

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



Carlos Eduardo Dias Campos

**Caracterização em nível de espécie de cepas com importância clínica, previamente identificadas como *Mycobacterium intracellulare* /*Mycobacterium chimaera* e seu perfil epidemiológico.**

Rio de Janeiro  
2016

Carlos Eduardo Dias Campos

**Caracterização em nível de espécie de cepas com importância clínica, previamente identificadas como *Mycobacterium intracellulare* /*Mycobacterium chimaera* e seu perfil epidemiológico.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Epidemiologia em Saúde Pública. Área de concentração: Epidemiologia Aplicada aos Serviços de Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Pais Ramos

Rio de Janeiro  
2016

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

C198c Campos, Carlos Eduardo Dias  
Caracterização em nível de espécie de cepas com importância clínica, previamente identificadas como *Mycobacterium intracellulare* / *Mycobacterium chimaera* e seu perfil epidemiológico. / Carlos Eduardo Dias Campos. -- 2016.  
61 f. : tab. ; graf.

Orientador: Jesus Pais Ramos.  
Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

1. Infecções por Micobactéria não Tuberculosa - epidemiologia.  
2. Perfil de Saúde. 3. *Mycobacterium avium*. 4. Complexo *Mycobacterium avium*. 5. *Mycobacterium chimaera*.  
6. *Mycobacterium intracellulare*. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.9294

Carlos Eduardo Dias Campos

**Caracterização em nível de espécie de cepas com importância clínica, previamente identificadas como *Mycobacterium intracellulare* /*Mycobacterium chimaera* e seu perfil epidemiológico.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Epidemiologia em Saúde Pública. Área de concentração: Epidemiologia Aplicada aos Serviços de Saúde.

Aprovada em: 21 de novembro de 2016.

Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dra. Haiana Charifker Schindler  
Fundação Oswaldo Cruz-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Prof. Dr. Paulo Redner  
Fundação Oswaldo Cruz-Escola  
Nacional de Saúde Pública-Centro de Referência Professor Hélio Fraga

Prof. Dr. Jesus Pais Ramos  
Fundação Oswaldo Cruz-Escola  
Nacional de Saúde Pública-Centro de Referência Professor Hélio Fraga

Rio de Janeiro

2016

Aos meus pais Arnaldo e Lenice,  
a minha esposa Sonia e aos meus  
filhos Mateus e Juliana.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha esposa Sonia, pela dedicação, força e apoio, para a conclusão dessa dissertação, inclusive na revisão do texto e na formatação de tabelas.

Ao meu orientador Dr. Jesus Pais Ramos, pela confiança e amizade, desde que chegou ao nosso laboratório.

A Luciana Distasio pela amizade, e valiosa contribuição na preparação desse trabalho, discutindo, ponderando e sempre colaborando.

A Luane Distasio por sua competente ajuda na execução da técnica do sequenciamento.

Ao Paulo Victor Viana pela rica colaboração com os dados epidemiológicos.

Ao Paulo Caldas, do setor de identificação de MNT, pela amizade e troca de conhecimentos em todos esses anos.

Aos Drs. Otavio Porto, Jesus Pais Ramos e Paulo Basta, pelo empenho para que se tornasse realidade a idéia do mestrado profissional em nossa instituição.

A Dra. Fatima Fandinho, chefe do Laboratório de Referencia Nacional em Bacteriologia da Tuberculose e Micobacterioses Angela Maria Werneck, e demais colegas do laboratório.

A todos os colegas e professores do curso de mestrado pela convivência e amizade ao longo desses anos.

E por fim gostaria de agradecer a Dra. Angela Maria Werneck Barreto (*in memorian*), por ter me recebido tão bem no laboratório, sempre com boa vontade, força e incentivo e pela grande amizade que se construiu entre nós. *Ciao Angellina! In God we trust!*

*Hit the Road, MAC, and Don't You Come Back No More.*

*With apologies to Ray Charles.*

GRIFFITH, 2015, p.1222

## RESUMO

A infecção causada por micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT) pode resultar em interações assintomáticas, em alguns casos porém, pode também resultar em infecções sintomáticas, cujas manifestações clínicas são pulmonares, linfáticas, cutâneas ou disseminada. Dentre as espécies que fazem parte do “Complexo” *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* é a que está mais relacionada com doenças pulmonares, entretanto, este microrganismo pode acometer diversos órgãos, tanto em pessoas imunocomprometidas como em imunocompetentes. A identificação das espécies do "Complexo" *M. avium* está se tornando cada vez mais importante, pois facilita a possibilidade do conhecimento de possíveis fontes de infecção ambientais, da virulência desses microrganismos, das diferenças no prognóstico da doença, e inclusive de estratégias terapêuticas específicas. Além de nos permitir conhecer as espécies mais prevalentes, assim como sua distribuição epidemiológica. Assim sendo, este estudo tem por objetivo, identificar as cepas de *M. intracellulare*/*M. chimaera*, através da metodologia do sequenciamento e investigar o perfil epidemiológico dos pacientes. Todas as 154 amostras de 66 pacientes foram sequenciadas utilizando três alvos genéticos (genes 16S rRNA, *hsp65* e a região ITS). Dentre os indivíduos de estudo 57 (86,4%) tiveram suas cepas identificadas como *M. intracellulare*, 5 (7,6%) como *M. chimaera*, 2 (3,0%) como *M. marseillense*, 1 (1,5%) como *M. timonense* e 1 (1,5%) como *M. yongonense*. Do total de pacientes, 21 (31,8%) foram provenientes da região sul, 16 (24,2%) sudeste, 15 (22,7%) centro-oeste, 13 (19,7%) nordeste, e 1 (1,5%) norte, 45 (68,2%) eram do sexo masculino e 21 (31,8%) do sexo feminino, tendo a idade variando de 26 a 87 anos, média de 62 anos e mediana 61,5 anos. O sexo masculino foi o mais frequente na maioria das regiões, com exceção do nordeste, onde houve predominância do sexo feminino. Existem poucos estudos que investigaram os casos de MNT nacionalmente e ainda mais escassos os que analisaram *M. intracellulare*/*M. chimaera*. Esse fato aumenta a relevância do nosso trabalho, que visa em parte, suprir a carência desse tipo de estudo no Brasil.

