



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

ANA ROBERTA FUSCO DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS ISOLADAS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS PULMONARES
NO ESTADO DO PARÁ**

**BELÉM
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

ANA ROBERTA FUSCO DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS ISOLADAS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS PULMONARES
NO ESTADO DO PARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Karla Valéria Batista Lima

**BELÉM
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ANA ROBERTA FUSCO DA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE MICOBACTÉRIAS NÃO
TUBERCULOSAS ISOLADAS DE ESPÉCIMES CLÍNICOS
PULMONARES NO ESTADO DO PARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais. Área de Concentração: Patologia das Doenças Tropicais.

Aprovado em: 29 de novembro de 2012

Banca Examinadora

Profa. Dra. Karla Valéria Batista Lima

Orientador – IEC/SVS/MS

Profa. Dra. Maisa Silva de Sousa

Membro – NMT/UFPA

Profa. Dra. Silvia Helena Marques da Silva

Membro – IEC/SVS/MS

Prof. Dr. Philip Noel Suffys

Membro – Fiocruz

Profa. Dra. Antonia Margareth Moita Sá

Membro – CCBS/UEPA

Profa. Dra. Irna Carla do Rosário Souza Carneiro

Membro Suplente – CCBS/UEPA

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Costa, Ana Roberta Fusco da.

Caracterização genética de micobactérias não tuberculosas isoladas de espécimes clínicos pulmonares no Estado do Pará / Ana Roberta Fusco da Costa; orientadora, Karla Valéria Batista Lima. – 2012

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Micobactérias. 2. Pulmões – Doenças. 3. Pará. I. Lima, Karla Valéria Batista, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.24098115

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Karla Valéria Batista Lima, agradeço profundamente pela compreensão, pela confiança, pelos conselhos, pela ajuda em todas as etapas percorridas até a finalização deste trabalho, e principalmente pelo exemplo de perseverança, profissionalismo e amizade.

Agradeço a Dra. Maria Luiza Lopes, chefe da SABMI/IEC, pela amizade e inestimável ajuda. Por permitir a realização deste projeto dentro da SABMI. Por isolar, fornecer as cepas de micobactérias e me auxiliar em alguns experimentos. Nada disto teria sido possível sem a presença dela.

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

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

Ao Professor Dr. Philip Noel Suffys, por suas contribuições imprescindíveis nas análises e discussão de resultados.

Agradeço ao bolsista Jeann Ricardo da Costa Bahia pela amizade e grande ajuda no trabalho técnico de bancada. A colaboração dele, marcada pela competência e profissionalismo, foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

Aos estagiários e grandes amigos Emilyn, Wana, Joseline, Marília, Yan, João e Débora.

Aos meus pais, Maria das Graças Fusco da Costa e Vespasiano Pantoja da Costa, pelo amor e incentivo aos estudos.

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

Ao meu noivo Reynaldo Lima pelo exemplo, incentivo e companheirismo. Pelas conversas serenas que me deram forças para nunca desistir, lutar por meus objetivos e sempre buscar novas conquistas.

Às minhas irmãs de coração Sarah, Romina, Ismari, Ana Judith, Luana, Maria Luiza, Cintya, Silvia, Maurimélia, Maísa e Karla. Por todas as coisas boas que eu pude aprender com essas mulheres especiais e maravilhosas.

Aos meus amigos da SABMI, Andréa, Sirene, Edimilson, Maria Oneide, Madalena, Odete, Caetano, Raimundo Nonato, Cláudio, Cláudia, Muller, Arnaldo, José Góes e Dolores.

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

Ao Núcleo de Medicina Tropical-UFPA pela oportunidade.

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

David Romero

RESUMO

Nos últimos anos tem sido observado um aumento de relatos de infecções causadas por micobactérias não tuberculosas (MNT). No entanto, dados sobre frequência e espécies envolvidas em infecções pulmonares no Brasil são limitados, principalmente em estados da Região Norte do Brasil. O conhecimento das espécies de MNT associadas às infecções pulmonares tem importância clínica e epidemiológica, sendo as técnicas moleculares ferramentas capazes de oferecer um diagnóstico espécie-específico, o qual é necessário para a instituição de terapia adequada. O presente trabalho descreve a diversidade de MNT isoladas de espécimes pulmonares encaminhados ao Instituto Evandro Chagas entre 1999 e 2011 para pesquisa de micobactérias. As MNT foram inicialmente caracterizadas por *PCR-restriction analysis* (PRA-*hsp65*) e reidentificadas por sequenciamento dos genes RNAr 16S, *hsp65*, *rpoB* e região ITS1. De acordo com os achados, o método de PRA-*hsp65* mostrou-se uma ferramenta prática para identificação MNT, permitindo a distinção de uma grande variedade de espécies de forma rápida, simples e barata, em comparação com o sequenciamento. Além disso, como sugerido no presente estudo, de acordo com a diversidade de espécies local, este método pode ser passível de modificações para proporcionar maior poder discriminatório. Para isolados do complexo *Mycobacterium avium* (MAC), a aplicação da análise de sequência do gene *rpoB* não se mostrou como alternativa adequada para discriminação de isolados do Estado do Pará, gerando resultados discrepantes com baixa resolução taxonômica. Um espectro particular de MNT foi associado aos casos de infecção pulmonar na região, representado principalmente por espécies dos complexos *M. chelonae*-*M. abscessus* (*M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. bolletii*), *M. avium* (*M. avium*, *M. intracellulare* e *M. colombiense*) e *M. simiae* (*M. simiae* e taxa não nomeados). Dentre esse último, duas potenciais espécies foram detectadas, *M. paraensis* sp. nov. e *M. amazoniensis* sp. nov., sendo propostas como novos membros do complexo *M. simiae*. Entre os indivíduos afetados, as principais características encontradas foram sexo feminino, a idade superior a 50 anos, etnia parda e história de infecção prévia por tuberculose. Embora este estudo não demonstre a real magnitude de infecções pulmonares por MNT no Estado do Pará, ele descreve a diversidade de espécies e claramente retrata a importância desse grupo na região, chegando a representar 13,5% dos isolamentos micobacterianos em um laboratório de referência. Conjuntamente a esse achado, a identificação de casos de MNT em indivíduos presuntivamente diagnosticados com TB, indica a necessidade de confirmação bacteriológica, especialmente nos casos de resistência primária ao esquema básico da tuberculose.

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

ABSTRACT

In recent years have been seen increased reports of nontuberculous mycobacteria (NTM) infections in the world. However, data on frequency and NTM species associated with pulmonary infections are still limited in Brazil, especially in states of Northern Brazil. The knowledge of species associated with NTM lung infections has clinical and epidemiological importance, being molecular techniques efficient tools to provide diagnostic species-specific, which is necessary for choice of appropriate therapy. This study describes the diversity of NTM isolated from respiratory specimens at the Evandro Chagas Institute between 1999 and 2011. The NTM were initially characterized by PCR-restriction analysis (PRA-*hsp65*) and re-identified by sequencing of 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* and ITS1 targets. According to our findings, the PRA-*hsp65* method proved to be a convenient tool for identifying NTM, allowing distinction of a variety of species quickly, simply and inexpensively, as compared to the sequencing. Moreover, as suggested in this study, according to local species diversity, this method can be subject to modifications to provide greater discriminatory power. Sequence analysis of the *rpoB* gene of *Mycobacterium avium* complex (MAC) revealed that this target is not a suitable alternative for discrimination of isolates from State of Para, because it generated discrepant results with low taxonomic resolution. *M. chelonae*, *M. avium* and *M. simiae* complexes were the most frequent NTM. Two potential species were detected, *M. paraensis* sp. nov. and *M. amazoniensis* sp. nov., being proposed as new members of the *M. simiae* complex. Among the patients with NTM disease, the main characteristics found were women older than 50 years, pardo ethnic group and previous tuberculosis. Although this study does not show the real magnitude of NTM lung infections in State of Para, it describes the diversity of species and clearly reveals the importance of this group in the region, which has accounted 13.5% of mycobacterial isolates in a reference laboratory. The findings highlight the need for bacteriological confirmation of cases presumptively diagnosed as TB with primary resistance to therapy for TB.

Keywords: nontuberculous mycobacteria, pulmonary infection, molecular identification, species diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Aspecto do esfregaço de micobactérias corados pela técnica de Ziehl-Nelsen	4
Figura 2. Fluxograma dos procedimentos laboratoriais utilizados para identificação de MNT	20
Artigo 1 - Figure 1. Restriction sites for SmII based on 441 bp <i>hsp65</i> sequences of <i>M. massiliense</i> , <i>M. bolletii</i> , <i>M. avium</i> and <i>M. colombiense</i> strains	27
Artigo 2 - Figura 1. Árvores filogenéticas baseadas nas sequências do RNAr 16S (A), <i>hsp65</i> (B) e <i>rpoB</i> (C) de 15 isolados do complexo <i>Mycobacterium avium</i> e sete cepas de referência	33
Artigo 3 - Figure 1. Relationships between the sequences from the type strains and the isolated NTM, as inferred from the partial 16S rRNA gene	42
Artigo 3 - Figure 2. Relationships between the sequences from the type strains and the NMT isolated presently as inferred from the partial ITS1 sequences	42
Artigo 3 - Figure 3. Relationships between the sequences from the type strains and the NMT isolated presently as inferred from the partial <i>hsp65</i> sequences	43
Artigo 3 - Figure 4. Relationships between the sequences from the type strains and the NMT isolated presently as inferred from the partial <i>rpoB</i> sequences	43
Artigo 3 - Figure 5. Phylogenetic tree based on the concatenated 16S rRNA, ITS1, <i>hsp65</i> and <i>rpoB</i> sequences	44
Artigo 3 - Figure 6. Phylogenetic tree based on the concatenated 16S rRNA, ITS1, <i>hsp65</i> and <i>rpoB</i> sequences	44
Capítulo de livro – Figure 1. Geographic localization of the Pará State, Amazon Region of Brazil	51
Capítulo de livro - Figure 2. Frequency of NTM isolation from clinical pulmonary specimens of patients from Pará State, Brazil, 1999-2010	53
Capítulo de livro - Figure 3. Frequency of isolation of nontuberculous <i>Mycobacterium</i> species between the 1999-2003 and 2004-2010 periods in Pará State, Brazil	54

Capítulo de livro - Figure 4. Relationships between sequences from the type strains and the NTM isolated presently, inferred from partial 16S rRNA gene ...	56
Capítulo de livro - Figure 5. Relationships between sequences from the type strains and the NMT isolated presently, as inferred from partial <i>hsp65</i> sequences	57
Artigo 4 - Figure 1. Proportion of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial lung disease by age group - State of Para, Brazil, 2010-2011	73

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Espectro de doenças, espécies e distribuição geográfica de micobactérias não tuberculosas	3
Quadro 2. Provas para distinção entre CMTB e MNT	5
Quadro 3. Provas bioquímicas para identificação de micobactérias	6
Quadro 4. Regimes de tratamento recomendados para as mais frequentes micobactérias não tuberculosas associadas à doença pulmonar	12
Quadro 5. Marcadores moleculares para caracterização de isolados clínicos de MNT	21
Artigo 1 - Table 1. Comparison between <i>hsp65</i> PRA and <i>hsp65</i> sequencing	27
Artigo 2 - Tabela 1. Perfis alélicos obtidos por PRA- <i>hsp65</i> para membros do complexo <i>Mycobacterium avium</i> isolados no Instituto Evandro Chagas entre 2004 e 2007	32
Artigo 2 - Tabela 2. Valores de similaridades para as sequências <i>rpoB</i> (abaixo à esquerda) e <i>hsp65</i> (acima à direita) para membros do complexo <i>Mycobacterium avium</i> isolados no Instituto Evandro Chagas entre 2004 e 2007	33
Capítulo de livro - Table 1. American Thoracic Society diagnostic criteria on nontuberculous mycobacterial pulmonary disease (Griffith et al., 2007)	51
Capítulo de livro - Table 2. Clinical significance of NTM isolated in Pará State, Brazil, 1999-2010	53
Capítulo de livro - Table 3. Clinical characteristics of patients with NTM pulmonary infection from Pará State, Brazil, 1999-2010	55
Artigo 4 - Table 1. Individuals who met the ATS microbiological criteria for nontuberculous mycobacterial pulmonary disease from Pará State, Brazil	72
Artigo 4 - Table 2. Summary of distinguishing features of NTM patients	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amicacina
ATS	American Thoracic Society
<i>BstEII</i>	Enzima isolada de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLA	Claritromicina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>dnaJ</i>	Gene que codifica uma proteína de choque térmico de 40 KDa
EMB	etambutol
<i>erm</i>	Erythromycin ribosome methyltransferase
EUA	Estados Unidos da América
<i>gyrB</i>	Gene que codifica a sub-unidade beta da DNA girase
<i>HaeIII</i>	Enzima isolada de <i>Haemophilus aegyptius</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
<i>hsp65</i>	Gene que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa
IEC	Instituto Evandro Chagas
INH	Isoniazida
ITS1	16S-23S rRNA internal transcribed spacer 1
LJ	Löwenstein-Jensen
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MCL	Micobactérias de crescimento lento
MCR	Micobactérias de crescimento rápido
mL	Mililitro
MNT	Micobactérias não tuberculosas
MS	Ministério da Saúde
pb	Pares de bases
PNB	Ácido para-nitrobenzoico
PRA	Análise dos fragmentos de restrição enzimática de produtos de PCR

<i>recA</i>	Gene que tem função crucial na recombinação de DNA homólogo e reparo de danos no DNA
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico
RNA 23S	RNA ribossômico 23S
RNAr 16S	Gene que codifica a proteína ribossômica 16S
<i>rpoB</i>	Gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase
SABMI	Seção de Bacteriologia e Micologia
<i>secA</i>	Gene que codifica componente da principal rota de secreção de proteínas através da membrana citoplasmática
<i>sodA</i>	Gene que codifica a enzima superóxido dismutase
STR	Estreptomicina
STX	Sulfametoxazol
<i>tuf</i>	Gene que codifica o fator de alongação Tu

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS	2
1.2	EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR MNT	2
1.3	MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO	4
1.3.1	Caracterização fenotípica	4
1.3.2	Análise de ácidos micólicos	5
1.3.3	Métodos moleculares	6
1.3.3.1	Sequenciamento	6
1.3.3.2	Sondas comerciais	8
1.3.3.3	<i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (PRA)</i>	9
1.4	TESTES DE SENSIBILIDADE	9
1.4.1	Mecanismos de resistência	10
1.5	TRATAMENTO DA DOENÇA PULMONAR	12
2	JUSTIFICATIVA	13
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVO GERAL	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	CASUÍSTICA	18
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	18
4.3	ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA	18
4.4	PRECAUÇÕES DE ORDEM ÉTICA	19
4.5	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	19
4.5.1	Cultura de micobactérias	19
4.5.2	Extração de DNA	20
4.5.3	Amplificação dos fragmentos do <i>DNAr 16S</i>, <i>ITS1</i>, <i>hsp65</i> e <i>rpoB</i>	21
4.5.4	Sequenciamento nucleotídico	22
4.5.5	Análise das sequências	22
4.5.6	Restrição enzimática <i>in silico</i> baseada no método de <i>PRA-hsp65</i>	22
4.6	DESCRIÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS	23
4.7	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	23

5	PUBLICAÇÕES	24
5.1	ARTIGO 1 - MOLECULAR IDENTIFICATION OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA ISOLATES IN A BRAZILIAN MYCOBACTERIA REFERENCE LABORATORY	25
5.2	ARTIGO 2 - IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE MEMBROS DO COMPLEXO <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> ISOLADOS DE INFECÇÕES PULMONARES NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL	30
5.3	ARTIGO 3 - MULTIGENE PHYLOGENETIC ANALYSIS SUPPORTS <i>MYCOBACTERIUM PARAENSIS</i> SP. NOV. AND <i>MYCOBACTERIUM AMAZONIENSIS</i> SP. NOV. AS TWO NEW SPECIES OF SLOW-GROWING SCOTOCHROMOGENIC MYCOBACTERIA RELATED TO <i>MYCOBACTERIUM SIMIAE</i> COMPLEX	38
5.4	CAPÍTULO DE LIVRO - PULMONARY NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIAL INFECTIONS IN THE STATE OF PARA, AN ENDEMIC REGION FOR TUBERCULOSIS IN NORTH OF BRAZIL	49
5.5	ARTIGO 4 - OCCURRENCE OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIAL PULMONARY INFECTION IN AN ENDEMIC AREA OF TUBERCULOSIS	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
	APÊNDICE	89
	APÊNDICE 1 – FICHA EPIDEMIOLÓGICA	90

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

As micobactérias pertencem ao filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, subclasse Actinobacteridae, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. As características mínimas para inclusão de espécies nesse gênero são: (i) a álcool-ácido resistência; (ii) a presença de ácidos micólicos com 60-90 átomos de carbono, e (iii) um conteúdo de GC de 61-71%.

A introdução de modernas técnicas genéticas nos estudos taxonômicos levou ao aumento do número de descrições de espécies micobacterianas a partir de 1990, e tem continuado até o presente. Atualmente, o gênero *Mycobacterium* é composto por 155 espécies e 13 subespécies, sendo que mais de 40% das novas descrições foram realizadas entre 2000 e 2010 (TORTOLI, 2003; TORTOLI, 2006; EUZÉBY, 2012). As micobactérias não tuberculosas (MNT) compreende um grupo, distinto do complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e *M. leprae*, com uma grande diversidade de espécies micobacterianas com diferentes características fenotípicas, genéticas e patogênicas (TORLOLI, 2003).

Filogeneticamente as MNT podem ser classificadas em quatro principais grupos sistemáticos: (i) micobactérias de crescimento rápido (MCR); (ii) MCR termotolerantes; (iii) micobactérias de crescimento lento (MCL) fotocromógenas, escotocromógenas ou acromógenas; e (iv) espécies intermediárias. O grupo intermediário compreende membros estreitamente relacionados que compartilham características tanto das espécies de MCR quanto de MCL e são representados por dois principais agrupamentos taxonômicos: os complexos *M. terrae* e *M. simiae* (RUNYON, 1959; TORTOLI, 2003).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR MNT

As MNT estão amplamente distribuídas no meio ambiente, e recentemente têm sido reconhecidas como importante causa de doença em imunocomprometidos e em indivíduos aparentemente imunocompetentes (GRIFFITH et al., 2007; GLASSROTH, 2008).

A doença humana como resultado da infecção por MNT pode ser classificada nas seguintes síndromes clínicas: doença pulmonar, linfadenite, doença cutânea e doença disseminada, dentre as quais a doença pulmonar se apresenta como a mais comum condição clínica localizada (KOH et al., 2006). Entretanto, as infecções associadas a procedimentos

cosméticos e médicos invasivos têm contribuído para a emergência de casos nos últimos anos (PARRISH et al., 2008).

É marcante a variabilidade geográfica das espécies de MNT envolvidas com infecções (Quadro 1). A doença pulmonar por MNT nos Estados Unidos é comumente causada pelo complexo *M. avium* (MAC), seguida pelo *M. kansasii* (GRIFFITH et al., 2007). *M. kansasii* é o mais comum patógeno na Inglaterra (BRITISH THORACIC SOCIETY, 2000), enquanto que *M. malmoense* é mais frequente na Escócia. Na Coréia, as MNT mais freqüentes na doença pulmonar são o MAC, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, enquanto que na África do Sul são encontrados *M. kansasii* e *M. scrofulaceum* (MARRAS, DALEY, 2002; KOH et al., 2002).

Quadro 1. Espectro de doenças, espécies e distribuição geográfica de micobactérias não tuberculosas.

Doenças	Espécies comuns	Distribuição geográfica	Espécies raras
Pulmonar	MAC, <i>M. abscessus</i>	Mundial	<i>M. simiae</i>
	<i>M. malmoense</i>	Escócia	<i>M. smegmatis</i>
Cutânea	<i>M. marinum</i> , <i>M. abscessus</i>	Mundial	MAC
	<i>M. ulcerans</i>	África, Ásia	
Linfadenite	MAC, <i>M. scrofulaceum</i>	Mundial	<i>M. kansasii</i>
	<i>M. malmoense</i>	Escandinávia	<i>M. abscessus</i>
Disseminada	MAC, <i>M. kansasii</i>	Mundial	<i>M. abscessus</i>
	<i>M. haemophilum</i>	EUA, Austrália	<i>M. genavense</i>

Nota: MAC, complexo *Mycobacterium avium*.

Fonte: Griffith et al. (2007)

No Brasil também é encontrada certa diversidade de espécies entre os diferentes estados. *M. kansasii* e *M. avium* representam as mais frequentes MNT associadas com infecção pulmonar (UEKI et al., 2005) em São Paulo. Em outro trabalho, Zamarioli et al. (2008) encontraram em São Paulo 13 diferentes espécies associadas à infecção pulmonar, com um maior número de isolamentos para *M. kansasii*, *M. avium* e *M. fortuitum*. Na Baixada Santista (São Paulo) *M. kansasii* e *M. fortuitum* foram detectadas em indivíduos HIV-negativos, enquanto que *M. avium* foi mais frequente em HIV-positivos (PEDRO et al., 2008).

Na Região Norte Brasileira, Barreto e Campos (2000) identificaram 35 casos de micobacteriose*, onde MAC, *M. terrae* e *M. fortuitum* foram as MNT de maior prevalência. No Pará, as espécies *M. massiliense*, *M. bolletii*, *M. abscessus* e *M. fortuitum* compreenderam as MCR em infecções pulmonares entre 2004 e 2007 (da COSTA et al., 2009; da COSTA, 2009). No Estado do Pará, micobactérias pertencente aos complexos *M. chelonae*, *M. avium* e *M. simiae* representaram as mais frequentes entre os isolados de MNT obtidos em laboratório de referência, no período de 1999 a 2008 (da COSTA et al., 2010).

1.3 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO

1.3.1 Caracterização fenotípica

Com o recente aumento de infecções causadas por MNT, há uma demanda aumentada para métodos diagnósticos mais específicos, sensíveis e rápidos para sua detecção e identificação. Tradicionalmente, a distinção entre espécies do CMTB e MNT pode ser realizada pelo teste de detecção do fator corda através de esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen. Em isolados pertencentes ao CMTB o teste é positivo, enquanto que para MNT o resultado é geralmente negativo, exceto para algumas espécies como *M. kansasii*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (Figura 1).

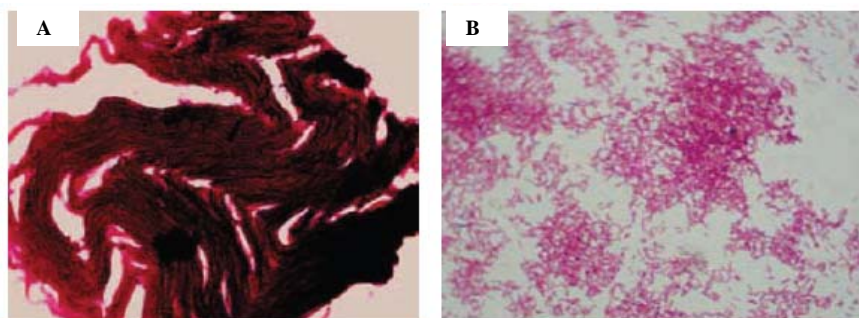


Figura 1. Aspecto do esfregaço de micobactérias corados pela técnica de Ziehl-Neelsen. A – Complexo *M. tuberculosis*. B – Micobactérias não tuberculosas.

Fonte: Brasil/MS (2008).

*Nota: O termo “micobacteriose” é utilizado durante o texto como sinônimo de infecções causadas por micobactérias não tuberculosas.

A capacidade de crescimento das micobactérias em meios contendo agentes inibidores seletivos é utilizada como ferramenta para diferenciação de MNT do complexo *M. tuberculosis*. O crescimento das micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* é inibido em meios contendo 500µg/mL de ácido para-nitrobenzoico (PNB), o que não ocorre com as MNT, exceto para *M. kansasii*, *M. xenopi* e *M. gastri*. Além desta, a avaliação da produção de niacina é útil para a diferenciação, na qual *M. tuberculosis* e *M. africanum*, do CMTB, e *M. simiae*, *M. chelonae* e *M. marinum* produzem quantidades detectáveis pelo teste *in vitro* (Quadro 2) são importantes para a distinção entre aqueles dois grupos de micobactérias (BRASIL/MS, 2008; WINN et al., 2008).

Quadro 2. Provas para distinção entre CMTB e MNT.

Características	CMTB	MNT
Pigmentação	ausente	variável
Fator corda	positivo	negativo
Crescimento em LJ-PNB	ausente	presente
Produção de niacina	positivo	negativo

Nota: CMTB: Complexo *M. Tuberculosis*, MNT: Micobactérias não tuberculosas, LJ: Löwenstein-Jensen, PNB: ácido para-nitrobenzoico.

Fonte: Brasil/MS (2008).

Características como morfologia das colônias, pigmentação e tempo de crescimento, podem fornecer uma identificação presuntiva do organismo e sugerir testes bioquímicos ou sondas de ácidos nucleicos que devem ser utilizadas para a identificação definitiva (NOLTE, METCHOCK, 1995). Dentre os testes fenotípicos, provas bioquímicas chaves são utilizadas para identificação das micobactérias (Quadro 3).

1.3.2 Análise de ácidos micólicos

Estudos demonstram que os ácidos micólicos em micobactérias são espécie-específicos. Os métodos atuais permitem fácil extração de suficiente quantidade de ácidos micólicos a partir de pequenas quantidades de bactérias (VOSSLER, 2000). Sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores de fluorescência têm aumentado significativamente a sensibilidade do método, além de reduzirem a massa celular e o tempo de identificação de micobactérias (SOMOSKOVI et al., 2002).

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

Quadro 3. Provas bioquímicas para identificação de micobactérias.

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

Fonte: FORBES; SAHM; WEISSFELD (1998).

1.3.3 Métodos moleculares

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

1.3.3.1 Sequenciamento

O sequenciamento de genes constitutivos tem sido amplamente aplicado para caracterização de micobactérias, sendo que a análise do gene de RNAr 16S é considerada “padrão ouro” (HOLBERG-PETERSEN et al., 1999; TURENE et al., 2001; CLOUD et al., 2002; NEONAKIS et al., 2008). Este gene consiste em uma sequência de aproximadamente 1.500 pb, na qual o primeiro terço concentra a maior variabilidade nucleotídica dentro do gene de micobactérias e pode ser dividido em dois trechos denominados de regiões hipervariáveis A e B (posições 130-210 e 430-500, respectivamente, referente ao genoma de *Escherichia coli*). Para o propósito de identificação, a sequência da região A é geralmente suficiente, enquanto que a região B pode ser considerada confirmatória, uma vez que em vários casos suas sequências são compartilhadas dentro dos grupos sistemáticos

micobacterianos. Uma particularidade quanto a avaliação deste alvo refere-se ao caso de que MCR, exceto *M. chelonae* e *M. abscessus*, apresentam duas cópias do operon ribossômico (TORTOLI, 2003). De modo geral, os primeiros 500 pb são adequados para a identificação de espécies comumente isoladas nos laboratórios clínicos.

Apesar de ser considerado como referência para identificação, em algumas situações as sequências desse gene apresentam poucas variações nucleotídicas entre as espécies do gênero *Mycobacterium*, o que revela a necessidade de utilização de outros alvos mais variáveis. Adicionalmente, deve-se levar em conta que não existe um *cut-off* para o número mínimo de diferenças no gene de RNAr 16S que indique uma taxa distinta dentro do gênero *Mycobacterium* (TORTOLI, 2003; GOMILA, RAMIREZ, LALUCAT, 2007).

Roth et al. (1998) demonstraram que devido a ampla variabilidade no gênero *Mycobacterium*, as sequências espaçadoras ITS1 (16S-23S rRNA *internal transcribed spacer 1*) poderiam ser utilizadas para diferenciar MCR, que em geral apresentam-se como espécies mais estreitamente relacionadas que as MCL. As ITS1 exibem tamanhos que variam de 270 a 400 pb e nas MCR, que contêm duas cópias do operon ribossômico, duas diferentes cópias de ITS1 também podem estar presentes. Nestes casos, recomenda-se a clonagem dessa região antes do sequenciamento.

