LACEN/SC, pelo Centro de Referência Nacional. Devido à alta similaridade da região 16S rRNA entre as bactérias pertencentes a um mesmo complexo, os resultados da identificação de *M. avium*, *M. terrae*, *M. fortuitum* e *M. abscessus* foram relatados como MAC, Complexo *M. terrae*, Grupo *M. fortuitum* e Grupo *M. chelonae-abscessus*, respectivamente.

### 5.11 PCR seguida de análise de restrição – PRA- *hsp65*

Para a realização do método PRA-*hsp65*, foi feita a amplificação, pela PCR, de um fragmento de 441pb do gene *hsp65*, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') (TELENTI et al., 1993). A PCR foi realizada em um volume final de 50µL, contendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25 pmoles de cada iniciador, 10% glicerol, tampão de reação 1X (Tris-HCl pH8,4 200 mM: KCl 500 mM), 1,5 U 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 7 minutos. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Personal® (Eppendorf, Alemanha), com reagentes Invitrogen (Carlsbad, EUA).

O produto amplificado foi submetido à ação das enzimas de restrição *BstE II* (Promega, EUA) e *Hae III* (Invitrogen, EUA). Para a digestão do fragmento com *BstE II*, foram utilizados 10µL do produto de PCR, 6U da enzima em tampão 1X e incubou-se a 60°C durante 1

hora. Para a digestão com *Hae III*, foram utilizados 10 $\mu$ L do produto de PCR, 6U da enzima em tampão 1X e incubou-se a 37°C durante 1 hora (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 e 50 pb. Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação UV de 320 nm (HOEFER-MacroBue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT<sup>®</sup> Biosystems). A imagem foi analisada pela comparação dos padrões de bandas obtidos na digestão enzimática com aqueles já existentes no banco de espécies do programa PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>).

## 5.12 Sequenciamento de DNA

A região 16S rRNA e o gene *hsp65* foram sequenciados utilizando-se os produtos de PCR obtidos nos itens 5.7 e 5.10, respectivamente. Para o fragmento de 1027pb da região 16S rRNA, foram utilizados os *primers* F285 e Myc264; para o fragmento de 441pb do gene *hsp65*, foi utilizado o *primer* Tb11. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Protozoologia/MIP/CCB/UFSC.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit *DYEnamic<sup>®</sup> ET Dye Terminator* (GE Healthcare, Buckinghamshire) de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das bases foi realizada de forma automatizada pelo Sistema de Análise de DNA *MegaBace1000 DNA Analysis System* (GE Healthcare).

As reações foram realizadas na presença de 5,0 pmoles dos iniciadores e quantidades superiores a 1.000 ng de DNA. Para a reação foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial (95° C por 25 segundos); seguida de 35 ciclos com etapas de desnaturação (95°C por 15 segundos), pareamento dos iniciadores (60°C por 30 segundos) e extensão (60°C por 90 segundos). Os produtos desta reação foram precipitados com isopropanol 70% e eletroinjetados a 3KV por 120 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 9KV.

As sequências geradas foram analisadas quanto à qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (<http://www.phrap.org>). Neste pacote, cada nucleotídeo sequenciado recebe um valor de qualidade dado pela fórmula  $q = -10 \log_{10}(p)$ , onde  $q$  e  $p$  são respectivamente o valor de qualidade e a probabilidade de erro de uma determinada base. A confirmação da identidade dos fragmentos e sua

comparação com outras espécies foi realizada através da ferramenta *blastn* do programa BLAST utilizando-se a base de dados não redundante, disponível no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **5.13 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram cadastrados em um banco de dados e analisados através do software SPSS<sup>®</sup> 16.0. As variáveis nominais foram sumarizadas como números absolutos e percentuais. As variáveis numéricas foram sumarizadas como média, desvio padrão e valores máximos e mínimos, quando apresentaram distribuição normal, e mediana quando não apresentaram esse tipo de distribuição. A associação entre as variáveis qualitativas foi avaliada em um nível de significância de 95%, pelos testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher, quando dicotômicas, e pelo teste de ANOVA, quando apresentaram mais de duas categorias. A associação entre variáveis qualitativas e quantitativas foi avaliada pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O rendimento diagnóstico das técnicas utilizadas foi mensurado pela análise da sensibilidade, tomando-se como padrão áureo o cultivo em meio sólido.





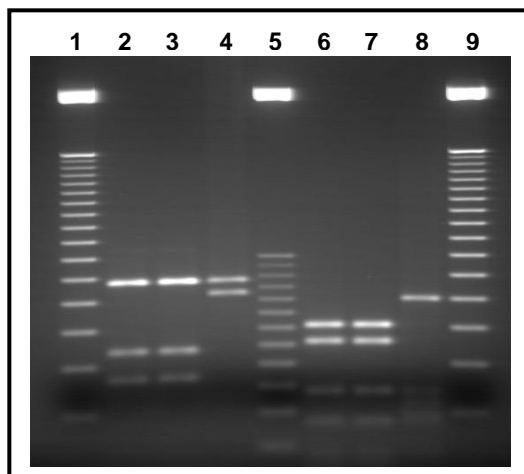
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Laboratório de Referência

No período de agosto de 2009 a agosto de 2011, 1.612 culturas foram positivas para micobactérias, no Estado de Santa Catarina. Destas, 152 amostras, isoladas de 126 pacientes, eram suspeitas de ser MNT. Oitenta e oito foram identificadas MNT (5,4% do total de micobactérias isoladas no Estado) e 49 como pertencentes ao CMTB. As 15 amostras restantes apresentaram resultados sugestivos de contaminação e, por isso, foram excluídas do estudo.

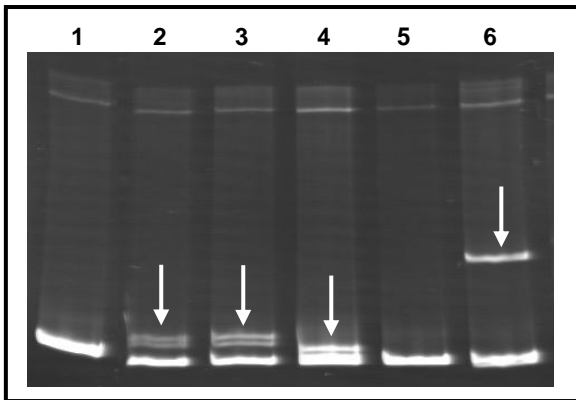
Das 137 amostras de micobactérias, 129 (94,2%) foram identificadas pelos métodos MMSA e PRA-*hsp65*. O MMSA identificou as mesmas 129, enquanto o PRA-*hsp65* foi capaz de identificar 100% das amostras.

A Figura 5 mostra os resultados obtidos com a realização do método PRA-*hsp65* em 3 amostras de cultura.



**Figura 5.** Gel representativo da identificação dos isolados 1, 2 e 3, com a utilização do método PRA-*hsp65*. Linha 1: marcador de peso molecular de 50 pb; linha 2: amostra A1 digerida pela enzima *BstE II*; linha 3: A2 digerida pela enzima *BstE II*; linha 4: A3 digerida pela enzima *BstE II*; linha 5: marcador de peso molecular de 25 pb; linha 6: A1 digerida pela enzima *Hae III*; linha 7: A2 digerida pela enzima *Hae III*; linha 8: A3 digerida pela enzima *Hae III*; linha 9: marcador de peso molecular de 50 pb. Os fragmentos de restrição obtidos nas amostras 1 e 2 foram *BstE II*: 235-130-85 e *Hae III*: 150-130-70. Já na amostra 3, o padrão obtido foi *BstE II*: 235-210-0 e *Hae III*: 200-70-60. Comparando-se os padrões de bandas obtidos com aqueles já existentes no banco de espécies do programa PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>), as amostras 1 e 2 foram identificadas como *M. tuberculosis* e a amostra 3 foi identificada como *M. abscessus*.

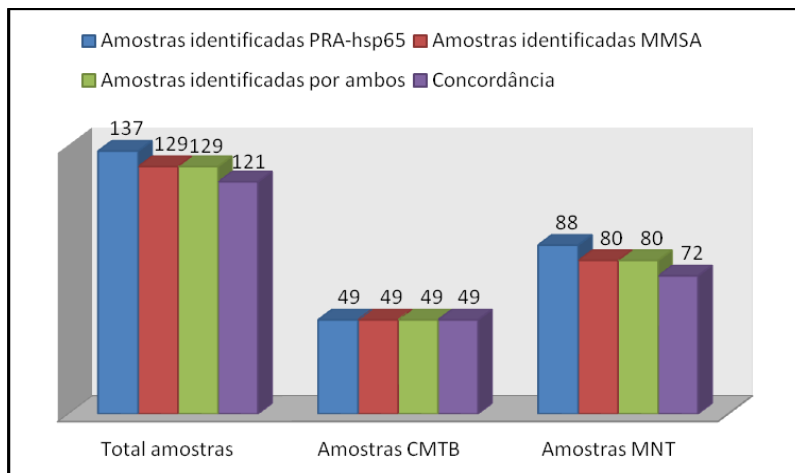
A Figura 6 mostra os resultados obtidos na identificação de uma amostra de cultura, utilizando-se o método MMSA.



**Figura 6.** Gel representativo da identificação do isolado 5, com a utilização do método MMSA. Linha 1: Amostra A5; linha 2: A5 + *M. tuberculosis*; linha 3: A5 + *M. gordonae*; linha 4: A5 + *M. kansasii*; linha 5: A5 + *M. avium*; linha 6: A5 + *M. fortuitum*. Nas linhas 2, 3, 4 e 6 observa-se a presença de duas ou mais bandas, correspondentes ao homoduplex e ao heteroduplex (indicado pelas setas), enquanto na linha 5 apenas uma banda é visualizada (homoduplex). Isto permite a identificação da amostra 5 como *M. avium*. A amostra da linha 1, em que apenas uma banda é visualizada, serve como controle da reação.

Das 129 amostras identificadas por ambos os métodos, 121 (93,8%) apresentaram resultados concordantes. Entre as 49 amostras pertencentes ao CMTB, houve concordância em 100%. Das 88 amostras de MNT, o método MMSA identificou 80 (90,9%), enquanto o PRA-*hsp65* identificou 100%. Entre as 80 amostras de MNT identificadas por ambos os métodos, a concordância foi de 90,0% (Figura 7).

Para confirmação da espécie das 8 amostras discordantes, foi realizado o sequenciamento do DNA. O Quadro 3 mostra os resultados obtidos em cada metodologia. Pode-se observar que o MMSA identificou corretamente 5 das 8 amostras, enquanto o PRA-*hsp65* identificou corretamente as outras 3. Então, das 80 amostras de MNT identificadas por ambos os métodos, o MMSA identificou corretamente 77 (96,2%) e o PRA-*hsp65* identificou corretamente 75 (93,8%).

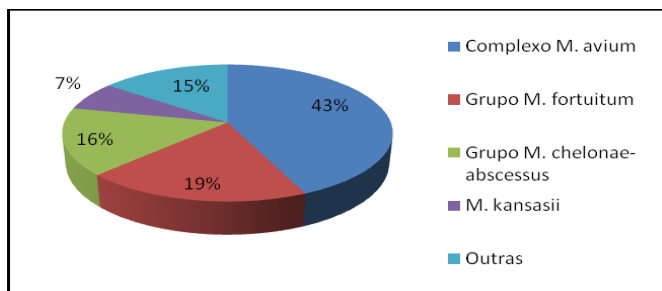


**Figura 7.** Comparação dos resultados de identificação de micobactérias pelos métodos PRA-*hsp65* e MMSA.

**Quadro 3.** Amostras de MNT com resultados de identificação discordantes entre MMSA e PRA-*hsp65* e confirmação da espécie por sequenciamento de DNA.

AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO		
	MMSA	PRA- <i>hsp65</i>	SEQUENCIAMENTO
MNT7	Grupo <i>M. fortuitum</i>	<i>M. bohemicum</i>	<i>M. peregrinum</i>
MNT8	Complexo <i>M. terrae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>
MNT13	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
MNT37	Grupo <i>M. fortuitum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. fortuitum</i>
MNT38	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
MNT54	Grupo <i>M. fortuitum</i>	<i>M. bohemicum</i>	<i>M. bohemicum</i>
MNT61	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
MNT77	Grupo <i>M. fortuitum</i>	<i>M. bohemicum</i>	<i>M. peregrinum</i>

Do total de 88 isolados de MNT, foram identificados 38 MAC (43,3%), 17 Grupo *M. fortuitum* (19,3%), 14 Grupo *M. chelonae-abscessus* (15,9%), 6 *M. kansasii* (6,8%), 3 *M. gordonae* (3,4%), 2 *M. simiae* (2,3%), 2 *M. szulgai* (2,3%), 2 *M. nonchromogenicum* (2,3%), 1 *M. bohemicum* (1,1%), 1 *M. hiberniae* (1,1%), 1 *M. terrae* (1,1%) e 1 *M. kubicae* (1,1%) (Figura 8).



**Figura 8.** Espécies de MNT isoladas no LACEN/SC.

A Tabela 1 mostra as espécies de MNT pertencentes ao MAC e aos Grupos *M. fortuitum* e *M. chelonae-abscessus*, que foram identificadas pelo método PRA-*hsp65*.

**Tabela 1.** Espécies de MNT identificadas, pelo método PRA-*hsp65*, em cada Complexo/Grupo.

COMPLEXO/GRUPO	N	ESPÉCIES	N
MAC	38	<i>M. avium</i>	35
		<i>M. intracellulare</i>	3
Grupo <i>M. fortuitum</i>	17	<i>M. fortuitum</i>	13
		<i>M. peregrinum</i> / <i>M. porcinum</i> / <i>M. septicum</i>	4
Grupo <i>M. chelonae-abscessus</i>	14	<i>M. abscessus</i>	11
		<i>M. chelonae</i>	3

O pulmão foi o sítio mais frequente de obtenção dos isolados, totalizando 85,3% dos casos. Dentre as amostras clínicas, 80,8% foram escarro, 4,5% lavado brônquico, 3,4% sangue, 1,1% líquido, 1,1% líquido pleural e 8,9% eram provenientes de secreção obtida de lesão pós-cirúrgica.

A Tabela 2 apresenta as espécies de MNT identificadas e as amostras clínicas das quais foram isoladas. O pequeno número de amostras em cada grupo não permitiu a realização de testes de associação. Entretanto, pode-se observar que, das 38 amostras identificadas como MAC, 35 eram de origem pulmonar; os 3 isolados de sangue foram identificados como MAC; as 6 amostras de *M. kansasii* e as 3 de *M. gordonae* foram isoladas de escarro; das 8 amostras de lesão pós-cirúrgica, 6 foram identificadas como pertencentes ao Grupo *M. fortuitum*; das MNT de menor frequência (agrupadas como “outras”), nenhuma foi isolada de material nobre, como líquido e sangue.

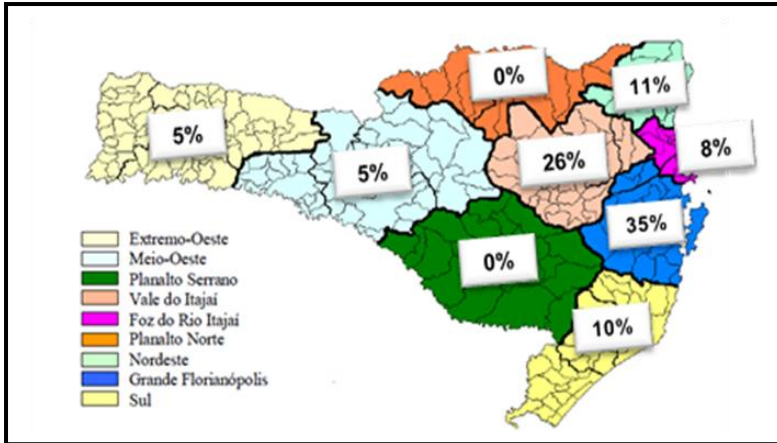
**Tabela 2.** Espécies de MNT identificadas, de acordo com o sítio de isolamento.

AMOSTRA	ESPÉCIE						TOTAL
	MAC	MKA	Grupo MFO	Grupo MAB	MGO	Outras	
ESCARRO	34	6	10	10	3	8	71
LAVBRO <sup>a</sup>	1	0	0	3	0	0	4
LÍQUOR	0	0	1	0	0	0	1
SANGUE	3	0	0	0	0	0	3
LIQ.PL <sup>b</sup>	0	0	0	1	0	0	1
PÓS-CIR. <sup>c</sup>	0	0	6	0	0	2	8
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>88</b>

a = Lavado brônquico; b = Líquido pleural; c = lesão pós-cirúrgica. MKA = *M. kansasii*; MFO = *M. fortuitum*; MAB = *M. abscessus*; MGO = *M. gordonae*.

Os municípios de origem dos isolados foram agrupados de acordo com as Macrorregiões de Saúde do Estado de Santa Catarina. Os

isolados procedentes da Grande Florianópolis e do Vale do Itajaí representaram 35,3% e 26,1% do total, respectivamente (Figura 9). Nenhum isolado foi recebido das regiões Planalto Serrano e Planalto Norte.



**Figura 9.** Distribuição dos isolados de MNT por região do Estado de Santa Catarina.

A Tabela 3 mostra a distribuição das espécies identificadas conforme a região do Estado. Observando-se os dados da tabela, também não é possível verificar a associação de alguma espécie com determinada região.

Os dados referentes à correlação clínica dos isolados foram obtidos junto ao Núcleo de Epidemiologia do Hospital Nereu Ramos. As informações sobre o desenvolvimento ou não de doença foram obtidas de 52 das 88 amostras.

**Tabela 3.** Distribuição das espécies de MNT identificadas de acordo com a região do Estado.

REGIÃO	ESPÉCIE					TOTAL
	MAC	MKA	Grupo MFO	Grupo MAB	Outras	
EXTREMO OESTE	2	0	1	0	1	4
MEIO OESTE	1	0	2	0	1	4
VALE DO ITAJAÍ	15	0	1	4	3	23
FOZ DO RIO ITAJAÍ	2	0	1	3	1	7
NORDESTE	3	3	1	3	0	10
SUL	3	2	3	1	0	9
GRANDE FLORIANÓPOLIS	12	1	8	3	7	31
<b>TOTAL</b>	<b>38</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>88</b>

MKA = *M. kansasii*; MFO = *M. fortuitum*; MAB = *M. abscessus*; MGO = *M. goodii*.

### 6.1.1 Micobacterioses

Trinta e cinco isolados, obtidos de 26 pacientes (34,2% de um total de 76 pacientes), foram associados com o desenvolvimento de infecção. O diagnóstico de micobacteriose foi feito de acordo com a clínica do paciente e o isolamento de MNT em cultura. Dos casos em que a amostra clínica foi escarro, 16 (de um total de 21) tiveram pelo menos 2 isolamentos de MNT em cultura, como é recomendado pelas Diretrizes da ATS/IDSA (GRIFFITH et al., 2007), e os outros 5 tiveram apenas um.

Dos 26 pacientes diagnosticados com micobacteriose, 15 (57,7%) eram do sexo masculino, com média de idade 47,5 ( $\pm$  14,3) anos (23-78 anos), e 11 (42,3%) eram do sexo feminino, com média de idade de 44,3

( $\pm$  15,0) anos (26-76 anos). Sete (30,4%) eram HIV-soropositivos e 16 (69,6%), HIV-soronegativos.

O MAC foi o principal agente identificado, sendo responsável por 17 dos 26 casos de micobacteriose (65,4%). Destes, 13 foram causados por *M. avium* e 4 por *M. intracellulare/M. chimaera*. *M. fortuitum* foi responsável por 3 casos, assim como *M. abscessus*, *M. kansasii* foi responsável por 2 casos e *M. simiae*, por 1 caso.

O pulmão foi o sítio de infecção mais frequente, atingido em 88,6% dos casos (23/26). Dentre as amostras clínicas, foram recebidas para cultivo 21 amostras de escarro, 2 lavados brônquicos, 1 amostra de sangue e 2 secreções obtidas de lesão pós-cirúrgica.