Palavras-Chave: Micobactérias não causadoras de tuberculose. “Complexo” *Mycobacterium avium*. *Mycobacterium intracellulare*. *Mycobacterium chimaera*. Epidemiologia de micobactérias não causadoras de tuberculose.

## ABSTRACT

The infection caused by nontuberculous mycobacteria (NTM) may result in asymptomatic interactions, but in some cases, may also result in symptomatic infections whose clinical manifestations are pulmonary, lymphatic, cutaneous or disseminated. Among the species that are part of the *Mycobacterium avium* Complex, *M. intracellulare* is the species that is more related with lung disease, however, this organism can affect different organs in both immunocompromised and immunocompetent individuals. The identification of the species of the *M. avium* Complex is becoming increasingly important as it provides the possibility of knowledge of possible sources of environmental infection, virulence of these microorganisms, the differences in the prognosis of the disease, and even of specific therapeutic strategies. In addition to allowing us to meet the most prevalent species and its epidemiological distribution. Therefore, this study aims to identify the strains of *M. intracellulare*/*M. chimaera* by sequencing methodology and investigate the epidemiological profile of the patients. All 154 samples from 66 patients were sequenced using three genetic targets (16S rRNA, hsp65 and ITS region genes). Among the study subjects 57 (86.4%) had their strains identified as *M. intracellulare*, 5 (7.6%) as *M. chimaera*, 2 (3.0%) as *M. marseillense*, 1 (1.5 %) As *M. timonense* and 1 (1.5%) as *M. yongonense*. Of all patients, 21 (31.8%) were from the southern region, 16 (24.2%) southeast, 15 (22.7%) midwest, 13 (19.7%) northeast, and 1 ( 1.5%) north, 45 (68.2%) were men and 21 (31.8%) were women, with ages ranging 26-87 years, mean 62 years and median 61.5 years. Men were most frequent in almost all regions except the northeast, where there was a predominance of women. There are few studies that have investigated the cases of NTM nationally and even scarcer who analyzed *M. intracellulare* / *M. chimaera*. This fact increases the relevance of our work, which aims in part, address the lack of such studies in Brazil.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria. *Mycobacterium avium* Complex. *Mycobacterium intracellulare*. *Mycobacterium chimaera*. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA, para as espécies do “Complexo” <i>M. avium</i> .....	14
Figura 2 -	Árvore filogenética concatenada construída a partir da sequencias dos genes, hsp65, 16S rRNA e da região ITS através da metodologia neighbour joining. Os valores de bootstrap foram calculados a partir de 1000 repetições e exibidos aqueles superiores a 50. A sequencia de <i>M. abscessus</i> CIP 104536 foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. A barra indica o número desubstituições por posição de nucleotídeos.....	39
Figura 3 -	Gráfico das espécies identificadas através da técnica do sequenciamento e árvore filogenética.....	40
Figura 4 -	Gráfico da distribuição geográfica dos pacientes do estudo.....	40
Figura 5 -	Boxplot da idade (anos) por sexo, Brasil, 2014 a 2015.....	41
Figura 6 -	Boxplot da idade (anos) por região geográfica, Brasil, 2014 a 2015.....	42
Figura 7 -	Boxplot da idade (anos) por espécie de micobactéria, Brasil, 2014 a 2015.....	42
Figura 8 -	Fluxograma para identificação através da técnica do sequenciamento da região ITS de cepas de <i>M. intracellulare</i> / <i>M. chimaera</i> .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultado do Sequenciamento nos três alvos estudados.....	32
Tabela 2 -	Amostras que apresentaram resultados divergentes em um dos três alvos estudados.....	38
Tabela 3 -	Características clínico-epidemiológicas segundo sexo, faixa etária, região, material clínico por espécies identificadas, Brasil, 2014 a 2015.....	43
Tabela 4 -	Características clínico-epidemiológicas segundo sexo, faixa etária, espécie identificada, material clínico por região geográfica, Brasil, 2014 a 2015.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ABF	Azul de bromofenol
CIP	<i>Collection de l'Institut Pasteur</i>
CRPHF	Centro de Referência Professor Hélio Fraga
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DP	desvio padrão
DSM	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i>
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
ITS	Região do espaçador Interno Transcrito
MAC	“Complexo” <i>Mycobacterium avium</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MNT	Micobactérias não causadoras de tuberculose
PCR	Reação da polimerase em cadeia ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
ph	Potencial Hidrogeniônico
PRA- <i>hsp65</i>	Análise por enzimas de restrição ( <i>Restriction polymorphism analysis</i> ) do gene <i>hsp65</i>
q.s.p	quantidade suficiente para
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ( <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> )
TBE	Tris borato EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UV	ultra-violeta