Outro alvo genético frequentemente usado com o propósito de identificação refere-se ao gene codificante da proteína de choque térmico de 65 kDa (*hsp65*), cujo tamanho da sequência compreende 1.623 pb. Uma sequência de 441 pb muito variável do gene *hsp65* vem sendo bastante utilizada e tem comprovado ser útil na distinção de espécies micobacterianas (RINGUET et al., 1999; MCNABB et al., 2004). Sequências mais amplas desse gene também têm sido avaliadas (KIM et al., 2005). O marcador *hsp65* apresenta uma das mais extensas bases de dados disponíveis no GenBank, o que o torna, junto com o gene do RNAr 16S, o alvo de escolha para avaliações com finalidade taxonômica.

O sequenciamento do gene *rpoB* (codificador da subunidade beta da RNA polimerase) foi proposto como procedimento adicional no processo de caracterização de isolados micobacterianos, sendo seu uso recomendado para discriminação de espécies estreitamente relacionadas e também como apoio no delineamento de novas espécies (KIM et al., 1999). Adékambi, Colson e Drancourt (2003) verificaram que as sequências de *rpoB* são mais variáveis que as do gene do RNAr 16S nas MCR, sugerindo que a análise daquele alvo possa aumentar a discriminação molecular entre as mesmas. Este estudo também encontrou

percentual de homologia inter e intra-espécies de 84,3 – 96,6% e 98,2 – 99,9%, respectivamente, demonstrando ser uma boa opção para identificação de MCR.

Outros genes têm sido descritos para diferenciação de espécies micobacterianas, incluindo *gyrB* (gene que codifica a sub-unidade beta da DNA girase), *recA* (gene que tem função crucial na recombinação de DNA homólogo e reparo de danos no DNA), *secA* (gene que codifica componente da principal rota de secreção de proteínas através da membrana citoplasmática) *dnaJ* (gene que codifica uma proteína de choque térmico), *sodA* (gene que codifica a enzima superóxido dismutase) e *tuf* (gene que codifica o fator de alongação Tu) (DOMENECH et al., 1997; GOMILA, RAMIREZ, LALUCAT, 2007; YAMADA-NODA et al., 2007; MIGNARD, FLANDROIS, 2007).

1.3.3.2 Sondas comerciais

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

Sondas comerciais de DNA complementares ao RNAr 16S estão disponíveis para a identificação rápida de culturas de *M. tuberculosis*, complexo *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* e *M. kansasii*, com acurácia de 90% (LEÃO et al., 2004; FIELD; COWIE., 2006). Entretanto, as sondas disponíveis para MCR nos Estados Unidos e Europa permitem a identificação de apenas algumas espécies (BROWN-ELLIOTT, WALLACE, 2002).

Os principais sistemas comerciais disponíveis que utilizam sondas para identificação de micobactérias compreendem: (I) AccuprobeND (Gen-Probe), que utiliza a técnica de amplificação por transcrição reversa de RNAr 16S com detecção por quimioluminescência e permite a diferenciação entre de espécies do complexo CMTB e as MNT mais frequentemente associadas a infecções. É específico, rápido (resultados em 2 horas) e fornece um diagnóstico precoce de infecção por organismos do complexo *M. tuberculosis*; (II) Inno LiPAND Mycobacteria (Innogenetics) e Genotype MycobacteriaND (Hain Diagnostika) utiliza o princípio de hibridização reversa com sondas imóveis. Inicialmente, se realiza a amplificação da região intergênica 16S-23S do gene do RNAr seguida de reação de hibridização reversa. Apresenta sensibilidade e especificidade idêntica a

AccuprobeND, no entanto, o tempo de realização da técnica é mais longo (6 horas) e o custo para implantação laboratorial é maior (CATTOIR, 2004).

1.3.3.3 *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (PRA)*

Técnicas baseadas na análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição enzimática de produtos de PCR (em inglês *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis - PRA*) têm sido utilizadas na identificação de várias espécies de MNT de forma rápida e simples. Essa metodologia tem sido aplicada para avaliação de diversos alvos micobacterianos como RNAr 16S (DOMENECH et al., 1994; HERNANDEZ et al., 1999), ITS1 (ROTH et al., 1998; KHAN et al., 2005), *hsp65* (TELENTI et al., 1993), *rpoB* (LEE et al., 2000), *dnaJ* (TAKEWAKI et al., 1994), *recA* (BLACKWOOD et al., 2000) e *tuf* (SHIN et al., 2009).

Consiste na amplificação de um fragmento gênico por PCR seguida pela restrição enzimática e análise dos padrões resultantes, sendo que mesmos podem diferenciar uma variedade de espécies de MNT comumente isoladas na rotina laboratorial. Dentre as diferentes técnicas de PRA citadas, a análise do fragmento de 441 pb do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*) tem apresentado crescente aplicação. Esta metodologia se mostra vantajosa pela possibilidade de identificar muitas espécies de MNT de interesse médico de forma rápida, simples e economicamente viável quando comparado ao sequenciamento (da SILVA ROCHA et al., 1999; SILVA et al., 2001; da SILVA ROCHA et al., 2002, HÄFNER et al., 2004; KIM et al., 2005; LEÃO et al., 2005; WANG et al., 2005; MARTIN et al., 2007). Em recente algoritmo publicado, 100 diferentes padrões foram disponibilizados para diferenciação de 57 espécies micobacterianas (CHIMARA et al., 2008). Além desse, há o algoritmo *online* PRASITE que oferece para consulta um total de 176 padrões, referentes a 116 espécies (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

1.4 TESTES DE SENSIBILIDADE

Há avanços na discussão sobre o papel dos testes de sensibilidade *in vitro* para o manejo de indivíduos com micobacterioses. No entanto, discordâncias sobre sua utilidade resultam da observação de que, ao contrário de *M. tuberculosis*, a resposta de membros do MAC às drogas anti-tuberculose tais como a rifampicina e o etambutol não podem ser confiavelmente determinadas com base nos atuais testes de sensibilidade *in vitro* (GRIFFITH et al. 2007).

M. kansasii, *M. marinum* e *M. fortuitum* são sensíveis *in vitro* a vários antimicrobianos e a resposta clínica aos agentes terapêuticos parece estar muito próxima aos padrões de susceptibilidade encontrados, embora esta observação não tenha sido avaliada por estudos randomizados controlados. Em contraste, os membros do MAC têm limitada sensibilidade *in vitro*, e a resposta clínica mostra correlação apenas para macrolídeos. Além desse grupo, organismos como *M. abscessus* e *M. simiae* têm limitada sensibilidade *in vitro*, com poucas evidências de correlação entre sensibilidade encontradas nos testes a qualquer agente antimicrobiano e resposta clínica no tratamento de doença pulmonar. Em contraste, parece haver uma correlação entre os testes *in vitro* e a resposta clínica nos casos de infecções de pele e tecidos moles causadas por *M. abscessus*, embora esta observação não tenha sido avaliada prospectivamente (HORAN, CANGELOSI, 2009).

Limites de sensibilidade foram definidos laboratorialmente para distinguir populações de micobactérias definidas como sensíveis e resistentes. Entretanto, para a maioria das MNT os *cut-offs* laboratoriais não confirmam ser clinicamente significantes, uma vez que existem poucos dados para validar o teste de sensibilidade de muitas das espécies de MNT como um guia para a seleção da terapia antimicrobiana (HORAN, CANGELOSI, 2009).

Até que a relação entre a suscetibilidade de muitas MNT e sua resposta clínica aos antimicrobianos seja melhor compreendida e esclarecida, deve o clínico ter a ciência de que, ao contrário da TB, algumas doenças causadas por MNT podem não ser erradicadas em um dado indivíduo com terapia baseada nos resultados de susceptibilidade *in vitro*.

1.4.1 Mecanismos de resistência

A resistência às drogas antimicobacterianas comumente usadas pode ser classificada em primária (quando o indivíduo foi infectado por uma cepa droga-resistente) ou adquirida (quando a resistência foi desenvolvida durante o curso do tratamento). Estes mecanismos diferem daqueles associados com a resistência intrínseca, definida como a característica inata de algumas espécies de micobactérias para excluir certos agentes do arsenal antimicobacteriano (HORAN, CANGELOSI, 2009).

A resistência de isolados de MNT a diferentes drogas tem sido correlacionada com o fenômeno análogo de alteração do alvo da droga. Um exemplo é a resistência à rifampicina, associada a mutações no gene *rpoB* de isolados clínicos de *M. kansasii*, mas com extensão limitada em *M. avium*. Este mecanismo foi também relatado em clones rifampicina-resistentes de *M. ulcerans* produzidos em laboratório. Similarmente, mutações sem sentido na

região peptidiltransferase do gene RNAr 23S têm sido associadas com resistência à macrolídeos em *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. avium* (GRIFFITH et al., 2007).

Muitas MCR potencialmente patogênicas são consideradas sensíveis aos novos macrolídeos como a claritromicina, que é um importante componente no tratamento de micobacterioses (GRIFFITH et al., 2007). Entretanto, variáveis padrões de suscetibilidade a esse antimicrobiano são observados entre isolados clínicos de *M. abscessus*, *M. bolletii* e *M. massiliense*, o que enfatiza a necessidade da realização de testes de suscetibilidade para o apropriado manejo do paciente (ADÉKAMBI et al., 2006; KIM et al., 2008; ADÉKAMBI, DRANCOURT, 2009).

Os macrolídeos atuam inibindo seletivamente a síntese protéica bacteriana pela ligação reversível a subunidade 50S do ribossomo. Estudos demonstram que esses antimicrobianos interagem com o domínio V do RNA ribossômico 23S (RNAr 23S) próximo ao centro peptidiltransferase, interferindo na elongação da cadeia peptídica (SCHLÜNZEN et al., 2001; GARZA-RAMOS et al., 2001; GAYNOR et al., 2003). Nas micobactérias, a resistência clinicamente adquirida aos macrolídeos é conferida por mutações pontuais nas bases 2058 ou 2059 (posições segundo genoma de *Escherichia coli*) no domínio V do RNAr 23S (WALLACE et al., 1996).

Embora a resistência aos macrolídeos por mutações não ocorra com elevada frequência entre as espécies bacterianas, deve-se considerar uma maior suscetibilidade desse fenômeno em membros do grupo *M. chelonae-abscessus*, que exibem somente uma cópia do operon ribossomal (TORTOLI, 2003). Acredita-se que outro mecanismo seja o principal responsável pela resistência aos macrolídeos em MCR: a expressão de genes *erm* (*erythromycin ribosome methyltransferase*) que estão envolvidos com o fenótipo de resistência intrínseca. Os genes *erm* representam uma família de genes codificadores de metilases, que adicionam um ou mais grupos metil à adenina na posição 2058 do RNAr 23S. Essa modificação impede a ligação dos macrolídeos ao ribossomo, o que reduz a atividade inibitória desse agente antimicrobiano (ROBERTS et al., 2008).

Quatro classes de metilases Erm foram descritas em MCR: Erm(38) em *M. goodii* e *M. smegmatis*; Erm(39) em *M. boenickei*, *M. fortuitum*, *M. houstonense*, *M. neworleansense* e *M. porcinum*; Erm(40) em *M. mageritense* e *M. wolinskyi*; e recentemente a metilase Erm(41) em *M. abscessus* e *M. bolletii* (NASH et al., 2006; NASH et al., 2009).

Dada a importância dos macrolídeos para o tratamento de MNT, é desastroso que a maioria de MCL tenha somente uma cópia do operon do RNAr, uma característica que pode

fazê-las mais suscetíveis do que a maioria de bactérias à mutações de uma única etapa que conduzem à resistência aos macrolídeos (HORAN,CANGELOSI, 2009).

Estudos relatam casos de perda de eficácia de macrolídeos em isolados clínicos pulmonares de *M. abscessus* considerados susceptíveis por testes de suscetibilidade *in vitro* (CLSI, 2003). No entanto, a descoberta de genes *erm* conferindo um fenótipo de resistência induzida poderia explicar o fenômeno da perda de eficácia terapêutica nesses isolados (NASH et al., 2006), assim como em *M. bolletii*, cujos dados de suscetibilidade são limitados. Em geral, mecanismos como alterações de permeabilidade na parede celular e bombas de efluxo parecem ser mais importantes que mutações nos alvos. Seria apropriado concluir que esses mecanismos não são suficientemente compreendidos em MNT. Estudos mais detalhados para obter melhor compreensão destes mecanismos são necessários, o que pode auxiliar no desenvolvimento de melhores testes diagnósticos e agentes terapêuticos para o tratamento de infecções de MNT.

1.5 TRATAMENTO DA DOENÇA PULMONAR

A maioria das recomendações para tratamento é baseada em revisões retrospectivas e estudos de casos. Diretrizes definidas pela ATS (GRIFFITH et al., 2007) e BTS (2000) são as mais utilizadas. A duração do tratamento estende-se até 12 meses após a negatificação da baciloscopia. Alguns regimes de tratamento são apresentados no Quadro 4.

Quadro 4. Regimes de tratamento recomendados para as mais frequentes micobactérias não tuberculosas associadas à doença pulmonar

Espécies	Tratamento
<i>M. malmoense</i>	RIF, INH e EMB ± macrolídeo ± quinolona
MAC	RIF, EMB e macrolídeo. Incluir aminoglicosídeo para doença cavitária. Se houver resistência ao macrolídeo, usar RIF, INH, EMB e AMC/STR (primeiros 3-6 meses). Administrar 3 vezes por semana para doença limitada e diariamente para as formas mais extensas
<i>M. xenopi</i>	CLA, RIF, INH, EMB ± STR (primeiros 3-6 meses)
<i>M. kansasii</i>	RIF, INH e EMB. Se houver resistência a RIF, usar INH, EMB, STX, + AMC/STR (primeiros 3-6 meses)
<i>M. gordonae</i>	2 agentes com susceptibilidade <i>in vitro</i>
<i>M. chelonae</i>	CLA + agente adicional (susceptibilidade <i>in vitro</i>)
<i>M. fortuitum</i>	2 agentes com susceptibilidade <i>in vitro</i>
<i>M. abscessus</i>	Macrolídeo + 1-2 agentes adicionais ± ressecção se a doença for limitada

Notas: RIF: rifampicina, INH: isoniazida, EMB: etambutol, AMC: amicacina, STR: estreptomicina, CLA: claritromicina, STX: sulfametoxazol.

Fonte: Traduzido de McGrath, McCabe e Anderson (2008).

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Há consenso de que o conhecimento das espécies de MNT associadas às infecções tem importância clínica e epidemiológica, e que sua precoce detecção pode auxiliar na escolha da melhor conduta terapêutica e no prognóstico clínico. Devido ao fato da diferenciação entre espécies micobacterianas do CMTB e MNT não ser possível através da baciloscopia (método diagnóstico prioritário em países onde a tuberculose é endêmica, como o Brasil), há a necessidade de aplicação de técnicas que permitam uma caracterização melhor desses micro-organismos.

Tradicionalmente, as micobactérias são identificadas por ensaios fenotípicos. Entretanto, esses têm as desvantagens de ser laboriosos, consumirem muito tempo, caracterizar um limitado número de espécies e geralmente não fornecer resultados em tempo oportuno para auxiliar nas decisões clínicas. Todavia, métodos baseados em análise de DNA são atualmente os mais empregados na identificação de MNT, pois fornecem melhor distinção das espécies micobacterianas, além de terem as vantagens de serem mais específicos, sensíveis e rápidos, o que os tornam promissores para aplicação em laboratórios de referência, de modo a suprir a crescente demanda de diagnóstico em decorrência da emergência das micobacterioses.

No Estado do Pará tem sido observado um aumento de registro de micobacterioses associadas às infecções pulmonares e a diversos procedimentos médicos como cirurgias bariátricas, laparoscopias, mesoterapias, implante de próteses, além do uso de medicamentos injetáveis (DA COSTA et al., 2009). Até 2003, cinco casos eram registrados em média, mas nos anos seguintes foi observado um aumento acentuado, sendo que entre 2004 e 2008 foram registrados 152 casos, 72 relacionados a dois surtos (VIANA-NIERO et al.; 2008, DA COSTA, 2009).

Dado o amplo número de espécies de MNT, torna-se necessário a realização de estudos para melhor caracterizar os isolados, de forma a se obter informações sobre a diversidade de espécies presentes em nossa região, além de relevância clínica desses isolamentos.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a identificação das micobactérias não tuberculosas (MNT) isoladas de espécimes clínicos pulmonares no Estado do Pará.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in silico* o método de PRA-*hsp65* aplicado ao diagnóstico molecular das micobacterioses no Estado do Pará;
- Caracterizar por análise de sequências os isolados de MNT;
- Descrever as características clínico-epidemiológicas dos casos de infecção pulmonar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram avaliadas micobactérias previamente classificadas como MNT, pertencentes ao acervo da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas (SABMI/IEC), e isoladas no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2011. As cepas foram isoladas de espécimes clínicos pulmonares provenientes de 165 indivíduos sintomáticos respiratórios. As amostras foram encaminhadas à SABMI/IEC pelo Hospital Universitário João de Barros Barreto, Centro de Saúde Escola do Marco, Unidade Municipal de Saúde de Cametá e Unidade Municipal de Saúde de Santarém. Os espécimes clínicos de origem pulmonar dos quais as micobactérias foram isoladas incluíram escarro (n=146), lavado broncoalveolar (n=18) e lavado gástrico (n=1).

Foram consideradas de importância bacteriológica as micobactérias isoladas pelo menos duas vezes consecutivas de escarro ou uma vez de lavado broncoalveolar, de acordo com os critérios bacteriológicos sugeridos pela *American Thoracic Society* (GRIFFITH et al., 2007).

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos os indivíduos cujas MNT foram isoladas de espécimes pulmonares no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2011. Foram excluídos os indivíduos que apresentaram mais de uma espécie de micobactéria isolada de seus espécimes clínicos.

4.3 ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA

As MNT são consideradas micro-organismos oportunistas, causando infecções em indivíduos que apresentam fatores de riscos como doenças estruturais pulmonares ou imunossupressão (WINN et al., 2008). O risco de contaminação por essas micobactérias pode acontecer durante o processamento de culturas de MNT, onde bacilos dispersos em aerossóis podem ser inalados pelo manipulador. Para evitar a exposição ao risco foram utilizados padrões, práticas especiais e equipamentos de segurança aplicáveis aos agentes designados para o nível de biossegurança II, observando para as boas práticas microbiológicas, além da

utilização de equipamento de proteção individual e coletivo adequados. Todos os isolados micobacterianos desse estudo foram processados em cabine de segurança biológica classe II, tipo B-2 por profissional qualificado, seguindo os procedimentos recomendados pelo Ministério da Saúde (BRASIL/MS, 2008).

4.4 PRECAUÇÕES DE ORDEM ÉTICA

As condutas éticas da pesquisa seguiram os termos da resolução no 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde, e da declaração de Helsinque-Tóquio sobre pesquisas biomédicas em humanos (BRASIL, 1996). Por tratar-se de projeto baseado no uso de material arquivado, foi solicitada a direção do IEC a autorização para uso de cepas armazenadas na SABMI/IEC. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas (CEP/ IEC) sob pareceres nº 0010/2008/CAAE: 0001.0.072.073-08, nº 003/2011/CAAE: 0017.0.072.000-10, nº 020/2011/CAAE: 0010.0.072.000-11.

4.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Um fluxograma dos procedimentos laboratoriais aplicados à caracterização das MNT é apresentado na Figura 2.

4.5.1 Cultura de micobactérias

As micobactérias deste estudo foram obtidas de cultivos de espécimes clínicos previamente descontaminados pelo método de n-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (KUBICA et al., 1963), semeados em meio de cultura sólido LJ (Difco) e incubados à 35-37°C na ausência de luz. A distinção presuntiva entre espécies do CMTB e MNT foi obtida através da análise macro e microscópica da cultura, pesquisa do fator corda e teste de inibição de crescimento em meio LJ contendo ácido para-nitrobenzoico (0,5 mg/mL), de acordo com as recomendações do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias (2008).

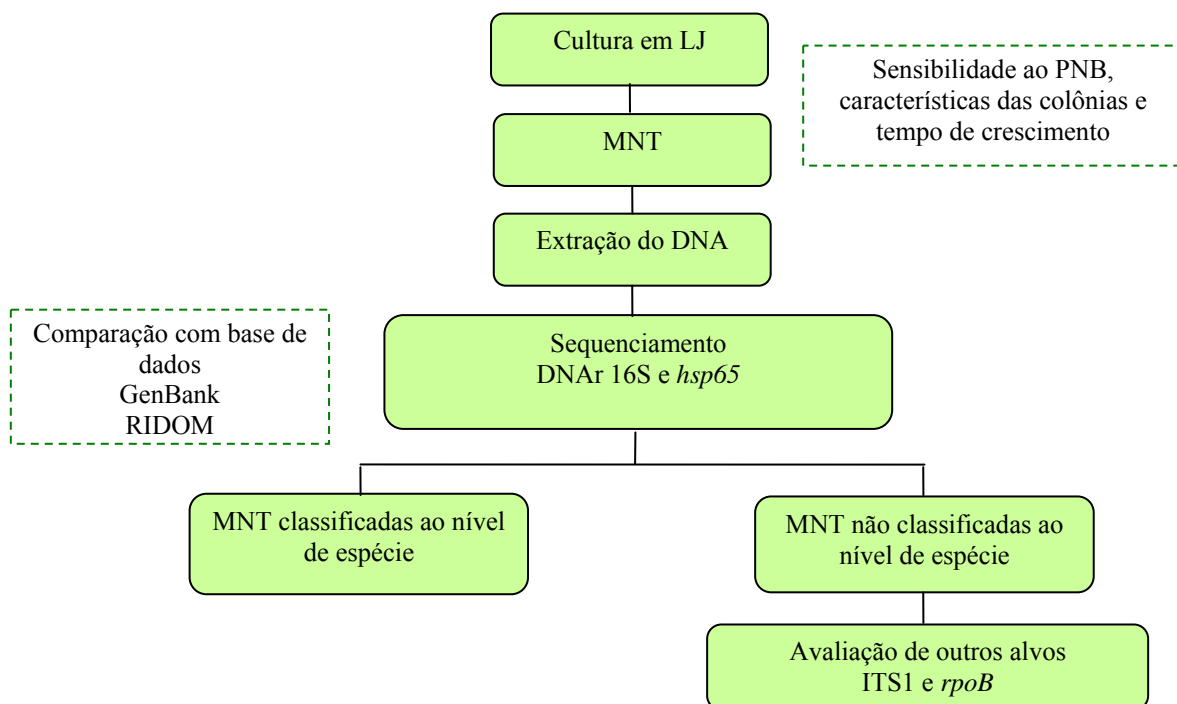


Figura 2. Fluxograma dos procedimentos laboratoriais utilizados para identificação de micobactérias não tuberculosa.

4.5.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada semelhante a protocolo descrito previamente (LIMA et al., 2007). Em resumo, uma alíquota de 300 μ L da suspensão bacteriana foi transferida para microtubos contendo 200 μ L de tampão de lise (Tris HCl pH 9,0 300mM, EDTA 100 mM, sucrose 4,8%, SDS 1,25%), 200 μ L de tampão de (Tris HCl pH8 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA pH8 10 mM, sucrose 5%) e 10 μ L de proteinase K 20 mg/mL (Invitrogen, Carlsbad, EUA), posteriormente incubada a 56°C por 12 horas. Os detritos celulares foram removidos com 200 μ L de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamil 25:24:1 v/v (Fisher BioReagents, Fair Lawn, EUA). O DNA foi precipitado com 100 μ L de acetato de sódio 3M, pH 4,8 (Sigma, Brasil) e 500 μ L de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e tratado com 500 μ L de etanol 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após centrifugação a 13.000 rpm (16.845xg) a 4°C, o álcool foi removido por evaporação. O DNA foi ressuspensão em 100 μ L de tampão TE 1X (Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenado a temperatura de -20°C. A concentração

da solução de DNA foi determinada usando Kit Qubit Fluorometer, segundo as recomendações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

4.5.3 Amplificação dos fragmentos do RNAr *16S*, *ITS1*, *hsp65* e *rpoB*

Para amplificação dos alvos RNAr *16S*, *ITS1*, *hsp65* e *rpoB* foram utilizados os iniciadores descritos no Quadro 5. A reação de amplificação foi realizada em volume final de 20 µl, contendo 1U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 250 µM de dNTP (Invitrogen, Carlsbad, EUA), tampão de Taq DNA polymerase 1X (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 20pmol de cada iniciador (Invitrogen, São Paulo, Brasil) 1.5 mM de MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e aproximadamente 50 ng de DNA molde. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador MyGenie 96 Gradient Thermal Block (Bioneer, Daejeon, Coréia do Sul). Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose D-1 Low EEO 1% (Pronadisa, Madri, Espanha), corado com SYBR Safe 10.000x (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Como marcador de peso molecular foi utilizado o padrão 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Após a eletroforese, os produtos foram recortados do gel e purificados com o sistema S.N.A.P.TM Gel Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

Quadro 5. Marcadores moleculares para caracterização de isolados clínicos de MNT.

Marcadores	Sequências (5' → 3')	Tamanho dos produtos (pb)	Referências
DNAr <i>16S</i>	16S-27f (AGA GTT TGA TGG CTC AG)	~ 919	Lane et al., 1991
	16S-907r (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT)		
ITS1	16S-1511f (AAG TCG TAA CAA GGT ARC CG)	~ 550 bp	Lane et al., 1991
	23S-23r (TCG CCA AGG CAT CCA CC)		
<i>hsp65</i>	HSPF3 (ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT)	644	Kim et al., 2005
	HSPR4 (AAG GTG CCG CGG ATC TTG TT)		
<i>rpoB</i>	MycoF (GGC AAG GTC ACC CCG AAG GG)	~ 723	Adékambi et al., 2003
	MycoR (AGC GGC TGC TGG GTG ATC ATC)		

4.5.4 Sequenciamento nucleotídico

Os produtos de amplificação foram diretamente sequenciados utilizando 5 pmol/ μ L de cada iniciador em sistema BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, conforme recomendação do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Posteriormente, o excesso de iniciadores e ddNTP foram removidos com o BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, e submetidos a eletroforese capilar no analisador genético ABI3130 (Applied Biosystems, Tóquio, Japão).

4.5.5 Análise das sequências

As sequências geradas foram alinhadas pelo método hierárquico de múltiplos alinhamentos (ClustalW) no programa BioEdit (versão 7.0.9; Tom Hall [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). As similaridades com sequências relacionadas obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) foram analisadas no programa MegAlign (versão 7.0; DNASTar [<http://www.dnastar.com>])). Dendogramas foram construídos no programa MEGA (versão 5.0; Tamura, Dudley, Nei and Kumar [<http://www.megasoftware.net/>])).

4.5.6 Restrição enzimática *in silico* baseada no método de PRA-*hsp65*

A existência de MNT com padrões de restrição idênticos limita a habilidade de laboratórios de pesquisa em utilizar efetivamente o método de PRA-*hsp65*. Por essa razão, as sequências de *hsp65* de isolados clínicos e cepas-tipo foram submetidas a uma análise *in silico* dos sítios de restrição enzimática. Para espécies relacionadas que sabidamente compartilham mesmo padrão de PRA-*hsp65* (*M. massiliense* e *M. bolletii*; *M. avium* e *M. colombiense*), buscou-se endonucleases adicionais que permitissem suas distinções. Em síntese, as endonucleases de restrição foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: i) apenas enzimas que reconhecessem sítios com mais que seis pares de bases e cujos fragmentos gerados fossem adequados para análise do tamanho em géis de agarose (\geq 50 pb); ii) entre as enzimas com o mesmo sítio de reconhecimento, apenas uma foi selecionada; e iii) enzimas com múltiplos sítios de reconhecimento foram excluídas. A

simulação da digestão enzimática das sequências *hsp65* de 441pb foi realizada usando o programa BioEdit (versão 7.0.9, Tom Hall [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]).

4.6 DESCRIÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS

Os dados demográficos e clínico-epidemiológicos referentes aos indivíduos com infecção por MNT foram obtidos das fichas médicas e incluíram as seguintes variáveis: sexo, faixa etária, local de residência, doença prévia, fatores predisponentes a infecção pulmonar por MNT, tempo de doença, tratamento, tempo de tratamento, sinais e sintomas. Os dados foram registrados em ficha epidemiológica (APÊNDICE 1) e armazenados em banco de dados no programa Excel 2007 (Windows, 2007).

4.7 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados em tabelas, gráficos e figuras. Os grupos de dados foram expressos como médias \pm desvios padrão. Comparações foram feitas por teste não-paramétrico (Teste G ou Qui-quadrado com correção de *Yates*). A significância das comparações foi determinada com valor de $p < 0,05$. A análise de dados foi realizada através do programa BioEstat, versão 5.0 (versão 5.0; Ayres et al., 2007 [<http://www.mamiraua.org.br/>]).