Dentre as regiões do Estado, nenhuma se destacou em número de casos, que se distribuíram entre Vale do Itajaí (8/26), Grande Florianópolis (7/26), Nordeste (5/26), Sul (4/26) e Foz do Rio Itajaí (2/26). Nenhum caso foi confirmado nas regiões Extremo Oeste, Meio Oeste, Planalto Serrano e Planalto Norte.

As informações sobre o esquema de tratamento instituído foram obtidas em 19 casos. Em todos eles, foram seguidas as Diretrizes da ATS/IDSA e recomendações do Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Alterações foram realizadas de acordo com a resposta clínica do paciente. Nos casos de infecção por MAC, o tratamento baseou-se, na maioria dos casos, no uso de amicacina, claritromicina, etambutol e isoniazida. O mesmo ocorreu nos casos de infecção por *M. abscessus* e *M. simiae*. Já no tratamento dos casos de infecção por *M. kansasii*, instituiu-se o uso de rifampicina, isoniazida e etambutol. Não foram obtidas informações quanto aos esquemas utilizados para o tratamento de *M. fortuitum*.

Dezesseis dos 26 pacientes foram notificados, inicialmente, no SINAN, com diagnóstico de TB. Quando analisada a forma de encerramento, verificou-se que apenas 7 (43,8%) foram encerrados da forma correta: mudança de diagnóstico. Entre os demais, 3 foram encerrados como cura de TB, 1 como transferência, 1 como óbito por outras causas, 1 foi migrado para o sistema TBMR e outros 3 não foram encerrados.

### **6.1.2 Contaminação ou colonização**

Dos 52 isolados de MNT dos quais foram obtidas informações clínicas dos pacientes, 18 (correspondentes a 16 pacientes) não foram



considerados causa de infecção. Dentre os 16 pacientes, 6 não apresentaram sinais e sintomas, 6 foram tratados com sucesso para TB e 5 estão com tratamento para TB em curso e sendo monitorados para uma possível infecção por MNT.

### 6.1.3 Isolados sem informações

No caso de 33 isolados, correspondentes a 31 pacientes, as informações clínicas não puderam ser obtidas. Em pesquisa realizada no SINAN, observou-se que 10 pacientes foram notificados com diagnóstico de TB. A Tabela 7 apresenta as espécies identificadas nesses isolados e os casos de notificação de TB. Pode-se observar que, dentre os casos notificados para TB, encontram-se 4 MAC e 2 *M. kansasii*. Já entre os que não tinham diagnóstico de TB, predominaram espécies de crescimento rápido, espécies menos frequentes e aquelas normalmente relacionadas à contaminação de cultura.

**Tabela 4.** Isolados de MNT sem informações clínicas e casos de notificação de TB.

NOTIFICAÇÃO TB	ESPÉCIE					TOTAL
	MAC	MKA	Grupo MFO	Grupo MAB	Outras	
SIM	4	2	2	0	0	8
NÃO	6	0	7	6	6	25
<b>TOTAL</b>	10	2	9	6	6	33

MKA = *M. kansasii*; MFO = *M. fortuitum*; MAB = *M. abscessus*; MGO = *M. goodii*.

## 6.2 Hospital de Referência

No período de abril de 2010 a abril de 2011, foram internados, no Hospital Nereu Ramos, 212 pacientes com diagnóstico inicial de TB e 4 pacientes com diagnóstico inicial de MNT. Daqueles com diagnóstico

de TB, 167 apresentaram a forma pulmonar da doença e, destes, 66 preencheram os critérios de inclusão para coleta de amostra de escarro.

Das 66 amostras de escarro coletadas, 57 apresentaram crescimento em cultura em meio sólido e 9 não apresentaram crescimento bacilar. Como o cultivo foi tomado como padrão áureo para avaliação das demais técnicas e todas as amostras foram coletadas de pacientes com diagnóstico confirmado de micobactérias, as amostras negativas na cultura foram excluídas do estudo. As 57 restantes foram utilizadas para a avaliação das técnicas diagnósticas e de identificação, diretamente de amostras de escarro, e para a pesquisa da ocorrência de MNT em pacientes internados com diagnóstico de TB.

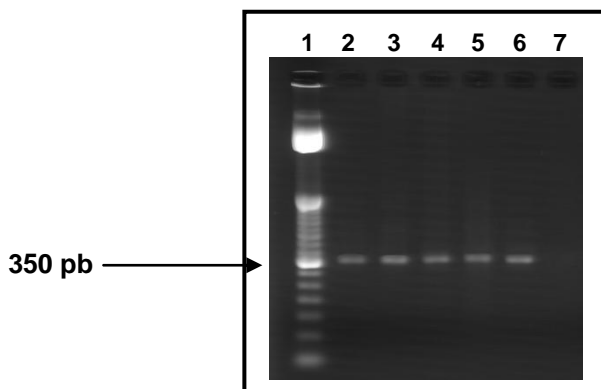
### ***6.2.1 Avaliação de técnicas diagnósticas***

#### ***6.2.1.1 Baciloscopia***

A baciloscopia, realizada no LACEN/SC, apresentou resultado positivo em 53 amostras de escarro e resultado negativo em 4 amostras. Das amostras positivas, o resultado foi expresso como 1+ em 10 (17,5%), 2+ em 19 (33,3%) e 3+ em 24 amostras (43,2%).

#### ***6.2.1.2 PCR controle***

O DNA extraído diretamente das 57 amostras clínicas foi submetido à PCR controle, para verificação da sua qualidade e da presença de inibidores da reação. Todas as amostras apresentaram amplificação do produto de 350 pb da região 16S rRNA de eubactérias e, assim, puderam ser utilizadas para a realização das demais técnicas moleculares (Figura 10).



**Figura 10.** Gel de agarose representativo da amplificação do fragmento de 350pb da região 16S rRNA de eubactérias, de amostras de DNA extraídas diretamente do escarro. Linha 1: marcador de peso molecular de 50 pb; linhas 2, 3, 4 e 5: amostras positivas; Linha 6: controle positivo da reação (DNA de cultura da cepa H37Rv de *M. tuberculosis*); Linha 7: controle negativo da reação.

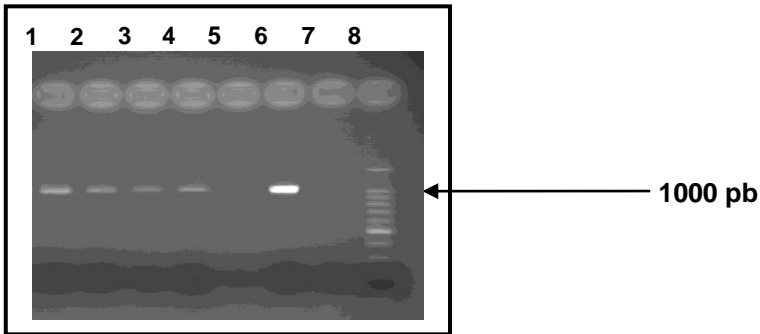
### 6.2.1.3 PCR convencional 16S rRNA

A PCR convencional, baseada na amplificação da região 16S rRNA de micobactérias, foi feita com 57 amostras de DNA extraídas diretamente do escarro. Apresentou resultado positivo em 52 (91,2%) amostras e resultado negativo em 5 (8,8%). Tomando-se a cultura como padrão áureo, a sensibilidade da metodologia foi de 91,2% (IC95% 84,0- 99,0)

A Figura 11 mostra os produtos de 1027 pb resultantes da amplificação da região 16S rRNA, nas amostras clínicas 1 a 4.

Quando comparada à baciloscopia, a PCR apresentou concordância de 92,4% (49/53) dentre as amostras positivas e concordância de 25% (1/4) nas amostras negativas.

Quando relacionada aos resultados da baciloscopia, expressos em número de cruzes, a positividade da PCR não apresentou associação estatisticamente significativa ( $p = 0,563$ ). Também não houve associação estatisticamente significativa entre os resultados da PCR convencional e o tempo de tratamento decorrido até a coleta da amostra ( $p = 0,660$ ) e entre a positividade da PCR e a coinfeção pelo HIV ( $p = 0,388$ ).



**Figura 11.** Gel de agarose representativo da amplificação do fragmento de 1027pb da região 16S rRNA de micobactérias, de amostras de DNA extraídas diretamente do escarro. Linhas 1, 2, 3 e 4: amostras positivas; linha 5: amostra negativa; Linha 6: controle positivo da reação (DNA de cultura da cepa H37Rv de *M. tuberculosis*); Linha 7: controle negativo da reação; Linha 8: marcador de peso molecular de 100 pb.

A Tabela 5 apresenta os resultados da PCR convencional estratificados pelos resultados da baciloscopia, pelo tempo de tratamento decorrido até a coleta da amostra de escarro e pela coinfeção pelo HIV. Pode-se observar que, dentre as 5 amostras que apresentaram resultado negativo na PCR, o resultado da baciloscopia variou de negativo até 3+. Ainda, pode-se observar que dentre as 4 amostras com baciloscopia negativa, 3 (75%) foram positivas na PCR. Em relação ao tempo de tratamento, pode-se observar que a positividade da PCR foi semelhante entre as amostras coletadas em um período de tratamento menor do que uma semana e aquelas coletadas num período entre uma semana e 15 dias; ainda, dentre as 5 amostras com resultado negativo na PCR, 3 foram coletadas com menos de uma semana de tratamento e 2 amostras, num período de tratamento maior. Quando avaliados em relação à coinfeção pelo HIV, observou-se que a reação teve alta positividade tanto para amostras de pacientes HIV-soropositivos quanto HIV-soronegativos; das 5 amostras negativas na PCR, 3 pacientes eram HIV-soropositivos e 2 HIV-soronegativos.

Quando avaliada a partir de DNA de cultura de micobactérias, a reação apresentou sensibilidade de 10 fg de DNA para *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. avium* e *M. kansasii*.

**Tabela 5.** Resultados da PCR convencional estratificados de acordo com os resultados da baciloscopia, tempo de tratamento e coinfeção pelo HIV.

PCR CONVENCIONAL	BACILOSCOPIA			TOTAL
	1+	2+	3+ NEGATIVA	
POSITIVA	9	17	23	52
NEGATIVA	1	2	1	5
<b>TOTAL</b>	10	19	24	57

PCR CONVENCIONAL	TEMPO DE TRATAMENTO		TOTAL
	< 1 SEMANA	> 1 SEMANA	
POSITIVA	24 (88,9%)	28 (93,3%)	52
NEGATIVA	3 (11,1%)	1 (6,7%)	5
<b>TOTAL</b>	27 (100%)	30 (100%)	57

PCR CONVENCIONAL	HIV			TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	NT <sup>a</sup>	
POSITIVA	19 (83,4%)	30 (93,8%)	3	52
NEGATIVA	3 (13,6%)	2 (6,2%)	0	5
<b>TOTAL</b>	22 (100%)	32 (100%)	3	57

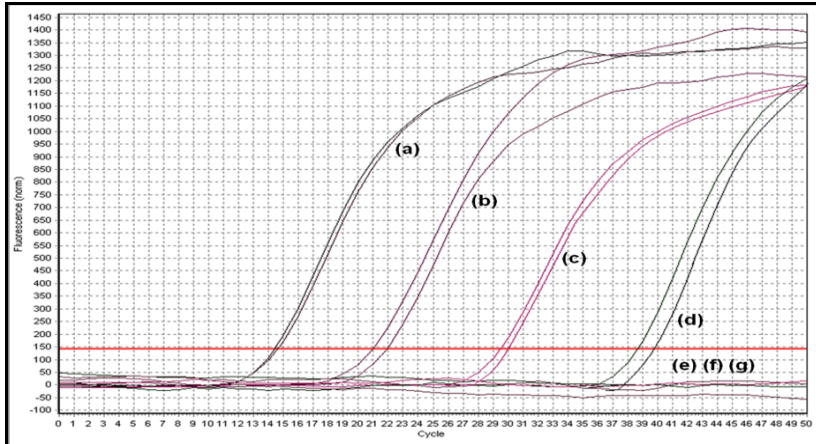
a = Não testado

#### 6.2.1.4 PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi padronizada utilizando-se as cepas referência *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium* ATCC25398, *M. fortuitum* ATCC6841, *M. kansasii* ATCC12498, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

As condições ideais para a amplificação do fragmento de 207pb da região ITS 16S-23S de micobactérias, foram: 95°C por 3 minutos, seguidos de 50 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 30 segundos.

As reações apresentaram sensibilidade de 10 fg de DNA para *M. tuberculosis* (Figura 12), 1  $\mu$ g para *M. fortuitum* e 1 fg para *M. avium* e *M. kansasii*, valores semelhantes aos obtidos com a PCR convencional do gene 16S rRNA (10 fg de DNA). Os DNAs extraídos de cultura de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* não apresentaram amplificação.



**Figura 122.** Imagem representativa dos testes de sensibilidade da sonda *Mycobacterium-specific* para *M. tuberculosis*: (a) 100,0 ng de DNA, (b) 1,0 ng de DNA, (c) 1  $\mu$ g de DNA, (d) 10 fg de DNA, (e) 1 fg de DNA, (f) 0,1 fg de DNA, (g) Controle negativo. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Após a padronização da reação, foi testada sua utilização para detecção de micobactérias diretamente de amostras de escarro. Inicialmente, foi realizada uma avaliação com 20 amostras. Com as mesmas condições descritas acima, 12 (60%) amostras foram positivas (60%) e 8 negativas (40%). Os resultados não apresentaram associação estatisticamente significativa em relação ao resultado da bacilosopia ( $p = 0,528$ ), ao tempo de tratamento decorrido até a coleta da amostra ( $p = 0,675$ ) e à coinfeção pelo HIV ( $p = 0,535$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultados da PCR em tempo real estratificados de acordo com os resultados da baciloscopia, tempo de tratamento e coinfeção pelo HIV.

PCR EM TEMPO REAL	BACILOSCOPIA			TOTAL	
	1+	2+	3+ NEGATIVA		
POSITIVA	0	7	3	2	12
NEGATIVA	1	3	3	1	8
<b>TOTAL</b>	1	10	6	3	20

PCR EM TEMPO REAL	TEMPO DE TRATAMENTO		TOTAL
	< 1 SEMANA	> 1 SEMANA	
POSITIVA	6	6	12
NEGATIVA	4	4	8
<b>TOTAL</b>	10	10	20

PCR EM TEMPO REAL	HIV		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVA	5	7	12
NEGATIVA	4	4	8
<b>TOTAL</b>	9	11	20

Considerando-se a alta sensibilidade analítica observada anteriormente e a possibilidade da presença de inibidores nas amostras de escarro, os DNAs foram diluídos na proporção 1:10. Após esta alteração, o DNA de micobactérias foi detectado em todas as 20 amostras.

Então, a PCR em tempo real para detecção de micobactérias diretamente de amostras de escarro foi realizada com as mesmas condições já padronizadas e com DNA diluído 1:10. Quando testadas as 57 amostras de DNA extraídas de escarro, a reação apresentou resultado positivo em todas, o que representa 100% de sensibilidade.

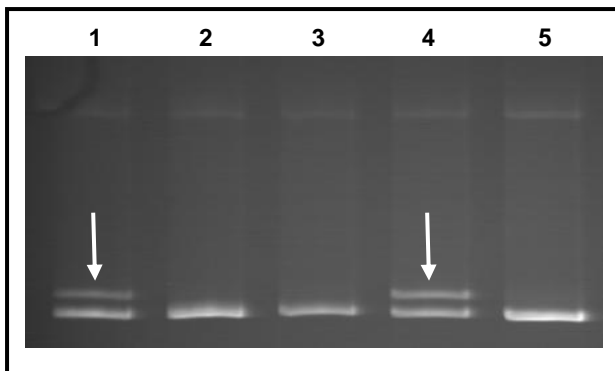
Quando testadas as 15 amostras de escarro de pacientes sem suspeita de TB, nenhuma apresentou amplificação.

### 6.2.1.5 MMSA

Utilizando-se o método MMSA, avaliou-se a possibilidade de identificação da espécie de micobactéria a partir do DNA extraído diretamente de amostras de escarro. Para isto, foram utilizados os produtos de PCR do gene 16S rRNA.

Das 52 amostras positivas na PCR do gene 16S rRNA (item 6.2.1.3), o MMSA permitiu a identificação da espécie em 29 (55,8%); nas outras 23, a quantidade de DNA amplificado na PCR não foi suficiente para a visualização do resultado. Considerando-se o total de 57 amostras e tomando-se a cultura como padrão áureo, a sensibilidade da metodologia foi de 50,9% (IC95% 39,0-66,0).

A Figura 13 mostra os resultados da identificação de *M. tuberculosis* nas amostras clínicas 1 e 2.



**Figura 13.** Gel representativo da identificação das amostras clínicas 1 e 2 com a utilização do método MMSA. Linha 1: Amostra A1 + *M. avium*; linha 2: A1 + *M. tuberculosis*; linha 3: A2 + *M. tuberculosis*; linha 4: A2 + *M. avium*; linha 5: *M. avium*. Observa-se que nas linhas 2 e 3, apenas uma banda é visualizada (homoduplex), enquanto nas linhas 1 e 4, 2 bandas são visualizadas (heteroduplex – indicado pelas setas). Isto permite a identificação de *M. tuberculosis* em ambas as amostras. A amostras da linha 5, em que apenas uma banda é visualizada, serve como controle da reação.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a capacidade de identificação pelo MMSA e o resultado da baciloscopia expresso em número de cruzes ( $p = 0,401$ ), o tempo de tratamento



decorrido até a coleta da amostra ( $p = 0,557$ ) e a coinfeção pelo HIV ( $p = 0,457$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Capacidade de identificação da espécie, diretamente de amostras de escarro, pelo MMSA, estratificada de acordo com os resultados da baciloscopia, tempo de tratamento e coinfeção pelo HIV.

IDENTIFICAÇÃO MMSA ESCARRO	BACILOSCOPIA				TOTAL
	1+	2+	3+	NEGATIVA	
SIM	7 (70%)	9 (47%)	12 (50%)	1 (25%)	29
NÃO	3 (30%)	10 (53%)	12 (50%)	3 (75%)	28
<b>TOTAL</b>	10 (100%)	19 (100%)	24 (100%)	4 (100%)	57

IDENTIFICAÇÃO MMSA ESCARRO	TEMPO DE TRATAMENTO		TOTAL
	< 1 SEMANA	> 1 SEMANA	
SIM	14 (52%)	15 (50%)	29
NÃO	13 (48%)	15 (50%)	28
<b>TOTAL</b>	27 (100%)	30 (100%)	57

IDENTIFICAÇÃO MMSA ESCARRO	HIV			TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	NT <sup>a</sup>	
SIM	10 (45%)	17 (53%)	2	29
NÃO	12 (55%)	15 (47%)	1	28
<b>TOTAL</b>	22 (100%)	32 (100%)	3	57

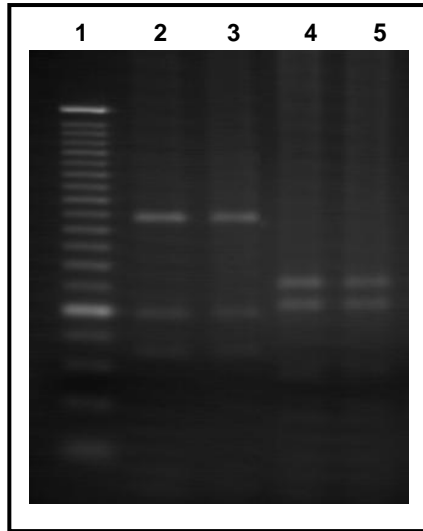
#### 6.2.1.6 PRA-*hsp65*

O método PRA-*hsp65* também foi utilizado para avaliar a possibilidade de identificação da espécie de micobactéria a partir do DNA extraído diretamente de amostras de escarro.