5 PUBLICAÇÕES

Mycobacteriology

Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory

Ana Roberta Fusco da Costa^{a,b,*}, Maria Luiza Lopes^a, Ismari Perini Furlaneto^{a,b},
Maísa Silva de Sousa^{a,b}, Karla Valéria Batista Lima^{a,b}

^aLaboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas, Rodovia BR 316, Km7, Ananindeua, 67030-000 Pará, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Av. Generalíssimo Deodoro n. 92, Belém, 66055-240 Pará, Brazil

Received 14 May 2010; accepted 25 July 2010

Abstract

This study utilized the *hsp65* polymerase chain reaction restriction analysis (PRA) method in the identification of nontuberculous mycobacteria (NTMs) isolated in a Brazilian mycobacteria laboratory. NTM isolates from clinical specimens collected from 192 patients were characterized using the *hsp65* PRA method and analyzed using both 16S rRNA and *hsp65* gene sequencing. Only 30% of the NTM strains were correctly identified through PRA, though the suggested inclusion of an additional restriction enzyme could increase the resolution to roughly 90%. A total of 17 NTM strains were not identified to species level and may represent a new taxonomic entity classified as belonging to the *Mycobacterium simiae* complex. This study demonstrates the applicability of *hsp65* PRA in the identification of several NTM strains in a reference laboratory, though the results suggest that some modifications to the original PRA method could increase its resolution substantially.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria; Molecular identification; PCR-restriction analysis

1. Introduction

Nontuberculous mycobacteria (NTMs) are widely distributed in the environment, and in the last years, they have been recognized as an important cause of pulmonary disease in immunocompromised patients of developed nations (Griffith et al., 2007; Jarzembowski & Young, 2008). Critically, the number of reported nonpulmonary NTM infections has been increasing in recent years. This increase has been attributed to infections following various surgical procedures including cardiac surgery, injections, plastic surgery, liposuction, and laser-assisted *in situ* keratomileusis (Bodle et al., 2008; Marras et al., 2007). Thus, it is necessary to develop laboratory methods that enable the diagnosis of these infections.

Several molecular methods have been proposed for use in NTM identification, including the use of specific DNA probes (AccuProbe; GenProbe, San Diego, CA), sequencing of housekeeping genes, and the polymerase chain reaction (PCR) restriction analysis (PRA) method based on 16S rRNA (Domenech et al., 1994; Hernandez et al., 1999), 16S–23S rRNA internal transcribed spacer (Khan et al., 2005; Roth et al., 1998), *hsp65* (Telenti et al., 1993), *rpoB* (Lee et al., 2000), *dnaJ* (Takewaki et al., 1994), *recA* (Blackwood et al., 2000), and *tuf* (Shin et al., 2009) genes. Although the molecular methods listed above allow for rapid and reliable species identification, the *hsp65* PRA method has the advantages of being fast, cheap, and easy to use in clinical laboratory; moreover, it can be used to identify a wide range of *Mycobacterium* spp. (Chimara et al., 2008; da Silva et al., 2001; Häfner et al., 2004; Kim et al., 2005; Leao et al., 2005; Martin et al., 2007; Wang et al., 2005).

* Corresponding author. Tel.: +55-91-3214-2116; fax: +55-91-3214-2129.
E-mail address: anacosta@iec.pa.gov.br (A.R.F. da Costa).

In this study, NTMs that had already been characterized using the *hsp65* PRA method were reevaluated through *hsp65* gene and 16S rRNA sequencing analysis. The aim of this investigation was to evaluate the true applicability of the PRA method in the identification of NTM in a reference laboratory for the diagnosis of mycobacteriosis in northern Brazil, where NTMs have been identified as emerging pathogens.

2. Materials and methods

2.1. NTM isolates

All of the NTM isolates evaluated were obtained from clinical specimens collected by the Section of Bacteriology and Mycology at the Evandro Chagas Institute, Pará, Brazil, between January 1999 and December 2008. The clinical specimens included both pulmonary samples (sputum samples and bronchoalveolar washes) and non-pulmonary samples (skin biopsies, lymph node biopsies, and abscess secretions).

Clinical samples were decontaminated using the *N*-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide method. The samples were subsequently inoculated onto Löwenstein–Jensen medium (Difco, France) and incubated in the absence of light at between 35 and 37 °C. As described previously, the distinction between species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and NTM was made through both macro- and microscopic culture analyses, the cord factor test and the inhibition test in a medium containing 0.5 mg/mL *para*-nitrobenzoic acid (Brasil, 2008).

This study was approved by the ethics committee of the Evandro Chagas Institute (protocol no. 001/08, CAAE: 0001.0.072.073-08).

2.2. PCR restriction enzyme analysis

All of the NTM isolates in this study were analyzed for variability within the *hsp65* gene using the PRA method. In brief, a 441-base pair (bp) fragment of the *hsp65* gene was amplified using the primers TB11 and TB12, as previously described (Telenti et al., 1993). A negative control (water) and a positive control (*M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 DNA) were included in every amplification run. After confirming the amplification of the 441-bp PCR products, the amplicons were digested with 10 U each of *Bst*EII (New England Biolabs, USA) and *Hae*III (Invitrogen, Brazil) in separate reactions. The restriction fragments were separated by electrophoresis in an 8% polyacrylamide gel (Proquimios, Brazil) with 50- and 25-bp ladder molecular weight markers (Invitrogen). The *hsp65* PRA patterns were analyzed by simple visual comparison with the molecular weight markers and interpreted using published algorithms (Chimara et al., 2008; Ferdinand et al., 2004) and the PRASITE Web site (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

2.3. Sequencing of the *hsp65* gene

A fragment of the *hsp65* gene was sequenced using a single NTM isolate from each of the 192 patients. In brief, a 441-bp fragment of *hsp65* was amplified using primers TB11 and TB12 (Telenti et al., 1993), and PCR fragments were purified using a SNAP™ Gel Purification Kit (Invitrogen). Using forward and reverse primers, the amplified products were directly sequenced using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's recommendations. Subsequently, the products were precipitated using the ethanol–EDTA method and resuspended in 10 µL of Hi-Di formamide (Applied Biosystems, USA), and sequence analysis was performed on an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Japan). The sequences obtained were aligned with the sequences of related species from GenBank using the BlastN algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>); similarities were calculated using the multiple alignment algorithms of BioEdit software (version 7.0.9; Tom Hall, Carlsbad, CA [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). Sequencing of the 5' end of 16S rRNA gene was performed only to resolve discrepancies between the PRA and *hsp65* sequencing analysis, according to the procedure previously described (Shin et al., 2006).

Confidence in the *hsp65* sequence identification of NTM was achieved when sequence matches of 100% occurred with sequences from NTM-type strains; however, we also concluded that accurate identifications could be confidently made when unambiguous matches exceeding 97% occurred, according to previously determined acceptance criteria standards (McNabb et al., 2004). In terms of 16S rRNA gene sequences, no cutoff exists for the minimum number of nucleotide differences in the indication of distinct taxa in the genus *Mycobacterium*, whose members are closely related to each other (Tortoli, 2003). Therefore, 16S rRNA gene sequencing was not necessarily used for the identification of isolates but was utilized to assist in establishing taxonomic grouping.

2.4. Computer-simulated restriction fragment analysis

The existence of NTM with identical restriction patterns limits the ability of clinical laboratories to effectively use the PRA method. For this reason, *hsp65* nucleotide sequences of both NTM isolates and NTM-type strains (*Mycobacterium bolletii* CIP 108541 and *Mycobacterium massiliense* CIP 108297; *Mycobacterium colombiense* CIP 108962 and *Mycobacterium avium* CIP 104244) that share the same PRA patterns were subjected to computer-simulated restriction analysis to select additional endonuclease enzymes for differentiation of these species. In brief, restriction endonuclease enzymes were selected according the following criteria: 1) only enzymes that recognized sites of more than 6 bp and were also 6-bp cutters were selected to generate fragments of adequate size for analysis; 2) among enzymes

Table 1
Comparison between *hsp65* PRA and *hsp65* sequencing

<i>hsp65</i> PRA	<i>n</i>	%	<i>hsp65</i> sequencing	<i>N</i>	%
<i>M. abscessus</i> II	104	54.2	<i>M. massiliense</i>	89	46.4
			<i>M. bolletii</i>	15	7.8
<i>M. avium</i> I	23	12.0	<i>M. avium</i>	18	9.4
			<i>M. colombiense</i>	5	2.6
<i>M. fortuitum</i> I	20	10.4	<i>M. fortuitum</i>	20	10.4
<i>M. asiaticum</i> I	12	6.3	<i>Mycobacterium</i> sp.	12	6.3
<i>M. intracellulare</i> I	11	5.7	<i>M. intracellulare</i>	11	5.7
Unknown	5	2.6	<i>Mycobacterium</i> sp.	5	2.6
<i>M. abscessus</i> I	3	1.6	<i>M. abscessus</i>	3	1.6
<i>M. smegmatis</i> I	3	1.6	<i>M. smegmatis</i>	3	1.6
<i>M. interjectum</i> ^a	3	1.6	<i>M. interjectum</i>	3	1.6
<i>M. simiae</i> I	3	1.6	<i>M. simiae</i>	2	1.0
			<i>M. scrofulaceum</i>	1	0.5
<i>M. kansasii</i> I	2	1.0	<i>M. kansasii</i>	2	1.0
<i>M. parascrofulaceum</i> III	1	0.5	<i>M. parascrofulaceum</i>	1	0.5
<i>M. szulgai</i> I	1	0.5	<i>M. szulgai</i>	1	0.5
Unknown	1	0.5	<i>M. terrae</i>	1	0.5
Total	192	100.0	Total	192	100.0

^a Pattern compatible with *M. interjectum*, according to Ferdinand et al. (2004).

that had the same recognition site, only 1 was selected, and 3) enzymes with multiple recognition sites were excluded. Simulated digestions of the *hsp65* sequences by each of the restriction enzymes were conducted using the BioEdit software (version 7.0.9, Tom Hall [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]).

2.5. Nucleotide sequence accession number

Novel nucleotide sequences of fragments of the 16S rRNA and *hsp65* genes from *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium* sp. strains obtained in this study are available in the GenBank database under accession numbers GU826694–GU826696 and GQ478699–GQ478701, respectively.

3. Results

3.1. NTM molecular identification

It was shown that 64 out of 192 strains (33.3%) or 10 out of 17 (58.8%) species were correctly identified using the *hsp65* PRA method, including *Mycobacterium fortuitum*,

M. avium, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium interjectum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium parascrofulaceum*, and *Mycobacterium szulgai* (Table 1).

Roughly 6% (*n* = 12) of the NTM strains were identified as *Mycobacterium asiaticum* I by the PRA method. In a partial sequence of the *hsp65* gene, these isolates showed 94.3% similarity to *M. asiaticum* (AY299133) and 96.9% similarity to *M. avium* (DQ284768). The latter species represented the most closely related taxon with valid nomenclature deposited in GenBank. Genetic sequencing of the 16S rRNA of these isolates revealed the presence of a short helix 18, a characteristic feature of rapidly growing mycobacteria and *M. simiae*. The analysis of 16S rRNA sequences revealed that these isolates showed 99.2% similarity to *M. simiae* (GQ153280). One other NTM isolate that was identified as *M. simiae* I by PRA showed 99.7% similarity to *M. scrofulaceum* (AF547871) after *hsp65* sequencing analysis was performed.

Two unknown patterns were characterized among some isolates: (1) *Bst*II, 326/115; *Hae*III, 140/97/87; and (2) *Bst*II, 441; *Hae*III, 130/105. The first pattern (1) was discovered in an isolate that showed 99.1% similarity to the *M. terrae* strain variant MS267 (AY550213) according to the results of *hsp65* sequence analysis. An additional 5 isolates (pattern 2) exhibited 99.2% and 96.9% of similarity to *Mycobacterium* sp. FI-07156 (EU370529) and *M. avium* (DQ284768), respectively. These isolates were classified by culture features as slowly growing mycobacteria with variable pigmentation and showed 99.2% similarity to *M. simiae* (GQ153280), according to the results of 16S rRNA sequencing analysis.

Clinical isolates of *M. massiliense* (*n* = 89) and *M. bolletii* (*n* = 15) could not be differentiated by PRA; the analysis instead identified them as type II *Mycobacterium abscessus*. Roughly 69% (72/104) of these strains (61 *M. massiliense* and 11 *M. bolletii*) were isolates from an outbreak in the state of Pará that had been previously reported (Viana-Niero et al., 2008). *M. colombiense* (*n* = 5) could not be distinguished from *M. avium* because both presented the same PRA pattern. These 3 species (*M. massiliense*, *M. bolletii*, and *M. colombiense*) were the most common ones detected, representing 56.8% of all NTM isolates, thus, suggesting the possibility of inaccurate diagnoses based on PRA. For

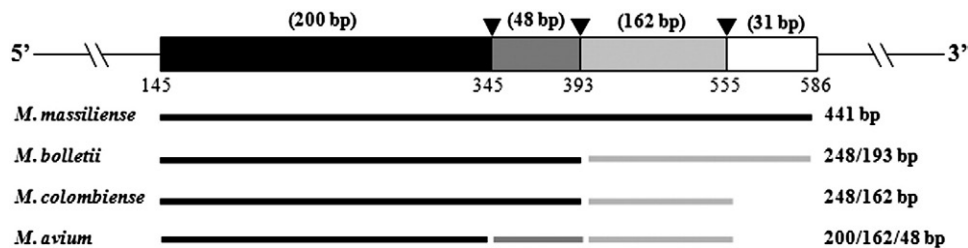


Fig. 1. Restriction sites for SmI based on the 441 bp *hsp65* sequences of *M. massiliense*, *M. bolletii*, *M. avium* and *M. colombiense* strains. Downward-pointing arrows indicate sites cut by SmI. Numbers in parenthesis indicate the size of the fragments yielded by digestion with SmI. Positions 145–586 in *hsp65* gene of *M. tuberculosis*, GenBank accession n° M15467.

this reason, we performed a computer-simulated restriction analysis of *hsp65* sequences from *M. massiliense*, *M. bolletii*, *M. avium*, and *M. colombiense* species. Based on polymorphisms C393G (*M. bolletii* and *M. massiliense*) and G345C (*M. colombiense* and *M. avium*), the enzyme SmlI (C↓TYRAG) was chosen and suggested for distinction of these species. According to the performed simulations, this enzyme yields a typical fragment pattern of fragments for these species, as presented in the Fig. 1.

4. Discussion

Numerous reports of increasing frequency suggest that pulmonary and extrapulmonary infections caused by NTM represent an emerging public health threat (Griffith, 2010; Piersimoni & Scarparo, 2009). Further complicating matters is the existence of 148 valid species and subspecies of mycobacteria (Euzéby, 2010). This study assessed the *hsp65* PRA method as a tool for the identification of NTM isolates, due to the emergence of many newly described *Mycobacterium* spp. since the beginning of its use in our laboratory.

Roughly 30% of the identifications of NTM strains by *hsp65* PRA were concordant with the results of *hsp65* sequencing, including common species such as *M. fortuitum*, *M. avium*, and *M. intracellulare*. On the other hand, most NTM strains could not be differentiated because they shared the same PRA patterns; such strains include *M. massiliense* and *M. bolletii* or *M. avium* and *M. colombiense*, as shown in previous studies (da Costa et al., 2009; Kim et al., 2008; Murcia et al., 2006; Viana-Niero et al., 2008). In general, the majority of these imprecise results correspond to *M. massiliense* and *M. bolletii* strains (54.2%) that formerly belonged to the same species of mycobacteria and were only recently recognized as different species of *M. abscessus* (Adékambi et al., 2004; Adékambi et al., 2006). The distinction at the species level is important because antibiotic susceptibility can vary between species. For instance, macrolides such as clarithromycin have been recommended as first-line antimicrobial drugs for the treatment of *M. abscessus* lung disease (Griffith et al., 2007). However, in recent studies, it has been shown that *M. bolletii* isolates are highly resistant to macrolides (Adékambi & Drancourt, 2009; Adékambi et al., 2006). This is consistent with our findings in 4 patients with *M. bolletii* pulmonary infections who did not present clinical improvement after 12 months of macrolide-based therapy (data not shown).

To overcome the limitations of this assay, we proposed the inclusion of the restriction enzyme SmlI into *hsp65* PRA in order to distinguish strains of *M. massiliense* from *M. bolletii* (formerly *M. abscessus* type II), as suggested in a previous study (da Costa et al., 2009), or *M. colombiense* from *M. avium* type I. With the use of this approach, it would be possible to correctly identify roughly 90% of the NTM strains investigated in this study. Thus, though it would not

enable identification of all samples, the incorporation of an additional restriction enzyme step into the *hsp65* PRA method could greatly improve the identification of the most prevalent species. In addition, a total of 19 (9.9%) strains were not identified because they presented unknown restriction patterns. These included *M. scrofulaceum*, *M. terrae*, and *Mycobacterium* sp., the last of which was closely related to the *M. simiae* complex. It may therefore represent a previously unreported PRA pattern of these species. According to Ferdinand et al. (2004), *hsp65* PRA is not suitable to identify either rarely observed or new strains.

This study demonstrates the applicability of the *hsp65* PRA method in the identification of NTM species isolated from the state of Pará in the Amazon region of Brazil. We find that the incidence of identical restriction patterns for some NTM and the identification of new species of mycobacteria are the principal complications of using such a method, though nucleic acid sequencing of the *hsp65* gene helped to clarify ambiguous results. Nevertheless, it must be emphasized that the underdiagnosis of NTM in tuberculosis-endemic regions is related to the limited availability of laboratory facilities in addition to the overburden of other diseases (Gopinath & Singh, 2010). Given these circumstances, priorities lie in the selection of diagnostic methods that are both simple and economically viable. Although various molecular methods, such as gene sequencing, have been developed for the rapid and precise identification of NTM, most of them are very expensive. Unfortunately, most clinical laboratories in developing countries like Brazil do not have the necessary resources to introduce this service into their routines. In contrast, the *hsp65* PRA method is a feasible tool for NTM identification because it can identify a wide range of *Mycobacterium* spp. quickly, simply and cheaply in comparison to other molecular methods. Therefore, it may be concluded that the *hsp65* PRA method still represents a good clinical option due to its cost-effectiveness in comparison to other methods.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (process no. 102/2004), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and the Evandro Chagas Institute, Ananindeua, Pará, Brazil.

References

- Adékambi T, Drancourt M (2009) *Mycobacterium bolletii* respiratory infections. *Emerg Infect Dis* 15:302–305.
- Adékambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M (2006) *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:133–143.
- Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, La Scola B, Raoult D, Drancourt M (2004) Amoebal coculture of *Mycobacterium*

- massiliense* sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptico pneumonia. *J Clin Microbiol* 42:5493–5501.
- Blackwood KS, He C, Gunton J, Turenne CY, Wolfe J, Kabani AM (2000) Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* 38:2846–2852.
- Bodle EE, Cunningham JA, Della-Latta P, Schluger NW, Saiman L (2008) Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in patients without HIV infection, New York City. *Emerg Infect Dis* 14:390–396.
- Brasil (2008) Brasília: Ministério da Saúde, pp. 1–436 http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf.
- Chimara E, Ferrazoli L, Ueki SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leao SC (2008) Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiol* 8:48, doi:10.1186/1471-2180-8-48.
- da Costa AR, Lopes ML, Leao SC, Schneide MP, de Sousa MS, Suffys PN, Corvelo TC, Lima KV (2009) Molecular identification of rapidly growing mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the state of Pará, Amazon region, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65:358–364.
- da Silva CF, Ueki SY, Geiger DCP, Leao SC (2001) *hsp65* PCR restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43:25–28.
- Domenech P, Menendez MC, Garcia MJ (1994) Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. *FEMS Microbiol Lett* 116:19–24.
- Euzéby JP (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47:590–592 List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update: April 08, 2010. URL:<http://www.bacterio.net>. 2010.
- Ferdinand S, Legrand E, Goh KS, Berchel M, Mazzarelli G, Sola C, Tortoli E, Rastogi N (2004) Taxonomic and phylogenetic status of non-tuberculous mycobacteria in a Caribbean setting. *Mol Cell Probes* 18:399–408.
- Gopinath K, Singh S (2010) Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: are we neglecting the danger? *PLoS Neg Trop Dis* 4:e615, doi:10.1371/journal.pntd.0000615.
- Griffith DE (2010) Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis* 23(2):185–190.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huit G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, Fordham von Reyn C, Wallace RJ, Winthrop K (2007) American Thoracic Society. An Official ATS/IDSA Statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 175:367–416.
- Häfner B, Haag H, Geiss HK, Nolte O (2004) Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. *Mol Cell Probes* 18:59–65.
- Hernandez SM, Morlock GP, Butler WR, Crawford JT, Cooksey RC (1999) Identification of *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol* 37:3688–3692.
- Jarzebowski JA, Young MB (2008) Nontuberculous mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med* 132:1333–1341.
- Khan IU, Selvaraju SB, Yadav JS (2005) Method for rapid identification and differentiation of the species of the *Mycobacterium chelonae* complex based on 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer PCR-restriction analysis. *J Clin Microbiol* 43:4466–4472.
- Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, Lee SH, Chae GT, Cha CY, Kook YH, Kim BJ (2005) Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1649–1656.
- Kim HY, Kook Y, Yun YJ, Park CG, Lee NY, Shim TS, Kim BJ, Kook YH (2008) Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae*-*Mycobacterium abscessus* group isolates. *J Clin Microbiol* 46:3384–3390.
- Leao SC, Bernardelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, Mejia GI, da Silva Telles MA, Chimara E, Velazco M, Fernandez J, Rodrigues PA, Guerrero MI, Leon CI, Porras TB, Rastogi N, Goh KS, Suffys P, da Silva Rocha A, dos Santos Netto D, Ritacco V, Lopez B, Barrera L, Palomino JC, Martin A, Portaels F (2005) Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods* 61:193–199.
- Lee H, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ (2000) Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. *J Clin Microbiol* 38:2966–2971.
- Marras TK, Chedore P, Ying AM, Jamieson F (2007) Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. *Thorax* 62:661–666.
- Martin A, Uwizeye C, Fissette K, De Rijk P, Palomino JC, Leao S, Portaels F (2007) Application of the *hsp65* PRA method for the rapid identification of mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium. 71:39–43.
- McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, Black WA, Isaac-Renton J (2004) Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol* 42:3000–3011.
- Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E, Garcia MJ (2006) *Mycobacterium colombiense*, sp. nov., a new member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2049–2054.
- Piersimoni C, Scarpato C (2009) Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis* 15:1351–1358.
- Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H (1998) Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* 36:139–147.
- Shin S, Kim EC, Yoon JH (2006) Identification of nontuberculous mycobacteria by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA, the heat shock protein 65 and the RNA polymerase β -subunit genes. *Korean J Lab Med* 26:153–160.
- Shin JH, Cho EJ, Lee JY, Yu JY, Kang YH (2009) Novel diagnostic algorithm using *tuf* gene amplification and restriction fragment length polymorphism is promising tool for identification of nontuberculous mycobacteria. *J Microbiol Biotechnol* 19:323–330.
- Takewaki S, Okuzumi K, Manabe I, Tanimura M, Miyamura K, Nakahara K, Yazaki Y, Ohkubo A, Nagai R (1994) Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. *Int J Syst Bacteriol* 44:159–166.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T (1993) Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31:175–178.
- Tortoli E (2003) Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16:319–354.
- Viana-Niero C, Lima KVB, Lopes ML, Rabello MC, Marsola LR, Brilhante VC, Durham AM, Leao SC (2008) Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *J Clin Microbiol* 1:52–57.
- Wang SX, Tay L, Sang LH (2005) Rapid identification of pathogenic rapidly growing mycobacteria by PCR-restriction endonuclease analysis. *Ann Acad Med Singapore* 34:137–140.

Identificação genotípica de membros do complexo *Mycobacterium avium* isolados de infecções pulmonares no Estado do Pará, Brasil

Genotypic identification of members of the *Mycobacterium avium* complex isolated from pulmonary infections in Pará State, Brazil

Identificación genotípica de miembros del complejo *Mycobacterium avium* aislados de infecciones pulmonares en el Estado de Pará, Brasil

Ana Roberta Fusco da Costa

Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Emilyn da Costa Conceição

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil
Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Maria Luíza Lopes

Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Karla Valéria Batista Lima

Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Jeann Ricardo da Costa Bahia

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil
Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: O complexo *Mycobacterium avium* (MAC) compreende micobactérias de crescimento lento, naturalmente encontradas no meio ambiente, capazes de causar infecções em diversas espécies de seres vivos, incluindo aves, suínos e humanos. Tais infecções podem ser assintomáticas, clinicamente significantes e, em alguns casos, fatais. No entanto, existe a necessidade de se disponibilizarem técnicas que ofereçam uma identificação conclusiva de bactérias estreitamente relacionadas. As técnicas de biologia molecular se apresentam como ferramentas promissoras para uma identificação mais precisa. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Neste trabalho foram avaliados os marcadores moleculares RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB* aplicados à distinção de membros do MAC isolados no Laboratório de Micobactérias do Instituto Evandro Chagas. **RESULTADOS:** Amostras de MAC colhidas em 15 pacientes foram previamente avaliadas pelo método de análise de polimorfismo de fragmentos de restrição do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*), que forneceu três diferentes perfis: (I) *Bst*EII: 235/115/100, *Hae*III: 145/130/60; (II) *Bst*EII: 235/210, *Hae*III: 130/105; e (III) *Bst*EII: 235/210, *Hae*III: 145/130. Árvores filogenéticas foram construídas após análise do RNAr 16S, em que as amostras foram distribuídas em dois grupos, semelhante ao encontrado na análise de *hsp65*. Entretanto, os resultados de *rpoB* foram discordantes daqueles das outras árvores, devido à modificação de topologia. **CONCLUSÃO:** Os achados deste estudo sugerem que diferentes forças evolucionárias podem estar atuando sobre o gene *rpoB*, e, desta forma, é necessário que se tenha precaução ao estabelecer esse alvo para fins taxonômicos. Adicionalmente, recomenda-se que mais de um marcador, incluindo o RNAr 16S, seja avaliado para a identificação micobacteriana.

Palavras-chave: Complexo *Mycobacterium avium*; Polimorfismo de Fragmento de Restrição; Análise de Sequência de DNA; Filogenia.

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Ana Roberta Fusco da Costa

Instituto Evandro Chagas, Seção de Bacteriologia e Micologia, Laboratório de Biologia Molecular

Rodovia BR316, km 7, s/nº. Bairro: Levilândia

CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil

E-mail: anacosta@iec.pa.gov.br/robertafusco@gmail.com

Tel./Fax: +55 (91) 3214-2116 / +55 (91) 3214-2129

INTRODUÇÃO

O complexo *Mycobacterium avium* (MAC), juntamente com outras espécies micobacterianas atípicas, denominadas de micobactérias não tuberculosas (MNT), compreende micobactérias de crescimento lento, naturalmente encontradas no meio ambiente¹, capazes de causar infecções em diversas espécies de seres vivos, incluindo aves, suínos e humanos, podendo se apresentar como assintomáticas, clinicamente significantes e, em alguns casos, fatais². Esse complexo é constituído pelas espécies *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. colombiense* e *M. chimaera*^{3,1}.

O MAC representa um importante grupo de micobactérias associado a várias patologias humanas, especialmente às infecções disseminadas em pacientes com aids⁴. Além dessas, recentes evidências sugerem que a taxa de infecção em pacientes imunocompetentes esteja em elevação nos EUA^{5,6,7}.

Várias metodologias são aplicadas à diferenciação de membros do MAC, dentre as quais estão incluídas a soroglutinação⁸, a hibridização DNA-RNAr com sondas comerciais (Accuprobe; GenProbe), a análise do polimorfismo de restrição do gene *hsp65* (65-kDa heat shock protein)⁹, a análise de ITS (16S-23S rDNA internal transcribed spacer)¹⁰, a RNAr 16S (RNA ribossômico 16S)¹¹, a *hsp65*¹² e, recentemente, a região V do gene *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase)¹³. Este último alvo foi proposto como alternativa para identificação de MAC em uma única etapa¹⁴, mas há poucos estudos utilizando esse marcador.