Das 57 amostras, a PCR do gene *hsp65* foi positiva em 30 amostras (52,6%). A análise de restrição com as enzimas *BstE II* e *Hae III* foi realizada para as amostras positivas na PCR. Destas, foi possível

a identificação da espécie de 27 amostras; nas restantes, a quantidade de DNA amplificado na PCR não foi suficiente para a visualização do resultado. Tomando-se o cultivo em meio sólido como padrão áureo, a sensibilidade da técnica foi de 47,4% (IC95% 33,0-59,0).

A Figura 14 mostra os resultados da identificação de *M. tuberculosis* nas amostras clínicas 1 e 2.



**Figura 14.** Gel representativo da identificação das amostras clínicas 1 e 2 com a utilização do método PRA-*hsp65*. Linha 1: *ladder* 25 pb; linha 2: amostra A1 digerida pela enzima *BstE II*, linha 3: A2 digerida pela enzima *BstE II*; linha 4: A1 digerida pela enzima *Hae III*; linha 5: A2 digerida pela enzima *Hae III*. Os fragmentos de restrição obtidos, em ambas as amostras, foram *BstE II*: 235-130-85 e *Hae III*: 150-130-70. Comparando-se os padrões de bandas obtidos com aqueles já existentes no banco de espécies do programa PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>), as amostras foram identificadas como *M. tuberculosis*.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a capacidade de identificação pelo MMSA e o resultado da bacilosopia expresso em número de cruzes ( $p = 0,375$ ), o tempo de tratamento decorrido até a coleta da amostra ( $p = 0,234$ ) e a coinfeção pelo HIV ( $p = 0,138$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Capacidade de identificação da espécie, diretamente de amostras de escarro, pelo PRA-*hsp65*, estratificada de acordo com os resultados da baciloscopia, tempo de tratamento e coinfeção pelo HIV.

IDENTIFICAÇÃO PRA- <i>hsp65</i> ESCARRO	BACILOSCOPIA				TOTAL
	1+	2+	3+	NEGATIVA	
SIM	3 (30%)	12 (63%)	10 (42%)	2 (50%)	27
NÃO	7 (70%)	7 (37%)	14 (58%)	2 (50%)	30
<b>TOTAL</b>	10 (100%)	19 (100%)	24 (100%)	4 (100%)	57

IDENTIFICAÇÃO PRA- <i>hsp65</i> ESCARRO	TEMPO DE TRATAMENTO		TOTAL
	< 1 SEMANA	> 1 SEMANA	
SIM	11 (41%)	16 (53%)	27
NÃO	16 (59%)	14 (47%)	30
<b>TOTAL</b>	27 (100%)	30 (100%)	57

IDENTIFICAÇÃO PRA- <i>hsp65</i> ESCARRO	HIV			TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	NT <sup>a</sup>	
SIM	13 (59%)	13 (41%)	2	27
NÃO	9 (41%)	19 (59%)	1	30
<b>TOTAL</b>	22 (100%)	32 (100%)	3	57

A Tabela 9 apresenta uma comparação dos resultados da identificação de espécie obtidos com os métodos MMSA e PRA-*hsp65*. Pode-se verificar que, das 57 amostras, 13 (22,8%) foram identificadas por ambos os métodos, 16 (28,1%) foram identificadas somente pelo MMSA, 14 (24,6%) foram identificadas somente pelo PRA-*hsp65* e 14 (24,6%) não foram identificadas por nenhuma das metodologias utilizadas. Assim, a associação dos métodos MMSA e PRA-*hsp65* permitiu a identificação da espécie de micobactéria de 75,4% das amostras de DNA obtidas diretamente do escarro.

**Tabela 9.** Comparação entre os métodos PRA-*hsp65* e MMSA para identificação de espécie de micobactéria diretamente de amostras de escarro.

IDENTIFICAÇÃO PRA- <i>hsp65</i> ESCARRO	MMSA ESCARRO		TOTAL
	SIM	NÃO	
SIM	13 (22,8%)	14 (24,6%)	27 (47,4%)
NÃO	16 (28,1%)	14 (24,6%)	30 (52,6%)
<b>TOTAL</b>	29 (50,9%)	28 (%)	57 (100%)

### 6.2.2 Determinação da ocorrência de doença pulmonar causada por MNT em pacientes internados com diagnóstico de TB

A pesquisa de MNT foi realizada em pacientes internados com diagnóstico de TB pulmonar no Hospital Nereu Ramos. Para isto, foram utilizadas as mesmas 57 amostras de escarro que serviram para avaliação das técnicas diagnósticas.

Para a identificação da espécie, foram utilizados os métodos MMSA e PRA-*hsp65*. Quando possível, a identificação foi realizada diretamente da amostra de escarro; quando a quantidade de DNA obtida diretamente da amostra clínica não foi suficiente, a identificação foi realizada utilizando-se DNA obtido a partir do cultivo das amostras.

Das 57 amostras, 56 foram identificadas como *M. tuberculosis*, por ambos os métodos, e 1 (1,8%) foi identificada como *M. avium* pelo MMSA e como *M. intracellulare/M. chimaera* pelo PRA-*hsp65*. Como o MMSA identifica, na maioria dos casos, somente o Complexo, os resultados foram considerados concordantes.

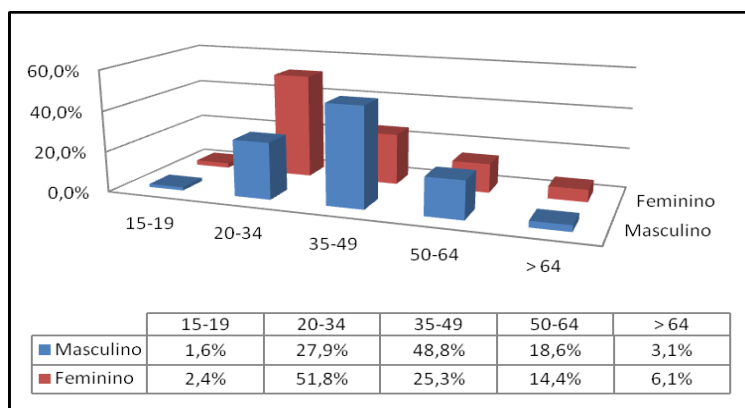
O paciente, do sexo feminino, 76 anos, HIV-soronegativo, estava em tratamento para TB, já na fase de manutenção, e foi internado devido às complicações da doença. Nesta, que já era sua terceira internação, foi realizada a identificação de MNT, registrada a alteração de diagnóstico e iniciado o tratamento apropriado.

### 6.2.3 Perfil dos pacientes internados com diagnóstico de infecção por micobactérias

Como o número de pacientes que preencheram os critérios de inclusão para coleta de amostra de escarro foi pequeno, foi analisado o perfil do total de pacientes internados com diagnóstico de infecção por micobactérias. Foi feita a avaliação do perfil dos pacientes internados com diagnóstico inicial de TB e também daqueles internados com diagnóstico de micobacteriose.

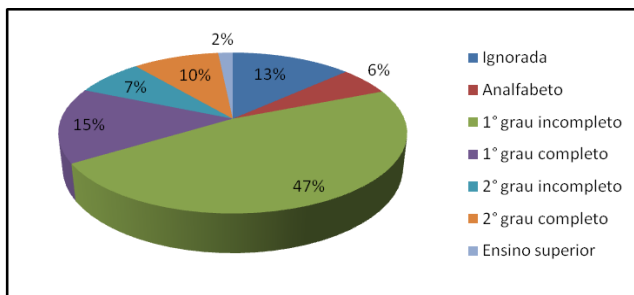
#### 6.2.3.1 Perfil dos pacientes internados com diagnóstico de TB

No período de abril de 2010 a abril de 2011, 212 pacientes foram internados Hospital Nereu Ramos, com diagnóstico de TB. Destes, 60,8% eram do gênero masculino e 39,2% do gênero feminino, com idade média de 39,1 ( $\pm$  13,3) anos (15 a 84 anos). Entre os homens, a faixa etária mais comum foi de 35-49 anos (48,8%) e entre as mulheres, 20-34 anos (51,8%) (Figura 15).



**Figura 15.** Distribuição por faixa etária e gênero dos pacientes internados com diagnóstico de TB no Hospital Nereu Ramos.

A raça predominante foi a branca (79,2%), seguida das raças preta (13,7%), parda (6,6%) e indígena (0,5%). Quanto ao grau de escolaridade, o grupo mais frequente foi de 1º grau incompleto (47,2%) (Figura 16).



**Figura 16.** Grau de escolaridade dos pacientes internados com TB no Hospital Nereu Ramos.

Os municípios de residência foram agrupados de acordo com as Macrorregiões de Saúde do Estado de Santa Catarina. Os pacientes procedentes dos municípios da região da Grande Florianópolis representaram 83,02% das internações. Do restante, 10 pacientes (4,73%) residiam na região Foz do Rio Itajaí, 8 (3,76%) na região Sul, 5 (2,36%) na região Nordeste, 4 (1,89%) no Meio Oeste, 3 (1,42%) no Planalto Norte, 3 (1,42%) no Vale do Itajaí, 2 (0,94%) no Planalto Serrano (0,94%) e 1 (0,47%) paciente residia no Rio Grande do Sul. Nenhum paciente internado era procedente da região Extremo Oeste.

Quanto à ocupação, 6,6% dos pacientes relataram ser aposentados, 2,4% estudantes, 18,4% do lar e 11,3% relataram estar desempregados. Outras ocupações, na grande maioria não especializadas, foram relatadas por 52,9% dos pacientes internados. Destes, trabalhadores da construção civil representaram 11,3% e trabalhadores da área da saúde, 1,42%. Ainda, 8,4% dos pacientes eram institucionalizados (todos presidiários) e 6,1% eram moradores de rua.

Das formas clínicas da TB, 78,8% dos pacientes foram acometidos pela forma pulmonar e 38,7%, por formas extrapulmonares. Apresentaram a forma pulmonar, isoladamente, 61,3% dos pacientes, 21,2% apresentaram somente a forma extrapulmonar e 17,5% apresentaram as formas pulmonar e extrapulmonar (Figura 18). Dentre

as formas extrapulmonares, a meningoencefálica foi a mais frequente, acometendo 25 pacientes (11,8%), seguida de ganglionar periférica (10,4%), miliar (9,4%), pleural (6,1%) e disseminada (1,4%). Outras formas (laríngea, óssea, pancreática e pericárdica) acometeram 4 pacientes (1,9%). Ainda, 6 pacientes (2,8%) apresentaram mais de um sítio de acometimento.

A sorologia para o HIV foi positiva em 58,5% dos casos e negativa em 38,2%. Em 3,3% dos casos, o exame anti-HIV não foi realizado. Todos os pacientes HIV-soropositivos já tinham desenvolvido Aids.

A coinfeção pelo HIV apresentou associação estatisticamente significativa com a forma clínica da doença ( $p < 0,001$ ). Pode-se verificar, na Tabela 10, que as formas extrapulmonares foram mais frequentes em pacientes HIV-soropositivos do que em HIV-soronegativos: 80% dos pacientes com a forma extrapulmonar isolada e 89% dos pacientes com a forma pulmonar e extrapulmonar eram HIV-soropositivos. A Figura 17 mostra a proporção de coinfeção com HIV para cada forma extrapulmonar.

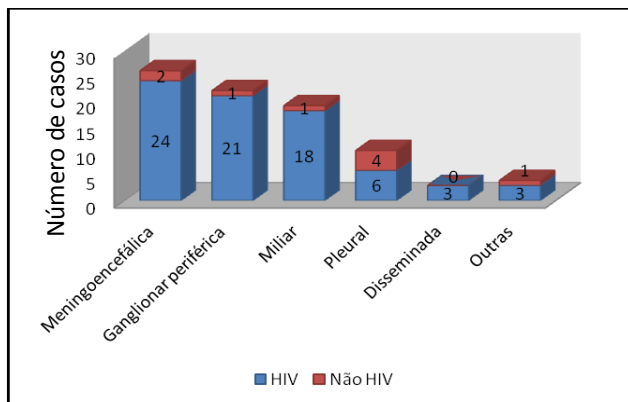
**Tabela 10.** Distribuição da forma clínica da TB de acordo com a sorologia para HIV.

HIV	FORMA			TOTAL
	PULMONAR	EXTRAPULMONAR	P + E <sup>b</sup>	
POSITIVO	55 (42%)	36 (80%)	33 (89%)	124
NEGATIVO	72 (56%)	6 (13%)	3 (8%)	81
NT <sup>a</sup>	3 (2%)	3 (7%)	1 (3%)	7
<b>TOTAL</b>	130 (100%)	45 (100%)	37 (100%)	212

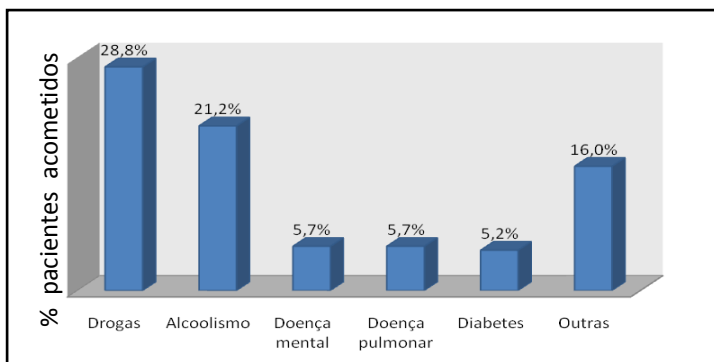
$p < 0,001$ ; a = Não testado; b = pulmonar + extrapulmonar

Os pacientes que apresentavam outras comorbidades associadas à TB representaram 60,4% do total de internados. Dentre as comorbidades mais frequentes, o uso de drogas de abuso esteve associado a 61 casos (28,8%), sendo o crack a droga mais citada (29/35 relatos) e o alcoolismo esteve associado a 45 casos (21,2%). Também merecem

destaque: doenças pulmonares, doença mental e diabetes (Figura 18). Em um paciente, havia a coinfeção TB/ *M. avium*. A ocorrência de mais de uma dessas comorbidades ocorreu em 25% dos casos e a associação mais frequente foi alcoolismo e uso de drogas ilícitas (12,3% do total de casos).



**Figura 17.** Formas extrapulmonares de TB ocorridas em pacientes internados no Hospital Nereu Ramos e coinfeção pelo HIV.



**Figura 18.** Comorbidades associadas à TB em pacientes internados no Hospital Nereu Ramos.

O esquema de tratamento instituído em 82,6% dos casos foi o Dose Fixa Combinada (DFC). Também foram utilizados o esquema SELZT (utilizado para casos de TBMR) em 11 casos (5,2%), o esquema



SEO (estreptomicina, etambutol e ofloxacino, utilizado para casos de hepatotoxicidade) em 7 casos (3,3%) e rifampicina + isoniazida (fase de manutenção do esquema DFC) em 9 casos (4,2%). Outros esquemas de tratamento, principalmente injetáveis, foram utilizados em 6 pacientes (2,8%). Quatro casos (1,9%) resultaram em óbito antes do início do tratamento.

Quanto ao tipo de entrada para internação, 44,8% dos pacientes eram casos novos, 30,7% foram encaminhados por transferência da atenção básica em saúde, 16% eram reingressos após abandono e 8,5% apresentaram casos de recidiva da doença.

O tipo de entrada apresentou associação estatisticamente significativa com a positividade para o HIV ( $p = 0,016$ ). Pode-se observar, na Tabela 11, que há mais casos de reingresso após abandono de pacientes HIV-soropositivos (76%) do que de pacientes HIV-negativos (24%).

**Tabela 11.** Tipo de entrada para internação de pacientes com TB segundo a positividade para o HIV.

HIV	TIPO DE ENTRADA				TOTAL
	CASO NOVO	TRANSFERÊNCIA	REING. ABANDONO	RECIDIVA	
POSITIVO	59 (62%)	29 (45%)	26 (76%)	10 (56%)	124
NEGATIVO	31 (33%)	34 (52%)	8 (24%)	8 (44%)	81
NT <sup>a</sup>	5 (5%)	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	7
<b>TOTAL</b>	95(100%)	65 (100%)	34 (100%)	18(100%)	212

$p = 0,016$ ; a = Não testado.

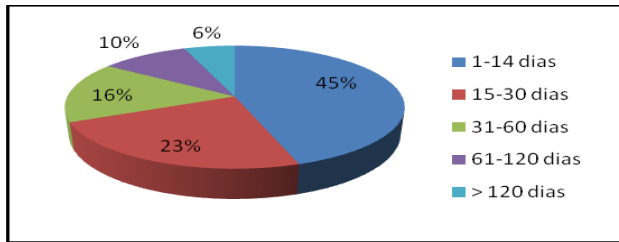
A forma mais comum de encerramento de caso no SINAN foi a transferência do paciente aos cuidados da atenção básica em saúde, que ocorreu em 71,7% dos casos. Óbitos devido à TB ocorreram em 13,2% dos casos, enquanto óbitos por outras causas foram relatados em 3,3%. O índice de abandono foi de 5,2%. Ainda, 3 pacientes (1,5%) receberam alta por cura, 9 (4,2%) foram migrados para o Sistema TBMR e 2 (0,9%) tiveram seu diagnóstico alterado, um deles para micobacteriose

causada por *M. avium* (amostra identificada na pesquisa de MNT, item 6.2.2).

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o tipo de encerramento no SINAN e a coinfeção com HIV. Como grande parte dos encerramentos foi do mesmo tipo (transferência para atenção básica), as análises foram prejudicadas pelo pouco número de casos das outras formas de encerramento.

O tempo de internação foi muito variado. Teve como mediana 17 dias, mínimo de 1 e máximo de 265. Verificou-se, ainda, que 44,8% dos pacientes permaneceram internados de 1 a 14 dias (Figura 19).

Houve associação estatisticamente significativa entre o tempo de internação e o gênero ( $p = 0,015$ ). Enquanto mulheres permaneceram internadas por um tempo mediano de 12 dias, os pacientes do sexo masculino permaneceram por um tempo mediano de 21 dias.

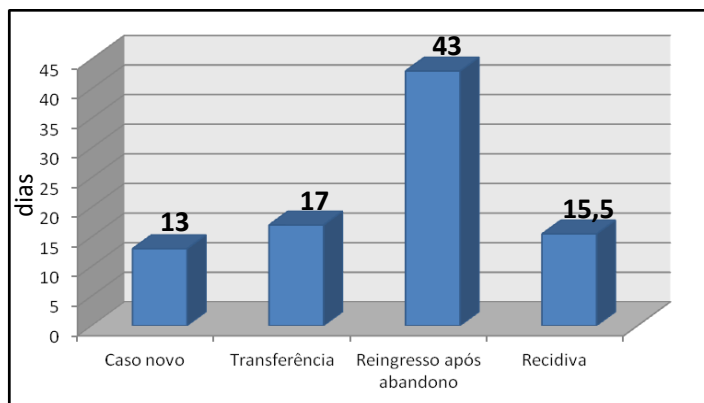


**Figura 19.** Tempo de internação por TB no Hospital Nereu Ramos.

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o tempo de internação e a forma clínica da doença, nem entre o tempo de internação e a positividade para o HIV. Já em relação à presença de outras comorbidades, verificou-se que o tempo de internação foi maior para aqueles que apresentavam alguma doença associada à TB (mediana = 21,5 dias) em comparação com aqueles sem outros agravos (mediana = 13,5 dias) ( $p = 0,017$ ).

Observou-se que houve diferenças no tempo de internação de acordo com o tipo de entrada para internação ( $p < 0,001$ ) (Figura 20). De acordo com os testes, pacientes ingressos como caso novo (internação mediana = 13 dias) permaneceram menos tempo internados que aqueles provindos de transferência da atenção básica em saúde (mediana = 17 dias;  $p = 0,027$ ) e do que pacientes reingressos após abandono (mediana = 43 dias;  $p < 0,001$ ). Ainda, pacientes reingressos

após abandono permaneceram mais tempo internados do que aqueles transferidos da atenção básica em saúde ( $p = 0,011$ ).



**Figura 20.** Tempo mediano de internação por TB no Hospital Nereu Ramos, de acordo com o tipo de entrada.

### 6.2.3.2 Perfil dos pacientes internados com diagnóstico de micobacteriose

No período do estudo, 6 pacientes foram internados com diagnóstico de MNT. Dois deles, nesse período, iniciaram a internação com diagnóstico de TB: um foi identificado na pesquisa de MNT do item 6.2.2 e o outro, que não participou da amostragem, foi identificado após realização da cultura. Os outros 4 pacientes, nesta internação já entraram com diagnóstico de MNT.

Três pacientes eram do sexo masculino e 3 do sexo feminino, com média de idade de  $50,8 \pm 17,6$  anos (mínimo 31 e máximo 76 anos). Eram procedentes das regiões Grande Florianópolis (3), Foz do Rio Itajaí (2) e Sul (1).

Com exceção de um paciente, todos tiveram pelo menos duas culturas identificadas como MNT. As espécies identificadas foram MAC, em 4 casos, e *M. abscessus* em 2 casos.

Dois pacientes apresentavam coinfeção pelo HIV. Os outros 4 apresentavam pelo menos uma das seguintes comorbidades: fibrose cística, asma, diabetes, hipertensão arterial.

A forma pulmonar ocorreu em 5 dos 6 pacientes. Em um paciente, HIV-soropositivo, foi diagnosticada micobacteriose disseminada causada por *M. avium*.

Para a instituição do tratamento, foram seguidas as Diretrizes da ATS/IDSA e recomendações do Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Alterações foram realizadas de acordo com a resposta clínica do paciente. Tanto nos casos de infecção pulmonar por MAC quanto naqueles causados por *M. abscessus*, o tratamento baseou-se no uso de amicacina, claritromicina, etambutol e isoniazida. O esquema proposto para tratamento de MAC disseminado foi rifabutina, moxifloxacino, claritromicina, etambutol e amicacina, durante 24 meses.

Verificou-se, pelo histórico dos pacientes, que 4 dos 6 foram diagnosticados, inicialmente, como TB e notificados no SINAN. Até o diagnóstico correto de MNT, decorreram de 8 meses a 3 anos. Observou-se, ainda, que em 2 dos casos ocorreram 3 internações até a alteração do diagnóstico.

Os pacientes que tiveram MNT como diagnóstico inicial foram diagnosticados durante a primeira internação. A identificação da MNT foi realizada já no primeiro isolado obtido e confirmada pelo cultivo e identificação de uma segunda amostra.

De acordo com o histórico de internações, do total de 6 pacientes, ocorreram 15 internações, com média de  $34,3 \pm 27,4$  dias (mínimo de 5 e máximo de 115 dias).

Nenhum dos casos foi, até agora, encerrado com cura. Três pacientes foram a óbito, tendo como causa a infecção por MNT. Os outros 3 estão com o tratamento em curso, decorrido, no mínimo, 1 ano do início do tratamento.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Laboratório de Referência

Uma vez que cada espécie de MNT apresenta um perfil específico de susceptibilidade aos antimicrobianos e que causam doenças clinicamente indistinguíveis da TB, a identificação da espécie de micobactéria é fundamental sob o ponto de vista clínico, visando a adoção da conduta terapêutica adequada (GRIFFITH et al., 2007; TORTOLI, 2009). Os métodos convencionais de identificação utilizam testes fenotípicos, baseados em testes bioquímicos e nas características de crescimento em cultivo. Entretanto, esses testes são demorados, trabalhosos e de difícil reprodutibilidade (NEONAKIS et al., 2008; NGAN et al., 2011). Diversos métodos moleculares são utilizados como alternativas de identificação mais rápida e acurada. Dentre eles, pode-se citar *multiplex*-PCR (NGAN et al., 2011), PCR em tempo real (RICHARDSON, SAMSON & BANAEI, 2009), PCR seguida de análise de restrição (CHIMARA et al., 2008; PEDRO et al., 2008) e métodos de hibridização (SUFFYS et al., 2001; TORTOLI, MARIOTTINI & MAZZARELLI, 2003).

Neste estudo, foram utilizados os métodos PRA-*hsp65* e MMSA para identificação da espécie de micobactéria. Dentre os 88 isolados de MNT, o MMSA identificou a espécie em 80 amostras, enquanto o PRA-*hsp65* foi capaz de identificar em 100% delas. Quando comparados os resultados das amostras identificadas por ambas as metodologias, o MMSA identificou corretamente 96,3%, enquanto o PRA-*hsp65* identificou corretamente 93,8%, não havendo diferença significativa entre os métodos.

Em estudo realizado por Rocha e colaboradores (2002), o método PRA-*hsp65* foi utilizado para identificar MNT de isolados clínicos de vários estados do Brasil, com o objetivo de avaliar o desempenho do método nos diversos laboratórios do país. No estudo, foram utilizadas mais de 50 espécies e este método de identificação obteve melhores resultados do que os métodos tradicionais e *kits* comerciais. Chimara e colaboradores (2008) utilizaram o método na identificação de amostras clínicas de MNT no Instituto Adolfo Lutz. Foram analisadas 434 amostras da rotina do laboratório de micobactérias e o PRA-*hsp65* mostrou-se concordante em 74% com os métodos bioquímicos. Quando comparados com o sequenciamento de DNA, o PRA-*hsp65* apresentou

acurácia de 90,3%, em comparação a 77,9% dos métodos fenotípicos. Ainda, dentre as espécies patogênicas mais comuns, o PRA-*hsp65* identificou corretamente 98,8% dos isolados.

Os métodos utilizados neste trabalho são de fácil execução e capazes de agilizar a identificação da espécie de micobactéria, fornecendo resultados em cerca de um dia. Apesar de identificar somente o complexo a que pertencem algumas espécies, a identificação obtida com o método MMSA já é suficiente para a adoção do tratamento adequado (GRIFFITH et al., 2007). Ainda, embora não tenha sido capaz de identificar todas as amostras, o que ocorreu por falta do DNA padrão da espécie, este método foi capaz de identificar corretamente as espécies patogênicas relatadas com mais frequência na literatura.

A despeito de sua importância, a identificação da espécie não faz parte da rotina do diagnóstico de micobactérias em grande parte dos laboratórios. Entretanto, estudos têm demonstrado que, nas últimas décadas, houve um aumento significativo dos isolamentos de MNT. Em países nos quais a incidência de TB encontra-se em decréscimo e em fase de estabilização, esse aumento é observado com mais clareza (COOK, 2010). Em estudo de Grubek-Jaworska e colaboradores (2009), realizado na Polônia, 68,1% dos isolados de pacientes HIV-soronegativos com suspeita de TB eram MNT, embora somente 8,7% tenham sido associados ao desenvolvimento de doença. Em trabalho realizado nos Estados Unidos, Satyanarayana e colaboradores (2011) encontraram 92,5% de MNT dentre o total de isolados de micobactérias. Em países em desenvolvimento, os números encontrados são menores, principalmente devido aos altos índices de TB. Al-Mahruqi e colaboradores (2009) e Bicmen e colaboradores (2010) encontraram 9% e 2,1% de MNT em pacientes suspeitos de TB, enquanto Nunes e colaboradores (2008) encontraram 1,1% em pacientes HIV-soropositivos com suspeita de TB pulmonar.

Em estudo brasileiro coordenado por Pedro e colaboradores (2008) no período de 1996 a 2005, no Estado de São Paulo, observou-se que 24,4% dos isolados de micobactérias corresponderam a MNT em um laboratório de referência. Motta e Bona e colaboradores (2011), em trabalho realizado no Piauí, encontraram 9% de MNT, enquanto em Minas Gerais, Froes e colaboradores (2003) encontraram 6%, em trabalhos realizados em hospitais públicos. Em estudos conduzidos com pacientes HIV-soropositivos com suspeita de TB pulmonar, Ferreira e colaboradores (2002) e Zamarioli e colaboradores (2009) e identificaram MNT em 15,0% e 24,2% das amostras, nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, respectivamente. No Brasil, ainda é difícil

comparar dados relativos às MNT, pois os poucos existentes são estudos isolados, com variação quanto ao período, ao tipo de amostras clínicas e à população analisada.

Em Santa Catarina, todas as culturas positivas para micobactérias são enviadas ao Laboratório de Referência (LACEN/SC), responsável por encaminhar aquelas suspeitas de MNT para identificação da espécie. De acordo com a instituição, em anos anteriores a este estudo, estimava-se que as MNT corresponderem a 1,2% das culturas positivas para micobactérias. Entretanto, no período deste estudo, conduzido entre agosto de 2009 e agosto de 2011, 5,4% dos isolados de micobactérias de todo o Estado foram identificados como MNT. Segundo Pedro e colaboradores (2008), no Estado de São Paulo, o aumento observado na frequência de MNT a partir de 2001 pôde ser explicado pela implantação do método automatizado com cultura líquida, método mais sensível do que a cultura tradicional. Em Santa Catarina, este método foi implantado em 2010, o que justifica também a observação do aumento no número de isolamentos de MNT no Estado.

Dentre as espécies isoladas no presente estudo, verificou-se um predomínio do MAC (43,3%), seguido do Grupo *M. fortuitum* (19,3%), Grupo *M. chelonae-abscessus* (15,9%) e *M. kansasii* (6,8%). Perfil semelhante foi encontrado também em estudos internacionais (KOH et al., 2006a; MARRAS et al., 2007; LAI et al., 2010) e em estudos brasileiros conduzidos por Chimara e colaboradores (2008) e Pedro e colaboradores (2008), no Estado de São Paulo. Estudos ainda destacam o isolamento de *M. xenopi* (MARRAS et al., 2007; GRUBEK-JAWORSKA et al., 2009; ANDRÉJAK et al., 2010) e *M. malmoense* (ANDRÉJAK et al., 2010), descritos com mais frequência na Europa e América do Norte e não encontrados neste estudo, e de *M. gordonae* (CHIMARA et al., 2008; PEDRO et al., 2008), reconhecido frequentemente como contaminante de culturas.

O pulmão foi o sítio mais frequente de obtenção dos isolados (85,3% dos casos), assim como observado em grande parte dos estudos com isolados de MNT (MARRAS et al., 2007; PEDRO et al., 2008; LAI et al., 2010). Em estudo realizado entre 1991 e 1997, Ueki e colaboradores (2005) relataram 29,3% de isolados provenientes de doença disseminada e 15,8% de origem extrapulmonar, enquanto apenas 48% tiveram origem pulmonar. Estes dados refletem a realidade do período que antecedeu a expansão da terapia antirretroviral, no qual a doença disseminada por MAC era relatada com alta frequência.

Ao observar-se os resultados das 8 amostras provenientes de lesão pós-cirúrgica, verificou-se que em 6 foi identificado *M. fortuitum*,

espécie que, juntamente com outras MCR, é frequentemente relatada na literatura associada a esse tipo de lesão (PADOVEZE et al., 2007; DUARTE et al., 2009).

A distribuição geográfica das MNT assemelhou-se à distribuição da TB em Santa Catarina. Enquanto 61,4% dos isolados eram procedentes da Grande Florianópolis e do Vale do Itajaí, regiões que apresentam os maiores índices de TB do Estado (>41 casos/100.000 habitantes), amostras das regiões Extremo Oeste e Meio Oeste, com menores índices de TB (11-20 casos/100.000 habitantes), representaram 12% do total (DIVE, 2009). Percebe-se assim que este comportamento é contrário ao ocorrido em países com baixos índices de TB, nos quais os isolamentos de MNT têm destaque. Entretanto, isto pode ocorrer devido à pouca suspeita clínica, justamente em decorrência dos baixos índices de TB.

Deve-se ter cautela em atribuir às MNT a responsabilidade pela etiologia da doença, visto que, por serem ubíquas no ambiente, seu isolamento em cultura pode ser correspondente a uma contaminação ambiental ou colonização do hospedeiro, e não a uma infecção real (TORTOLI, 2003; GRIFFITH et al., 2007). Neste estudo, 34,2% dos isolados foram relacionados à infecção, embora não tenham sido obtidas informações de 47,4% dos pacientes. Em estudo de Koh e colaboradores (2006a) e Grubek-Jaworska e colaboradores (2009), observou-se que, respectivamente, apenas 25% e 20% dos isolados de MNT de origem pulmonar, estavam associados à doença. Em contraste, em estudo de Cassidy e colaboradores (2009), 56% dos pacientes atenderam aos critérios diagnósticos da ATS/IDSA.

Embora tenha sido descrita há algumas décadas como mais comum em homens, estudos recentes têm demonstrado que a doença causada por MNT é mais comum em mulheres na faixa de 50 a 80 anos (CHAN & ISEMAN, 2010; THOMSON, 2010; WINTHROP, 2010). Neste estudo, entretanto, foi observado um predomínio do gênero masculino (57,5% – 15/26), com média de idade 47,5 anos para o sexo masculino e 44,3 anos para o sexo feminino. Diversos trabalhos relataram que as micobacterioses ocorrem, normalmente, em pacientes acima de 60 anos, o que não pode ser verificado neste trabalho. Ainda, em países em desenvolvimento, demonstrou-se que é possível observar o acometimento de pacientes em faixas etárias maiores em relação à TB, enquanto em países desenvolvidos essa diferença nem sempre é significativa devido à maior faixa etária dos pacientes com TB (KOH et al., 2006b; MOTTA et al., 2011; SATYANARAYANA et al., 2011).



Assim como relatado em outros estudos e também como verificado entre o total de isolados de MNT deste estudo, o pulmão foi o sítio de infecção mais frequente e o MAC foi o principal agente identificado entre os pacientes com micobacterioses (MARRAS et al., 2007; PEDRO et al., 2008; CASSIDY et al., 2009; ANDRÉJAK et al., 2010). As demais espécies identificadas como associadas à infecção, neste estudo, foram *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. kansasii* e *M. simiae*, também verificadas em outros estudos brasileiros (PEDRO et al., 2008). Observou-se que, embora secundárias, *M. kansasii* e MCR também são destacadas em diversos estudos. Verificou-se, ainda, que estudos asiáticos apontam um aumento nas infecções por MCR, principalmente *M. abscessus* (JEON et al., 2005; KOH et al., 2006a) e estudos europeus e da América do Norte destacam também as doenças causadas por *M. xenopi* e *M. malmoense* (MARRAS et al., 2007; ANDRÉJAK et al., 2010).

Observou-se, neste estudo, que 30,4% dos pacientes eram HIV-soropositivos, enquanto 69,6% eram HIV-soronegativos. Diversos estudos demonstram baixas taxas de coinfeção pelo HIV em micobacterioses pulmonares (KOH et al., 2006a; ANDRÉJAK et al., 2010; SATYANARAYANA et al., 2011) e destacam outras comorbidades que atuam como fatores de risco para o desenvolvimento da doença, principalmente doenças pulmonares pré-existentes (AREND, van SOOLINGEN & OTTENHOFF, 2009; CASSIDY et al., 2009; KENDALL et al., 2011). Infelizmente, os dados acerca de outras comorbidades não puderam ser obtidos neste estudo.

Assim como observado para o total de isolados (culturas positivas) de MNT, a distribuição geográfica dos casos de micobacterioses (doença) assemelhou-se à distribuição da TB no Estado. Apesar de não haver uma região predominante, os casos confirmados de infecção por MNT são provenientes de regiões que apresentam índices de TB mais altos em relação às regiões que não apresentaram nenhum caso confirmado da doença.

Em relação aos casos de micobacterioses notificados, inicialmente, como casos de TB, observou-se que apenas 43,8% foram encerrados de maneira correta. Isto pode ser reflexo da falta de informação dos profissionais da saúde em relação às micobacterioses e às medidas cabíveis em casos de mudança de diagnóstico.

Observou-se, também, que para muitos isolados não foram obtidas informações quanto ao desenvolvimento de doença, o que pode indicar que apesar de isolada e identificada MNT, pode haver desconhecimento do diagnóstico. Dentre os 8 pacientes notificados no

SINAN para TB, 4 apresentaram isolados identificados como MAC e 2 como *M. kansasii*, espécies que apresentam alta relação com infecção. Considerando-se a notificação para TB, presume-se a presença de sintomas clínicos. Por isso, a busca desses pacientes é importante para o esclarecimento do diagnóstico.

Em Santa Catarina, foi fundado, em meados de 2011, o ambulatório de MNT do Hospital Nereu Ramos, para atendimento de pacientes de todo o Estado. Este serviço foi criado após a observação do aumento de isolamentos de MNT, pelo LACEN/SC, e devido à falta de atendimento especializado para estes pacientes, que não são vinculados ao Programa Nacional de Tuberculose. Atualmente, é realizada a busca dos pacientes dos quais são isoladas e identificadas MNT, para avaliação clínica e esclarecimento diagnóstico. Com esta integração do Laboratório de Referência com um serviço voltado para o atendimento dos pacientes com infecção por MNT, espera-se que haja maior valorização da ocorrência de micobacterioses, com encaminhamento adequado de todos os pacientes e melhor conhecimento da realidade epidemiológica do Estado.

## **7.2 Hospital de Referência**

### ***7.2.1 Avaliação de técnicas diagnósticas***

O controle efetivo da TB depende, principalmente, de um diagnóstico rápido e eficiente, que permita a instituição do tratamento adequado e consequente interrupção da cadeia de transmissão da doença (WHO, 2011). Além disso, com o aumento do número de isolamentos de MNT, a identificação da espécie de micobactéria tornou-se também importante, devido às diferenças nos protocolos de tratamento para cada espécie (GRIFFITH et al., 2007; WU et al., 2008; McGRATH et al., 2010). Entretanto, os métodos diagnósticos convencionais apresentam limitações importantes: enquanto a baciloscopia apresenta sensibilidade reduzida, o cultivo de micobactérias para diagnóstico e identificação da espécie necessita de um período de tempo maior para obtenção dos resultados (NEONAKIS et al., 2008; HATTA et al., 2010).

Os métodos moleculares, principalmente a PCR, surgem como uma alternativa para o diagnóstico rápido de micobactérias, fornecendo resultados em cerca de um dia. Seu emprego em amostras respiratórias e seu valor clínico são muito variáveis entre diferentes estudos (LANGE

& MORI, 2010; WILSON, 2011). Quando avaliados em meta-análises, testes moleculares (*in house* e comerciais) realizados em amostras com baciloscopia positiva apresentaram sensibilidade acima de 95%, o que demonstra sua utilidade na confirmação rápida do diagnóstico de TB (GRECO et al., 2006; GRECO et al., 2009). Em contraste, quando executados em amostras com baciloscopia negativa, apresentam resultados de sensibilidade muito heterogêneos (variando de 9% a 100%), especialmente em testes *in house*, o que dificulta sua adoção no diagnóstico de rotina (SARMIENTO et al., 2003; FLORES et al., 2005).

Dentre os diferentes alvos de amplificação, destacam-se o elemento de inserção *IS6110* e a região 16S rRNA (NEONAKIS et al., 2008). Verificou-se que uso do elemento de inserção *IS6110* favorece o aumento da acurácia diagnóstica dos métodos moleculares, devido às suas múltiplas cópias no genoma do CMTB (HERMANS et al., 1990; van SOOLINGEN et al., 1991; FLORES et al., 2005). Entretanto, este alvo não permite a detecção de MNT e, por isso, a região 16S rRNA também tem grande utilização no diagnóstico e identificação de micobactérias (HUGHES et al., 1993; SYRE et al., 2009).

Neste trabalho, a PCR convencional foi realizada utilizando-se como alvo a região 16S rRNA, que permite a detecção de micobactérias e posterior identificação da espécie. A sensibilidade global obtida foi 91,2% (IC95% 84,0- 99,0). Em relação às amostras positivas e negativas na baciloscopia, teve sensibilidade de 92,4% e 75,0%, respectivamente. Entretanto, o pequeno número de amostras com baciloscopia negativa (4) não permitiu uma boa avaliação da sensibilidade neste tipo de amostra. Este número reduzido pode ser explicado pelo tipo de amostragem do estudo, que utilizou como população os pacientes com diagnóstico de TB confirmado. Por este motivo, também, não foi possível calcular especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do método, já que seriam necessárias amostras negativas para TB para a realização dos cálculos.