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a aplicação deste marcador, bem como o RNAr 16S e *hsp65*, para distinguir espécies membros do MAC isoladas no Laboratório de Micobactérias da Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI) do Instituto Evandro Chagas (IEC), contribuindo desta forma para o aprimoramento da identificação desse grupo de micobactérias, ainda pouco conhecido na Região Amazônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo retrospectivo de identificação de 60 amostras do MAC isoladas de espécimes clínicos pulmonares provenientes de 15 pacientes das cidades de Belém, Ananindeua, Parauapebas e Marabá, Estado do Pará. As amostras foram isoladas no Laboratório de Referência Regional de Micobactérias, SABMI/IEC, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2007. A infecção por MNT foi definida segundo os critérios da *American Thoracic Society*¹⁵ e Ministério da Saúde¹⁶, que consideraram de importância bacteriológica as MNT de origem pulmonar isoladas pelo menos duas vezes consecutivas de escarro ou lavado bronco-alveolar. Foram excluídos os pacientes com mais de uma espécie de micobactéria isolada dos espécimes clínicos.

O projeto que deu origem a este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres

Humanos do IEC, sob parecer nº 0010/2008, CAAE: 0001.0.072.073-08.

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Cultivo micobacteriano

Todas as amostras foram processadas em cabine de segurança biológica classe II B2, na SABMI/IEC, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2007.

Os espécimes clínicos foram semeados em meio sólido Löwenstein-Jensen (LJ-Difco, São Paulo, Brasil) e incubados a 35-37 °C na ausência de luz. A distinção presuntiva entre espécies do complexo *M. tuberculosis* e MNT foi obtida por meio da análise macro e microscópica da cultura, pesquisa do fator corda e teste de inibição de crescimento em meio LJ contendo 0,5 mg/mL de ácido para-nitrobenzóico (MP Biomedicals, Sólun, EUA)¹⁶. Todas as culturas com características sugestivas de MNT foram submetidas à identificação molecular.

Extração do DNA

Duas alçadas de crescimento micobacteriano em meio sólido foram suspensas em 300 µL de água MilliQ estéril. Essa suspensão foi transferida para microtubos contendo 600 µL de tampão de lise (Tris HCl pH 9,0 300 mM, EDTA 100 mM, sucrose 4,8%, SDS 1,25%), 600 µL de tampão de homogeneização (Tris HCl pH8 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA pH8 10 mM, sucrose 5%), 15 µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubada a 56 °C por 12 h. Os detritos celulares foram removidos com 600 µL de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamil 25:24:1 (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O DNA foi precipitado com 100 µL de acetato de sódio 3M, pH 4,8 (Sigma, São Paulo, Brasil) e 500 µL de isopropanol (Merck, Steinheim, Alemanha), centrifugado a 13.000 rpm por 10 min e tratado com 500 µL de etanol 70% (Merck, Steinheim, Alemanha). Após centrifugação a 13.000 rpm (16.845 xg), a 4 °C, o álcool foi removido por evaporação e o DNA precipitado foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE 1x (Tris HCl pH8 10 mM, EDTA pH8 1 mM). A concentração da solução de DNA foi determinada usando o Kit Qubit Fluorometer (Invitrogen, São Paulo, Brasil), segundo as recomendações do fabricante.

Identificação genotípica

As amostras foram identificadas inicialmente pelo método de PRA-*hsp65*, segundo o qual uma sequência de 441 pb foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do gene alvo *hsp65*, utilizando os primers TB11 (5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3') e TB12 (5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3')⁹. Os produtos da PCR foram digeridos separadamente com 10 U das enzimas *Bst*II (New England Biolabs, Ipswich, EUA) e *Hae*III (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Os fragmentos assim obtidos foram separados por eletroforese em gel de poli-acrilamida 8% (Biosolve LTD, Valkenswaard, Holanda) contendo marcadores de peso molecular de 25 pb e 50 pb (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Posteriormente, uma amostra de cada um dos 15 pacientes foi submetida ao sequenciamento dos genes RNAr 16S (RNAf/RNAr), *hsp65* (HSPF3/HSPR4) e *rpoB* (Mycof/Mycor), de acordo com condições previamente descritas^{13,17,18}.

Após a verificação dos produtos da PCR em gel de agarose Seakem LE 1% (Cambrex, Rockland, EUA), estes foram purificados usando o sistema de purificação S.N.A.P.TM Gel Purification Kit (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Os produtos amplificados foram diretamente sequenciados com os *primers forward* e *reverse* usando o sistema *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e purificados com *BigDye X Terminator Purification Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), conforme as recomendações do fabricante. Posteriormente, foram submetidos ao analisador genético ABI3130 (Applied Biosystems, Tóquio, Japão).

Análises

Os perfis de PRA foram analisados por simples comparação visual com os marcadores de peso molecular, sendo interpretados com algoritmos publicados^{19,20,21,16} e PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). As sequências nucleotídicas obtidas para RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB* foram alinhadas com sequências de espécies relacionadas depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) usando o algoritmo de múltiplo alinhamento no programa BioEdit (v 7.0.9; TomHal[<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de *neighbor-joining*, com modelo de correção Kimura-2-parâmetros no programa MEGA (v 4.0; Tamura, Dudley, Nei and Kumar [<http://www.megasoftware.net/>]), tomando *M. fortuitum* ATCC 13756 como grupo externo. A análise de *bootstrap* com mil replicações foi realizada. As sequências do GenBank utilizadas para comparações compreenderam: *M. avium* subsp. *avium* (RNAr 16S: EF521895, *hsp65*: AF547808, *rpoB*: EF521907), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (RNAr 16S: EF521896, *hsp65*: AF547809, *rpoB*: EF521906), *M. avium* subsp. *silvaticum* (RNAr 16S: EF521891, *hsp65*: AF547810, *rpoB*: EF521905), *M. avium* subsp. *hominissuis* (RNAr 16S: EF521892, *hsp65*: EU239782, *rpoB*: EF521911), *M. intracellulare* (RNAr 16S: X52927, *hsp65*: EU239784, *rpoB*: EF521909), *M. chimaera* (RNAr 16S: EF521894, *hsp65*: EU239783, *rpoB*: EF521908) e *M. colombiense* (RNAr 16S: AM062764, *hsp65*: EU239785, *rpoB*: EF521910).

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO POR PRA-*hsp65*

O PRA-*hsp65* realizado nas amostras de MAC caracterizou-as em três diferentes perfis alélicos associados às espécies *M. intracellulare* e *M. avium* (Tabela 1).

ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DO RNAr 16S, *hsp65* E *rpoB*

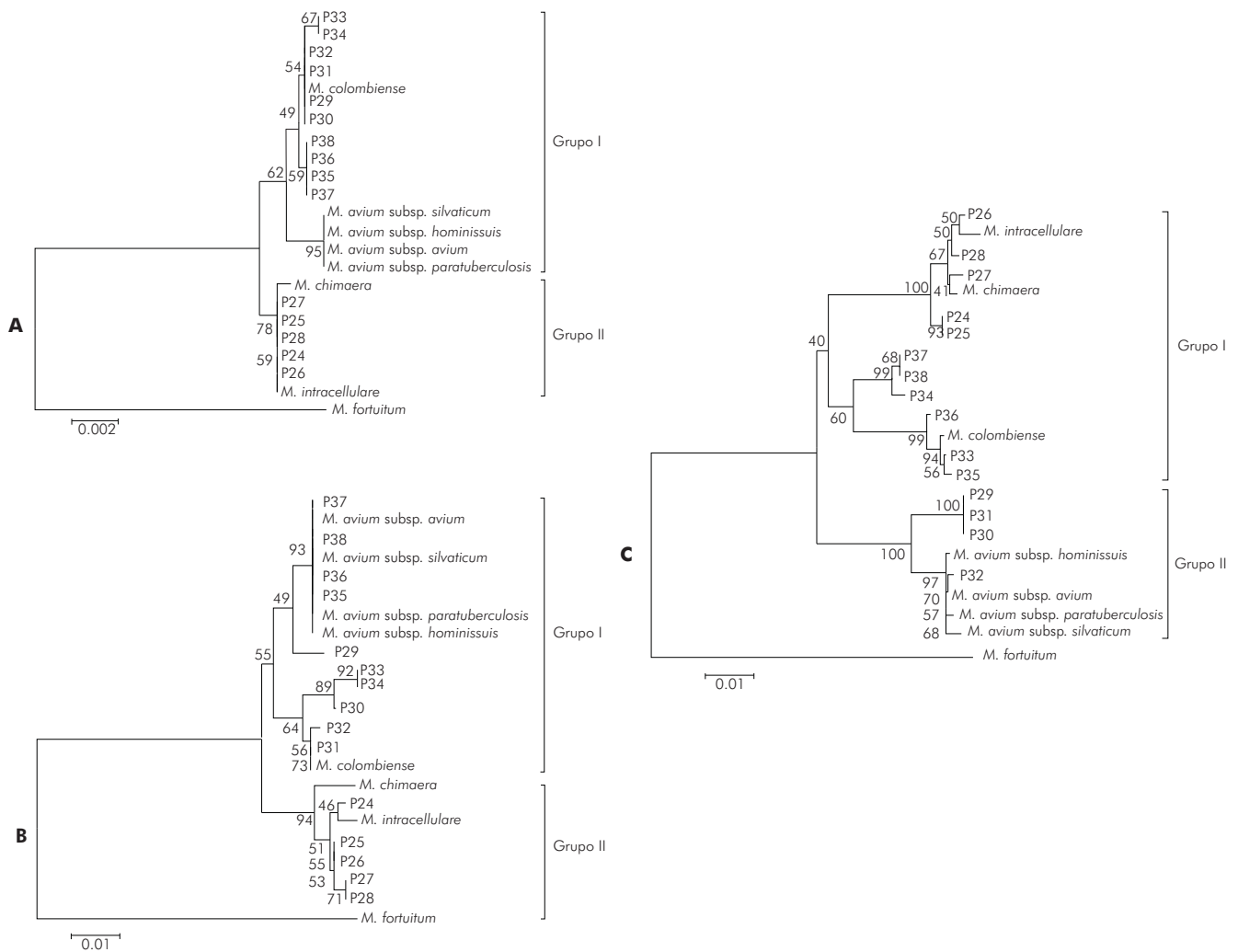
As amostras apresentaram cinco genótipos distribuídos em dois grupos, cujos valores de similaridade variaram de 98,3% a 100% com sequências do RNAr 16S de cepas de MAC disponíveis no GenBank. Apesar das subespécies de *M. avium* não serem diferenciadas entre si, elas exibiram divergências de 2,1% com *M. chimaera*, 1,7% com *M. intracellulare* e 0,9% com *M. colombiense*. As amostras apresentaram cinco genótipos distribuídos em dois grupos, cujos valores de *bootstrap* indicavam baixo poder discriminatório para esse marcador. O grupo I apresentou sequências de táxons relacionados à espécie *M. avium*, que estavam subdivididos em três subgrupos, dos quais apenas um foi sustentado por valor de *bootstrap* de 95%, compreendendo aquele com subespécies de *M. avium* obtidas do GenBank. A diversidade nucleotídica para este subgrupo com relação às amostras isoladas de espécimes clínicos deste estudo foi atribuída às substituições nas posições 154 (C T), 155 (A T) e 169 (C T). O grupo II comportou amostras estreitamente relacionadas ao *M. intracellulare* e ao *M. chimaera*, compartilhando similaridades de 99,5% a 100% (Figura 1A).

Na análise das sequências do *hsp65* das amostras clínicas observaram-se nove genótipos com similaridades de 97% a 100%. As similaridades entre as amostras e as cepas de referência são apresentadas na tabela 2. Os táxons foram alocados em dois grupos, sendo o grupo I dividido em um subgrupo com *M. avium* sp., cujo valor de *bootstrap* foi de 93%, e um outro com amostras relacionadas ao *M. colombiense*. O grupo II apresentou amostras relacionadas ao *M. intracellulare* e *M. chimaera*, resultado semelhante ao obtido na análise de RNAr 16S (Figura 1B).

Na análise do gene *rpoB*, verificou-se similaridade de 95% a 100% entre as amostras, com divergências de 0,2% – 0,3% entre as subespécies *M. avium* e a clara distinção de *M. avium* dos demais membros do MAC (Tabela 2). Entretanto, observou-se mudança na topologia dos isolados, comparada com aquelas obtida para RNAr 16S e *hsp65*, sendo que amostras antes filogeneticamente relacionadas ao *M. colombiense* foram agrupadas com *M. avium* (P30 – P32) e vice-versa (P35 – P38). Um achado importante foi a modificação dos membros nos agrupamentos: o grupo I foi formado por *M. intracellulare* com espécies relacionadas e *M. colombiense*, e o grupo II por subespécies de *M. avium* (Figura 1C). Onze genótipos foram encontrados na análise desse alvo molecular.

Tabela 1 – Perfis alélicos obtidos por PRA-*hsp65* para membros do MAC isolados no IEC entre 2004 e 2007

Perfis	Pacientes	Nº amostras	<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	Identificação – PRA- <i>hsp65</i>
I	P24 - 28	16	235/115/100	145/130/60	<i>M. intracellulare</i> 1/ <i>M. chimaera</i> 1
II	P29 - 36	40	235/210	130/105	<i>M. avium</i> 1/ <i>M. colombiense</i> 1
III	P37 - 38	4	235/210	145/130	<i>M. avium</i> 3



As árvores foram construídas através do método *neighbor-joining*, utilizando o modelo de correção de distância Kimura-2-parâmetros. Os números nos nós indicam os valores de *bootstrap* obtidos em mil repetições (expressos em porcentagem). *M. fortuitum* ATCC 13756 foi usado como grupo externo.

Figura 1 – Árvores filogenéticas baseadas nas sequências do rRNA 16S (A), *hsp65* (B) e *rpoB* (C) de 15 isolados do MAC e sete cepas de referência

Tabela 2 – Valores de similaridades para as sequências *rpoB* (abaixo à esquerda) e *hsp65* (acima à direita) para membros do MAC isolados no IEC entre 2004 e 2007

Amostras	Similaridade (%)																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. P24	ID	99,7	99,7	99,5	99,5	97,1	97,1	97,1	96,9	96,9	96,9	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	99,5	98,8	97,1
2. P25	100	ID	100	99,7	99,7	97,3	97,3	97,3	97,1	97,1	97,1	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	99,2	98,5	97,3
3. P26	99,2	99,2	ID	99,7	99,7	97,3	97,3	97,3	97,1	97,1	97,1	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	99,2	98,5	97,3
4. P27	99,2	99,2	99,4	ID	100	97,1	97,1	97,1	96,9	96,9	96,9	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	99,0	98,3	97,1
5. P28	99,1	99,1	99,5	99,2	ID	97,1	97,1	97,1	96,9	96,9	96,9	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	99,0	98,3	97,1
6. P29	94,6	94,6	94,2	94,2	94,6	ID	98,1	99,0	98,8	97,6	97,6	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	96,6	96,4	99,0
7. P30	94,6	94,6	94,2	94,2	94,6	100	ID	99,0	99,2	99,5	99,5	98,1	98,1	98,1	98,1	98,1	98,1	98,1	98,1	96,6	97,3	99,0
8. P31	94,6	94,6	94,2	94,2	94,6	100	100	ID	99,7	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	96,6	96,9	100
9. P32	95,2	95,2	94,6	94,6	94,7	98,0	98,0	98,0	ID	98,8	98,8	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	96,4	97,1	99,7
10. P33	95,4	95,4	95,3	95,6	95,4	94,7	94,7	94,7	94,5	ID	100	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	96,4	97,1	98,5
11. P34	95,9	95,9	95,7	95,7	95,9	95,7	95,7	95,7	95,7	97,1	ID	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	96,4	97,1	98,5
12. P35	95,3	95,3	95,2	95,4	95,3	94,6	94,6	94,6	94,3	99,8	97,3	ID	100	100	100	100	100	100	100	97,6	97,3	98,5
13. P36	95,9	95,9	95,7	96,0	95,9	94,9	94,9	94,9	94,6	99,5	97,3	99,4	ID	100	100	100	100	100	100	97,6	97,3	98,5
14. P37	96,0	96,0	95,9	95,9	96,0	95,9	95,9	95,9	95,9	97,3	99,5	97,1	97,4	ID	100	100	100	100	100	97,6	97,3	98,5
15. P38	96,0	96,0	95,9	95,9	96,0	95,9	95,9	95,9	95,9	97,3	99,5	97,1	97,4	1	ID	100	100	100	100	97,6	97,3	98,5
16. Maa	95,2	95,2	94,7	94,7	94,9	98,1	98,1	98,1	99,8	94,6	95,9	94,5	94,7	96,0	96,0	ID	100	100	100	97,6	97,3	98,5
17. Map	95,0	95,0	94,6	94,6	94,7	98,0	98,0	98,0	99,7	94,5	95,7	94,3	94,6	95,9	95,9	99,8	ID	100	100	97,6	97,3	98,5
18. Mas	94,9	94,9	94,5	94,5	94,6	97,8	97,8	97,8	99,5	94,3	95,6	94,2	94,5	95,7	95,7	99,7	99,5	ID	100	97,6	97,3	98,5
19. Mah	95,2	95,2	94,7	94,7	94,9	98,3	98,3	98,3	99,7	94,5	95,7	94,3	94,6	95,9	95,9	99,8	99,7	99,5	ID	97,6	97,3	98,5
20. Mi	99,4	99,4	99,5	99,5	99,4	94,3	94,3	94,3	94,7	95,4	95,9	95,3	95,9	96,0	96,0	94,9	94,7	94,6	94,9	ID	98,8	96,6
21. Mchi	99,0	99,0	99,4	99,1	99,2	93,9	93,9	93,9	94,3	95,0	95,4	94,9	95,4	95,6	95,6	94,5	94,3	94,2	94,5	99,2	ID	96,9
22. Mcol	95,4	95,4	95,3	95,6	95,4	94,7	94,7	94,7	94,5	99,7	97,4	99,8	99,5	97,3	97,3	94,6	94,5	94,3	94,5	95,4	95,0	ID

Maa: *M. avium* subsp. *avium*; Map: *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; Mas: *M. avium* subsp. *silvaticum*; Mah: *M. avium* subsp. *hominissuis*; Mi: *M. intracellulare*; Mchi: *M. chimaera*; Mcol: *M. colombiense*.

DISCUSSÃO

O estudo de membros do MAC tem se tornado importante pela prevalência em infecções disseminadas em pacientes com aids e pelo aumento do número de infecções em pacientes sem aids. Estudos têm sugerido que as infecções por MAC em pacientes com aids possam ser causadas por um limitado número de cepas relacionadas ao *M. avium*^{22,23}. No entanto, as espécies e subespécies pertencentes ao MAC não são facilmente diferenciadas por testes fenotípicos, sendo os métodos moleculares, portanto, a melhor opção atualmente para identificação dessas micobactérias³.

O PRA-*hsp65* é considerado um método simples, de fácil implantação nos laboratórios clínicos e que permite a identificação de uma ampla variedade de espécies detectadas na rotina laboratorial^{19,24,21}. Entretanto, ele não possibilita a diferenciação de espécies recentemente descritas, como *M. colombiense* e *M. chimaera*, que compartilham perfis com as variantes alélicas *M. avium* I e *M. intracellulare* I, respectivamente^{19,25}. Em virtude das diferentes significâncias clínicas entre as espécies de MAC, é necessário que se faça o esclarecimento taxonômico^{3,26}.

O sequenciamento do RNAr 16S evidenciou a distribuição dos isolados em dois principais agrupamentos: um com táxons relacionados ao *M. avium* e outro ao *M. intracellulare*, porém os baixos valores de *bootstrap* encontrados na árvore demonstram o pequeno poder discriminatório para este alvo. Embora o RNAr 16S tenha um importante valor para a taxonomia das micobactérias, definindo a classificação das mesmas em grupos sistemáticos, a pequena variabilidade encontrada entre membros pertencentes ao MAC não permite distinção em nível de espécie¹.

As sequências *hsp65* apresentaram maior polimorfismo quando comparadas ao RNAr 16S. As similaridades variaram de 97% a 100%. No grupo I, que reuniu espécies relacionadas ao *M. avium* e *M. colombiense*, não foi possível realizar uma clara diferenciação entre os isolados. Ou seja, quando adotado o valor de *cut-off* acima de 97% para diferenciação de espécies por *hsp65*, proposto por McNabb et al¹², não foi possível diferenciar *M. avium* de *M. colombiense*, cujas sequências de referência compartilharam similaridades de 98,5%. No entanto, ao considerarmos o maior escore de similaridade, conseguimos identificar 90% (9/10) dos isolados deste grupo, representados por *M. colombiense* (P30 – P34) e *M. avium* (P35 – P38), excluindo apenas P29, que exibiu 99% de similaridade com ambas as espécies. Esse achado confirma a estreita relação entre *M. avium* e *M. colombiense*, como demonstrado por Murcia et al²⁵. Os isolados clínicos P24 a P28 exibiram maior similaridade com *M. intracellulare*, embora compartilhassem 98,3% –

98,8% de similaridade com *M. chimaera*. Tal dado demonstra a necessidade de busca por novos alvos moleculares, capazes de distinguir uma ampla variedade de espécies, incluindo aquelas que exibem estreitas relações filogenéticas.

Um segmento da região V do gene *rpoB*, inicialmente usado para identificação de micobactérias de crescimento rápido¹³ e recentemente proposto para identificação de espécies do MAC¹⁴, foi avaliado neste estudo. Na análise das sequências foram observadas incongruências de resultados quando comparados ao sequenciamento dos genes RNAr 16S e *hsp65*. Como observado na figura 2A, *M. colombiense* mostrou-se estreitamente relacionado ao *M. avium*, o que também se estendeu à análise de *hsp65* (Figura 2B). Este achado é equivalente ao descrito por Murcia et al²⁵. No entanto, na análise do *rpoB* verificou-se que *M. colombiense* se apresentou no grupo relacionado ao *M. chimaera* e *M. intracellulare*, ocorrendo, portanto, mudança na topologia da árvore. Além disso, houve uma inversão na alocação dos isolados dentro dos grupos, sendo que alguns isolados filogeneticamente relacionados ao *M. colombiense* foram reunidos com *M. avium* e vice-versa.

A disposição de táxons na árvore de *rpoB* deste estudo também foi observada em trabalho prévio que demonstrou a utilidade deste marcador para identificação de MAC, segundo o qual divergência de 0,7% possibilitou a diferenciação de 93% dos isolados clínicos¹⁴.

Há um consenso a respeito de que o conhecimento preciso de isolados de MAC envolvidos em infecções possa fornecer importantes dados sobre a heterogeneidade clínica e patogenicidade destes membros, bem como sobre o estabelecimento de terapia baseada na diversidade genotípica^{27,28,3}.

CONCLUSÃO

Embora o gene *rpoB* tenha sido proposto como marcador molecular adicional para diferenciação de micobactérias, inclusive de isolados pertencentes ao MAC, os achados deste estudo demonstraram que os resultados da análise do gene *rpoB* foram discordantes daqueles encontrados para as sequências do RNAr 16S e *hsp65*, sugerindo que diferentes forças evolucionárias atuam sobre marcadores individuais. Diante do exposto, alertamos que a seleção de alvos moleculares para fins taxonômicos deve ser baseada em marcadores conservados, onde se observe a manutenção da relação das espécies com seus grupos sistemáticos conhecidos e que exibam maior poder discriminatório que o gene do RNAr 16S. Adicionalmente, recomendamos que mais de um marcador, incluindo o RNAr 16S, seja avaliado para a identificação das espécies micobacterianas.



Genotypic identification of members of the *Mycobacterium avium* complex isolated from pulmonary infections in Pará State, Brazil

ABSTRACT

INTRODUCTION: The *Mycobacterium avium* complex (MAC) is a group of slow-growing mycobacteria naturally found in the environment capable of causing infections in a wide variety of living species, including birds, swines and humans. These infections can be asymptomatic, clinically significant and, in some cases, fatal. There is a demand for techniques that are capable of conclusively identifying closely related bacteria. Molecular biological techniques are promising tools for a more precise identification. **MATERIAL AND METHODS:** In this study, we evaluated the ability of 16S rRNA, *hsp65* and *rpoB* molecular markers to distinguish between members of the MAC isolated in the Mycobacteria Laboratory at the Instituto Evandro Chagas. **RESULTS:** MAC samples collected from 15 patients were previously evaluated using an *hsp65* gene restriction fragment length polymorphism analytical method (RFLP-*hsp65*), and they showed three different profiles: (I) *BstEII*: 235/115/100, *HaeIII*: 145/130/60; (II) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 130/105; and (III) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 145/130. We constructed phylogenetic trees using 16S rRNA analysis in which the samples were distributed into two groups, similarly to those found in the *hsp65* analysis. However, the results from the *rpoB* analysis disagreed with those of the other trees due to changes in topology. **CONCLUSION:** The findings from this study warrant that various evolutionary forces may be acting on the *rpoB* gene. Thus, it is necessary to be cautious when using this target for taxonomic analyses. Additionally, we recommend that multiple markers (including 16S rRNA) be evaluated when identifying mycobacteria.

Keywords: *Mycobacterium avium* Complex; Polymorphism, Restriction Fragment Length; Sequence Analysis, DNA; Phylogeny.

Identificación genotípica de miembros del complejo *Mycobacterium avium* aislados de infecciones pulmonares en el Estado de Pará, Brasil

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El complejo *Mycobacterium avium* (MAC) comprende micobacterias de crecimiento lento, naturalmente encontradas en el medio ambiente, capaces de causar infecciones en diversas especies de seres vivos, incluyendo aves, porcinos y humanos. Tales infecciones pueden ser asintomáticas, clínicamente significativas y, en algunos casos, fatales. Sin embargo, existe la necesidad de poner a disposición técnicas que ofrezcan una identificación conclusiva de bacterias estrechamente relacionadas. Las técnicas de biología molecular se presentan como herramientas prometedoras para una identificación más precisa. **MATERIALES Y MÉTODOS:** En este trabajo fueron evaluados los marcadores moleculares RNAr 16S, *hsp65* y *rpoB* aplicados a la distinción de miembros del MAC, aislados en el laboratorio de Micobacterias del Instituto Evandro Chagas. **RESULTADOS:** Muestras del MAC colectadas en 15 pacientes fueron previamente evaluadas por el método de análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción del gen *hsp65* (PRA-*hsp65*), que suministró tres perfiles diferentes: (I) *BstEII*: 235/115/100, *HaeIII*: 145/130/60; (II) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 130/105; y (III) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 145/130. Se construyeron árboles filogenéticos luego del análisis del RNAr 16S, en el que las muestras fueron distribuidas en dos grupos, semejante al encontrado en el análisis de *hsp65*. Sin embargo, los resultados del *rpoB* fueron discordantes de los otros árboles, debido a la modificación de la topología. **CONCLUSIÓN:** Los hallazgos de este estudio sugieren que distintas fuerzas evolutivas pueden estar actuando sobre el gen *rpoB*, y así, es necesario tener precaución al establecer esa meta para fines taxonómicos. Adicionalmente, se recomienda que más de un marcador, incluyendo el RNAr 16S, sea evaluado para la identificación micobacteriana.

Palabras clave: Complejo *Mycobacterium avium*; Polimorfismo de Longitud del Fragmento de Restricción; Análisis de Secuencia de ADN; Filogenia.



REFERÊNCIAS

- 1 Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Apr;16(2):319-54.
- 2 Smole SC, McAleese F, Ngampasutadol J, von Reyn CF, Arbeit RD. Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by restriction and sequence analysis of *hsp65*. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3374-80.
- 3 Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, et al. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54: 1277-85.
- 4 von Reyn CF, Arbeit RD, Horsburgh CR, Ristola MA, Waddell RD, Tvaroha SM, et al. Sources of disseminated *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *J Infect.* 2002 Apr;44(3):166-70.