As principais dificuldades envolvidas no diagnóstico molecular da TB são a natureza da amostra e seu processamento, a natureza fisiológica das micobactérias e o baixo número de bacilos presentes na amostra (THORNTON et al., 1998; GRECO et al., 2006; LIMA et al., 2008).

Em trabalho realizado anteriormente, Bazzo (2006) obteve uma sensibilidade de 62,1% na PCR para detecção de micobactérias diretamente de amostras de escarro, com a utilização do mesmo alvo, com os mesmos iniciadores deste estudo. A maior sensibilidade obtida no presente estudo (92,1%) pode ser atribuída, principalmente, ao

processamento inicial da amostra de escarro: ao protocolo tradicional, que utiliza N-acetil-L-cisteína (NALC) e solução de NaOH/SDS 1%, foram adicionadas pérolas de vidro. Assim, além da lise química, que contribui para a fluidificação e homogeneização da amostra, o atrito promovido pelas pérolas de vidro, mediante agitação, auxiliou no rompimento dos aglomerados de micobactérias, formados devido à produção do fator corda, e na distribuição dos bacilos na amostra. Com isso, aumentou-se a superfície de contato das soluções responsáveis pela lise celular com as micobactérias, permitindo maior eficiência da extração de DNA e aumento na sensibilidade da PCR (NOGUEIRA et al., *in press*).

Quando comparada aos resultados da baciloscopia, em cruces, a PCR não apresentou associação estatisticamente significativa. Ou seja, em amostras com baciloscopia positiva, a positividade da PCR não pareceu estar associada à quantidade de bacilos presentes na amostra. Isso reforça a idéia de que outras características, principalmente referentes à natureza da amostra de escarro, que contém uma gama diversa de componentes, principalmente enzimas, exercem importante influência na reação (NOORDHOEK et al., 2003; GRECO et al., 2009).

Estudos demonstraram que a coinfeção pelo HIV reduz a sensibilidade da baciloscopia, devido ao menor número de bacilos presentes em amostras de pacientes coinfectados (KIVIHYA-NDUGGA et al., 2004; PATEL et al., 2011; SCHERER et al., 2011). Entretanto, quando comparada à positividade da PCR, a coinfeção não apresentou associação significativa neste estudo, assim como relatado por Scherer e colaboradores (2011).

Também não houve associação estatisticamente significativa entre os resultados da PCR e o tempo de tratamento decorrido até a coleta da amostra. Observou-se que, mesmo em até 15 dias de tratamento, a sensibilidade da PCR não sofreu alteração significativa. Isso mostra que a PCR pode ser utilizada como ferramenta de auxílio na confirmação do diagnóstico mesmo após instituição recente da terapia, que muitas vezes é iniciada com base em sinais clínicos e sintomas, sem confirmação laboratorial. Em outros estudos, recomenda-se sua realização em um período de até 7 dias após o início do tratamento (YUEN et al., 1993b; KIRAZ et al., 2010).

Apesar de útil na confirmação do diagnóstico mesmo após a instituição da terapia, o uso da PCR não é recomendado como ferramenta para monitorar a resposta ao tratamento, uma vez que é capaz de detectar DNA de bacilos não-viáveis presentes na amostra (KIRAZ et al., 2010). Em estudo realizado por Hellyer e colaboradores

(1996), pacientes após 6 meses de tratamento com sinais clínicos e microbiológicos de cura, tiveram suas amostras submetidas à PCR. Observou-se 25% de positividade no teste, o que ocorreu devido à detecção de organismos sem viabilidade. Estudos indicam que o monitoramento da terapia pode ser realizado com o uso da RT-PCR (PCR antecedida de transcrição reversa), pela detecção do mRNA de micobactérias, presente somente quando há metabolismo celular ativo (KIRAZ et al., 2010).

A metodologia PCR em tempo real também vem sendo muito utilizada em pesquisas como intuito de aprimorar o diagnóstico de micobactérias, principalmente em amostras paucibacilares. Assim como a PCR convencional, apresenta resultados muito variáveis entre os diferentes estudos. Em amostras positivas na baciloscopia, apresenta sensibilidade acima de 95% (MILLER et al., 2002; HEGINBOTHOM, MAGEE & FLANAGAN, 2003; RENTON et al., 2009; BOHEME et al., 2011), enquanto em amostras pulmonares com baciloscopia negativa e amostras extrapulmonares, apresenta resultados heterogêneos, com sensibilidade variando de 37% a 95% (ARMAND et al., 2011; BOHEME et al., 2011; CAUSSE et al., 2011; INOUE et al., 2011; KALANTRI, HEMVANI & CHITNIS, 2011). Apesar dos resultados variados, muitos estudos exaltam os avanços obtidos com o uso da PCR em tempo real no diagnóstico de micobactérias em amostras paucibacilares (BRUIJNESTEIJN van COPPENRAET et al., 2004; RESTREPO et al., 2006; CAUSSE et al., 2011).

Dentre os diversos alvos de amplificação utilizados, destacam-se o *IS6110* (BROCCOLO et al., 2003; RESTREPO et al., 2006; FLORES et al., 2009; INOUE et al., 2011), que permite a detecção específica do CMTB, a região 16S rRNA (BURGGRAF et al., 2005; CHANDRAN & KENNETH, 2010; KALANTRI, HEMVANI & CHITNIS, 2011) e a região intergênica ITS 16S-23S (KRAUS et al., 2001; MILLER et al., 2002; BRUIJNESTEIJN van COPPENRAET et al., 2004). Com a utilização das duas últimas, é possível a detecção de *Mycobacterium sp.* e identificação da espécie de micobactéria. Ainda, diversos métodos de detecção da amplificação podem ser utilizados. Para a detecção de DNA de micobactérias, os mais comumente utilizados são *SYBR Green*, sondas *TaqMan* e *molecular beacons*. Devido a gama de alvos e metodologias de detecção, é grande a diversidade de protocolos adotados entre os diferentes estudos (PARASHAR et al., 2006).

Neste estudo, a região intergênica ITS 16S-23S foi utilizada como alvo de amplificação pela PCR em tempo real, o que possibilitou a detecção tanto de *M. tuberculosis* quanto de MNT. A região amplificada

possibilita, ainda, a utilização de sondas para detecção específica de *M. tuberculosis* e *M. avium* (BRUIJNESTEIJN van COPPENRAET et al., 2004), procedimento que não foi realizado neste estudo, mas será realizado posteriormente.

A sensibilidade analítica do ensaio apresentou diferenças entre as espécies, variando de 1pg de DNA para *M. fortuitum*, 10 fg para *M. tuberculosis* e 1 fg para *M. avium* e *M. kansasii*. Em estudo de padronização da metodologia de PCR em tempo real, Flores e colaboradores (2009) encontraram sensibilidade semelhante, de 3,3 fg de DNA, quantidade equivalente a 15 micobactérias.

A técnica de PCR em tempo real, quando aplicada às amostras de escarro, apresentou, inicialmente, sensibilidade de 60%. Após a diluição do DNA na proporção 1:10, a sensibilidade atingiu 100%, demonstrando sua aplicabilidade na detecção de micobactérias diretamente de amostras clínicas. Esta diferença na sensibilidade pode ser explicada pelo pequeno volume final da reação, de 10µL. Quando em reações com volume total maior, traços de inibidores da reação, potencialmente presentes na amostra de DNA, são diluídos a níveis subcríticos; já quando em volumes finais menores, esta diluição provavelmente é insuficiente e, assim, estas substâncias podem causar interferências na reação (BASTIEN; PROCOP & REISCHL, 2008). Então, apesar de todos os DNA extraídos diretamente de amostras de escarro terem sido avaliados pela PCR controle, de volume final 50µL, as reações de PCR em tempo real, de volume final 10µL, podem ter sofrido interferência de inibidores presentes nas amostras de DNA.

Estudos mostraram que, quando comparados à PCR convencional, os resultados obtidos com a utilização da PCR em tempo real parecem ser muito semelhantes. Assim como na PCR convencional, são obtidos melhores resultados em amostras respiratórias, em relação às extrapulmonares (LEMAÎTRE et al., 2004; PARASHAR et al., 2006). Estudos demonstraram que as reações de PCR em tempo real parecem estar menos sujeitas à ação de inibidores e a contaminações com *amplicons* e são realizadas em um tempo menor do que a PCR convencional (PARASHAR et al., 2006; RESTREPO et al., 2006). Entretanto, neste trabalho, observou-se que a técnica de PCR em tempo real apresentou maior susceptibilidade à ação de inibidores, o que foi contornado com a diluição do DNA a proporção 1:10.

Neste estudo, a sensibilidade obtida com a PCR em tempo real (100%) foi maior do que aquela obtida na PCR convencional (91,2%). Entretanto, sua aplicabilidade em amostras paucibacilares ainda deve ser estudada, uma vez que, neste estudo, o número de amostras negativas na

baciloscopia foi muito pequeno. Para isto, devem ser utilizadas amostras de pacientes com suspeita de TB, a fim de avaliar, além da sensibilidade, a especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da metodologia.

Embora o grande número de trabalhos na literatura, os métodos moleculares ainda não substituem os métodos tradicionais para o diagnóstico da TB e de outras micobactérias. Entretanto, sua inclusão na rotina laboratorial é recomendada como uma ferramenta auxiliar na agilização do diagnóstico (WILSON, 2011).

Além da detecção de micobactérias diretamente do escarro, muitos estudos demonstram a possibilidade da identificação da espécie a partir da amostra clínica. Para isto, diversas técnicas foram descritas, tais como *multiplex*-PCR (PARK et al., 2006; GOPINATH & SINGH, 2009; HATTA et al., 2010), PCR em tempo real (KIM et al., 2010; CHO et al., 2011), PCR seguida de análise com enzimas de restrição (KIM et al., 2008; WU et al., 2008; VARMA-BASIL et al., 2010) e técnicas de hibridização (SEAGAR et al., 2008; SYRE et al., 2009).

No estudo de Gopinath & Singh (2009), foi utilizado um protocolo de *multiplex*-PCR para detecção e identificação de *M. tuberculosis*, de MAC e do gênero *Mycobacterium*. A metodologia desenvolvida foi capaz de detectar e identificar a espécie em 77,24% das amostras clínicas testadas. Entretanto, dentre as MNT, somente o MAC pôde ser identificado; as demais espécies foram somente detectadas com iniciadores gênero-específicos. Em estudo utilizando técnica semelhante, Park e colaboradores (2006) identificaram *M. tuberculosis* em 96,4% das amostras positivas na baciloscopia e 70,2% em amostras negativas na baciloscopia, quando com diagnóstico de TB. Entretanto, a detecção só pôde ser realizada em 2,0% das amostras clínicas com diagnóstico confirmado de MNT.

Em trabalho utilizando PCR em tempo real, Kim e colaboradores (2010) amplificaram o gene *hsp65* de micobactérias e utilizaram sondas para detecção de *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. abscessus* e *M. fortuitum*, diretamente de amostras clínicas. A sensibilidade global da técnica foi 76,1%. Entretanto, observou-se um aumento na sensibilidade de acordo com o aumento do número de bacilos na amostra (60,9% em amostras com baciloscopia 1+ e 100% em amostras 3+) e, ainda, que a detecção e identificação de *M. tuberculosis* foi mais sensível em relação a algumas espécies de MNT.

Testes comerciais também estão disponíveis para a identificação de micobactérias diretamente da amostra clínica. Seagar e colaboradores (2008) e Syre e colaboradores (2009) avaliaram a aplicabilidade do teste

GenoType Mycobacteria Direct (Hain Lifescience GmbH, Alemanha), que possibilita a detecção e a identificação de *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* e *M. malmoense*, com sondas de hibridização. No primeiro estudo, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 80,5% e 75%, respectivamente, enquanto no segundo estudo, os valores obtidos foram de 93,3% e 90%. Em ambos os estudos, observou-se que a sensibilidade para detecção e identificação de MNT é menor em relação àquela obtida para *M. tuberculosis*. Como a sensibilidade dos métodos moleculares em amostras com baciloscopia negativa é muito variável, a utilização dos testes comerciais para identificação da espécie é recomendada para amostras com resultado positivo na baciloscopia.

Neste estudo, a identificação da espécie diretamente das amostras de escarro foi realizada utilizando-se as técnicas MMSA e PRA-*hsp65*. O MMSA foi capaz de identificar a espécie em 50,9% dos casos, enquanto o PRA-*hsp65* identificou em 47,4%. Varma-Basil e colaboradores (2010), utilizaram a metodologia PRA-*hsp65*, com as enzimas *Sau96I* e *CfoI*, diretamente de amostras de escarro. A sensibilidade global obtida foi de 76,6%, sendo de 84,5% em amostras positivas na baciloscopia e de 11,0% em amostras com baciloscopia negativa. Estes valores refletem a sensibilidade de identificação de *M. tuberculosis*, visto que na amostragem do estudo não havia amostras com MNT.

Utilizando o PRA-*hsp65* precedido de *nested-PCR*, Wu e colaboradores (2008) obtiveram sensibilidade de 89%. Observaram que houve aumento na sensibilidade de acordo com o aumento do número de bacilos na amostra (53,0% em amostras com baciloscopia 1+ e 100% em amostras 3+) e que a sensibilidade na detecção e na identificação de *M. tuberculosis* é maior em relação àquela para MNT.

Quando avaliadas separadamente, as sensibilidades do MMSA e do PRA-*hsp65* apresentaram valores muito baixos em relação ao descrito na literatura. Entretanto, quando utilizadas em associação, possibilitaram a identificação da espécie em 75,4% das amostras de escarro. Ao contrário do observado por Wu e colaboradores (2008) e Kim e colaboradores (2010), na identificação da espécie diretamente de amostras clínicas, não foi encontrada associação entre os valores em cruzes da baciloscopia e a sensibilidade do método de identificação. Devido ao pequeno número de amostras negativas na baciloscopia, a avaliação do rendimento das técnicas neste tipo de amostras foi prejudicada.



Assim como ocorrido na realização da PCR convencional, não foi observada associação da sensibilidade dos métodos com a coinfeção pelo HIV nem em relação ao tempo de tratamento decorrido até a coleta da amostra de escarro. Portanto, a confirmação da espécie pelos métodos MMSA e PRA-*hsp65* pode ser realizada mesmo após alguns dias do início do tratamento.

Verificou-se, ainda, que dentre as 30 amostras não identificadas pelo método PRA-*hsp65*, 27 apresentaram resultado negativo na PCR, enquanto as outras 3 apresentaram resultado positivo, mas quantidade de DNA insuficiente para a observação do resultado da identificação da espécie. Já no método MMSA, das 28 amostras não identificadas, somente 5 apresentaram resultado negativo na PCR, enquanto as demais apresentaram resultado positivo, mas quantidade de DNA insuficiente para identificação da espécie. Assim, pode-se concluir que o método MMSA tem maior sensibilidade na detecção de micobactérias (91,2%) em relação ao PRA-*hsp65* (52,6%), apesar de não apresentarem diferenças significativas em relação à capacidade de identificação da espécie a partir da amostra clínica (50,9% e 47,4%).

As metodologias utilizadas neste estudo apresentam como vantagem, em relação às demais técnicas descritas na literatura, a possibilidade de identificação 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 para cada espécie, o método PRA-*hsp65* é capaz de realizar a identificação de diversas espécies de acordo com o padrão de bandas obtido na eletroforese. O método MMSA também pode ser realizado para a detecção de diversas espécies, desde que seja possível a obtenção do DNA da espécie a ser pesquisada (amostra padrão).

Como mencionado anteriormente, Seagar e colaboradores (2008), Wu e colaboradores (2008) e Syre e colaboradores (2009) observaram, na execução de testes de identificação de micobactérias diretamente de amostras clínicas, uma sensibilidade menor para MNT em relação a *M. tuberculosis*. Neste estudo, apenas uma amostra das 57 avaliadas foi identificada como MNT. Assim, para avaliar melhor o desempenho dos testes, um estudo com mais amostras de escarro contendo MNT é necessário.

Pode-se concluir que a associação dos métodos MMSA e PRA-*hsp65* permite a identificação precoce, em cerca de um dia, de cerca de 75% das amostras testadas. Nesses casos, então, já é possível a instituição da terapêutica adequada com a confirmação da espécie

causadora da infecção, de forma rápida, sem a necessidade de isolamento em cultura para esse propósito.

### ***7.2.2 Determinação da ocorrência de doença pulmonar causada por MNT em pacientes internados com diagnóstico de TB***

A baciloscopia é considerada o método de escolha para a detecção dos casos de TB, por demonstrar mais rapidamente a presença do agente etiológico e, desta forma, agilizar a implantação de ações para eliminar os focos infecciosos da doença. Em países em desenvolvimento, a cultura para isolamento e identificação de *M. tuberculosis* não é realizada em grande parte dos casos. Devido aos altos índices de TB, geralmente, pacientes sintomáticos e com resultado positivo na baciloscopia são tratados com fármacos tuberculostáticos. Com isso, infecções causadas por MNT muitas vezes são tratadas desta mesma forma e, somente após a falha da terapia instituída para TB, a cultura para identificação da espécie é realizada (JEON et al., 2005; GRUBEK-JAWORSKA et al., 2009; ZAMARIOLI et al., 2009).

Em estudo realizado no Irã, Tabarsi e colaboradores (2009) realizaram a identificação da espécie em isolados de cultura de todos os pacientes com suspeita de TBMR, encaminhados para o Centro de Referência Nacional. Dos 105 pacientes participantes, 12 (11,43%) apresentavam infecção por MNT e não por *M. tuberculosis*. Em trabalho semelhante realizado no Brasil, no Estado da Bahia, 19 (8,2%) dos 231 pacientes suspeitos de TBMR avaliados por Matos e colaboradores (2004) apresentavam infecção por MNT. Estes estudos reforçam a importância da identificação da espécie, principalmente em pacientes suspeitos de TBMR, a fim de evitar gastos desnecessários com o tratamento inadequado do paciente, com os altos custos do tratamento da TBMR, que seria adotado sem necessidade, e devido às complicações com a falha da terapia.

Nos anos de 1995 e 1996, Gomes e colaboradores (2000) realizaram trabalho para verificar o perfil de resistência de *M. tuberculosis* em pacientes HIV-soropositivos internados no Hospital de Referência Nereu Ramos, mesma instituição em que foi realizado o presente estudo. Dentre os 39 isolados de micobactérias obtidos, 3 (7,7%) foram identificados como MNT e apresentaram resistência à maioria dos fármacos utilizados no teste de sensibilidade. Sem a

realização do estudo, esses pacientes seriam abordados como portadores de TB, devido à falta do diagnóstico correto.

Neste estudo, das 57 amostras coletadas de pacientes internados com diagnóstico de TB, somente 1 (1,8%) foi identificada como MNT. Apesar da pequena amostragem, este dado pode indicar que os médicos que atuam no serviço estão atentos para a possibilidade de infecção por MNT e realizam o diagnóstico de forma adequada, principalmente após a abertura do ambulatório para atendimento de pacientes com micobacteriose e também devido ao auxílio do Laboratório de Referência, que encaminha para identificação as amostras suspeitas de acordo com os testes laboratoriais, mesmo sem suspeita clínica inicial. Pode-se somar a isto a possibilidade de que, apesar das falhas na terapia instituída para TB, os pacientes infectados por MNT podem não apresentar complicações que necessitem de internação, podendo ser abordados ambulatorialmente. Assim, a identificação da espécie e alteração de diagnóstico ocorrem, em sua maioria, de forma ambulatorial.

### ***7.2.3 Perfil dos pacientes internados com diagnóstico de TB***

O tratamento para TB deve ser realizado, preferencialmente, em regime ambulatorial, acompanhado pelas unidades básicas de saúde. A hospitalização devido à TB é indicada somente em casos graves da doença ou naqueles em que a probabilidade de abandono do tratamento é alta, principalmente em virtude das condições sociais do paciente (CALIARI & FIGUEIREDO, 2007).