- 5 Cappelluti E, Fraire AE, Schaefer OP. A case of 'hot tub lung' due to *Mycobacterium avium* complex in an immunocompetent host. *Arch Intern Med.* 2003 Apr;163(7):845-8.
- 6 Lumb R, Stapledon R, Scroop A, Bond P, Cunliffe D, Goodwin A, et al. Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompetent adults. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8):4906-10.
- 7 Myojo M, Fujiuchi S, Matsumoto H, Yamazaki Y, Takahashi M, Satoh K, et al. Disseminated *Mycobacterium avium* complex (DMAC) in an immunocompetent adult. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003 May;7(5):498-501.
- 8 Tsang AY, Denner JC, Brennan PJ, McClatchy JK. Clinical and epidemiological importance of typing of *Mycobacterium avium* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 1992 Feb;30(2):479-84.
- 9 Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction, restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993 Feb;31:175-8.
- 10 Frothingham R, Wilson KH. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J Bacteriol.* 1993 May;175(10):2818-25.
- 11 Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3637-48.
- 12 McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 2004 Jul;42(7):3000-11.
- 13 Adékambi T, Colson P, Drancourt M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5699-708.
- 14 Ben Salah I, Adékambi T, Raoult D, Drancourt M. *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology.* 2008 Dec;154(12):3715-23.
- 15 Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:367-416.
- 16 Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
- 17 Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, et al. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. *J Microbiol Methods.* 2005 Aug;62(2):199-209.
- 18 Shin S, Kim EC, Yoon JH. Identification of nontuberculous mycobacteria by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA, the heat-shock protein 65 and the RNA polymerase β -subunit genes. *Korean J Lab Med.* 2006 Jun;26(3):153-60.
- 19 Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol.* 2001 Aug;39(8):2799-806.
- 20 Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 1997 Nov;35(11):2969-73.
- 21 Leão SC, Bernadelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods.* 2005 May;61(2):193-9.
- 22 Ritacco V, Kremer K, Van der Laan T, Pijnenburg JE, Haas PE, van Soolingen D. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998 Mar;2(3):242-51.
- 23 Yakrus MA, Good RC. Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol.* 1990 May;28(5):926-9.
- 24 Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiology.* 2008; 8(48):1-12.
- 25 Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E, Garcia MJ. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(9):2049-54.
- 26 Turenne CY, Wallace R Jr, Behr MA. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Apr;20(2):205-29.

- 27 Frothingham R, Wilson KH. Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. *J Infect Dis.* 1994 Feb;169(2):305-12.
- 28 Maekura R, Okuda Y, Hirotani A, Kitada S, Hiraga T, Yoshimura K, et al. Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3150-8.

Recebido em / Received / Recibido en: 31/7/2010
Aceito em / Accepted / Aceito en: 24/8/2010

MULTIGENE PHYLOGENETIC ANALYSIS SUPPORTS *MYCOBACTERIUM PARAENSIS* SP. NOV. AND *MYCOBACTERIUM AMAZONIENSIS* SP. NOV. AS TWO NEW SPECIES OF SLOW-GROWING SCOTOCHROMOGENIC MYCOBACTERIA RELATED TO *MYCOBACTERIUM SIMIAE* COMPLEX

Ana Roberta Fusco da Costa¹, Maria Luiza Lopes¹, Enrico Tortoli², Jeann Ricardo da Costa Bahia¹, Karla Valéria Batista Lima¹

¹ Bacteriology and Mycology Section, Evandro Chagas Institute, Ananindeua, Para, Brazil; ² Regional Reference Center for Mycobacteria, Microbiology and Virology Laboratory, Careggi University Hospital, Florence, Italy; ³ Tropical Medicine Nucleus, Federal University of Para, Belem, Para, Brazil

Corresponding Author

Ana Roberta Fusco da Costa
Bacteriology and Mycology Section
Evandro Chagas Institute
Ananindeua, Para, Brazil
Phone: +55-91-3214-2124
FAX: +55-91-3214-2129
E-mail: anacosta@iec.pa.gov.br

Para: **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2013).**

Abstract

Two previously unknown, slow-growing scotochromogenic mycobacteria species were isolated from ten patients with pulmonary symptoms. The sequences of the 16S rRNA genes of these strains showed a high degree of similarity with species related to the *Mycobacterium simiae* complex. Phylogenetic analysis based on the concatenation of the 16S rRNA, ITS1, *hsp65* and *rpoB* sequences indicated that the strains were closely related to *M. interjectum* ATCC 25275T but represented two distinct phylogenetic entities. In addition, the 16S rRNA and *rpoB* nucleotide signatures can be effectively used to differentiate between these two closely related species. The genetic data obtained in this study support the conclusion that the strains represent two novel *Mycobacterium* species, for which the name *Mycobacterium paraensis* sp. nov. (type strain IEC24T) and *Mycobacterium amazoniensis* sp. nov. (GII - type strain IEC31T) are proposed.

1. Introduction

The application of modern genetic techniques to taxonomic studies has led to an increase in the number of descriptions of mycobacteria species that began in 1990 and has continued until the present. Currently, the genus *Mycobacterium* consists of 157 species, of which 64 were newly described between 2000 and 2010 (Tortoli et al., 2003; Tortoli, 2006; Euzéby, 2012). Recently, a group composed of the species with phenotypic and genotypic features related to *M. simiae* was denominated *M. simiae* complex (Tortoli et al., 2011). A total of 17 species, including *M. simiae*, *M. genavense*, *M. intermedium*, *M. interjectum*, *M. lentiflavum*, *M. triplex*, *M. heidelbergense*, *M. kubicae*, *M. palustre*, *M. montefiorensis*, *M. florentinum*, *M. sherrisii*, *M. parmense*, *M. parascrofulaceum*, *M. saskatchewanense*, *M. stomatepieae* and *M. europaeum*, comprises this taxonomic group (Tortoli, 2003, 2006; Tortoli et al., 2010). Among them, *M. simiae* is the most frequently reported as a cause of pulmonary infection (Griffith et al., 2007).

In this study, we describe two potentially novel scotochromogenic slow-growing mycobacteria (SGM) related to *M. simiae* complex, which have frequently been isolated from patients with pulmonary nontuberculous mycobacteria (NTM) infection in the State of Pará, Amazon Region, Brazil. These mycobacteria were discovered during the re-identification of 32 nontuberculous mycobacteria (NTM) clinical isolates that had previously been identified as *Mycobacterium asiaticum* I (29 strains) or with an unknown pattern (three strains; *BstEII* [441 pb], *HaeIII* [115 pb/105 pb]) by the PRA-*hsp65* method using the 16S rDNA and *hsp65* sequencing method (Lane, 1991; Kim et al., 2005).

2. Materials and methods

2.1. Patients and mycobacterial strains

The 32 strains were isolated from sputum samples from ten patients who were residents of the State of Pará, Brazil, at the Evandro Chagas Institute between 1999 and 2010. All the patients presented respiratory symptoms, such as chronic cough and chest pain. Bronchiectasis sequelae was occasionally associated with hemoptysis, and in all cases, the presence of symptoms had been reported for at least 24 months.

All clinical specimens were inoculated into Lowenstein-Jensen medium (Difco, France) after decontamination by the N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide procedure

(Webb, 1962) and incubated at 35 to 37 °C in the absence of light for at least six weeks or until colonies appeared. Conventional procedures were used to distinguish between organisms of the MTBC and NTM groups, including the macroscopic analysis of the colony characteristics, as MTBC exhibit a rough aspect and resemble breadcrumbs or cauliflower, the detection of cord factor from MTBC by Ziehl-Neelsen stain, and the growth inhibition test in medium containing 0.5 mg/mL para-nitrobenzoic acid, a specific inhibitor of MTBC, all according to Kubica (1973).

2.2. Molecular characterization

Genomic DNA was extracted using the phenol-chloroform method (Sambrook et al., 1989). The purified DNA was used as a template for the PCR amplification of four targets, including the 16S rRNA, heat-shock protein 65 KDa (*hsp65*) and β -subunit of RNA polymerase (*rpoB*) genes and the internal transcribed spacer 1 (ITS1).

The partial sequences of 16S rRNA (907 bp), ITS1 (372 bp), *hsp65* (644 bp) and *rpoB* (764 bp) were amplified as described previously (Lane et al., 1991; Kim et al., 2005; Adékambi et al., 2003). The amplicons were purified using the SNAPTM Gel Purification Kit (Invitrogen) and directly sequenced using both forward and reverse primers for each system and the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kits (Applied Biosystems, Foster City, CA) and were then analyzed with an ABI3130 sequencer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan).

Using the multiple-alignment algorithm of the BioEdit software (version 7.0.9; Tom Hall [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]), the sequences were aligned with the closest relatives retrieved from the GenBank database across the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms RIDOM database (RIDOM, URL: <http://rdna.ridom.de/>).

The phylogenetic analysis of single genes and the comparison to the concatenated analysis of the partial 16S rRNA gene (501 bp), *hsp65* (401 bp), *rpoB* (710 bp) and ITS1 (222 bp) sequences were also performed. The trees were inferred by the Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) and maximum-parsimony (Fitch, 1971) methods using the Kimura's 2-parameter distance correction model in MEGA software (Version 5.0; Tamura et al. [<http://www.megasoftware.net/>]). Bootstrap analysis (1,000 repeats) was applied using the *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977T sequences as an out-group. The GenBank accession numbers for the *Mycobacterium* sequences determined in this study are as follows:

HM056102- HM056111 for the *16S rDNA*, XXX for ITS1, HM056136- HM056145 for the *hsp65*, and XXX for *rpoB* sequences.

3. Results

The phylogenetic tree inferred from the 16S rRNA classified the strains in this study into two main groups that were clearly separated into clades, each with a single nucleotide signature, that were distinguished from one another by seven positions in the gene, yielding a divergence of 1.4%. The first group (GI) contained six strains (IEC24T-IEC29), and the second group (GII) was composed of 4 strains (IEC31T-IEC34). GI exhibited an identical sequence to the *Mycobacterium* IWGMT 90093 (GenBank accession no. X88910) and exhibited the closest similarity to *M. simiae* ATCC 25275T (99%) and *M. palustre* ATCC BAA-377 (99%), while the GII members exhibited similarity of 99.6% and 99.4% to *M. palustre* and *M. interjectum* ATCC 51457, respectively.

The ITS1 analysis did not allow the differentiation between the GI and GII strains, with both groups in the same cluster (Figure 2). Three sequevars were identified among the strains: one for IEC24T, one for IEC31T and another that was shared by the IEC25-29 and IEC32-34 strains. The sequevars found among the strains differed by only one mismatch in the nucleotide sequences. The ITS1 sequences in this study did not identify corresponding sequences or sequences with higher similarity using GenBank. Strains IEC24T and IEC31T exhibited 96.8% similarity to *Mycobacterium* sp. FI-0220 (GenBank accession no. DQ381727) and were marginally related to *M. heidelbergense* (92.8%) (GenBank accession no. HM022203).

By *hsp65* analysis, the strains from the two groups were grouped into only one cluster supported by a bootstrap value of 99% (Figure 3), with the strains exhibiting divergences of 0 to 0.5%. Three different sequevars, with one mismatch each, were identified: one for IEC24T, IEC25, IEC28 and IEC31, one for IEC26, IEC27, IEC29 and IEC32, and one for IEC33 and IEC34. The highest degrees of similarity (96.8-97%) were for *M. parmense* (GenBank accession no. AY943202), with 13 mismatches.

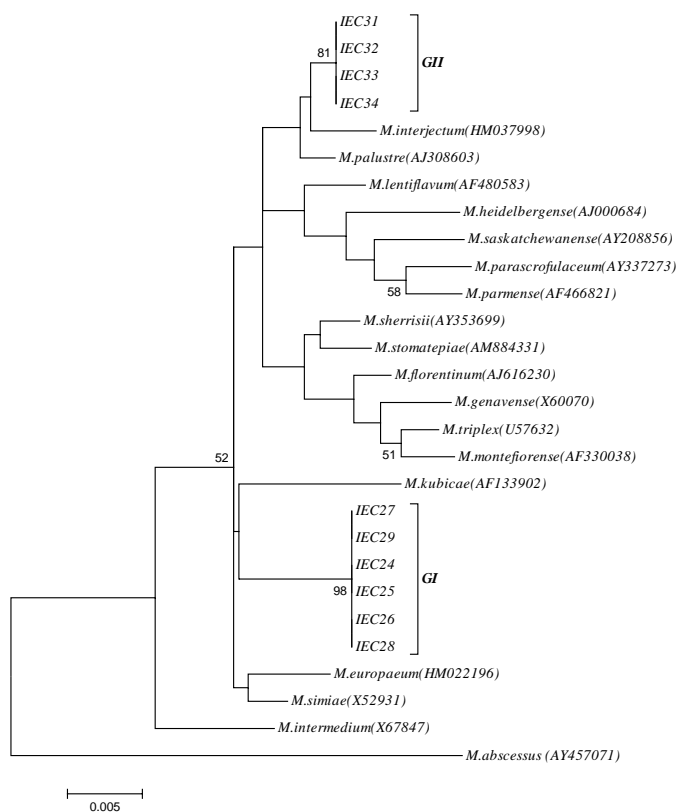


Figure 1. Relationships between the sequences from the type strains and the isolated NTM, as inferred from the partial 16S rRNA gene. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method and Kimura's 2-parameter distance correction model. The support for each branch, as determined from 1000 bootstrap samples, is indicated by the value at each node (as a percentage). Percentage bootstrap values > 50 are given at nodes. *M. abscessus* ATCC 19977T was used as outgroup.

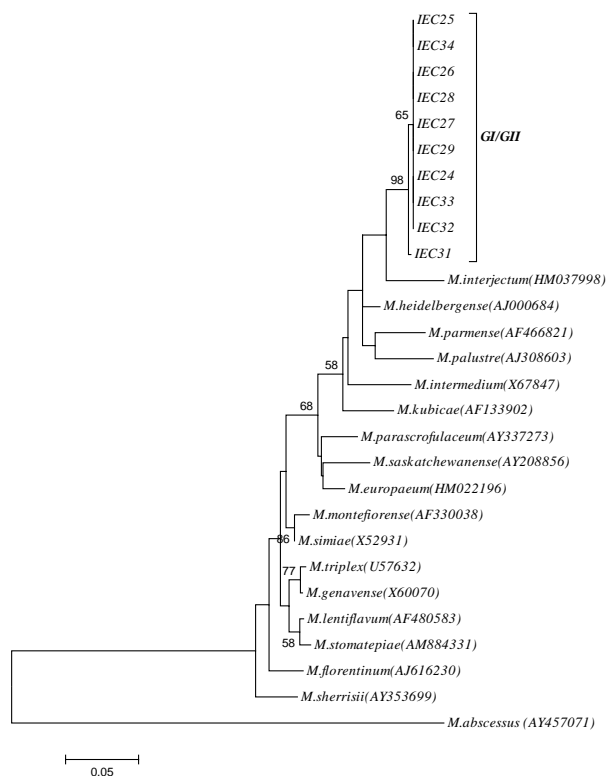


Figure 2. Relationships between the sequences from the type strains and the NMT isolated presently as inferred from the partial ITS1 sequences. The phylogenetic tree was constructed as described above.

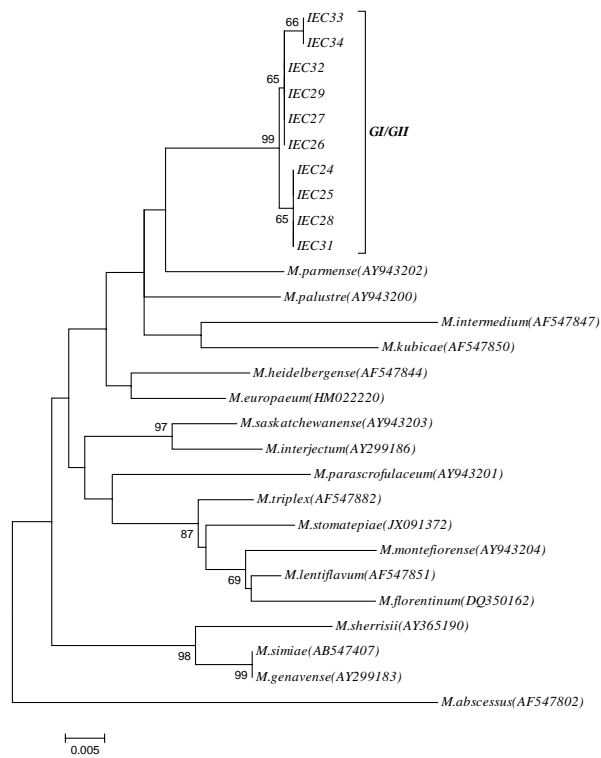


Figure 3. Relationships between the sequences from the type strains and the NMT isolated presently as inferred from the partial *hsp65* sequences. The phylogenetic tree was constructed as described above.

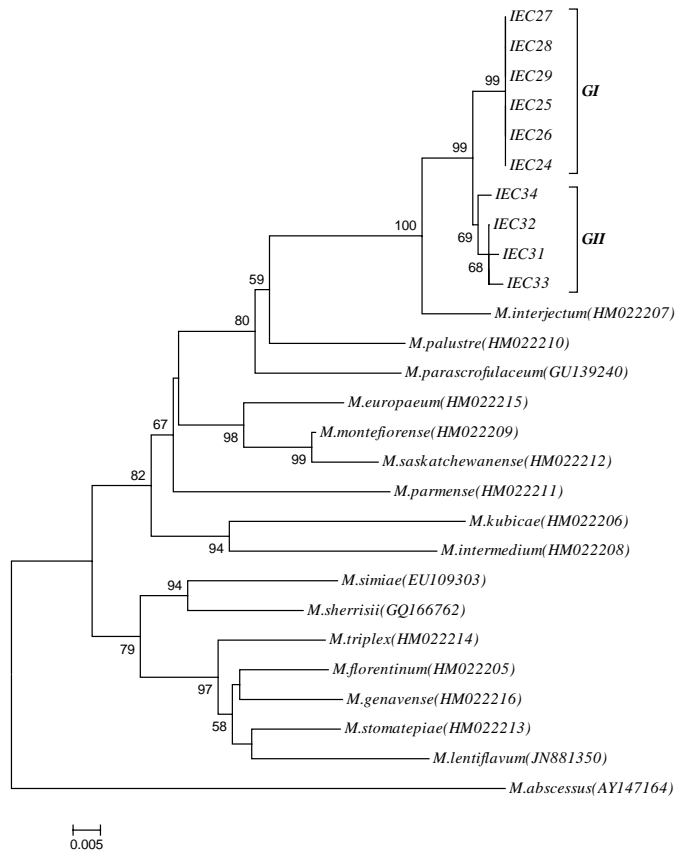


Figure 4. Relationships between the sequences from the type strains and the NMT isolated presently as inferred from the partial *rpoB* sequences. The phylogenetic tree was constructed as described above.

The *rpoB* gene sequencing analysis provided a clear distinction between the GI and GII strains, as well as from other members of *M. simiae* complex (Figure 4). The strains from GI and GII were separated by divergences of 0.9 to 1.2%. The GI strains showed one sequevar, while GII was composed of four different genotypes with intra-specific divergence $\leq 0.8\%$. The highest sequence similarity was found for *M. interjectum* ATCC 51457T. When these sequences were compared to *M. interjectum* ATCC 51457T (GenBank accession no. HM022207), both the GI and GII strains exhibited sequence similarities of 97.3% (19 nucleotide substitutions) and 97.3-97.6% (17 – 19 nucleotide substitutions), respectively.

The concatenation of the *16S rRNA*, ITS-1, *hsp65* and *rpoB* sequences increased the cluster resolution; the derived tree showed nodes supported with bootstrap values $> 90\%$, indicating a higher confidence (Figure 5 and 6). The tree showed that the GI and GII strains were distinct from each other but closely related to *M. interjectum* ATCC 51457T.

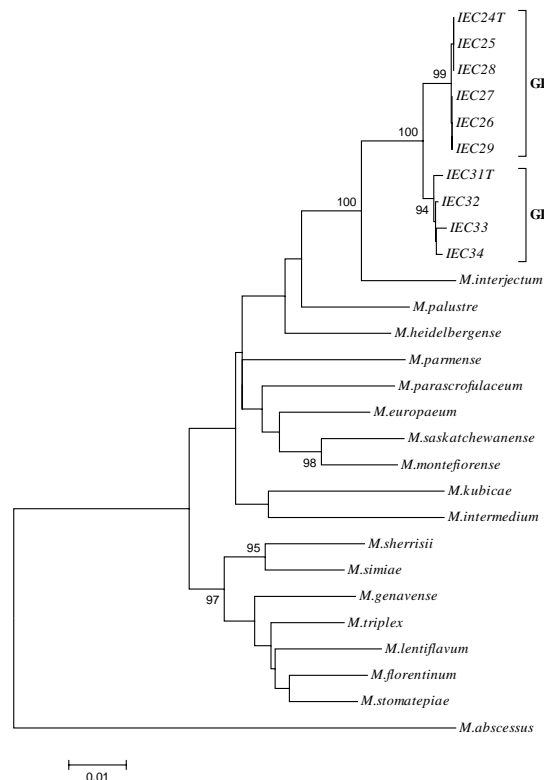


Figure 5. Phylogenetic tree based on the concatenated 16S rRNA, ITS1, *hsp65* and *rpoB* sequences. The phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method and Kimura's 2-parameter distance correction model. The support of each branch, as determined from 1000 bootstrap samples, is indicated by the value at each node (as a percentage). Percentage bootstrap values > 90 are given at nodes. *M. abscessus* ATCC 19977T was used as outgroup.

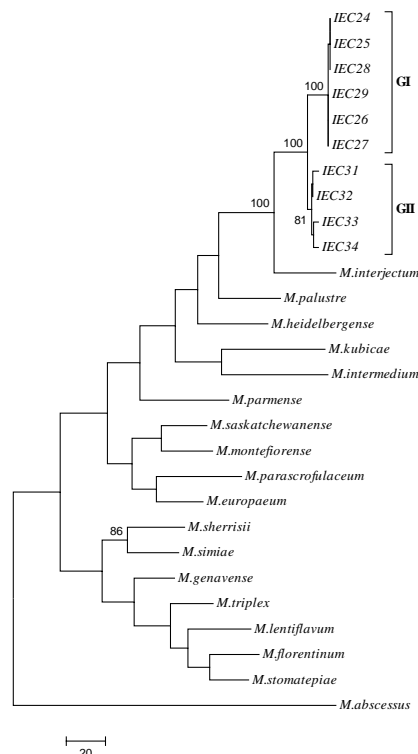


Figure 6. Phylogenetic tree based on the concatenated 16S rRNA, ITS1, *hsp65* and *rpoB* sequences. The phylogenetic tree was constructed by the Maximum Parsimony. The support of each branch, as determined from 1000 bootstrap samples, is indicated by the value at each node (as a percentage). Percentage bootstrap values > 80 are given at nodes. *M. abscessus* ATCC 19977T was used as outgroup.

4. Discussion

Recently, the application of molecular techniques for taxonomic or identification goals has allowed access to an increased diversity of isolates and the description of new species within the genus *Mycobacterium* (Tortoli, 2003). Most clinical laboratories still use biochemical assays to identify mycobacteria; however, with the increasing number of newly defined taxa and the recognition of known species variants, these assays sometimes fail to provide precise identification because of the lack of discriminatory power. To overcome the limitations of conventional methods, several molecular analyses based on housekeeping genes, such as the 16S rRNA gene (Turenne et al., 2001), *rpoB* (Kim et al., 1999; Adékambi et al., 2003) and *hsp65* (Ringuet et al., 1999; McNabb et al., 2004; Kim et al., 2005) and the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer 1 (ITS1) (Roth et al., 1998), have been used for species identification. The combined analysis of these targets has proven to be a valuable tool to provide the conclusive identification and differentiation of infrequently encountered species in addition to the delimitation of novel taxa.

In this study, we identified two groups of the strains (GI and GII) representing possible novel taxa. The NTM were isolated from ten patients who suffered pulmonary

complaints, residents from State of Para, in Brazilian Amazon. Each group was characterized by well-defined 16S rRNA and *rpoB* nucleotide signatures, which might be used to effectively differentiate between these two closely related species.

Although phenotypic assays are also used as parameters to distinguish *Mycobacterium* species, most novel species are generally determined by DNA sequence polymorphisms, especially by signature regions of 16S rRNA. In this study, substantial divergences from other known mycobacteria were found among the sequences of the 16S rRNA, ITS1, *hsp65* and *rpoB* genes. The divergences observed in these sequences generally exceeded the limits considered acceptable for the differentiation of mycobacterial species (Turenne et al., 2001; Adékambi et al., 2003; Tortoli, 2003).

The phylogeny based on multilocus sequence analysis indicated two distinct phylogenetic entities closely related to *M. interjectum*. The genetic data obtained in this study support the conclusion that the strains represent two novel *Mycobacterium* species, for which the name *Mycobacterium paraensis* sp. nov. (GI - type strain IEC24T) and *Mycobacterium amazoniensis* sp. nov. (GII - type strain IEC31T) are proposed.

5. References

Adékambi T, Colson P, Drancourt M (2003) *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 41(12):5699-708.

Euzéby JP (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47:590–592 List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update: July 09, 2011. URL: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>.

Fitch, W.M. (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20, 406–416.

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, Fordham von Reyn C, Wallace Jr RJ, Winthrop K. American Thoracic Society (2007) An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 175:367-416.

Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH (1999) Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol.* 37(6):1714-20.

Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, Lee SH, Chae GT, Cha CY, Kook YH, Kim BJ (2005) Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1649–1656.

Kubica GP (1973) Differential identification of mycobacteria. *Am Rev Resp Dis* 107: 9-12.

Lane DJ (1991) **16S/23S rRNA sequences**. In:___ Stackebrandt and Goodfellow Ed. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley, Chichester, p. 115-176.

McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, Black WA, Isaac-Renton J (2004) Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 42(7):3000-11.

Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, Gaillard JL, Pierre-Audigier C (1999) *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 37, 852–857.

Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, Fischer M, Mauch H (2000) Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol.* 38(3):1094-104.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory Manual, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Tortoli E (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new

mycobacteria of the 1990. *Clin Microbiol Rev.* 16(2):319-54.

Tortoli E (2006) The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 48(2):159-78.

Tortoli E, Böttger EC, Fabio A, Falsen E, Gitti Z, Grottola A, Klenk HP, Mannino R, Mariottini A, Messinò M, Pecorari M, Rumpianesi F (2011) *Mycobacterium europaeum* sp. nov., a scotochromogenic species related to the *Mycobacterium simiae* complex. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61(Pt 7):1606-11.

Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A (2001) Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 39(10):3637-48.

Webb, WR (1962) Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetylcysteine. *J. Thoracic Cardiovascular Surg.* 44:330-343.

Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infections in the State of Para, an Endemic Region for Tuberculosis in North of Brazil

Ana Roberta Fusco da Costa^{1,2}, Maria Luiza Lopes¹,
Maísa Silva de Sousa², Philip Noel Suffys³,
Lucia Helena Messias Sales⁴ and Karla Valéria Batista Lima¹
¹Evandro Chagas Institute, Bacteriology Section
²Federal University of Para, Tropical Medicine Nucleus
³Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation
⁴Federal University of Para, Department of Integrative Medicine
Brazil

1. Introduction

Traditionally, *Mycobacterium* species are divided in those belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), *M. leprae* and the nontuberculous or atypical mycobacteria (NTM), the latter consisting of either rapid (RGM) or slow growing (SGM) species, forming colonies, respectively, within seven days of culture or requiring longer incubation time (Runyon, 1959). Among the RGM are the *M. chelonae* complex, including *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. mucogenicum*, *M. salmoniphilum*, *M. bolletii* and *M. massiliense* (Brown-Elliot & Wallace, 2002; Whipps et al., 2007) and the *M. fortuitum* complex, including *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. mageritense*, *M. houstonense* and *M. boenikei* (Adékambi & Drancourt, 2004), containing the NTM commonly encountered in human specimens. Clinically important SGM are the *M. avium* complex (MAC), which include *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. colombiense* and *M. chimaera* (Tortoli, 2003; Tortoli et al., 2004).

Until now, 130 *Mycobacterium* species, with a considerable variability in pathogenicity have been described, being isolated from natural water reservoirs and drinking water distribution systems in buildings, hospitals, household plumbing, hot tubs, spas, building aerosols, boreal forest soils and peats, acidic, brown-waters swamps, potting soils and metal removal fluid systems (Tortoli, 2009; Euzéby, 2011, Falkinham, 2009). The lack of evidence for person-to-person transmission suggests that the environment is the most likely source of NTM infection (Marra & Daley, 2002).