Em países desenvolvidos, as principais causas de internação são falência do tratamento e a presença de efeitos adversos aos medicamentos, enquanto em países em desenvolvimento, o mau estado geral e a caquexia são as principais características dos pacientes indicados para internação, sinalizando falhas no processo de busca da atenção básica em saúde (OLIVEIRA et al., 2009).

Observou-se um predomínio do gênero masculino na população de estudo, o que também é relatado na literatura, tanto em relação à prevalência da TB quanto em relação aos pacientes hospitalizados em razão da doença (OLIVEIRA et al., 2009; GONÇALVES, CAVALINI & VALENTE, 2010; WHO, 2011a). Estudos demonstraram que os homens adoecem de TB em maior proporção do que as mulheres, e esta distribuição ocorre tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em

desenvolvimento (RIEDER, 1999). Em relação às internações, Galesi (2003) observou que pacientes do sexo masculino têm 1,6 vezes mais chances de ser internados devido à TB em relação àqueles do sexo feminino.

Quanto à faixa etária, os resultados encontrados neste trabalho são compatíveis com estudos que evidenciam que, em países em desenvolvimento, a tuberculose acomete principalmente a população economicamente ativa. Isto confere uma conotação social à doença e ocorre de forma diferente dos países desenvolvidos, onde a população mais atingida faz parte das faixas etárias mais avançadas (SEVERO et al., 2007; BRASIL, 2010b; FORTÚN et al., 2011). A maior ocorrência de TB em mulheres de faixas etárias mais jovens também está em conformidade com o relatado em outros estudos (OLIVEIRA et al., 2010). De acordo com Donald, Marrais & Barry (2010), isto se deve à concentração de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS, metabólito da dehidroepiandrosterona - DHEA), que se eleva antes em meninas em relação aos meninos, na fase da puberdade. A interação da DHEA com glicocorticóides leva a alterações na concentração de interferon- $\gamma$ , citocina essencial na resposta imune à TB. Estas alterações atingem seu pico entre os 20 e 24 anos, época na qual as mulheres estão mais susceptíveis a desenvolver a doença, e declinam após essa idade.

O predomínio de pacientes da cor branca (79,2%) reflete o perfil demográfico do Estado de Santa Catarina, no qual cerca de 83% dos habitantes são brancos (IBGE, 2010).

Em Santa Catarina, há diferenças regionais importantes no que diz respeito aos indicadores de TB. Em relação às internações, observou-se um predomínio de pacientes procedentes da Grande Florianópolis (83,02%), região que, juntamente com a Foz do Rio Itajaí, apresenta os maiores índices de TB no Estado: mais de 41 casos/100.000 habitantes. Em contraste, as regiões Extremo Oeste e Planalto Serrano têm taxas de 0-10 e 11-20 casos/ 100.000 habitantes, respectivamente (DIVE, 2009). Ainda, a proximidade dos municípios da Grande Florianópolis ao Hospital de Referência, localizado na mesma região, também favorece a internação desses pacientes.

A situação da tuberculose no mundo revela que a doença está ligada, entre outros fatores, à pobreza e à má distribuição de renda (BRASIL, 2008b). Os dados referentes ao grau de escolaridade, ocupação e moradia podem caracterizar a questão social da população do estudo, visto que grande parte tem baixo nível de escolaridade e exerce ocupações não especializadas, além da porcentagem considerável de moradores de rua e presidiários. No Brasil, tem-se observado

mudanças no quadro de incidência de TB quanto à escolaridade, na população geral: de 2001 a 2009, a proporção de indivíduos com mais de 8 anos de estudo passou de cerca de 20% para cerca de 40% (BRASIL, 2010c). Entretanto, entre os pacientes internados, essa tendência não foi observada e não deve ser seguida, visto que as causas sociais ainda são fatores importantes para a internação.

Neste estudo, a taxa de coinfeção TB/HIV entre os pacientes internados foi de 58,5%, em contraste com a taxa de coinfeção de 21% da população geral do Estado de Santa Catarina (BRASIL, 2010c). Em geral, a porcentagem de pacientes soropositivos tende a ser maior entre pacientes hospitalizados em relação ao verificado na população ambulatorial de pacientes com TB, por manifestarem complicações infecciosas mais graves, e conforme a complexidade do hospital, caso seja também referência para Aids, o que também ocorre neste trabalho (RIBEIRO & MATSUI, 2003). Em estudo de Gonçalves e colaboradores (2010), a coinfeção TB/HIV foi observada em 34,2% dos pacientes internados, em comparação com 17,9% encontrada no total de pacientes com TB.

Deve ser do conhecimento dos profissionais da saúde que, sendo a TB doença definidora de Aids, o teste sorológico para HIV deve ser ofertado a todos os pacientes com esta condição (PIRES NETO et al., 2010; BRASIL, 2011b). Neste estudo, o teste foi realizado em 96,7% dos pacientes internados, favorecendo uma abordagem adequada da coinfeção. No Brasil, em 2009, a testagem foi realizada somente em cerca de 50% dos casos novos de TB, enquanto em Santa Catarina, este índice foi de 65% (BRASIL, 2010c). Em estudo de Severo e colaboradores (2007) com pacientes internados, a testagem para o HIV foi realizada em 76% dos casos, enquanto em estudo de Pires Neto e colaboradores (2010), a coinfeção foi investigada em somente 54% dos casos.

Quanto à distribuição por formas clínicas, entre a população geral, ocorre cerca de 80% de formas pulmonares e 20% de formas extrapulmonares (BRASIL, 2010c). Entretanto, entre pacientes internados e em pacientes coinfectados pelo HIV, a razão entre TB pulmonar e TB extrapulmonar tende a ser menor (SHARMA & MOHAN, 2004; GONÇALVES, CAVALINI & VALENTE, 2010). Neste estudo, 78,8% dos pacientes apresentaram a forma pulmonar da doença e 38,7%, formas extrapulmonares. Estes dados são justificados pela alta coinfeção com HIV e pela maior gravidade das formas extrapulmonares, que necessitam, com maior frequência, de internação. Dentre as formas extrapulmonares, as mais frequentes foram

meningoencefálica e ganglionar periférica, comumente relatadas na literatura em pacientes coinfectados pelo HIV (SHARMA & MOHAN, 2004; KINGKAEW et al., 2009; SANTO, SANTOS & MOREIRA, 2009).

As comorbidades são, reconhecidamente, fatores de risco para a ocorrência de formas clínicas mais graves e de difícil diagnóstico. Em estudo de Gonçalves, Cavalini & Valente (2010), observou-se a associação de comorbidades à TB em 10,8% dos pacientes ambulatoriais, enquanto 66,2% dos pacientes internados apresentavam doenças associadas. Neste estudo, 60,4% dos pacientes apresentaram outras comorbidades, além do HIV, associadas à TB. Dentre elas, o uso de drogas de abuso foi o mais frequente (28,8%), seguido do alcoolismo (21,2%). Diversos estudos relatam o alcoolismo como a principal comorbidade associada à TB, sendo apontado como fator de reativação da doença e de dificuldade para adesão ao tratamento; já o uso de drogas de abuso é pouco relatado. Ainda, verificou-se em outros trabalhos, maior importância das hepatites em associação à TB, o que não foi observado neste estudo (RIBEIRO & MATSUI, 2003; SEVERO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; SANTO, SANTOS & MOREIRA, 2009).

Observou-se que para grande parte dos pacientes internados (82,6%), foi instituído o esquema padrão para o tratamento da TB. O índice de TBMR foi de 5,2%, valor semelhante ao encontrado por Severo e colaboradores (2007) e bem abaixo daqueles encontrados por Ribeiro & Matsui (2003) e Caliaro & Figueiredo (2007), de 12,5% e 26,3%, respectivamente, em pacientes internados.

Quanto ao tipo de entrada para internação, 44,8% dos pacientes eram casos novos de TB. No Brasil, o diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes com TB é de responsabilidade do sistema básico de saúde. A alta porcentagem encontrada indica que houve falhas nesse sistema, quer pelo acesso difícil para o paciente, quer pela baixa resolutividade das equipes. Entretanto, os números encontrados são menores em relação àqueles do estudo conduzido por Gonçalves, Cavalini & Valente (2010), no qual o primeiro diagnóstico foi realizado em 69,2% dos casos; em 12%, ocorreram casos de recidiva ou abandono e apenas 4,5% dos pacientes já estavam sendo acompanhados em outras unidades de saúde no advento da internação hospitalar. Em estudo de Ribeiro e Matsui (2003), 77,3% dos pacientes internados tiveram o primeiro diagnóstico realizado no hospital.

Observou-se que, dentre os pacientes reingressos após abandono, 76% eram HIV-soropositivos. Apesar do abandono do tratamento ter

múltiplas causas, principalmente sociais, a associação de efeitos colaterais dos esquemas terapêuticos instituídos para TB e HIV podem atuar como um agravante, favorecendo a relação entre retratamento por abandono e coinfeção pelo HIV, que foi encontrada também em outros estudos (CORTEZI & SILVA, 2006; PAULA, 2008; CAMPANI, MOREIRA & TIETBOHEL, 2011). Em ambiente hospitalar, esta associação também pode ser verificada devido à possibilidade de instalação da doença com maior gravidade nos pacientes coinfectados, após o abandono do tratamento, o que leva a uma maior necessidade de internação.

Verificou-se, também, que 30,7% dos pacientes internados eram procedentes da atenção básica em saúde. Estes dados podem justificar o pequeno número de amostras de escarro que foram coletadas neste estudo, visto que os pacientes transferidos, geralmente, já estavam com a terapia instituída e muitas vezes não preenchiam os critérios de inclusão quanto ao tempo de tratamento.

Em relação ao encerramento do caso, 71,7% dos pacientes internados com TB foram transferidos aos cuidados da atenção básica em saúde, após a melhora clínica, para dar continuidade ao tratamento. O índice de abandono foi de 5,2%, óbitos ocorreram em 13,2% dos casos e 1,5% dos pacientes receberam alta por cura. Valores semelhantes foram encontrados em trabalhos de Oliveira e colaboradores (2009) e Gonçalves, Cavalini & Valente (2010), evidenciando as principais características do serviço hospitalar para TB no Brasil. Oliveira e colaboradores (2009) verificaram que a taxa de óbitos em hospitais é maior que aquela relatada pela atenção básica em saúde, devido à gravidade da situação clínica dos pacientes internados em relação aos pacientes ambulatoriais. Já na instituição relatada por Caliarí e Figueiredo (2007), o serviço caracterizou-se por longas internações e taxas de 40% de cura, diferindo do padrão observado no país.

O tempo de internação variou de 1 a 265, com mediana de 17 dias, sendo que 44,8% dos pacientes permaneceram internados de 1 a 14 dias. Estudos de Gonçalves, Cavalini & Valente (2010) e Ribeiro & Matsui (2003) relataram tempos médios de internação de 25 e 29 dias, respectivamente. Em contraste, em estudo de Caliarí e Figueiredo (2007), 47,6% dos pacientes permaneceram internados de 100 a 200 dias; entretanto, este tempo é justificado pela alta porcentagem de pacientes que receberam alta por cura (40%), isto é, que permaneceram internados durante todo o tratamento, o que não é característico do serviço de referência do presente estudo. Assim como relatado por

Ribeiro e Matsui (2003), quando avaliado o tempo de internação em relação às comorbidades, não foi verificada associação com a positividade ao HIV; entretanto, o período de internação foi estatisticamente maior em pacientes apresentando outras comorbidades.

Nas duas últimas décadas, foi debatida a possibilidade de extinção dos hospitais de tisiologia no Brasil. Contudo, isto ainda não é possível devido, principalmente, ao caráter social da doença (OLIVEIRA et al., 2009). Poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o perfil das hospitalizações por TB no Brasil (OLIVEIRA, CAVALINI E VALENTE, 2010). Entretanto, sua realização tem grande importância para o conhecimento da realidade epidemiológica do serviço, o que possibilita a implantação de estratégias que permitam o atendimento e o apoio adequados à população atendida. Também, medidas que facilitem o acesso e a permanência do paciente na atenção básica em saúde devem ser ampliadas, por meio de medidas de suporte social, tratamento supervisionado e comunicação adequada entre todos os níveis de atendimento em saúde (RIBEIRO & MATSUI, 2003; CALIARI & FIGUEIREDO, 2007).

#### ***7.2.4 Perfil dos pacientes internados com micobacteriose***

Assim como para a TB, o tratamento e acompanhamento dos casos de micobacterioses são realizados, preferencialmente, de forma ambulatorial. Considerando-se os altos índices de TB no Estado, já era esperado que o número de internações por TB fosse muito superior às internações de pacientes com doença causada por MNT. Já em países desenvolvidos, nos quais os casos de TB e MNT têm índices parecidos, o número de internações por micobacterioses é mais significativo. Em estudo coordenado por Billinger e colaboradores (2009), foram registradas 23.216 internações associadas a infecções por MNT no período de 1998 a 2005, em 11 Estados dos Estados Unidos da América.

Billinger e colaboradores (2009) observaram um predomínio do gênero feminino e de pacientes com mais de 70 anos entre os internados com micobacterioses. Observou-se que esses dados refletem a realidade dos pacientes ambulatoriais quanto ao gênero; entretanto, quando comparadas as faixa etárias, verificou-se que a média de idade de pacientes internados é maior em relação àquela de pacientes ambulatoriais. Neste estudo, devido ao pequeno número de pacientes, não foi possível verificar o predomínio de um gênero. A média de idade



dos pacientes internados foi 50,8 anos; quando comparada à média de idade dos pacientes com micobacterioses do item 6.1 (46,08 anos), não foi possível verificar diferença significativa.

Dentre os 6 pacientes internados, houve predomínio de infecção pelo MAC (4 pacientes), da forma pulmonar da doença (5 pacientes) e de pacientes HIV-soronegativos (4 pacientes). Estas características foram verificadas também entre os pacientes com micobacterioses identificados no Laboratório de Referência neste trabalho (item 6.1.1) e em diversos estudos (WINTHROP et al., 2010; SIMONS et al., 2011). Em estudo com pacientes hospitalizados, Billinger e colaboradores (2009) verificaram que 71% daqueles com micobacteriose pulmonar eram HIV-soronegativos. No caso de internações, é importante ressaltar que pacientes HIV-soropositivos, devido à imunossupressão, podem estar internados por outras causas que não a doença causada por MNT.

Dentre os pacientes HIV-soropositivos deste estudo, um apresentou a forma pulmonar e outro apresentou a forma disseminada da doença, causadas por *M. avium*. Esta associação de HIV, *M. avium* e doença disseminada é frequentemente relatada na literatura (FERREIRA et al., 2002; KARAKOUSIS, MOORE & CHAISSON, 2004; TORTOLI, 2009).

Observou-se que os 4 pacientes HIV-soronegativos apresentavam alguma outra doença associada à infecção por MNT. Diversos estudos demonstraram que o desenvolvimento de micobacteriose está altamente relacionado com a presença de fatores de risco, principalmente doenças pulmonares pré-existentes (AREND, van SOOLINGEN & OTTENHOFF, 2009; CASSIDY et al., 2009; KENDALL et al., 2011). Billinger e colaboradores (2009) também encontraram uma alta associação entre micobacterioses e presença de fatores de risco. Os autores não encontraram alguma comorbidade predominante; no entanto, doenças pulmonares pré-existentes (principalmente DPOC) e doenças cardiovasculares pré-existentes (principalmente hipertensão arterial e fibrilação atrial) foram mais comuns entre os achados.

Verificou-se que 4 dos 6 pacientes foram, inicialmente, diagnosticados como TB e, até o diagnóstico correto de MNT, decorreram de 8 meses a 3 anos. Observou-se, ainda, que em 2 casos ocorreram 3 internações até a alteração do diagnóstico. Estes dados reforçam a importância da realização da cultura e da identificação da espécie para todos os casos de suspeita de TB, além da necessidade de valorização do resultado pelo clínico. Com o diagnóstico correto e adoção do tratamento indicado para a espécie identificada, são evitados gastos desnecessários com tratamento inadequado e complicações

decorrentes da falha terapêutica, além de propiciar melhores condições de saúde ao paciente.

Observou-se, ainda, que decorrido pouco mais de um ano do início do tratamento, nenhum paciente teve indicação de cura: 3 pacientes foram a óbito e os outros 3 estão com o tratamento em curso. Após 18 meses de acompanhamento de 12 pacientes, Tabarsi e colaboradores (2009) observaram melhora clínica em todos os casos. Já em estudos coordenados por Andréjak e colaboradores (2007 e 2010), verificou-se que o índice de mortalidade foi de 67% e 40,1%, respectivamente, após 5 anos de acompanhamento dos pacientes. Entretanto, em muitos casos, a causa primária do óbito pode ser atribuída às comorbidades associadas às micobacterioses, e não à infecção por MNT.

Existem poucos estudos na literatura abordando hospitalizações ocorridas em função de doenças causadas por MNT. Entretanto, sua realização tem grande importância para o conhecimento da realidade epidemiológica e das necessidades dos pacientes, o que possibilita a implantação de estratégias que permitam o atendimento e o apoio adequado à população atendida.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

1. No Estado de Santa Catarina, os isolados de MNT corresponderam a 5,4% do total de isolados de micobactérias. *M. avium* foi a espécie de maior ocorrência (39,8% dos casos), seguida de *M. fortuitum* (14,8%), *M. abscessus* (12,5%) e *M. kansasii* (6,8%). O pulmão foi o principal sítio de isolamento (85,3% dos casos) e 61,4% das amostras eram procedentes das regiões da Grande Florianópolis e do Vale do Itajaí;
2. O MMSA foi capaz de identificar 90,9% dos isolados de MNT, enquanto o PRA-*hsp65* identificou 100%. Os métodos apresentaram concordância de 90%. Após o sequenciamento do DNA dos isolados com resultados discordantes, observou-se que o MMSA identificou corretamente a espécie em 96,2% dos casos e o PRA-*hsp65*, em 93,8%;
3. Do total de isolados de MNT, 34,2% foram associados ao desenvolvimento de doença. O MAC foi o principal agente identificado (65,4% dos casos) e o pulmão foi o sítio de infecção mais frequente. *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. kansasii* e *M. simiae* também foram associados ao desenvolvimento de doença. Houve predomínio do gênero masculino e de pacientes HIV-soronegativos e a média de idade foi de 46 anos. Não houve destaque de nenhuma região do Estado em relação ao número de casos ou frequência de uma espécie;
4. Entre os pacientes internados com diagnóstico de TB, em apenas 1 caso (1,8%) foi identificada a presença de MNT;
5. A reação de PCR em tempo real padronizada neste estudo pode ser aplicada para a detecção de micobactérias a partir de amostras de escarro, desde que o DNA seja diluído na proporção 1:10;
6. Quando utilizadas para detecção de micobactérias diretamente de amostras de escarro, as técnicas de PCR e PCR em tempo real apresentaram sensibilidade de 91,2% e 100%, respectivamente, tomando-se como padrão áureo o cultivo em meio sólido. Os métodos MMSA e PRA-*hsp65* identificaram a espécie, diretamente de amostras de escarro, em 50,9% e 47,4% dos casos, respectivamente. Quando associados, possibilitaram a identificação da espécie 75,4% das

amostras. As metodologias avaliadas não sofreram influência da coinfeção pelo HIV, do tempo de tratamento anterior à coleta da amostra de escarro de até 15 dias e da quantidade de bacilos em amostras com baciloscopia positiva. Entretanto, necessitam ser avaliadas com um quantitativo maior de amostras com baciloscopia negativa.

7. Os pacientes internados com TB foram predominantemente do gênero masculino, na faixa etária de 35 a 49 anos, da raça branca, com ensino fundamental incompleto e exercendo ocupações não especializadas. A forma pulmonar foi mais frequente, embora a forma extrapulmonar tenha apresentado proporções maiores em relação à população geral. Os pacientes HIV-soropositivos corresponderam a 58,5% das internações e outras comorbidades estavam presentes em 60,4%, sendo o uso de drogas de abuso e álcool as mais frequentes. O tempo mediano de internação foi 17 dias e tratamento instituído em grande parte dos pacientes foi o DFC;

8. O número de pacientes internados com doença causada por MNT foi bem menor em relação àqueles internados com diagnóstico de TB. Não houve predomínio de um gênero e a média de idade foi de 50,8 anos. Entre os 6 pacientes internados, 4 tiveram diagnóstico inicial de TB. A doença pulmonar ocorreu em 5, o MAC foi o agente isolado em 4 e a coinfeção pelo HIV ocorreu em apenas 2. Os pacientes HIV-soronegativos apresentavam outras comorbidades associadas à infecção por MNT. O tempo médio de internação foi 34,3 dias. Após cerca de 1 ano do início do tratamento, nenhum caso foi encerrado com cura: 3 pacientes foram a óbito e 3 estão com o tratamento em curso;

O presente estudo permitiu a avaliação de técnicas moleculares que podem ser utilizadas como ferramentas para a agilização do diagnóstico e da identificação de micobactérias.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHEL, A. L.; WILLIAMS, M.; van HELDEN, P. D.; WARREN, R. M.; van PITTIUS, N. C. G. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases** [serial on the Internet], 2010. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/8/10-0314.htm>. Acesso em: out/2011.

AL-MAHRUQI, S. H.; van INGEN, J.; AL-BUSAIDY, S.; BOEREE, M. J.; AL-ZADJALI, S.; PATEL, A.; DEKHUIJZEN, P. N. R.; van SOOLINGEN, D. Clinical Relevance of Nontuberculous Mycobacteria, Oman. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.2, p. 292-294, 2009.

ALVAREZ-URIA, G. Lung disease caused by nontuberculous micobactéria. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 16, n. 3, p. 251-256, 2010.

ANDRÉJAK, C.; LESCURE, F-X.; DOUADI, Y.; LAURANS, G.; SMAIL, A.; DUHAUT, P.; JOUNIEAUX, V.; SCHMIT, J-L. Non-tuberculous mycobacteria pulmonary infection: Management and follow-up of 31 infected patients. **Journal of Infection**, v.55, p. 34-40, 2007.

ANDRÉJAK, C.; THOMSEN, V.O.; JOHANSEN, I. S.; RIIS, A.; BENFIELS, T. L.; DUHAUT, P.; SORENSEN, H. T.; LESCURE, F-X.; THOMSEN, R. W. nontuberculous Pulmonary Mycobacteriosis in Denmark Incidence and Prognostic Factors. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.181, p. 514-521, 2010.

AREND, S. M.; van SOOLINGEN, D.; OTTENHOFF, T.H. M. Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous micobactéria. **Current opinion in pulmonary medicine**, v.15, n.3, p. 201-208, 2009.

ARMAND, S.; VANHULS, P.; DELCROIX, G.; COURCOL, R.; LEMAÎTRE, N. Comparison of the Xpert MTB/RIF Test with an IS6110-TaqMan Real-Time PCR Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory and Nonrespiratory

Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.5, p. 1772-1776, 2011.

BARRERA, L. The Basics of Clinical Bacteriology. *In*: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3.ed. 2007. Disponível em: <http://www.tuberculosistextbook.com>. Acesso em: set/2011.

BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than “Conventional” PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.6, p. 1897-1900, 2008.

BAZZO, M. L. **Método de identificação e caracterização de micobactérias para uso em diagnóstico de rotina nos laboratórios de saúde e determinação da resistência**. 2006. 135f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BENTO, J. SILVA, A.S., RODRIGUES, F., DUARTE, R. Métodos diagnósticos em tuberculose. **Acta Médica Portuguesa**, v.24, n.1, p. 145-154, 2011.

BICMEN, C.; COSKUN, M.; GUNDUZ, A. T.; SENOL, G.; CIRAK, A.K.; TIBET, G. Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not? **New Microbiologica**, v.33, p. 399-403, 2010.

BILLINGER, M. E.; OLIVIER, K. N.; VIBOUD, C.; OCA, R. M.; STEINER, C.; HOLLAND, S. M.; PREVOTS, D. R. Nontuberculous Mycobacteria – Associated Lung Disease in Hospitalized Persons, United States, 1998-2005. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.10, p. 1562-1569, 2009.

BÖDDINGHAUS, B.; ROGALL, T.; FLORHR, T.; BLOCKER, H.; BOTTGER, E. C. Detection and identification of micobactéria by amplification of rRNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p. 1751-1758, 1990.

BOEHME, C. C.; NABETA, P.; HILLEMANN, D.; NICOL, M. P.; SHENAI, S.; KRAPP, F.; ALLEN, J.; TAHIRLI, R.; BLAKEMORE, R.; RUSTOMJEE, R.; MILOVIC, A.; JONES, M.; O'BRIEN, S.M.;

PERSING, D. H.; RUESCH-GERDES, S.; GOTUZZO, E.; RODRIGUES, C.; ALLAND, D.; PERKINS, M.D. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. **New England Journal of Medicine**, v.363,n.11, p. 1005-1015, 2010.

BOEHME, C. C.; NICOL, M. P.; NABERTA, P.; JOY, S.M.; GOTUZZO, E.; TAHIRLI, R.; GLER, M. T.; BLAKEMORE, R.; WORODRIA, W.; GRAY, C.; HUANG, L.; CACERES, T.; MEHDIYEV, R.; RAYMOND, L.; WHITELAW, A.; SAGADEVAN, K.; ALEXANDER, H.; ALBERT, H.; COBELENS, F.; COX, H.; ALLAND, D.; PERKINS, M.D. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralized use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. **Lancet**, v.377, p. 1495-1505, 2011.

BOMBARDA, S. Aspectos atuais e perspectivas futuras da tuberculose. **Pneumologia Paulista**, v.22, n.5,p.5, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde. **Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica**. 1.ed. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1.ed. Brasília, 2008a. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_laboratorio\\_tb.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf)>. Acesso em set/2011.

BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. **Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro: EAD/ENSP, 2008b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica conjunta Nº 01/2009. **Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento**. 2009a. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite\\_micobacteria/nota\\_tecnica\\_conjunta.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/nota_tecnica_conjunta.pdf). Acesso em: out/2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Nota Técnica Nº 2/2009. **Envio de cepas para identificação de espécie**. Rio de Janeiro, 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde / Fundação Nacional da Saúde. Vigilância Epidemiológica. **Informe Técnico da Tuberculose**. Disponível em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_tb\\_julho10\\_certo\\_22\\_07\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tb_julho10_certo_22_07_2010.pdf), 2010a. Acesso em: out/2011.

BRASIL. Ministério da Saúde/ Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Apresentação padrão do PNCT**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2ap\\_padrao\\_tb\\_20\\_10\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2ap_padrao_tb_20_10_11.pdf), 2010b. Acesso em: jan/2012.

BRASIL. Ministério da Saúde/ Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Tuberculose no Brasil: perspectivas e desafios**. XII Seminário Estadual de Avaliação em Tuberculose, Florianópolis: 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tuberculose: situação epidemiológica**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa\\_incidencia\\_tb\\_1990\\_2010\\_atual\\_31\\_05\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_tb_1990_2010_atual_31_05_11.pdf), 2011a. Acesso em: nov/2011.

BRASIL. Ministério da Saúde/Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. 1.ed. Brasília, 2011b.

BROCCOLO, F.; SCARPELLINI, P.; LOCATELLI, G.; ZINGALE, A.; BRAMBILLA, A. M.; CICHERO, P. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 4565-4572, 2003.

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



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

BRUIJNESTEIJN van COPPENRAET, E.S.; LINDEBOOM, J. A.; PRINS, J. M.; PEETERS, M. F.; CLAAS, E.C.J.; KUIJPER, E. J. Real-time PCR assay using fine-needle aspirate and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.6, p. 2644-2650, 2004.

BURGGRAF, S.; REISCHL, U.; MALIK, N.; BOLLWEIN, M.; NAUMANN, L.; OLGEMÖLLER, B. Comparison of an internally Controlled, Large-Volume LightCycler Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples with the COBAS AMPLICOR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.4, p.1564-1569, 2005.

CALIARI, J.S.; FIGUEIREDO, R. M. Perfil de pacientes com tuberculose internados em hospital especializado no Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.9, n.4, p. 30-35, 2007.

CAMPANI, S. T. A.; MOREIRA, J. S.; TIETBOEHL, C. N. Fatores preditores para o abandono do tratamento da tuberculose pulmonar preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil na cidade de Porto Alegre (RS). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.37, n.6, p. 776-782, 2011.

CAMPOS, H.S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão**, v. 15, p. 29-35, 2006.

CASSIDY, P. M.; HEDBERG, K.; SAULSON, A.; McNELLY, E.; WINTHROP, K. L. Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology. **Clinical Infectious Diseases**, v.49, p. e124-e129, 2009.

CAUSSE, M.; RUIZ, P.; GUTIÉRREZ-AROCA, J. B.; CASAL, M. Comparison of two molecular methods for the rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.8, p. 3065-3067, 2011.

CHAN, E.; ISEMAN, M. Slender, older women appear to be more susceptible to nontuberculous mycobacterial lung disease. **Gender medicine**, v.7, n.1, 1-18, 2010.

CHANDRAN, S.P.; KENNETH, J. Evaluation of COBAS TaqMan real time PCR assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Indian Journal of Medical Research**, v.132, p. 100-102, 2010.

CHAUHAN, D.S.; SHARMA, V.D.; PARASHAR, D.; CHAUHAN, S.; SINGH, D.; SINGH, H.B.; DAS, R.; AGGARWAL, B. M.; MALHOTRA, B.; JAIN, A.; SHARMA, M.; KATARIA, V. K.; AGGARWAL, J. K.; HANIF, M.; SHAHANI, A.; KATOCH, V. M. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from different parts of India based on IS6110 element polymorphism using RFLP analysis. **Indian Journal of Medical Research**, v.125, n.4, p. 577-581, 2007.

CHEMLAL, K.; PORTAELS, F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. **Current opinion in infectious diseases**, v.16, n.2, p.77-83, 2003.

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

CHO, S. Y.; KIM, M.J.; SUH, J-T.; LEE, H. L. Comparison of Diagnostic Performance of Three Real-Time PCR Kits for Detecting *Mycobacterium* Species. **Yonsei Medical Journal**, v.52, n.2, p. 301-306, 2011.

CONDE, M. B.; MELO, F. A. F.; MARQUES, A. M. C.; CARDOSO, N. C.; PINHEIRO, V. G. F.; DALCIN, P. T. R.; MACHADO JUNIOR, A.; LEMOS, A. C. M.; RUFFINO NETTO, A.; DUROVNI, B.; SANT'ANNA, C. C.; LIMA, D.; CAPONE, D.; BARREIRA, D.; MATOS, E. D.; MELLO, F. C. Q.; DAVID, F. C.; MARSICO, G.; AFIUNE, J. B.; SILVA, J.R. L.; JAMAL, L. F.; TELLES, M. A. S.; HIRATA, M. H.; DALCOLMO, M. P.; RABAHI, M. F.; CAILLEAUX-CESAR, M.; PALACI, M.; MORRONE, N.; GUERRA,

R. L.; DIETZE, R.; MIRANDA, S. S.; CAVALCANTE, S. C.; NOGUEIRA, S. A.; NONATO, T. S. G.; MARTIRE, T.; GALES, V. M. N.; DETTONI, V. V. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.10, p. 1018-1048, 2009.

COOK, G. M.; BERNEY, M.; GEBHARD, S.; HEINEMANN, M.; COX, R.; DANILCHANKA, O.; NIEDERWEIS, M. Physiology of mycobacteria. **Advances in microbial physiology**, v. 55, p. 81-182, 2009.

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

CORTEZI, M. D.; SILVA, M. V. Abandono do tratamento da tuberculose em pacientes coinfectados com HIV, em Itajaí, Santa Catarina, 1999-2004. **Boletim de Epidemiologia Sanitária**, v.14, n.3, p. 145-152, 2006.

DELWART, E. L.; SHEPPARD, H. W.; WALKER, B. D.; GOUDSMIT, J.; MULLINS, J. I. Human Immunodeficiency Virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA Heteroduplex Mobility Assays. **Journal of Virology**, v.8, p. 6672-6683, 1994.

DIVE – **Diretoria de Vigilância Epidemiológica**. Setor de Tuberculose, 2009. Disponível em: < <http://www.dive.sc.gov.br>>. Acesso em: out/2011.

DONALD, P. R.; MARAIS, B. J.; BARRY, C. E. Age and the epidemiology and pathogenesis of tuberculosis. **The Lancet**, v.375, p. 1852-1854, 2010.

DUARTE, R.S.; LOURENÇO, M.C.; FONSECA, L. S.; LEÃO, S.C.; AMORIM EDE, L.; ROCHA, I. L.; COELHO, F.S.; VIANA-NIERO, C.; GOMES, K. M.; SILVA, M.G.; LORENA, N.S.; PITOMBO, M.B.; FERREIRA, R.M.; GARCIA, M.H.; OLIVEIRA, G.P.; LUPI, O.; VILAÇA, B.R.; SERRADAS, L.R.; CHEBABO, A.; MARQUES, E.A.; TEIXEIRA, L.M.; DALCOLMO, M.; SENNA, S.G.; SAMPAIO, J. L. Epidemic postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 2149-2155, 2009.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr>. Acesso em: out/2011.

FALKINHAM, J. O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. **Journal of applied microbiology**, v.107, n.2, p. 356-367, 2009.

FERREIRA, R. M. C.; SAAD, M. H. F.; SILVA, M. G.; FONSECA, L. S. Non-tuberculous Mycobacteria I: One Year Clinical Isolates Identification in Tertiary Hospital Aids Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in Pre Highly Active Antiretroviral Therapy Era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.5, p. 725-729, 2002.

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

FLORES, E.; RODRIGUEZ, J.C.; GARCIA-PACHÓN, E.; SOTO, J.L.; RUIZ, M.; ESCRIBANO, I.; ROYO, G. Real-time PCR with internal amplification control for detecting tuberculosis: method design and validation. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.117, n.8, p. 592-597, 2009.

FORTÚN, J.; MARTIN-DAVILA, P.; NAVAS, E.; LOPEZ-VELEZ, R.; PINTADO, V.; COBO, J.; GONZALEZ, A.; BONILLA, M.; ANEIRO, V.; GOMEZ-MAMPASO, E.; MORENO, S. Changes in the epidemiology of tuberculosis: the influence of international migration flows. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.29,n.9, p. 654-659, 2011.

FROES, G. C; COUTINHO, R.L.; CANÇADO, L. R.; ÁVILA, M. N.; MIRANDA, S. S. Perfil e seguimento dos pacientes portadores de *Mycobacterium sp.* do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. **Jornal de Pneumologia**, v.29, n.6, p. 365-370,2003.

GALES, V. M. **Internação por tuberculose no século XXI: o caso do Município de São Paulo**. 2003. 97f. Tese (Doutorado em Saúde

Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

GERSTEIN, A. S. **Molecular Biology** – Problem solver: A Laboratory Guide. New York: Wiley Liss, 2001.

GOMES, C.; ROVARIS, D. B.; SEVERINO, J.L.; GRUNER, M. F. Perfil de resistência de “*M. tuberculosis*” isolados de pacientes portadores do HIV/AIDS atendidos em um hospital de referência. **Jornal de Pneumologia**, v.26, n.1, p. 25-29, 2000.

GONÇALVES, B. D.; CAVALINI, L. T.; VALENTE, J. G. Monitoramento epidemiológico da tuberculose em um hospital geral universitário. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.36, n.3, p. 347-355, 2010.

GOPINATH, K.; SINGH, S. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* Complexes and other Mycobacterial species directly from clinical specimens. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.425-435, 2009.

GRECO, S.; GIRARDI, E.; NAVARRA, A.; SALTINI, C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Thorax**, v.61, p. 783-790, 2006.

GRECO, S.; RULLI, M.; GIRARDI, E.; PIERSIMONI, C.; SALTINI, C. Diagnostic accuracy of *in house* PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.3, p. 569-576, 2009.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S. M.;

HORSBURGH, R.; HIOTT, G.; IADEMARCO, M. F.; ISEMAN, M.; OLIVIER, K.; RUOSS, S.; von REYN, C.F.; WALLACE, R. J.; WINTHROP, K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nonbubertuclous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.175, n.4, p. 367-416, 2007.

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

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

GRUBEK-JAWORSKA, H.; WALKIEWICZ, R.; SAFIANOWSKA, A.; NOWACKA-MAZUREK, M.; KRENKE, R.; PRZYBYLOWSKI, T.; CHAZAN, R. Nontuberculous mycobacterial infections among patients suspected of pulmonary tuberculosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.28, p. 739-744, 2009.

GUTIERREZ, R. S.; SANTOS, B.R.; ESPINA, C. A. A.; AZAMBUJA, H. C. P.; SILVA, L. C. C. Tuberculose. In: SILVA, L. C. C. **Condutas em pneumologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. P.412-444.

HATTA, M.; SULTAN, A. R.; TANDIROGANG, N.; YADI, M. Detection and identification of mycobacteria in sputum from suspected tuberculosis patients. **BMC Research Notes**, v.3, n.72, p. 1-6, 2010.

HEGINBOTHOM, M.L.; MAGEE, J. T.; FLANAGAN, P. G. Evaluation of the Idaho Technology LightCycler™ PCR for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.7,n.1, p. 78-83, 2003.

HELLYER, T.J.; FLETCHER, T. W.; BATES, J. H.; STEAD, W. W.; TEMPLETON, G. C.; CAVE, M. D.; EISENACH, K. D. Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, v.173, p. 934-941, 1996.

HERMANS, P. W. M.; SCHUITEMA, A. R. J.; van SOOLINGEN, D.; VERSTEYNEN, C. P. H. J.; BIK, E. M.; THOLE, J. E. R.; KOLK,

A.H.J.; van EMBDEN, J. D. A.; Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p. 1204-1213, 1990.

HUGHES, M. S.; SKUCE, R. A.; BECK, L. A.; NEILL, S. D. Identification of micobactéria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p. 3216-3222, 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2010**. 2010. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/>. Acesso em: jan/2012

INOUE, M.; TANG, W.Y.; WEE, S.Y.; BARKHAM, T. Audit and improve! Evaluation of a real-time probe-based PCR assay with internal control for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **European Journal of Clinical Microbiolofy and Infectious Disease**, v.30, p. 131-135, 2011.

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

JEON, K.; KOH, W.-J.; KWON, O. J.; SUH, G. Y.; CHUNG, M. P.; KIM, H.; LEE, N. Y.; PARK, Y.K.; BAI, G. H. Recovery rate of NTM from AFB smear-positive sputum specimens at a medical centre in South Korea. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.9, n.9, p.1046-1051, 2005.

JHONSON, M.; WALLER, E. A.; LEVENTHAL, J. P. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.14, n.3, p. 203-210, 2008.

KALANTRI, Y.; HEMVANI, N.; CHITNIS, D. S. Evaluation of real-time polymerase chain reaction, interferon-gamma, adenosine deaminase and immunoglobulin A for the efficient diagnosis of pleural tuberculosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v.15, n.14, p. e226-e231, 2011.

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. **The Lancet**, v.4, p. 557-565, 2004.

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

KENDALL, B. A.; VARLEY, C. D.; CHOI, D.; CASSIDY, P. M.; HEDBERG, K.; WARE, M. A.; WINTHROP, K. L. Distinguishing tuberculosis from nontuberculous mycobacteria lung disease, Oregon, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.3, p. 506-509, 2011.

KIM, S.; PARK, E.M.; KWON, O. J.; LEE, J.H.; KI, C-S.; LEE, N. Y.; KOH, W-J. Direct application of the PCR restriction analysis method for identifying NTM species in AFB-smear-positive respiratory specimens. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.12, n.11, p. 1344-1346, 2008.

KIM, K.; LEE, H.; LEE, M-K.; LEE, S-A.; SHIM, T-S.; LIM, S. Y.; KOH, W-J.; YIM, J-J.; MUNKHTSETSEG, B.; KIM, W.; CHUNG, S-I.; KOOK, Y-H.; KIM, B-J. Development and Application of Multiprobe Real-time PCR Method Targeting *hsp65* Gene for Differentiation of *Mycobacterium* Species from Isolates and Sputum Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.9, p. 3073-3080, 2010.