Unlike the bacterial species that belong to the MTBC, NTM are commonly present in the environment and when isolated from human specimens, may either be (i) contaminants during preparation of sputum cultures in the laboratory, (ii) colonizing organisms of the airways without causing disease or (iii) infectious organisms and causing disease and it is

not always easy to distinguish between these situations (Griffith et al., 2007). In the case of real infection with NTM, clinical syndromes are either lymphadenitis, pulmonary or cutaneous infection or disseminated disease, chronic pulmonary infection being the most common (Katoch, 2004; Piersimoni & Scarparo, 2009; Tortoli, 2009). Such NMT infections are frequently observed in immune-compromised patients in developed nations but also in immune-competent individuals with pre-existing structural pulmonary diseases (Griffith et al., 2007; Jeong et al., 2004; Jarzembowski & Young, 2008; Bodle et al., 2008; Glassroth, 2008; Sexton & Harrison, 2008; Griffith, 2010).

The diagnosis of NTM pulmonary disease is often difficult due to the overwhelming presence of environmental organisms, to the indolent nature of disease and the diversity of, mostly, nonspecific clinical symptoms. Therefore, guidelines and criteria for diagnosis of NTM pulmonary disease have been published (American Thoracic Society, 1997; British Thoracic Society, 2000) followed by the publication of a recent update of more lenient criteria (Griffith et al., 2007). Even so, these recommendations do not seem to be satisfactory as most patients with pulmonary disease due to NTM do not match these criteria (Marras et al., 2007; van Ingen et al., 2009). Also, in endemic countries for tuberculosis (TB), the pulmonary disease form is caused also by infection with organisms of the MTBC, presenting similar clinical symptoms. In addition, diagnostic procedures for pulmonary TB are sputum smear microscopy for acid-fast bacilli (AFB) and X-ray, not differentiating between *Mycobacterium* to the species level. Nonetheless, several case reports and studies on the prevalence of pulmonary disease caused by NTM in North America, Europe and Japan have been published during the last years (Good, 1980; Tsukamura et al., 1988; von Reyn et al., 1993; Falkinham, 2002; Kobashi & Matsushima, 2007; Iseman & Marras, 2008; Billinger et al., 2009; Thomson, 2010; Kendall et al., 2011).

The impact, magnitude and regional dimension of NTM infections in countries where TB is endemic is hardly known (Gopinath & Singh, 2010), such as the case in Brazil, where most cases of infectious NTM have been reported in the southeastern region and, more specifically, in São Paulo (Barreto & Campos, 2000; Ueki et al., 2005; Zamarioli et al., 2008; Pedro et al., 2008). In the Amazon region, North of Brazil, little epidemiological information on this matter is available (da Costa et al., 2009).

We therefore studied the frequency and diversity of NTM isolates, obtained from pulmonary specimens from residents of the Pará State, during a twelve year period.

2. Material and methods

2.1 Study setting and patients

All *Mycobacterium* isolates evaluated were obtained from sputum samples ($n = 119$) and bronchial washings ($n = 9$) from individuals with clinical symptoms of pulmonary TB and residents of the State of Pará, North Brazil (Fig. 1). The study included samples of patients from whom NTM was isolated from at least once, and this between January 1999 and December 2010, at the Evandro Chagas Institute, a reference center for the diagnosis of infections with *Mycobacterium*. Patient records were reviewed to assess the frequency of isolation and clinical relevance of the presence of NTM and the diagnosis for NTM lung infection was based on the diagnostic criteria published by the American Thoracic Society (Griffith et al., 2007) (Table 1).



Fig. 1. Geographic localization of the Pará State, Amazon Region of Brazil.

Clinical and radiographic analysis

- Pulmonary symptoms that include nodular or cavitary opacities on chest radiograph; multifocal bronchiectasis with multiple small nodules on a high resolution computed tomography (HRCT) scan; lack of abnormalities suggestive for other disease.

Microbiologic analysis

- Positive culture from at least two separate expectorated sputum samples, when initial sputum samples are AFB negative, consider repeated sputum AFB smears and cultures or positive culture results from at least one bronchial wash or lavage

Histopathologic analysis

- Transbronchial or other lung biopsy with mycobacterial histopathologic features (granulomatous inflammation or AFB) and positive culture for NTM.

Table 1. American Thoracic Society diagnostic criteria on NTM pulmonary disease (Griffith et al., 2007).

2.2 Mycobacterium cultures and isolates

Pulmonary specimens were decontaminated using the N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide procedure (Webb, 1962; Brasil, 2008), inoculated into Lowenstein-Jensen (LJ) medium (Difco, France) and incubated at 35 to 37°C in the absence of light for at least six weeks or until colonies appeared. Conventional procedures for distinguishing between organisms of the MTBC and of the NTM group included macroscopic analysis of aspect of colonies, which MTBC have a rough aspect resemble breadcrumbs or cauliflowers, detection of cord factor from MTBC by Ziehl-Neelsen stain, and the growth inhibition test in medium containing 0.5 mg/mL para-nitrobenzoic acid, a specific inhibitor of MTBC, all according to Kubica (1973).

2.3 Sequence analysis and phylogenetic analysis

Sequencing of part of the 16S ribosomal RNA (16S rRNA) and 65-kilodalton heat shock protein (*hsp65*) genes was performed as described by previous publications (Kim et al., 2005; Shin et al., 2006). After verification of PCR products on agarose gel Seakem LE 1% (Cambrex, United Kingdom), these were purified using the SNAP™ gel purification kit (Invitrogen). The amplified products were direct sequenced by using both forward and reverse primers of each system and the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kits (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed on an ABI3130 sequencer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan).

The 16S rRNA and *hsp65* sequences were aligned using the multiple-alignment algorithm of the Bioedit software (version 7.0.9; Tom Hall [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]) with the closest relatives retrieved from the GenBank database across of the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and the Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms RIDOM database (RIDOM, URL: <http://rdna.ridom.de/>). Phylogenetic trees were constructed from the presently-defined 16S rRNA or *hsp65* sequences separately using the neighbor-joining algorithm, including sequences of a selection of NTM-type strains, retrieved from GenBank (accession numbers in parenthesis next to the species names in Figs.3 and 4). For this, we used the Kimura's 2-parameter distance correction model and MEGA software (Version 4.0; Tamura et al. [<http://www.megasoftware.net/>]). Bootstrap analysis (1,000 repeats) was applied using the *Tsukamurela paurometabola* (KCTC 9821) sequences as an out-group. The GenBank accession numbers for the *Mycobacterium* sequences determined in this study included the following: FJ590454-FJ590472, HM056080- HM056113 for the 16S rRNA, and FJ536235- FJ536253, HM056114- HM056147 for the *hsp65* gene.

2.4 Statistical analysis

Statistical data were derived by using the nonparametric chi-square test and the Fisher exact test, where appropriate. P values less than 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed with the BioEstat software (version 5.0; Ayres et al. [<http://www.mamiraua.org.br/>]).

3. Results

3.1 Patients and NTM isolates

Between 1999 and 2010, *Mycobacterium* isolates were recovered from respiratory specimens of 1,580 patients, that were suspected of having pulmonary TB. Among these, 92% (1,453 cases) were infected with MTBC; from the rest (8%, 128 patients) we obtained 249 NTM isolates. Among the NTM-positive patients studied, 57.5% (n=73) presented at least two positive sputum cultures for the same species, or presented at least one bronchial wash positive culture and suffered therefore from infections as defined by the criteria of ATS (Griffith et al., 2007). The clinical significance of NTM pulmonary isolation among 1999-2010 is shown in Fig.2.

The remaining 55 patients could not be confirmed to suffer from NMT infection because (i) only a single sputum sample was collected and delivered to the laboratory (47 patients); (ii)

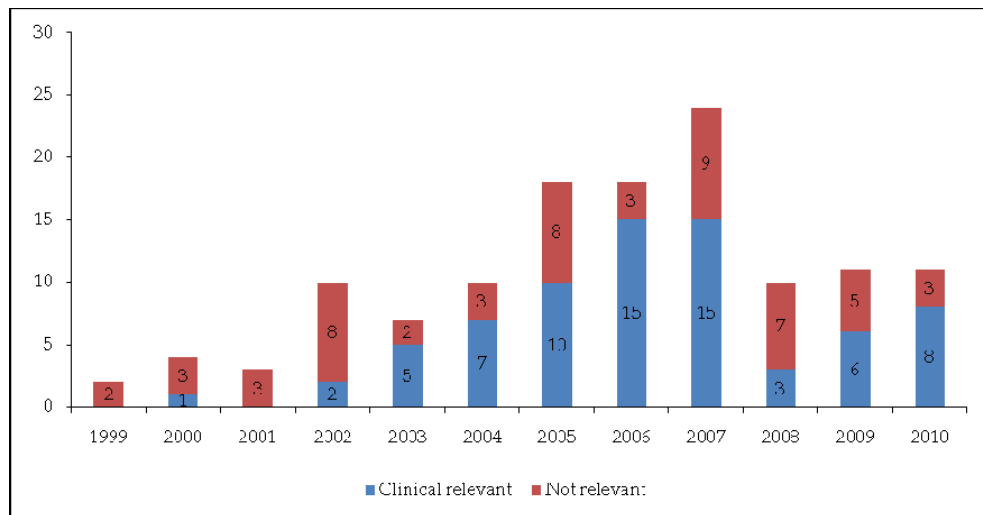


Fig. 2. Frequency of NTM isolation from clinical pulmonary specimens of patients from Pará State, Brazil, 1999-2010.

one sample was culture-positive and the others were culture-negative (five cases) or (iii) NTM were found in some patients who were also TB-positive (three patients). Distribution of species according clinical relevance and years of isolation is show in Tab.2 and Fig.3.

Species	Clinical relevant		Not relevant		Total	
	Patients	Isolates	Patients	Isolates	Patients	Isolates
<i>M. massiliense</i>	20	39	8	8	28	47
<i>M. simiae complex</i>	14	44	5	5	19	49
<i>M. intracellulare</i>	11	32	6	6	17	38
<i>M. avium</i>	10	28	12	12	22	40
<i>M. bolletii</i>	4	14	0	0	4	14
<i>M. abscessus</i>	3	8	1	1	4	9
<i>M. colombiense</i>	3	9	2	2	5	11
<i>M. kansasii</i>	2	3	0	0	2	3
<i>M. simiae</i>	2	4	1	1	3	5
<i>M. fortuitum</i>	1	6	18	18	19	24
<i>M. scrofulaceum</i>	1	3	0	0	1	3
<i>M. szulgai</i>	1	2	0	0	1	2
<i>M. terrae</i>	1	2	0	0	1	2
<i>M. parascrofulaceum</i>	0	0	1	1	1	1
<i>M. smegmatis</i>	0	0	1	1	1	1
Total	73	194	55	55	128	249

Table 2. Clinical significance of NTM isolated in Pará State, Brazil, 1999-2010.

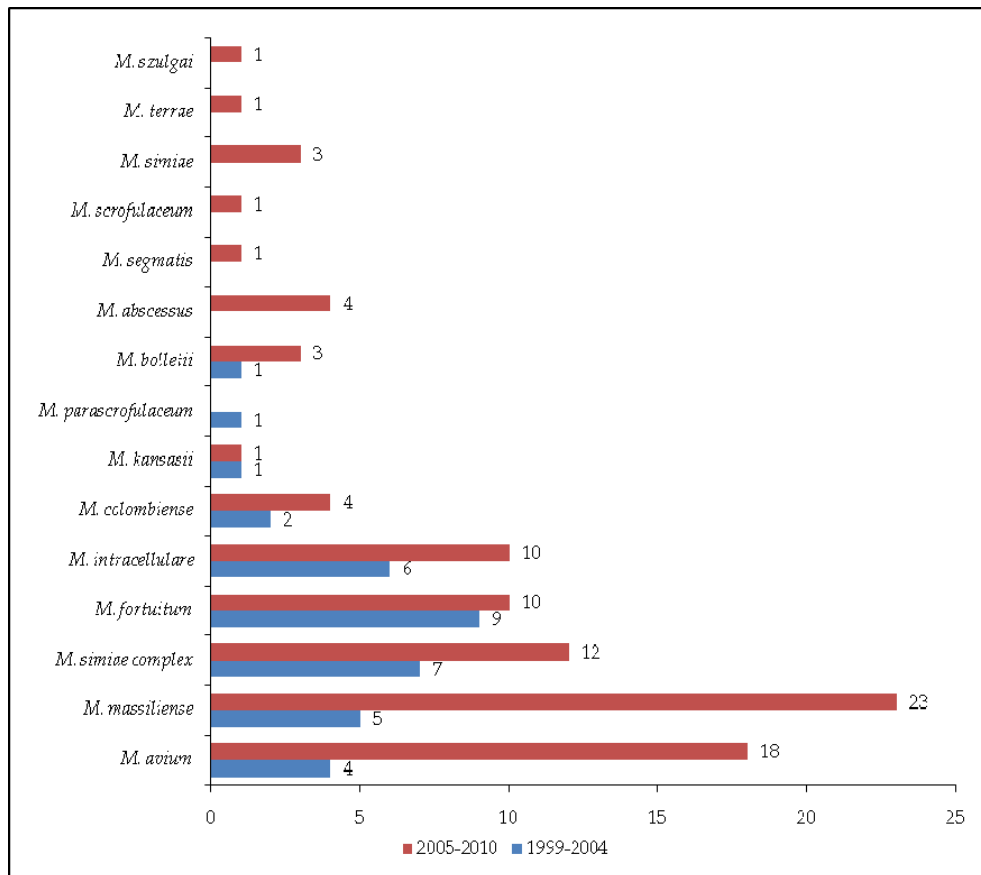


Fig. 3. Frequency of isolation of nontuberculous *Mycobacterium* species between the 1999-2003 and 2004-2010 periods in Pará State, Brazil.

Among the 73 patients with bacteriological ATS criteria for NMT infection, 64.4% (n=47; $p = 0,03$) were females and more detailed analysis of their treatment history revealed that 72 had previously been unsuccessfully treated for TB, using the first-line multidrug therapy scheme; one patient had been diagnosed as suffering from allergic bronchitis and therefore submitted to corticosteroid therapy. After confirmation of NTM infection, 70 patients were submitted to a daily regimen of clarithromycin (500-1,000 mg) and ethambutol (25 mg/kg) for 12 months. No therapy information was available for the patient infected with *M. fortuitum* and for the two cases with *M. kansasii*. Treatment outcome was not available for all cases but patients infected with members of the *M. simiae* complex did not present clinical improvement and at the end of our study period, one had died due to progression of disease.

All of the patients described above presented respiratory complaints consistent with TB while additional symptoms were observed (Table 3). Bronchiectasis sequelae occasionally associated with hemoptysis in patients infected with *M. abscessus* (n=1), *M. bolletii* (n=2), *M.*

Species	Gender		Clinical characteristics	Total
	Male	Female		
<i>M. massiliense</i>	6	14	chronic cough (20); sputum (20); chest pain (20); hemoptysis (5); dyspnea; loss weight (3)	20
<i>M. simiae</i> complex	4	10	chronic cough (14); sputum (14); chest pain (14) weight loss (14); fever (3); hemoptysis (10); malaise (14); dyspnea (3); down syndrome (1); fatigue (2)	14
<i>M. intracellulare</i>	5	6	chronic cough (11); sputum (11); chest pain (3)	11
<i>M. avium</i>	2	8	chronic cough (10); sputum (10); chest pain (10); HIV (1); gastroesophageal reflux disease (1)	10
<i>M. bolletii</i>	3	1	chronic cough (4); hemoptysis (2); decreased lung volume (1); fever (1); loss weight (1)	4
<i>M. abscessus</i>	1	2	chronic cough (3); sputum (3); hemoptysis (1); dyspnea (1); corticosteroid-immunosuppressed (1)	3
<i>M. colombiense</i>	2	1	chronic cough (3); chest pain (3)	3
<i>M. kansasii</i>	1	1	chronic cough (2); chest pain (2)	2
<i>M. simiae</i>	0	2	chronic cough (2); chest pain (2)	2
<i>M. fortuitum</i>	1	0	chronic cough (1); chest pain (1)	1
<i>M. scrofulaceum</i>	0	1	chronic cough (1); chest pain (1)	1
<i>M. szulgai</i>	0	1	chronic cough (1); chest pain (1)	1
<i>M. terrae</i>	1	0	chronic cough (1); chest pain (1)	1

Table 3. Clinical characteristics of patients with NTM pulmonary infection from Pará State, Brazil, 1999-2010.

massiliense ($n=5$) and *M. simiae* complex ($n=10$) while chronic cough was observed among patients, independent of the infecting *Mycobacterium* species. The interval between the onset of signs and symptoms and a definitive diagnosis of NTM infection was greater than 12 months, being more pronounced in cases with *M. simiae* complex isolates, reporting the presence of symptoms for at least 24 months.

3.2 NTM Identification on the genetic level

Based on 16S rRNA gene analysis, the majority of the NTM species isolated from patients could be grouped into three clades, containing sequences from either *M. avium*, *M. chelonae* or *M. simiae* complexes (Fig. 4).

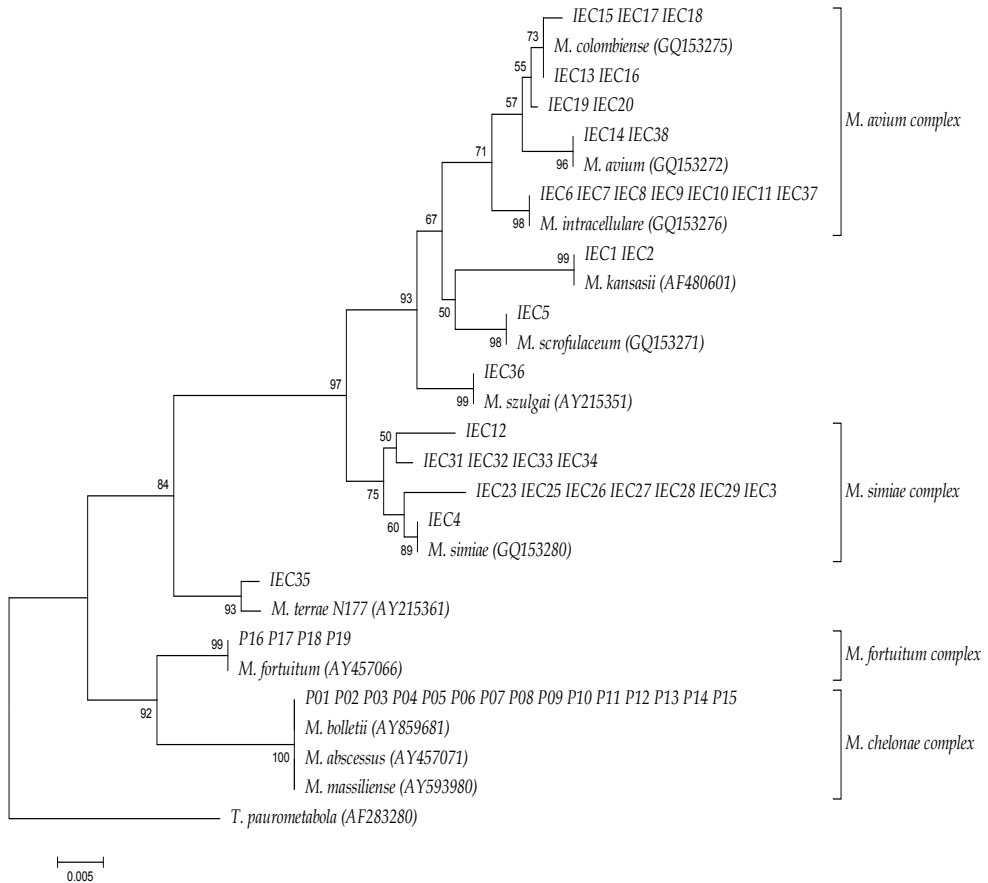


Fig. 4. Relationships between sequences from the type strains and the NTM isolated presently, inferred from partial 16S rRNA gene. Phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method and Kimura's 2-parameter distance correction model. The support of each branch, as determined from 1000 bootstrap samples, is indicated by the value at each node (as a percentage). *T. paurometabola* KCTC 9821 was used as outgroup.

Upon sequence analysis of part of the *hsp65* gene, we observed a higher genetic diversity than that of the 16S rRNA gene; nonetheless, the phylogenetic tree based on *hsp65* gene sequence analysis had the same global topology as that based on 16S rRNA gene (Fig. 5).

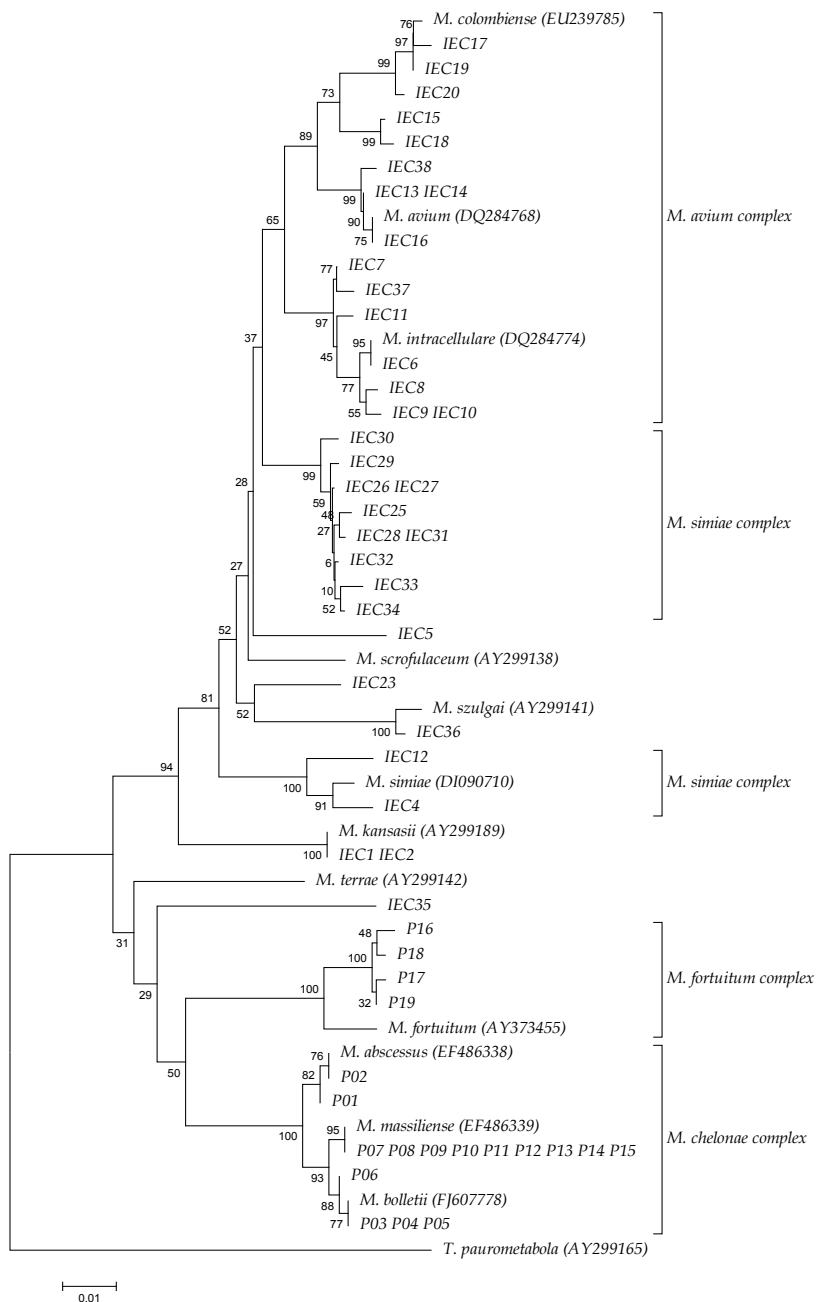


Fig. 5. Relationships between sequences from the type strains and the NMT isolated presently, as inferred from partial *hsp65* sequences. Phylogenetic tree was constructed as described above.

Among the 249 infectious isolates, 200 NMT sequences, derived from 108 patients, had already been described elsewhere and characteristic for 14 NMT species, the other 49 sequences derived from 19 cases were unpublished in public databases and all phylogenetically classified into the *M. simiae* complex.

4. Discussion

This study demonstrates that among 1,453 cases that were diagnosed between 1999 and 2010 as suffering from pulmonary TB, presence of NTM was observed in 128 (8%) of these and infection with such species proven to cause disease in 73 cases (5%). It was observed a steady increase in the number of NTM isolates during the study period, which was more pronounced from 2004 on, when an increase in the demand of culture for AFB at the Evandro Chagas Institute was the case. This latter could be due either to the increase of the physicians' sensitivity to occurrence of NTM infections in this region and/or to an increase of infection with NMT of the population.

In this study, significantly more females were infected with NTM, and this is contrary to most published data, presenting males as the major risk group for pulmonary NMT disease (Marras & Daley, 2002). However, some recent reports also demonstrated a female predominance (Freeman et al., 2007; Cassid et al., 2009; Prevot et al., 2010; Wintrop et al., 2010), in concordance with the recent data of Chan & Iseman (2010), describe a higher immune susceptibility of women to NTM pulmonary disease. In addition, when stratifying to the NMT species level, it was observed that gender associated infection was even more pronounced in the case of *M. massiliense* (70% females), *M. simiae* complex (71%) and *M. avium* (66%). Griffith et al. (2003) found a predominance of females (65%) among 154 cases of pulmonary disease by RGM, while descriptions of particular forms of pulmonary disease caused by MAC in women have been reported (Wallace, 1994; Reich & Johnson, 1995). Further studies are needed to elucidate the reasons for female susceptibility. Roughly 40% ($n=55$) of the patients with NTM-positive cultures did not meet the diagnostic criteria for NTM pulmonary infection but this does not necessarily mean that the presence of NMT is not the cause of disease. Unfortunately, due to lack of follow-up of patients, it cannot confirm this presently. There is little known about the pathophysiology of NTM-related lung disease what makes it difficult to be certain that colonization is not an indolent or even a slowly-progressive infection. Therefore, such cases need to remain under observation and seek expert consultation (Griffith et al., 2007).

Among the cases with confirmation of NMT infection as a cause of disease, mostly, previous diagnosis and treatment of TB was observed, none demonstrating improvement following treatment. Misdiagnosis of NTM infections as caused by members of the MTBC leads to unsuccessful treatment with anti-TB drugs and because clinicians experiment with various TB therapies without considering a culture-based test, there is a considerable delay in detection of NTM. This is even more a matter of concern in high prevalence countries of TB such as Brazil, where mostly, symptomatic patients with sputum smear positive for acid-fast bacilli are treated with anti-TB drugs without being testing for NTM-related disease, except when co-infected with HIV (Brasil, 2005).

In Brazil, it was common until 2009, to start second line treatment without performing culture test for NTM, when no improvement during the first round of TB treatment was

observed. The high level of pulmonary NTM that was misdiagnosed as TB strongly suggests the need for a different strategy of TB control in the state of Para.

In most countries, NTM-related disease, unlike TB, do not need to be reported unless they are healthcare-associated infections. Therefore, information on the frequency and diversity of NTM infections are usually obtained from laboratory records and surveillance studies (Marras et al., 2007; Parrish et al., 2008). To determine the true epidemiological status of NTM pulmonary disease, well designed population-based studies are needed. However, the financial burden on public health care system in developing countries makes it difficult to perform such surveillance studies. Therefore, laboratory procedures such as the introduction of both liquid and solid culture systems and use of molecular methods such as PCR restriction analysis (PRA) in reference laboratories could be an alternative for more knowledge and improvement of diagnose accuracy in those regions.

Sequence analysis has contributed to the recent description of several new *Mycobacterium* species and more precise identification and taxonomy of members of this genus. Genotypic taxonomy is typically based on the detection of highly conserved regions within the genome that harbor hypervariable sequences in which species-specific deletions, insertions, or replacements of single nucleotides are present in 16S rRNA, *hsp65* gene and more recently on a fragment of the gene coding for the beta sub-unit of RNA polymerase (*rpoB*) are also contributing to this field, mostly for RGM (da Costa et al., 2009; da Costa et al, 2010). Several amplification molecular methods, have been proposed to correct NTM identification, including specific DNA probes (AccuProbe: GenProbe, Inc., San Diego, CA, U.S.A) and PRA method based on 16S rRNA (Domenech et al., 1994), 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) (Roth et al., 1998), *hsp65* (Telenti et al., 1993), *rpoB* (Lee et al., 2000), cold-shock protein gene (*dnaJ*) (Takewaki et al., 1994), DNA repair protein gene (*recA*) (Blackwood et al., 2000) and elongation factor Tu gene (*tuf*) (Shin et al., 2009), but all have limitations as the variety of mycobacteria to be identified (da Costa et al., 2010a, b).