KIRAZ, N.; SAGLIK, I.; KIREMITCI, A.; KASIFOGLU, N.; AKGUN, Y. Evaluation of the GenoType Mycobacteria direct assay for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex obtained from sputum samples. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p. 930-934, 2010.

KIVIHYA-NDUGGA, L.; van CLEEFF, M.; JUMA, E.; KIMWOMI, J.; GITHUI, W.; OSKAM, L.; SCHUITEMA, A.; van SOOLINGEN, D.; NGANGA, L.; KIBUGA, D. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.3, p. 1012-1015, 2004.



KOH, W.-J.; KWON, O. J.; JEON, K.; KIM, T. S.; LEE, K.S.; PARK, Y. K.; BAI, G. H. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. **Chest**, v.129, n.2, p. 341-348, 2006a.

KOH, W.-J.; YU, C.-M.; SUH, G. Y.; CHUNG, M. P.; KIM, H.; KWON, O. J.; LEE, N.Y.; CHUNG, M. J.; LEE, K. S. Pulmonary TB and NTM lung disease: comparison of characteristics in patients with AFB smear-positive sputum. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.10, n.9, p. 1001-1007, 2006b.

KRAUS, G.; CLEARY, T.; YOUNG, A. K.; MILLER, N.; SEIVRIGHT, R.; SPRUILL, G.; HNATYSZYN, H. J. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex using fluorogenic probes and real-time PCR. **Molecular and cellular probes**, v.15, p. 375-383, 2001.

KUBICA, G. P.; DYE, W. E.; COHN, M.L.; MIDDLEBROOK, G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodiumhydroxide for culture of mycobacteria. **American Review of Respiratory Disease**, v.87, p. 775-779, 1963.

KWAN, C.K.; ERNS, J. D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.2, p. 351-376, 2011.

LAI, C.-C.; TAN, C.-K.; CHOU, C.-H.; HSU, H.-L.; LIAO, C.-H.; HUANG, Y.-T.; YANG, P.-C.; LUH, K.-T.; HSUEH, P.-R. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008.

LANGE, C.; MORI, T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. **Respirology**, v.15, n.2, p. 220-240, 2010.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEIJA, G.I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. 1.ed. European Commission, International Cooperation for Developing Countries, 2004. Disponível em: <http://www.esmycobacteriology.eu/PDF%20files/foreword.pdf>.

LEÃO, S.C.; TORTOLI, E.; EUZÉBY, J.P.; GARCIA, M. J. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* comb.nov.,

designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *Abscessus* subsp. Nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2311-2313, 2011.

LEMAÎTRE, N.; ARMAND, S.; VACHÉE, A.; CAPPILIEZ, O.; DUMOULIN, C.; COURCOL, R.J. Comparison of the Real-Time PCR Method and the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary and Nonpulmonary Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.9, p. 4307-4309, 2004.

LIMA, S. S. S.; CLEMENTE, W.T.; PALACI, M.; ROSA, R.V.; ANTUNES, C. M. F.; SERUFO, J. C. Conventional and molecular techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a comparative study. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, n.12, p. 1056-1062, 2008.

LOPES, A. J.; CAPONE, D.; MOGAMI, R.; TESSAROLO, B.; CUNHA, D. L.; CAPONE, R. B.; SIQUEIRA, H. R.; JANSEN, J.M. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. **Pulmão**, v.15, p. 253-261, 2006.

MARRAS, T.K.; CHEDORE, P.; YING, A. M.; JAMIESON, F. Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. **Thorax**, v.64, p. 661-666, 2007.

MATOS, E. D.; SANTANA, M. A.; SANTANA, M. C.; MAMEDE, P.; BEZERRA, B. L.; PANÃO, E. D.; SCHITINI FILHO, C. S.; LEMOS, A. C.M. Nontuberculosis Mycobacteria at a Multiresistant Tuberculosis Reference Center in Bahia: Clinical Epidemiological Aspects. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, p. 296-304, 2004.

McGRATH, E. E.; BLADES, Z.; McCABE, J.; JARRY, H.; ANDERSON, P.B. Nontuberculous mycobacteria and the lung: from suspicion to treatment. **Lung**, v.188, n.4, p. 269-282, 2010.

MILLER, N.; CLAREY, T.; KRAUS, G.; YOUNG, A. K.; SPRUILL, G.; HNATYSZYN, J. Rapid and Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Acid-Fast Bacillus Smear-Positive Respiratory Specimens and BacT/ALERT MP Culture Bottles by Using Fluorogenic

Probes and Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.11, p. 4143-4147, 2002.

MOSTOWY, S.; BEHR, M. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinics in chest medicine**, v.26, n.2, p. 207-216, 2005.

MOTTA e BONA, M. G.; LEAL, M. J. S.; MARTINS, L. M. S.; SILVA, R. N.; CASTRO, J. A.; MONTE, S. J. H. Restriction enzyme analysis of the clinical isolates from patients suspected of having pulmonary tuberculosis in Teresina, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.37, n.5, p. 628-635, 2011.

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

NGAMLERT, K.; SINTHUWATTANAWIBOOL, C.; McCARTHY, K. D.; SOHN, H.; STARKS, A.; KANJANAMONGKOLSIRI, P.; ANEKVORAPONG, R.; TASANEEVAPAN, T.; MONKONGDEE, P.; DIEM, L.; VARMA, J. K. Diagnostic performance and costs of Capilia TB for *Mycobacterium tuberculosis* Complex identification from broth-based culture in Bangkok, Thailand. **Tropical Medicine and International Health**, v.14, n.7, p. 748-753, 2009.

NGAN, G. J. Y.; NG, L. M.; JUREEN, R. T. P.; LIN, R. T. P.; TEO, J. W. P. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v.52, n.5, p. 546-554, 2011.

NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 152-157, 2000.

NOGUEIRA, C. L.; WILDNER, L. M.; SENNA, S. G.; ROVARIS, D.; GRUNER, M. F.; JAKIMIU, A. R.; SILVA, R. M.; BAZZO, M. L. Alternative sputum treatment to improve the PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. Article in press.

NUNES, E. A.; CAPITANI, E. M., COELHO, E.; PANUNTO, A. C.; JOAQUIM, O. A.; RAMOS, M. C. Doença pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não-tuberculosas entre pacientes recém-diagnosticados como HIV positivos em Moçambique, África. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, n.10, p.822-828, 2008.

OLIVEIRA, H. M. M. G.; BRITO, R. C.; KRITSKI, A. L.; RUFFINONETTO, A. Perfil epidemiológico de pacientes portadores de TB internados em um hospital de referência na cidade do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.8, p. 780-787, 2009.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B.; FREIRE, M. P.; ASSIS, D.B.; MADALOSSO, G.; PELLINI, A.C. G.; CÉSAR, M. L. V.; PISANI NETO, V.; BELTRAMELLI, M. M.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; SILVA TELLES, M. A.; SAMPAIO, J. L. M.; LEÃO, S. C. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v.67, n.2, p. 161-167, 2007.

PALMERO, D.J. Tuberculosis and HIV/Aids. *In*: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. 3.ed. 2007. Disponível em: <http://www.tuberculosistextbook.com>. Acesso em: set/2011.

PANDOLFI, J. R.; MALASPINA, A. C.; SANTOS, A. C. B.; SUFFYS, P. N.; OELLEMANN, M. A. C.; VALENTINI, S. R.; LEITE, C.Q.F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, p. 251-257, 2007.

PARASHAR, D.; CHAUHAN, D.S.; SHARMA, V.D.; KATOCH, V.M. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. **The Indian Journal of Medical Research**, v.124, p. 385-398, 2006.

PARK, H.; KIM,C.; PARK, K. H.; CHANG, C. L. Development and evaluation of triplex PCR for direct detection of mycobacteria in respiratory specimens. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p. 161-167, 2006.

PARSONS,L.; SOMOSKÖVI, A.; GUTIERREZ,C.; LEE, E.; PARAMASIVAN, C.N.; ABIMIKU, A.; SPECTOR, S.; ROSCIGNO, G.; NKENGASONG, J. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.2, p. 314-350, 2011.

PATEL, A. K.; THAKRAR, S. J.; GHANCHI, F. D. Clinical and laboratory profile of patients with TB/HIV coinfection: a case series of 50 patients. **Lung India**, v.28, n.2, p. 93-96, 2011.

PAULA, P. F. **Fatores associados à recidiva, ao abandono e ao óbito no retratamento da tuberculose pulmonar**. 2008. 136f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

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

PIRES NETO, R. J.; COSTA, C. O.; BASTOS FILHO, J. B. B.; LINS, J. M. M.; FEITOSA, R. G. F.; LEITÃO, T. M. J. S.; FAÇANHA, M. C.; PINHEIRO, V. G. F. Tuberculose em ambiente hospitalar: perfil clínico em hospital terciário do Ceará e grau de conhecimento dos profissionais de saúde acerca das medidas de controle. **RBPS**, v.23, n.2, p. 260-267, 2010.

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

RAGHAVAN,S.; ALAGARASU,K.; SELVARAJ, P. Immunogenetics of HIV and HIV associated tuberculosis. **Tuberculosis**, 2011. Article in press.

RAMACHADRAN, R.; PARAMASIVAN, C. N. What is new in the diagnosis of tuberculosis? Part 1: Techniques for diagnosis of tuberculosis. **Indian Journal of Tuberculosis**, v.50, p. 133-141, 2003.

RENISS – Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde. **Casos de infecção por micobactérias não tuberculosas notificadas**, 2009. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite\\_micobacteria/notificados.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/notificados.pdf). Acesso em: out/2011.

RENTON, B.J.; MORRELL, P. D.; COOKE, R.P. D.; DAVIES, P. D. O. Direct real-time PCR examination for *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples can be cost effective. **Health**, v.1, n.2, p. 63-66, 2009.

RESTREPO, B. I.; GOMEZ, D. I.; SHIPLEY, G. L.; McCORMICK, J. B.; FISHER-HOCH, S. P. Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. **Journal Microbiological Methods**, v.67, n.2, p. 220-229, 2006.

RIBEIRO, S. A.; MATSUI, T. N. Hospitalização por tuberculose em hospital universitário. **Jornal de Pneumologia**, v.29, n.1, p. 9-14, 2003.

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

RIEDER, H. L. **Epidemiologic basis of tuberculosis control**. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Paris: 1999.

ROCHA, A.S.; BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, E.D.; SILVA, M. V.B., FONSECA, L.; SAAD, M. H. DEGRAVE, W. M.; SUFFYS, P.N. Novel allelic variants of mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 4191-4196, 2002.

ROGALL, T.; FLOHR, T.; BOTTGER, E. C. Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p.1915-1920, 1990.

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

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

SALEEB, P.; OLIVIER, K.N. Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease: New Insights into Risk Factors for Susceptibility, Epidemiology, and Approaches to Management in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. **Current Infectious Disease Reports**, v.12,n.2, p. 198-203, 2010.

SANTO, L. A. L. A.; SANTOS, P. C. H.; MOREIRA, M. M. Perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes com tuberculose em hospital universitário da região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. **Bepa**, v.6, n. 68, p. 14-21, 2009.

SARMIENTO, O. L.; WEIGLE, K. A.; ALEXANDER, J.; WEBER, D. J.; MILLER, W. C. Assessment by Meta-Analysis of PCR for Diagnosis of Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p. 3233-3240, 2003.

SATYANARAYANA, G.; HEYSELL, S. K.; SCULLY, K. W.; HOUP, E. R. Mycobacterial infections in a large Virginia hospital, 2001-2009. **BMC Infectious Diseases**, v.11, p.113-117, 2011.

SCHERER, L. C.; SPERHACKE, R. D.; JARCZEWSKI, C.; CAFRUNE, P. I.; MICHELON, C. T.; RUPENTHAL, R.; RIBEIRO, M. O.; NETTO, A. R.; ROSSETTI, M. L. R.; KRITSKI, A. L. Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection. **BMC Pulmonary Medicine**, v.11, n.15, p. 1-24, 2011.

SEAGAR, A.L.; PRENDERGAST, C.; EMMANUEL, F.X.; RAYNER, A.; THOMSON, S.; LAURENSEN, I.F. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct Assay for the simultaneous detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex and four atypical mycobacterial

- species in smear-positive respiratory specimens. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p. 605-611, 2008.
- SEVERO, N. P. F.; LEITE, C. Q. F.; CAPELA, M.V.;SIMÕES, M. J. S. Características clínico-demográficas de pacientes hospitalizados com tuberculose no Brasil, no período de 1994 a 2004. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.33, n.5, p. 656-571, 2007.
- SHARMA,S.K.;MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. **The Indian Journal of Medical Research**, v.120.n.4, p. 316-353, 2004.
- SIA, I. G.; WIELAND, M.L. Current concepts in the management of tuberculosis. **Mayo Clinic Proceedings**, v.86, n.4, p. 348-361, 2011.
- SIMONS, S.; van INGEN, J.; HSUEH, P-R.; HUNG, N. V.; DEKHUIJZEN, P. N. R.; BOEREE, M. J.; van SOOLINGEN, D. Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Tract Infections, Eastern Asia. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.3, p. 343-349, 2011.
- SLOTAR, D.; ESCALANTE, P.; JONES,B. Pulmonary manifestations of HIV/Aids in the tropics. **Clinics in Chest Medicine**, v.23,p. 355-367, 2002.
- SOINI, H.; MUSSER, J.M. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. **Clinical Chemistry**, v.47, p. 809-814, 2001.
- STEINGART, K. R.; RAMSAY, A.; PAI,M. Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.5,n.3, p.327-331,2007.
- SUFFYS, P.N.; SILVA ROCHA, A.; OLIVEIRA, M.; DIAS CAMPOS, C. E.; WERNECK BARRETO, A. M.; PORTAELS, F.; RIGOUTS, L.; WOUTERS, G.; JANNES, G.; van REYBROECK, G.; MIJS, W.; VANDERBORGHT, B. Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.12, p. 4477-4482, 2001.
- SYRE, H.; MYNEEDU, V. P.; ARORA, V. K.; GREWAL, H. M. S. Direct detection of mycobacterial species in pulmonary specimens by two rapid amplification tests, the Gen-probe Amplified *Mycobacterium*



*tuberculosis* Direct Test and the GenoType Mycobacteria Direct Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.11, p. 3635-3639, 2009.

TABARSI, P.; BAGHAEI, P.; FARNIA, P.; MANSOURI, N.; CHITSAZ, E.; SHEIKHOLESLAM, F.; MARJANI, M.; ROUHANI, N.; MIRSAEIDI, M.; ALIPANAH, N.; AMIRI, M.; MASJEDI, M. R.; MANSOURI, D. Nontuberculous Mycobacteria Among Patients Who are Suspected for Multidrug-Resistant Tuberculosis – Need for Earlier Identification of Nontuberculous Mycobacteria. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.337, n.3, p. 182-184, 2009.

TAIWO, B.; GLASSROTH, J. Nontuberculous mycobacterial lung disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.24, n.3, p. 769-789, 2010.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n.3, p. 323-334, 2007.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, B. T. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p. 175-178, 1993.

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

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p. 319-354, 2003.

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

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. 9.ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2006, p.68-71.

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

van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P.W.M.; de HAAS, P. E. W., SOL, D.R.; van EMBDEN, A. The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains: evaluation of IS dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p. 2578-2586, 1991.

VARMA-BASIL, M.; PATHAK, R.; SINGH, K.; DWIVEDI, S. K. D.; GARIMA, K.; KUMAR, S.; SHARMA, D.; DHIMAN, B.; BOSE, M. Direct Early Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis from Clinical Samples. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.63, p.55-57, 2010.

WALÉRIA-ALEIXO, A.; KROON, E. G.; CAMPOS, M. A. S.; MARGUTI-PINTO, M.E.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C. Heteroduplex Mobility Assay for rapid, sensitive and specific detection of mycobacteria. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.36, p. 225-235, 2000.

WHO – World Health Organization. **The Global Plan to Stop TB 2006-2015**. Disponível em: <http://www.stoptb.org/global/plan/>. Acesso em: set/2011.

WHO – World Health Organization. **Global tuberculosis control 2011**, 2011a. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564380\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564380_eng.pdf). Acesso em: nov/2011.

WHO 2011b. **Tuberculosis diagnostics: Xpert MTB/RIF Test**. Disponível em: [http://www.who.int/tb/features\\_archive/factsheet\\_xpert\\_may2011update.pdf](http://www.who.int/tb/features_archive/factsheet_xpert_may2011update.pdf). Acesso em: nov/2011.

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

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

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

WINTHROP, K. L.; McNELLEY, E.; KENDALL, B.; MARSHALL-OLSON, A.; MORRIS, C.; CASSIDY, M.; SAULSON, A.; HEDBERG, K. Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Clinical Features An Emerging Public Health Disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.182, p. 977-982, 2010.

WU, T. L.; CHIA, J. H.; KUO, A. J.; SU, L. H.; WU, T. S.; LAI, H. C. Rapid identifications of micobactéria from smear-positive sputum samples by nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p. 3591-3594, 2008.

YUEN, L. K.; ROSS, B.C.; JACKSON, K.M.; DWYER, B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p. 1615-1618, 1993a.

YUEN, K. Y.; CHAN, K.S.; CHAN, C. M.; HO, B.S. W.; DAI, L. K.; CHAU, P.Y.; NG, M. H. Use of PCR in routine diagnosis of treated and untreated pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Pathology**, v.46, p. 318-322, 1993b.

ZAMARIOLI, L. A.; COELHO, A. G. V.; PEREIRA, C. M.; FERRAZOLI, L.; BAMMANN, R. H. Identificação laboratorial de micobactérias em amostras respiratórias de pacientes HIV-positivos com suspeita de tuberculose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.3, p. 290-297, 2009.



**APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**ESTUDO: “Tuberculose e doença pulmonar causadas por micobactérias em indivíduos soropositivos ao HIV: epidemiologia molecular e avaliação de técnicas diagnósticas”**

Eu, \_\_\_\_\_ confirmo que compreendi que:

1. O estudo acima intitulado refere-se a um projeto de pesquisa que visa melhorar o diagnóstico laboratorial da tuberculose com a utilização de um método molecular rápido e moderno chamado de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi-me explicado, também, que é muito importante fazer a identificação da espécie de bactéria que está me causando a tuberculose.
2. Estou ciente que coletarei uma amostra de escarro para ser utilizada no referido estudo e que esta amostra receberá uma numeração de forma que quando os resultados forem analisados e divulgados minha identidade não será revelada.
3. A amostra coletada é o escarro produzido espontaneamente e o procedimento de coleta não traz nenhum desconforto.
4. Confirmo ainda que entendi que esta amostra coletada não será utilizada para os exames de rotina solicitados pelo médico que está me atendendo, e que apenas é uma amostra que estou doando para pesquisa.
5. Mesmo que eu não me beneficie diretamente dos resultados da pesquisa estou ciente que estes resultados poderão contribuir

futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes.

6. Eu posso escolher participar ou não deste estudo. Minha decisão em participar desta pesquisa não implicará em quaisquer benefícios pessoais bem como não resultará em prejuízos pessoais.
7. Eu também sou livre para não participar desta pesquisa. Isto não implicará em quaisquer prejuízos pessoais. Coletando a amostra, eu estarei concordando em participar da pesquisa.
8. Todos os resultados dos testes laboratoriais feitos com a minha amostra serão sigilosos e somente serão utilizados para esta pesquisa.
9. A participação na pesquisa não gerará despesas pessoais, nem danos porque minha participação será apenas com a doação da amostra de escarro. Não será feita nenhuma intervenção no meu corpo.
10. Se eu tiver alguma dúvida a respeito, eu posso contatar a Professora Maria Luiza Bazzo pelos telefones 3721-8148 (Laboratório do Hospital Universitário).
11. Eu concordo em participar deste estudo.

Participante: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_