Based on the 16S rRNA and *hsp65* nucleotide sequences, we observed that the most frequent NTM isolates from our pulmonary samples were those of the *M. avium*, *M. chelonae* and *M. simiae* complexes. The most common NTM were *M. massiliense*, *M. intracellulare*, followed by *Mycobacterium* sp. from *M. simiae* complex. When compared with reports on NMT infections observed in other studies reported on Brazilian NTM cases, the species diversity and frequency is quite particular to the Para State, suggesting that environmental characteristics as temperature, pH and substrate composition may influence the geographical distribution of species. Our findings are in concordance with the fact that isolates of the *M. simiae* complex are rarely observed in other regions of Brazil.

There are few publications describing NTM in the Amazon region or Brazil. Barreto and Campos (2000) found 35 patients with NTM and showed that isolates of the *M. avium* complex, *M. terrae* and *M. fortuitum* were most common in samples collected between 1994 and 1999 in North of Brazil. A study that evaluated respiratory samples of non-indigenous and indigenous patients from Amazonas State with suspected pulmonary TB identified 19 patients with NTM infection, but the study did not report the identity of the isolates at the species level (Santos et al., 2006). A recent study by da Costa et al. (2009), showed that the *M. chelonae* complex, which includes the *M. massiliense* species, is the most frequent cause of pulmonary infections by RGM in Pará State, Amazon region of Brazil, similar to our

observations. Unlikely, in Brazilian southeast, *M. kansasii* and *M. avium* represented the most frequent type of NTM associated with pulmonary infections between 1991 and 1997 in the state of São Paulo (Ueki et al., 2005; Zamarioli et al. 2008; Pedro et al., 2008).

In contrast to other parts of the world, the species variability found in the present study is different. In countries from Latin America like Colombia, MAC, *M. chelonae* and *M. fortuitum* were the NTM isolated with more frequency (León, 1998), while MAC was most frequently isolated from argentinian HIV patients (Di Lonardo, 1995). MAC and *M. kansasii* were predominant in North America, some countries of Europe and South Africa (Griffith et al., 2007). In Asia, MAC, *M. abscessus* and *M. chelonae* were frequently isolated from pulmonary samples (Simons et al., 2011). The knowledge on diversity and epidemiology of species NTM associated to pulmonary in specific region is important because either: (i) it allows the adequate choice of laboratory methods for diagnosis (ii) it allows to recognize the species associated to disease; and (iii) it supplies information that will serve to improve the organization of health service net to attend these patients.

Perhaps the most important finding of this study was the identification of *M. simiae* complex members as the predominant cause of pulmonary infections. In fact, roughly 20% ($n=16$) of the pulmonary infections were caused by members of the *M. simiae* complex and among these, 14 belonged to an unidentified taxon ($n=14$). Currently, this taxonomic group is made up of 17 species including *M. simiae*, *M. genavense*, *M. intermedium*, *M. interjectum*, *M. lentiflavum*, *M. triplex*, *M. heidelbergense*, *M. kubicae*, *M. palustre*, *M. montefiorensis*, *M. florentinum*, *M. sherrisii*, *M. parmense*, *M. parascrofulaceum*, *M. saskatchewanense*, *M. stomatepieae* and *M. europaeum* (Tortoli, 2003, 2006; Tortoli et al., 2010). However, among these species, only *M. simiae* is recognized as a real cause of pulmonary infections, as reported in areas such as the Southwest of the United States, Israel and Cuba (Griffith et al., 2007). It is estimated that 9 to 21% of the *M. simiae* isolates from pulmonary specimens have clinical relevance (Rynkiewicz et al. 1998). The findings of this study suggest that members of this group may have pathogenic potential, but further studies are required to assess the characteristics of these isolates, including details on predisposing conditions from patients, as well as the drug susceptibility these NTM.

5. Conclusion

In conclusion, although our study is not necessarily representative for the whole Amazon region, it clearly demonstrates the importance of NTM pulmonary infections in this region. Our data also show that a variety of NTM species are involved, and that there is need for bacteriologic diagnosis in patients with TB, especially in patients who have failed TB treatment. We have shown that the lack of species identification in a significant subset (8.0%) of patients with a presumptive diagnosis of TB in a regional reference center can lead to misdiagnosis and may be followed by inadequate treatment.

6. Acknowledgment

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and the Evandro Chagas Institute, Ananindeua, Pará, Brazil.

7. References

- Adékambi T, Drancourt M (2004) Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 6):2095-105. ISSN 1466-5034.
- American Thoracic Society (1997) Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. *Am J Respir Crit Care Med* 156(2 Pt 2):S1-25. ISSN 1073-449X.
- Barreto AMW, Campos CED (2000) Micobactérias não-tuberculosas no Brasil. *Bol Pneum Sanit* 8(1):23-32. ISSN 0103-460X.
- Billinger ME, Olivier KN, Viboud C, de Oca RM, Steiner C, Holland SM, Prevots DR (2009) Non tuberculosis mycobacteria associated lung disease in hospitalized persons in unites states 1998-2005. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(10): 1562-1569.
- Blackwood KS, He C, Gunton J, Turenne CY, Wolfe J, Kabani AM (2000) Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* 38(8):2846-2852. ISSN 1098-660X.
- Bodle EE, Cunningham JA, Della-Latta P, Schluger NW, Saiman L (2008) Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in Patients Without HIV Infection, New York City. *Emerg Infect Dis* 14(3):390-396. ISSN 1080-6059.
- Brasil (2005) *Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica*. 6th ed. Brasília: Ministério da Saúde, pp. 732-756. Retrieved from http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf
- Brasil (2008) *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Série A. Normas e Manuais Técnicos*. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde 2008; pp.1-436. Retrieved from [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf.\(a\)](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf.(a))
- British Thoracic Society (2000) Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee Guidelines 1999. Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. *Thorax* 55:210-218. ISSN 1468-3296.
- Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr (2002) Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 15(4):716-46. ISSN 0983-8512.
- Cassidy PM, Hedberg K, Saulson A, McNelly E, Winthrop KL (2009) Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis* 15;49(12):e124-9. ISSN 1058-4838.
- Chan ED, Iseman MD (2010) Slender, older women appear to be more susceptible to nontuberculous mycobacterial lung disease. *Gen Med* 7(1):5-18.
- da Costa ARF, Lopes ML, Bahia JRC, Conceição EC, Lima KVB (2010a) Identificação genotípica de membros do complexo *Mycobacterium avium* isolados de infecções pulmonares no Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 1(3):35-42. ISSN 2176-6223.

- da Costa ARF, Lopes ML, Furlaneto IP, Sousa MS, Lima KVB (2010b) Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68(4):390-394. ISSN 0732-8893.
- da Costa ARF, Lopes ML, Leão SC, Schneider MPC, Sousa MS, Suffys PN, Corvelo TCO, Lima KVB (2009) Molecular identification of rapidly growing mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the State of Pará, Amazon region, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65(4):358-364. ISSN 0732-8893.
- Di Lonardo M, Isola NC, Ambroggi M, Rybko A, Poggi S (1995) Mycobacteria in HIV-infected patients in Buenos Aires. *Tuber Lung Dis* 76(3):185-189. ISSN 0962-8479.
- Domenech P, Menendez MC, Garcia MJ (1994) Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. *FEMS Microbiol Let* 116(1):19-24. ISSN 0378-1097.
- Euzéby JP (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47:590-592 List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update: July 09, 2011. URL: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>.
- Falkinham JO 3rd (2002) Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* 23:529-551. ISSN 1557-8216
- Falkinham JO 3rd (2009) Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* 107:356-367. ISSN 1364-5072.
- Freeman J, Morris A, Blackmore T, Hammer D, Munroe S, McKnight L (2007) Incidence of nontuberculous mycobacterial disease in New Zealand, 2004. *N Z Med J*. 15;120(1256):U2580. ISSN 0028-8446.
- Glassroth J (2008) Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Chest* 133(1):243-251. ISSN 0012-3692.
- Good RC (1980) From the Center for Disease Control. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States, 1979. *J Infect Dis* 142:779-783. ISSN 1537-6613.
- Gopinath K, Singh S (2010) Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: are we neglecting the danger? *PLoS Negl Trop Dis* 4:e615, doi:10.1371/journal.pntd.0000615. ISSN 1935-2735.
- Griffith DE (2010) Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis* 23(2):185-190. ISSN 1473-6527.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huiitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, Fordham von Reyn C, Wallace Jr RJ, Winthrop K. American Thoracic Society (2007) An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 175:367-416. ISSN 1073-449X.
- Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ Jr (1993) Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis* 147(5):1271-1278. ISSN 0003-0805.

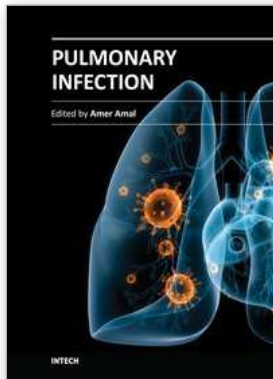
- Griffith DE (2007) Impact of new American Thoracic Society diagnostic criteria on management of nontuberculous mycobacterial infection. *Am J Respir Crit Care Med* 176:419. ISSN 1073-449X.
- Iseman MD, Marras TK (2008) The importance of nontuberculous mycobacterial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 15;178(10):999-1000. ISSN 1073-449X.
- Jarzembowski JA, Young MB (2008) Nontuberculous mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med* 132(8):1333-1341. ISSN 1543-2165.
- Jeong YJ, Lee KS, Koh WJ, Han J, Kim TS, Kwon OJ (2004) Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in immunocompetent patients: comparison of thin-section CT and histopathologic findings. *Radiology* 231(3):880-886. ISSN 1527- 1315.
- Katoch VM (2004) Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res* 120(4):290-304. ISSN 0971-5916.
- Kendall BA, Varley CD, Choi D, Cassidy PM, Hedberg K, Ware MA, Winthrop KL (2011) Distinguishing tuberculosis from nontuberculous mycobacteria lung disease, Oregon, USA. *Emerg Infect Dis* 17(3):506-9. ISSN 1080-6059.
- Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim M, Bai GH, Park YG, Lee SH, Chae GT, Cha CY, Kook YH, Kim BJ (2005) Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1649-1656. ISSN 1466-5034.
- Kobashi Y, Matsushima T (2007) The microbiological and clinical effects of combined therapy according to guidelines on the treatment of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease in Japan - including a follow-up study. *Respiration* 74:394-400. ISSN 1423-0356.
- Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS (2005) Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases: a Korean perspective. *J Korean Med Sci* 20:913-925. ISSN 1011-8934.
- Kubica GP (1973) Differential identification of mycobacteria. *Am Rev Resp Dis* 107: 9-12. ISSN: 0003-0805.
- Lee H, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ (2000) Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. *J Clin Microbiol* 38(8):2966-2971. ISSN 1098-660X.
- León CI (1998) Presencia de las micobacterias no tuberculosas en Colombia. *Médicas UIS* 12: 181-187. ISSN 1794-5240.
- Marras TK, Chedore P; Ying AM, Jamieson F (2007) Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. *Thorax* 62:661-666. ISSN 1468-3296.
- Marras TK, Daley CL (2002) Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med* 23:553-567. ISSN 1557-8216.
- Martin A, Uwizeye C, Fissette K, De Rijk P, Palomino JC, Leão S, Portaels PC, Scarparo C (2009) Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis* 15:1351-1358. ISSN 1080-6059.
- Parrish SC, Myers J, Lazarus A (2008) Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections in Non-HIV patients. *Postgrad Med* 120(4):78-86. ISSN 0032-5481.

- Pedro HSP, Pereira MIF, Goloni MRA, Ueki SYM, Chimara E (2008) Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. *J Bras Pneumol* 34(11):950-955. ISSN 1806-3713.
- Prevots DR, Shaw PA, Strickland D, Jackson LA, Raebel MA, Blosky MA, Montes de Oca R, Shea YR, Seitz AE, Holland SM, Olivier KN (2010) Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated healthcare delivery systems. *AM J Respir Crit Care Med* 182:970-976. ISSN 1073-449X.
- Reich JM, Johnson RE (1995) Mycobacterium avium complex lung disease in women. *Chest* 107(1):293-295. ISSN 1931-3543.
- Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H (1998) Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* 36(1):139-147. ISSN 1098-660X.
- Runyon EH (1959) Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am*. 43(1):273-290. ISSN 1557-9859.
- Rynkiewicz DL, Cage GD, Butler WR, Ampel NM (1998) Clinical and microbiological assessment of *Mycobacterium simiae* isolates from a single laboratory in southern Arizona. *Clin Infect Dis* 26(3):625-30. ISSN 1058-4838.
- Santos RMC, Ogusku MM, Miranda JM, Dos Santos MC, Salem JI (2006) Avaliação da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes indígenas e não indígenas. *J Bras Pneumol* 32(3):234-240. ISSN 1806-3713.
- Sexton P, Harrison AC (2008) Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. *Eur Respir J* 31: 1322-1333. ISSN 1399-3003.
- Shin S, Kim EC, Yoon JH (2006) Identification of nontuberculous mycobacteria by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA, the heat shock protein 65 and the RNA polymerase β -subunit genes. *Korean J Lab Med* 26:153-160. ISSN 1598-6535.
- Shin JH, Cho EJ, Lee JY, Yu JY, Kang YH (2009) Novel diagnostic algorithm using *tuf* gene amplification and restriction fragment length polymorphism is promising tool for identification of nontuberculous mycobacteria. *J Microbiol Biotechnol* 19(3):323-330. ISSN 1017-7825.
- Simons S, van Ingen J, Hsueh PR, Van Hung N, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, van Soolingen D (2011) Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. *Emerg Infect Dis* 17(3):343-349. ISSN 1080-6059.
- Takewaki S, Okuzumi K, Manabe I, Tanimura M, Miyamura K, Nakahara K, Yazaki Y, Ohkubo A, Nagai R (1994) Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. *Int J Syst Bacteriol* 44(1):159-166. ISSN 0020-7713.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T (1993) Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31:175-178. ISSN 1098-660X.

- Tortoli E (2003) Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16:319–354. ISSN 1098-6618.
- Tortoli E (2006) The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48(2):159–178. ISSN 1574-695X.
- Tortoli E (2009) Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infect* 15(10):906-10. ISSN 1469-0691.
- Tortoli E, Böttger EC, Fabio A, Falsen E, Gitti Z, Grottole A, Klenk HP, Mannino R, Mariottini A, Messinò M, Pecorari M, Rumpianesi F (2010) *Mycobacterium europaeum* sp. nov., a scotochromogenic species related to *Mycobacterium simiae* complex. *Int J Syst Evol Microbiol*. ijs.0.025601-0v1-ijs.0.025601-0. ISSN 1466-5034.
- Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, et al (2004) Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1277-1285. ISSN 1466-5034.
- Tsukamura M, Kita N, Shimoide H, Arakawa H, Kuze A (1988). Studies on the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan. *Am Rev Respir Dis* 137: 1280-1284. ISSN 0003-0805.
- Ueki SYM, Telles MAS, Virgilio MC, Giampaglia CMS, Chimara E, Ferrazoli L (2005) Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med Lab* 41(1):1-8. ISSN 1676- 2444.
- van Ingen J, Bendien SA, de Lange WC, Hoefsloot W, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, van Soolingen D (2009) Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax* 64:502–506. ISSN 1468-3296.
- van Ingen J, Boeree MJ, de Lange WC, Dekhuijzen PN, van Soolingen D (2007) Impact of new American Thoracic Society diagnostic criteria on management of nontuberculous mycobacterial infection. *Am J Respir Crit Care Med* 176:418-419. ISSN 1073-449X
- von Reyn CF, Waddell RD, Eaton T, Arbeit RD, Maslow JN, Barber TW, Brindle RJ, Gilks CF, Lumio J, Lähdevirta J, Ranki A, Dawson D, Falkinham JO 3rd (1993) Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. *J Clin Microbiol* 1993;12:3227-3230. ISSN 1098-660X.
- Wallace RJ Jr (1994) *Mycobacterium avium* complex lung disease and women. Now an equal opportunity disease. *Chest* 105(1):6-7. ISSN 1931-3543.
- Webb, WR (1962) Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetylcysteine. *J Thoracic Cardiovascular Surg*. 44:330-343. ISSN: 0022-5223.
- Whipps CM, Butler WR, Pourahmad F, Watral VG, Kent ML (2007) Molecular systematics support the revival of *Mycobacterium salmoniphilum* (ex Ross 1960) sp. nov., nom. rev., a species closely related to *Mycobacterium chelonae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 11):2525-31. ISSN 1466-5034.
- Winthrop KL, McNelley E, Kendall B, Marshall-Olson A, Morris C, Cassidy M, Saulson A, Hedberg K (2010) Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence

and clinical features: an emerging public health disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1;182(7):977-82. ISSN 1073-449X.

Zamarioli LA, Coelho AGV, Pereira CM, Nascimento ACC, Ueki SYM, Chimara E (2008) Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol* 34(8):590-594. ISSN 1806-3713.



Pulmonary Infection

Edited by Dr. Amer Amal

ISBN 978-953-51-0286-1

Hard cover, 128 pages

Publisher InTech

Published online 14, March, 2012

Published in print edition March, 2012

Pulmonary infections are notorious in causing considerable morbidity and mortality. Caused by bacteria, viruses or fungi, respiratory infections require distinct knowledge of recent advances in pathogenesis. Progress in the understanding of immunopathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection will explain how an atypical organism establishes infection. The chapter regarding pulmonary nontuberculous mycobacterial infections in the State of Para depicts a unique study in an endemic region for tuberculosis in North of Brazil. The diagnosis and treatment of latent tuberculosis is a formidable challenge. Thus, new developments in diagnosis and treatment of latent tuberculosis are included in this book. Challenging in their diagnosis, nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases require special education for management. The problems of respiratory infections in the immunocompromised host are increasing in numbers and in resilience to treatment. Therefore, the chapter describing the host immune responses against pulmonary fungal pathogens comes as a necessary section in this book. The insight brought forth from this book can be valuable for both clinicians and scientists.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Ana Roberta Fusco da Costa, Maria Luiza Lopes, Maise Silva de Sousa, Philip Noel Suffys, Lucia Helena Messias Sales and Karla Valéria Batista Lima (2012). Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infections in the State of Para, an Endemic Region for Tuberculosis in North of Brazil, *Pulmonary Infection*, Dr. Amer Amal (Ed.), ISBN: 978-953-51-0286-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/pulmonary-infection/pulmonary-nontuberculous-mycobacterial-infections-in-the-state-of-para-an-endemic-region-for-tubercu>

INTECH

open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821

OCCURRENCE OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIAL PULMONARY INFECTION IN AN ENDEMIC AREA OF TUBERCULOSIS

Ana Roberta Fusco da Costa¹, Joseph O. Falkinham, III², Maria Luiza Lopes¹, Jeann Ricardo da Costa Bahia¹, Emilyn Costa Conceição¹, Karla Valéria Batista Lima¹

¹ Bacteriology and Mycology Section, Evandro Chagas Institute, Ananindeua, Para, Brazil

² Department of Biological Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University,
Blacksburg, Virginia, USA

Corresponding Author

Ana Roberta Fusco da Costa

Bacteriology and Mycology Section

Evandro Chagas Institute

Ananindeua, Para, Brazil

Phone: +55-3214-2124

FAX: +55-3214-2129

E-mail: robertafusco@gmail.com

Enviado para: **Plos Neglected Tropical Diseases** em 03 de agosto de 2012.

Abstract

The majority of investigations of the epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) have focused on highly developed nations with a low prevalence of tuberculosis. In contrast, the Para region of northern Brazil represents an area of high tuberculosis prevalence and increasing NTM incidence. Toward the goal of understanding the dynamics of infection by all *Mycobacterium* species we report patient characteristics and the identification of NTM strains isolated from sputum samples from patients that were residents of Para, a state in the Amazon region, Northern of Brazil over the period January 2010 through December 2011 (2 years). The 29 NTM patients comprised 13.5 % of culture-positive mycobacterial cultures over the 2 year period. A major risk factor for NTM pulmonary disease was previous tuberculosis (76 %). Further, the average age of NTM patients (52 years) was significantly higher than that of tuberculosis patients (39 years) and more were female (72.4 % vs. 37.4 %). Unlike other Brazilian states, NTM pulmonary patients in Para were infected with a different spectrum of mycobacteria; primarily the rapidly growing *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium simiae* complex.

Key-words: nontuberculous mycobacteria; pulmonary infections, Amazon region.

Author Summary

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are environmental organisms that are naturally found in soil, water, dust and other sites. Several case reports and studies on the prevalence of pulmonary NTM disease have been published, nevertheless, the impact and the exact magnitude of NTM infections in countries where tuberculosis (TB) is endemic are not known. Here, we report the identification of NTM strains isolated from pulmonary samples from patients with a presumptive diagnosis of pulmonary TB and residents of State of Para, in the Amazon region, Northern of Brazil. This study documents the occurrence and diversity of species of NTM that cause pulmonary disease in a region representative of those in the world with high infection rates by *Mycobacterium tuberculosis*.

Introduction

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are environmental opportunistic pathogens that are natural inhabitants of soil [1] and drinking water [2], [3]. Humans and their agronomic animals are literally surrounded by nontuberculous mycobacteria [4]. Risk factors for NTM pulmonary disease include: chronic obstructive pulmonary disease (COPD), lung damage due to occupational exposures to dusts (e.g., mining), cystic fibrosis or heterozygosity for a cystic fibrosis mutation, α -1-antitrypsin deficiency [5]. Fisherman and others exposed to fish are at risk for skin infections caused by *Mycobacterium marinum* infection [5] and children from 18 months to 5 years are at risk for cervical lymphadenitis caused most typically by *Mycobacterium avium* [6]. Immunodeficiency, due to HIV-infection or immunosuppression due to cancer or chemotherapy are risk factors for *Mycobacterium avium* bacteremia [2].

Several case reports and studies on the prevalence of pulmonary disease caused by NTM in North America, Europe and Japan have been published during recent years [7], [8], [9], [10], [11]. Nevertheless, the impact and the exact magnitude of NTM infections in countries where tuberculosis is endemic are not known. Here, we report the identification of NTM strains isolated from pulmonary samples from patients with a presumptive diagnosis of pulmonary TB and residents of State of Para, in the Amazon region, Northern of Brazil. This study documents the occurrence and diversity of species of NTM that cause pulmonary disease in a region representative of those in the world with high infection rates by *Mycobacterium tuberculosis*.

Material and Methods

Patients and Clinical Samples

Patients presenting symptoms suggestive of mycobacterial disease and/or who were noted to have radiological alterations at medical examination, and whom NTM was isolated from at least once between January 2010 and December 2011, at the Evandro Chagas Institute, a Brazilian reference center for the diagnosis of infections with *Mycobacterium*, were included in this study. All the NTM isolates described in this study were obtained from pulmonary samples (sputum, bronchoalveolar washes, and gastric washes samples) of 38 individuals residents of the State of Para, North Brazil. Patient records were reviewed to assess the clinical data. Diagnostic criteria for NTM disease published by the American Thoracic Society (ATS) were applied to determine the clinical relevance of NTM isolation [12]. The clinical samples were initially

decontaminated, using the N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide procedure [13]. The samples were subsequently inoculated onto Löwenstein–Jensen medium (Difco, Sparks, USA) and incubated at 35 - 37° C in the absence of light for at least six weeks or until colonies appeared. Isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex were distinguished from NTM by the unique breadcrumb or cauliflower colony morphology of *M. tuberculosis*, and the production of cord factor and susceptibility to 0.5 mg para-nitrobenzoic acid mL by *M. tuberculosis* [14].

Ethics Statement

All subjects provided written consent by signing the free and informed consent form, and all patients data analyzed were anonymized. This study was approved by the ethics committee of the Evandro Chagas Institute (protocol nº 017/10, CAAE: 0017.0.072.000-10).

Molecular Identification

All NTM isolates of this study were identified by sequencing a portion of the 16S rRNA [15] and *hsp65* [16] genes.

Statistical Analysis

The descriptive analysis were expressed as mean ± standard deviation or percentage, while analytical statistics was conducted using either non-parametric Chi-squared test or G-test, using the software BioEstat version 5.01 [17]. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results

Patient Characteristics

From January 2010 to December 2011, a total of 69 NTM isolates were recovered from pulmonary specimens from 38 patients with respiratory symptoms that included chronic cough and alterations on chest X-ray. The patients and their characteristics are listed in Table 1. The 38 patients represented 13.5% of culture-positive mycobacterial cultures obtained in our laboratory over that period of time. Of the 38 patients, 29 met the American Thoracic Society diagnostic criteria for NTM infection [12]. All patients were initially diagnosed as having pulmonary tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) and had suffered a treatment failure.

Table 1. Individuals who met the ATS microbiological criteria for nontuberculous mycobacterial pulmonary disease from Para State, Brazil.

Nº	Race/color category	Gender	Age	Occupation	Water source	Area	AFB smear	Nº positive cultures	Clinical specime	HIV	Other associated conditions	Species
1	Pardo	F	52	Pensioner	Piped system	Urban	-	2	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. intracellulare</i>
2	Pardo	F	25	Housewife	Piped system	Urban	+	3	Sputum	+	Prior pulmonary TB	<i>M. avium</i>
3	Pardo	F	54	Housewife	Well	Urban	+	3	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. massiliense</i>
4	White	F	55	Housewife	Piped system	Urban	-	3	Sputum	-	Prior extrapulmonary TB; bronchiectasis; cavitary lung lesions; long-term corticosteroids use	<i>M. massiliense</i>
5	Pardo	F	71	Housewife	Piped system	Urban	+	2	Sputum	-	Prior extrapulmonary TB; bronchiectasis; cavitary lung lesions	<i>M. massiliense</i>
6	Pardo	F	32	Housewife	Well	Rural	+	2	Sputum	+	Ethilism	<i>M. avium</i>
7	Pardo	F	34	Housewife	Piped system	Urban	-	3	Sputum	-	Down syndrome	MSC (unspeciated)
8	Pardo	F	42	Uninformed	Well	Rural	+	3	Sputum	-	Bronchiectasis	<i>M. abscessus</i>
9	White	F	64	Pensioner	Piped system	Urban	+	3	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. massiliense</i>
10	Pardo	M	62	Uninformed	Well	Rural	-	2	Sputum	-	Bronchiectasis; cavitary lung lesions	MSC (unspeciated)
11	Pardo	F	19	Student	Piped system	Urban	-	2	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. intracellulare</i>
12	Pardo	F	53	Housewife	Well	Urban	+	2	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. massiliense</i>
13	White	F	69	Pensioner	Piped system	Urban	+	2	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. abscessus</i>
14	Pardo	F	41	Uninformed	Piped system	Urban	+	3	Sputum	-	Prior pulmonary TB; cavitary lung lesions	<i>M. massiliense</i>
15	Pardo	M	9	Student	Piped system	Urban	-	1	GL	+	Prior pulmonary TB; cavitary lung lesions	<i>M. avium</i>
16	Pardo	F	58	Housewife	Piped system	Urban	+	3	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. intracellulare</i>
17	Pardo	M	61	Broker	Piped system	Urban	+	1	BAL	-	Prior pulmonary TB	<i>M. massiliense</i>
18	Pardo	F	56	Housewife	Piped system	Urban	+	3	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. massiliense</i>
19	Pardo	F	84	Housewife	Well	Rural/Island	+	2	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. massiliense</i>
20	Pardo	F	63	Housewife	Well	Urban	+	2	Sputum	-	Chronic bronchitis	<i>M. massiliense</i>
21	Pardo	M	53	Uninformed	Piped system	Urban	-	1	BAL	-	Prior pulmonary TB; hematologic neoplasia; bronchiectasis	<i>M. massiliense</i>
22	Pardo	F	60	Seamster	Piped system	Urban	+	2	Sputum	-	Rheumatoid arthritis; long-term corticosteroids use; bronchiectasis	<i>M. boletii</i>
23	Pardo	M	64	Carpenter	Well	Rural	+	2	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. celatum</i>
25	Pardo	M	33	Uninformed	Well	Rural/Island	+	3	Sputum	+	Prior pulmonary TB	MSC (unspeciated)
25	Pardo	F	33	Housewife	Piped system	Urban	-	2	Sputum	-	Prior pulmonary TB;	<i>M. morioakaense</i>
26	Pardo	F	77	Uninformed	Piped system	Urban	+	1	BAL	-	Prior pulmonary TB; bronchiectasis	<i>M. massiliense</i>
27	Pardo	F	72	Pensioner	Piped system	Urban	-	2	Sputum	-	Hypothyroidism	<i>M. fortuitum</i>
28	Pardo	M	62	Farmer	Well	Rural	+	2	Sputum	-	Prior pulmonary TB; diabetes	<i>M. massiliense</i>
29	Pardo	M	60	Uninformed	Well	Rural	+	1	Sputum	-	Prior pulmonary TB	<i>M. kansasii</i>

Note: F (female); M (male); AFB (acid fast bacilli); - (negative); + (positive); BAL (bronchoalveolar lavage); GL (gastric lavage); TB (tuberculosis); MSC (*Mycobacterium simiae* complex).

A summary of the characteristics of the 29 NTM patients meeting the criteria for NTM disease [12] is provided in Table 2. Among the patients with NTM disease the mean age was 52.3 years (± 17.8 SD), and the mean time from onset of symptoms to NTM diagnosis was of 7.8 months (± 13.5 SD). Twenty of the 29 patients (68.9%) were more than 50 years old, whereas 69.4% of tuberculosis cases ($X^2=26.7$; $p < 0.0001$) reported in the state of Para are less than 50 years old (Figure 1).

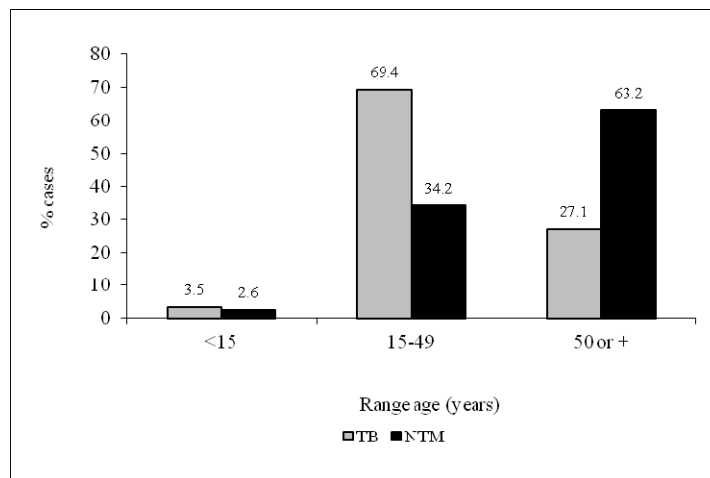


Figure 1. Proportion of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial lung disease by age group - State of Para, Brazil, 2010-2011.

The majority of NTM-infected patients (22/29, 75.8%) had prior tuberculosis (Table 1). Among the most frequent co-morbidities found were bronchiectasis (7/29, 24.1%) and cavitory lung lesions (5/29, 17.2%). A total 26 of the 29 NTM-infected patients (89.6%) were classified as pardo, a Brazilian term for people of mixed white and indigenous heritage, who constitute the majority of the Para state population, with a total of 5,270,307 (69.5%) of the population in the 2010 Brazil Census. The frequency of pardo individuals with NTM was significantly different that the percentage of pardo in the state of Para ($X^2=5.5$; $p = 0.0312$) (Table 2).

Among the 29 NTM-infected individuals, 21 were females (72.4%), aged between 19-84 years (50.9 ± 18.3 SD). There was statistically significant difference in the occurrence of *M. tuberculosis* and NTM infection between males and females (62.6% in male with TB *versus* 72.4% in female with NTM; $X^2=15.1$; $p = 0.0002$). None of the patients declared themselves as smokers. Roughly 72% (21/29) of patients were residents from an urban area, with 64.2% (18/21) of them having access to a water supply through piped systems The difference between NTM

urban and rural residents with access to piped water supply systems was found significant (G-test=21.3; $p=0.0001$). In Para state 85.3% of the residents from urban area have access to supply by piped systems.

Table 2. Summary of distinguishing features of NTM patients

Characteristic	NTM	Tuberculosis	In Para population	Significance
Mean Age	52.3 ± 17.8	38.8 ± 17.3	27.5	-
Patients > 50 years	68.9%	30.6%	14.0%	0.0001 (TB vs. NTM)
Female	72.4%	37.4%	49.6%	<0.0001 (TB vs. NTM)
Prior Tuberculosis	75.8%	Not Applicable	Not Applicable	-
Cavitary lesions	17.2%	90.4%	Not Applicable	-
Bronchiectasis	24.1%	Unknown	Not Applicable	-
Pardo	89.6%	70.9%	69.5%	0.0447 (NTM vs. Pop.)
Urban	72%	83.4%	68.6%	0.7988 (TB vs. NTM)
Piped water (urban area)	64.2%	Unknown	85.3%	<0.0001 (TB vs. Pop.)

NTM Isolates

Ten different NTM species were identified from the 29 patients meeting the ATS criteria and included *M. massiliense* ($n=13$; 44.8%), *M. avium* ($n=3$; 10.3%), *M. intracellulare* ($n=3$; 10.3%), *M. abscessus* ($n=2$; 6.9%), *M. bolletii* ($n=1$; 3.4%), *M. moriokaense* ($n=1$; 3.4%), *M. fortuitum* ($n=1$; 3.4%), *M. celatum* ($n=1$; 3.4%) and *M. kansasii* ($n=1$; 3.4%). Eight isolates (28%) from three patients were identified as being related to the *Mycobacterium simiae* complex by 16S rRNA sequence. The sequences obtained shared 100% similarity with the corresponding 16S rRNA (GenBank accession number HM056101) and *hsp65* gene sequences (GenBank accession number HM056135) of *Mycobacterium* sp. IEC23. The NTM pulmonary infection by *M. chelonae*-*M. abscessus* complex members (*M. abscessus*, *M. massiliense* and *M. bolletii*) occurred in females with an average age of 60.7 years. Among the nine patients who did not meet the diagnostic criteria the NTM disease, the species NTM species isolated included *M. fortuitum* ($n=3$; 33.3%), *M. avium* ($n=2$; 22.2%), *M. gordonae* ($n=1$; 11.1%), *M. colombiense* ($n=1$; 11.1%), *M. intracellulare* ($n=1$; 11.1%) and *M. abscessus* ($n=1$; 11.1%).

Discussion

About 80% (n=29/38) of all the NTM patients met the ATS criteria for NTM pulmonary disease [12]. Among nine cases that did not meet ATS criteria, one was highly suggestive of NTM infection. This patient showed both clinical symptoms of mycobacterial disease and a positive sputum smear. Such cases need to remain under observation and expert consultation sought [12].

This study clearly provides guidance in the diagnosis of NTM pulmonary disease in an area of high tuberculosis prevalence. Specifically, NTM-infected patients were older, more frequently female, of the pardo race, and had prior tuberculosis. Roughly 70% of NTM pulmonary infections cases were patients over 50 years old, as other contemporary studies have shown [18], [9]. In addition, NTM patients had a lower frequency of cavitary lesions compared to tuberculosis patients (Table 2) and has been shown in other studies [12]. We are intrigued with the finding that most of the patients were of the pardo race. The percentage of the NTM-patients reported here (89.6 %) is considerably higher than the percentage of pardo individuals in the state of Para (69.5 %). This could be due to either increased susceptibility of pardo individuals to NTM disease or greater opportunity of exposure to NTM-sources such as agricultural soils or drinking water [3], [19]. Assignment of increased susceptibility is problematic as pardo individuals represent a heterogeneous, genetically diverse group.

RGM species, including *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. bolletii* (formally *M. abscessus* species) represented almost 45% of all NTM pulmonary cases, whereas in Sao Paulo, *Mycobacterium avium* complex (MAC) and *M. kansasii* represent the most common NTM in the pulmonary disease [20], [21].

Based in the 16S rRNA sequencing analysis, a group with five isolates noncharacterized to level specie was classified as *M. simiae* complex (MSC). Among the MSC members, only *M. simiae* species is recognized as potentially pathogenic to human and it is most commonly associated to cervical lymphadenitis. Nevertheless, the recovery of *M. simiae* from pulmonary specimens has been reported, especially in Israel, Cuba, and the southwestern United States [12]. Similarly, in previous study we found in our laboratory strains phylogenetically related to MSC as the most frequent NTM in pulmonary infection in Para State, Brazil [22], [23].

References

1. Brooks RW, George KL, Parker BC, Falkinham JO 3rd, Gruff H (1984) Recovery and survival nontuberculous mycobacteria under various growth and decontamination conditions. *Can J Microbiol* 30(9):1112-7.
2. Falkinham JO 3rd, Parker BC, Gruff H (1980) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. I. Geographic distribution in the eastern United States. *Am Rev Respir Dis* 121(6):931-7.
3. Falkinham JO 3rd, C.D. Norton, and M.W. LeChevallier (2001) Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol* 67:1225-1231.
4. Falkinham JO 3rd (2009) Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* 107(2):356-67.
5. Marras TK, Daley CL (2002) Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med* 23(3):553-67.
6. Wolinsky E (1995) Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 20(4):954-63.
7. Tsukamura M, Shimoide H, Kita N, Kawakami K, Ito T (1981) Epidemiologic studies of lung disease due to mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Rev Infect Dis* 3(5):997-1007.
8. Iseman MD, Marras TK (2008) The importance of nontuberculous mycobacterial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 178(10):999-1000.

9. Billinger ME, Olivier KN, Viboud C, de Oca RM, Steiner C et al. (2009) Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005. *Emerg Infect Dis* 15(10):1562-9.
10. Thomson RM (2010) Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerg Infect Dis* 16(10):1576-83.
11. Kendall BA, Varley CD, Choi D, Cassidy PM, Hedberg K et al. (2011) Distinguishing tuberculosis from nontuberculous mycobacteria lung disease, Oregon, USA. *Emerg Infect Dis* 17(3):506-9.
12. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C et al. (2007) An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 175(4):367-416.
13. Webb WR (1962) Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetyl-cysteine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 44:330-43.
14. Kubica GP (1973) Differential identification of mycobacteria. *Am Rev Resp Dis* 107: 9-12.
15. Shin S, Kim EC, Yoon JH (2006) Identification of nontuberculous mycobacteria by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA, the heatshock protein 65 and the RNA polymerase β -subunit genes. *Korean J Lab Med* 26:153–160.
16. Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim M, Bai GH et al. (2005) Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1649–1656.
17. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres AL, Santos AS (2007) BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá - IDSM/MCT/CNPq, Belém, 324 pp. [URL: <http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas/>].

18. Cook JL (2010) Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *Br Med Bull* 96:45-59.
19. Falkingham JO 3rd (2011) Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerg Infect Dis* 17: 419-424.
20. Ueki SYM, Telles MAS, Virgilio MC, Giampaglia CMS, Chimara E et al. (2005) Nontuberculous mycobacteria: species diversity in São Paulo state, Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 41(1):1-8.
21. Zamarioli LA, Coelho AG, Pereira CM, Nascimento AC, Ueki SY et al. (2008) Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol* 34(8):590-4.
22. da Costa AR, Lopes ML, Furlaneto IP, de Sousa MS, Lima KV (2010) Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68(4):390-4.
23. da Costa AR, Lopes ML, Leão SC, Schneider MP, de Sousa MS et al. (2009) Molecular identification of rapidly growing mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the State of Pará, Amazon region, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65(4):358-64.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Considerando que dentre as razões para o subdiagnóstico de infecções por MNT em regiões endêmicas para tuberculose estejam os limitados recursos laboratoriais disponíveis e a sobrecarga de outras doenças, a seleção de métodos de identificação simples e economicamente viáveis torna-se prioridade. Apesar do sequenciamento de DNA oferecer identificação mais precisa e acurada das MNT, a maioria dos laboratórios clínicos não dispõem de recursos suficientes para introduzi-los e mantê-los em suas rotinas. Em contrapartida, o método de PRA-*hsp65* mostra-se como ferramenta prática para identificação MNT, permitindo a distinção de uma grande variedade de espécies de forma rápida, simples e barata, em comparação com outros métodos moleculares. Além disso, de acordo com a diversidade de espécies de cada local, o PRA-*hsp65* pode ser passível de algumas modificações para proporcionar maior poder discriminatório, como proposto no presente estudo. No entanto, é preciso ressaltar que a decisão de implementação de um teste molecular em determinado laboratório dependerá não apenas da disponibilidade de recursos financeiros, mas também da presença de pessoas treinadas que sejam capazes de manter padrões de proficiência dos testes. Ainda nesse contexto, a organização da identificação de MNT dentro de uma rede de laboratórios de referência regionais parece ser a melhor alternativa para otimização de recursos.
- A distinção das espécies de complexo *Mycobacterium avium* (MAC) tem importância clínica e terapêutica, podendo ser útil para a determinação da relação do micro-organismo com a doença e para investigação da fonte de infecção. No entanto, com a emergência de novas espécies dentro do MAC, a identificação destas tem representado um desafio para rotina laboratorial. Diversos alvos têm sido avaliados para diferenciação de membros do MAC, sendo o gene *rpoB* recentemente descrito com maior poder discriminatório. Entretanto, quando aplicado a isolados do Estado do Pará, a análise de *rpoB* gerou resultados discrepantes daqueles obtidos para os genes *DNAr 16S* e *hsp65*, alvos tradicionalmente utilizados para caracterização de MNT; não sendo, portanto, adequado para caracterização de estirpes de MAC circulantes nessa região. Esses achados remetem a necessidade de avaliação de um número maior de amostras, provenientes de diferentes áreas geográficas, bem como da análise de novos alvos para fins taxonômicos.

- Duas potenciais novas espécies, denominadas *M. paraensis* sp. nov. e *M. amazoniensis* sp. nov., foram propostas neste estudo, sendo frequentes nos casos de infecção pulmonar por MNT no Estado do Pará entre 1999 e 2011.
- Um espectro particular de MNT foi associado aos casos de infecção pulmonar no Estado do Pará, representado principalmente por espécies dos complexos *M. chelonae-M. abscessus*, *M. avium* e *M. simiae*.
- Dentre as principais características encontradas entre os casos de infecção pulmonar por MNT estavam: sexo feminino, idade superior a 50 anos, etnia parda e história de infecção prévia por tuberculose.
- Embora este estudo não demonstre a real magnitude de infecções pulmonares por MNT no Estado do Pará, ele claramente retrata a importância desse grupo na região, chegando a representar 13,5% dos isolamentos micobacterianos em um laboratório de referência. Conjuntamente a esse achado, a identificação de casos de MNT em indivíduos presuntivamente diagnosticados com TB, indica a necessidade de confirmação bacteriológica, especialmente nos casos de resistência primária ao esquema básico da tuberculose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÉKAMBI, T.; BERGER, P.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *rpoB* gene sequence based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.56, n.1, p.133–143, 2006.

ADÉKAMBI, T.; COLSON, P.; DRANCOURT, M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.12, p.5699-5708, 2003.

ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M. *Mycobacterium bolletii* respiratory infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v.15, n.2, p.302-305, 2009.

BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D. Micobactérias “Não Tuberculosas” no Brasil. **Bol. Pneum.**, v.8, p.23-32, 2000.

BLACKWOOD, K. S.; HE, C.; GUNTON, J.; TURENNE, C. Y.; WOLFE, J.; KABANI, A. M. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.8, p.2846–2852, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. *Resolução CNS 196, de 10 de outubro de 1996: Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos*. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm>. Acesso em: 08 nov. 2011.

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

BRITISH THORACIC SOCIETY (BTS). Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee Guidelines 1999. Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. **Thorax**, v.55, p.210-218, 2000.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.15, n.4, p.716-46, 2002.

BUTLER, W.R.; GUTHERTZ, L.S. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.4, p.704-26, 2001.

CATTOIR, V. Molecular identification of mycobacteria and detection of antibiotic resistance. **An. Biol. Clin.**, v.62, n.4, p.405-413, 2004.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes**. Approved Standard. CLSI document M24-A. v.23. n. 18 (ISBN 1-56238-500-3). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

CLOUD, J. L.; NEAL, H.; ROSENBERRY, R.; TURENNE, C. Y.; JAMA, M.; HILLYARD, D.R.; CARROLL, K.C. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.2, p.400-406, 2002.

da COSTA, A. R. F. **Diversidade Genética das Espécies de Micobactérias Não Tuberculosas Identificadas em Laboratório de Referência para o Diagnóstico da Tuberculose na Região Norte**. 2009. 102f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

da COSTA, A. R. F.; LOPES, M. L.; LEÃO, S. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; SOUSA, M. S.; SUFFYS, P. N.; CORVELO, T. C. O.; LIMA, K. V. B. Molecular identification of rapidly growing mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the State of Pará, Amazon region, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 65, n.4, p.358-364, 2009.

da SILVA ROCHA, A.; WERNECK BARRETO, A. M.; DIAS CAMPOS, C. E.; VILLAS-BÔAS DA SILVA, M.; 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*. **J. Clin. Microbiol.** v.40, n.11, p.4191-4196, 2002.

da SILVA ROCHA, A.; da COSTA LEITE, C.; TORRES, H. M.; DE MIRANDA, A. B.; PIRES LOPES, M. Q.; DEGRAVE, W. M.; SUFFYS, P. N. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. **J. Microbiol. Methods**. v.37, n.3, p.223-229, 1999.

DOMENECH, P.; MENENDEZ, M. C.; GARCIA, M. J. Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.116, n.1, p.19–24, 1994.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature - Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire - France. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em: 19 nov. 2012.

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

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

GARZA-RAMOS, G.; XIONG, L.; ZHONG, P.; MANKIN, A. Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA. **J. Bacteriol.**, v.183, n.23, p.6898-6907, 2001.

GAYNOR, M.; MANKIN, A. S. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.3, n.9, p.949-961, 2003.

GLASSROTH, J. Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. **Chest**, v.133, n.1, p.243-251, 2008.

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

GRIFFITH DE, AKSAMIT T, BROWN-ELLIOTT BA, CATANZARO A, DALEY C, GORDIN F, HOLLAND SM, HORSBURGH R, HUITT G, IADEMARCO MF, ISEMAN M, OLIVIER K, RUOSS S, FORDHAM von Reyn C, WALLACE Jr RJ, WINTHROP K. American Thoracic Society. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.175, n.7, p.367-416, 2007.

HÄFNER, B.; HAAG, H.; GEISS, H. K.; NOLTE, O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. **Mol. Cell. Probes**, v.18, n.1, p.59-65; 2004.

HERNANDEZ, S. M.; MORLOCK, G. P.; BUTLER, W. R.; CRAWFORD, J. T.; COOKSEY, R. C. Identification of *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.11, p.3688-3692, 1999.

HOLBERG-PETERSEN, M.; STEINBAKK, M.; FIGENSCHAU, K. J.; JANTZEN, E. ENG, J.; MELBY, K. K. Identification of clinical isolates of *Mycobacterium* spp. by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA gene. Experience from a clinical laboratory. **APMIS**, v.107, n.2, p.231-239, 1999.

HORAN, K.; CANGELOSI, G.A. Drug resistance by non-tuberculous mycobacteria. **Infect. Dis.**, p. 917-927, DOI: 10.1007/978-1-60327-595-8_17, 2009.

KHAN, I. U.; SELVARAJU, S. B.; YADAV, J. S. Method for rapid identification and differentiation of the species of the *Mycobacterium chelonae* complex based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer PCR-restriction analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.9, p.4466-4472, 2005.

KIM, H.; KIM, S. H.; SHIM, T. S.; KIM, M.; BAI, G. H.; PARK, Y. G.; LEE, S. H.; CHAE, G. T.; CHA, C. Y.; KOOK, Y. H.; KIM, B. J. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.55, pt.4, p.1649-1656, 2005.

KIM, B. J.; LEE, S. H.; LYU, M. A.; KIM, S. J.; BAI, G. H.; CHAE, G. T.; KIM, E. C.; CHA, C. Y.; KOOK, Y. H. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.6, p.1714-1720, 1999.

KIM, H. Y.; KOOK, Y.; YUN, Y. J.; PARK, C. G.; LEE, N. Y.; SHIM, T. S.; KIM, B. J.; KOOK, Y. H. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae*–*Mycobacterium abscessus* group isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, n.10, p.3384–3390, 2008.

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

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

KUBICA GP, DYE WE, COHN ML, MIDDLEBROOK G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.87, p.775–779, 1963.

LANE, DJ. **16S/23S rRNA sequences**. In: __ Stackebrandt and Goodfellow Ed. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley, Chichester, p. 115-176, 1991.

LEÃO, S. C.; BERNADELLI, A.; CATALDI, A.; ZUMARRAGA, M.; ROBLEDO, J.; REALPE, T.; MEJÍA, G. I.; TELLES, M. A. S.; CHIMARA, E.; VELAZCO, M.; FERNANDEZ, J.; RODRIGUES, P. A.; GUERRERO, M. I.; LEÓN, C. I.; PORRAS, T. B.; RATOGI, N.; GOH, K. S.; SUFFYS, P.; ROCHA, A. S.; NETTO, D. S.; RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; BARRERA, L.; PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; PORTAELS, F.. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. **J. Microbiol. Methods**, v.61, n.2, p.193-199, 2005.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA, G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. Vanden BROELLE, Brugges, 2004.

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

LEITE, C. Q. J.; DA SILVA ROCHA, A.; DE ANDRADE LEITE, S. R. A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin-layer chromatography and molecular methods. **Microbiol. Immunol.**, v.49, n.7, p.571-578, 2005.

LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L.; LOUREIRO, E. C. B.; COSTA, M.; M.; CARDOSO, N. C.; LIMA, G. L. F.; SOUSA, M. S. Nested-PCR for gene that encodes the antigen b applied to the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, n.2, p.212-215, 2007.

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

MARTIN, A.; UWIZEYE, C.; FISSETTE, K.; DE RIJK, P.; PALOMINO, J. C.; LEÃO, S.; PORTAELS, F. Application of the *hsp65* PRA method for the rapid identification of

mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium. **J. Microbiol. Methods**, v.71, n.1, p.39–43, 2007.

MCGRATH, E. E.; MCCABE, J.; ANDERSON, P. B. Guidelines on the diagnosis and treatment of pulmonary non-tuberculous mycobacteria infection. **Int. J. Clin. Pract.**, v.62, n.12, p.1947-1955, 2008.

MCNABB, A.; EISLER, D.; ADIE, K.; AMOS, M.; RODRIGUES, M.; STEPHENS, G.; BLACK, W. A.; ISAAC-RENTON, J. Assessment of partial sequencing of the 65-Kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.7, p.3000–3011, 2004.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. Identification of Mycobacterium using the EF-Tu encoding (*tuf*) gene and the tmRNA encoding (*ssrA*) gene. **J. Med. Microbiol.**, v.56, pt.8, p.1033-1041, 2007.

NASH, K. A.; ANDINI, N.; ZHANG, Y.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, n.10, p.3476–3478, 2006.

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

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

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

PARRISH, S. C.; MYERS, J.; LAZARUS, A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections in Non-HIV patients. **Postgrad. Med.**, v.120, n.4, p.78-86, 2008.

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

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

ROBERTS, M.C. Update on macrolide-lincosamidestreptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, 282: 147–59, 2008.

ROTH, A.; FISCHER, M.; HAMID, H. E.; LUDWIG, W.; MICHALKE, S.; MAUCH, H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.1, p.139-147, 1998.

RUNYON, E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Med. Clin. North America.**, v.43, n.1, p.273-290, 1959.

SCHLÜNZEN, F.; ZARIVACH, R.; HARMS, J.; BASHAN, A.; TOCILJ, A.; ALBRECHT, R.; YONATH, A.; FRANCESCHI, F. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**, v.413, n.6858, p.814-821, 2001.

SHIN, J. H.; CHO, E. J.; LEE, J. Y.; YU, J. Y.; KANG, Y. H. Novel diagnostic algorithm using *tuf* gene amplification and restriction fragment length polymorphism is promising tool for identification of nontuberculous mycobacteria. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.19, n.3, p.323-30, 2009.

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

SOMOSKOVI, A. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. **Clin. Chest Med.**, v.23, n.3, p.585– 597, 2002.

TAKEWAKI, S.; OKUZUMI, K.; MANABE, I.; TANIMURA, M.; MIYAMURA, K.; NAKAHARA, K.; YAZAKI, Y.; OHKUBO, A.; NAGAI, R. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.44, n.1, p.159-166, 1994.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E. C.; BODMER T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.2, p.175-178, 1993.

THIBERT, L.; LAPIERRE, S. Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.7, p.1759–1763, 1993.

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

TORTOLI, E. The new mycobacteria: an update. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.48, n.2, p.159-78, 2006.

TURENNE, C. Y.; TSCHETTER, L.; WOLFE, J.; KABANI, A. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.10, p.3637-3648, 2001.

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

VIANA-NIERO, C.; LIMA, K.V.B.; LOPES, M.L.; RABELLO, M.C.; MARSOLA, L.R.; BRILHANTE, V.C.; DURHAM, A.M.; LEAO, S.C. Molecular characterization of

Mycobacterium massiliense and *Mycobacterium bolletii* in outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **J. Clin. Microb.**, v.46, n.3, p.850-855, 2008.

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

WALLACE JR, R. J.; MEIER, A.; BROWN, B. A.; ZHANG, Y.; SANDER, P.; ONYI, G. O.; BÖTTGER, E. C. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.40, n.7, p.1676–1681, 1996.

WANG, S.X.; TAY, L.; SNG, L.H. Rapid identification of pathogenic rapidly growing mycobacteria by pcr-restriction endonuclease analysis. **An. Acad. Med. Singapore**, v. 34, n.1, p.137-140, 2005.

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

YAMADA-NODA, M.; OHKUSU, K.; HATA, H.; SHAH, M. M.; NHUNG, P. H.; SUN, X. S.; HAYASHI, M.; EZAKI, T. *Mycobacterium* species identification - a new approach via *dnaJ* gene sequencing. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.30, n.6, p.453-462, 2007.

ZAMARIOLI, L. A.; COELHO, A. G. V.; PEREIRA, C. M.; NASCIMENTO, A. C. C.; UEKI, S.Y.M.; CHIMARA, E. Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. **J. Bras. Pneumol.**, v.34, n.8, p.590-594, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 - FICHA EPIDEMIOLÓGICA



Reg.: _____

Data: ____/____/____

1. DADOS DO INDIVÍDUO:

Nome: _____

Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos Est. Civil: _____ Raça/Cor: _____

Sexo: () M () F

Mãe: _____

Escolaridade: 1- Não alfabetizado 2- alfabetizado 3- Fundamental 4- Médio 5- Superior

Profissão: _____ Naturalidade: _____

Endereço: _____

Compl.: _____ Bairro: _____ Cidade: _____

Telefone. contato: () _____

Data da inclusão no estudo: ____/____/____

2. DADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

2.1. Médico resp. pelo atendimento: _____

2.2. O paciente foi submetido a procedimento invasivo? SIM () NÃO ()

2.3. Data do procedimento: ____/____/____

2.4. Tipos de procedimento: _____

2.5. Estabelecimento de Saúde: _____

2.6. Sintomas no momento do diagnóstico:

() febre () astenia () Abscesso () prurido

() anorexia () cefaléia () nódulo () outros

() tontura () dispnéia () secreção purulenta local

() emagrecimento () tosse () cirurgia não cicatrizada

2.7. Tempo dos sintomas: _____(meses)

2.8. O paciente foi submetido a algum tratamento posterior?

SIM () NÃO ()

2.9. Tipo de tratamento: _____

2.10. Presença de co-morbidades? SIM () NÃO ()

2.11. Tipos de co-morbidades:

() HIV () DPOC () Fibrose cística

() Tuberculose () Insuficiência renal crônica () Corticóide dependente

() bronquiectasia () Outras: _____

2.12. Fatores de risco associados a doenças pulmonares:

() Uso de cigarro. () Familiares fumantes

() Uso de bebidas alcoólicas. () Outros: _____

() Exposição a sílica, fuligem (pó de carvão, cimento, tenhas de amianto...)

2.13. Doenças anteriores

() Sarampo () Coqueluche

3. DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS:

3.8. Situação de moradia

() Área alagada () Esgotos abertos () Saneamento básico adequado

3.9. Casa própria: () sim () não

3.10. Tempo de residência:

3.11. Número de cômodos da casa:

3.12. Número de pessoas que residem na casa:

3.13. Número de pessoas que dormem no mesmo cômodo do indivíduo acometido:

3.14. Sistema de abastecimento de água:

() Água tratada () Sem água encanada () Água de poço

3.15. Armazenamento de água para alimentação

() Pote () Recipientes plástico em geladeira () Outros

3.16. Presença de quintal na casa

3.17. O indivíduo acometido realiza atividades frequentes com terra ou água?

Especificar: _____

3. DADOS LABORATORIAIS

3.1. Características morfológicas das colônias:

3.2. Caracterização Molecular