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
KDa	Quilodaltons
mL	Mililitro
pb	pares de bases
μL	microlitro
ng	nanograma
μm	micrometro
rpm	rotações por minuto
pmol	picomol
U/ μL	unidade por microlitro
min.	minutos

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
2.1	MÉTODOS LABORATORIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS.....	19
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	21
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	22
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
5	<b>METODOLOGIA</b> .....	23
5.1	DESENHO DO ESTUDO.....	23
5.2	AMOSTRAS DO ESTUDO.....	23
5.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	23
5.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	23
5.5	SEQUENCIAMENTO.....	23
5.5.1	Extração de DNA.....	23
5.5.2	Reação da PCR- genes <i>16S</i> rRNA, <i>hsp65</i> e região ITS.....	24
5.5.3	Separação Eletroforética.....	26
5.5.4	Purificação dos Produtos da PCR.....	26
5.5.5	Reações de Sequenciamento.....	26
5.5.6	Precipitação dos produtos da Reação de Sequenciamento .....	27
5.5.7	Desnaturação.....	27
5.5.8	Análise das Sequencias.....	28
5.5.9	Análise filogenética.....	28
5.6	VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS.....	29
5.6.1	Fonte de Dados.....	29
5.6.2	Análise de Dados.....	29
6	<b>ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	30
7	<b>RESULTADOS</b> .....	31
8	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45
9	<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
	<b>REFERENCIAS</b> .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

As micobactérias estão ordenadas taxonomicamente na ordem Actinomycetales, sub-ordem Corynebacterinae, família Mycobacteriaceae, e um único gênero *Mycobacterium* sendo este composto por microrganismos em forma de bacilos, imóveis, não esporulados, não encapsulados, medindo de 0,1 a 10 micrômetros de comprimento por 0,2 a 0,6 micrômetros de largura cuja característica principal é a álcool-ácido resistência. Excetuando-se *M. leprae*, podem ser divididas em dois grandes grupos de espécies, as que integram o “Complexo” *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. pinnipedii*, *M. africanum* e *M. microti*) e um grupo que inclui mais de 150 espécies denominadas micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT) (TORTOLI, 2014; BERGEY, 2012; GRIFFITH *et al.*, 2007; BRASIL, 2005).

Em micobacteriologia, a definição de “Complexo” faz referência a diferentes espécies de micobactérias que apresentam grande similaridade genética e o mesmo espectro de doenças, cujo diagnóstico diferencial em nível de espécie é difícil e exige laboratórios de alta complexidade (DAVID *et al.*, 2004; BROSCHE *et al.*, 2002).

A infecção causada por MNT pode resultar em interações assintomáticas, em alguns casos porém, pode também resultar em infecções sintomáticas, cujas manifestações clínicas são pulmonares, linfáticas, cutâneas ou disseminada (GRIFFITH *et al.*, 2007). A doença pulmonar crônica é a forma mais comum pela qual se apresentam infecções ocasionadas por MNT. Nesses casos, os pacientes frequentemente são adultos com sintomas variáveis como tosse, falta de ar e cansaço. A transmissão entre seres humanos até hoje não foi evidenciada, sendo que a contaminação ocorre principalmente através de MNT presentes em ambientes naturais e feitos pelo homem (GRIFFITH *et al.*, 2007; FALKINHAM III, 2010; VAN INGEN, 2015).

Este trabalho propõe-se a investigar qual a espécie mais prevalente de micobactéria dentre aquelas caracterizadas como *M. intracellulare*/*M. chimaera* através da metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de restrição enzimática do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*) com importância clínica. Além disso, foram também investigados dados epidemiológicos dos pacientes diagnosticados com infecções causadas por essas MNT.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

As primeiras MNT descritas na literatura datam do final do século dezenove. A partir de então, diversas espécies foram descritas, isoladas de ambiente, animais e humanos. A associação do isolamento desses microrganismos e doença não estava bem estabelecido, sendo o trabalho de Wolinsky um marco nesse aspecto do estudo das MNT, pois descreveu as diferentes doenças causadas por esse grupo de microrganismos, evidenciando o papel das MNT como causadoras de doenças e mostrando a importância do estudo das mesmas (EUZÉBY, 2015; KAZDA, 2009; FALKINHAM III, 1996; WOLINSKY, 1979).

O isolamento de MNT tem aumentado em todo o mundo assim como sua importância como agente etiológico. Dentre as MNT potencialmente patogênicas, figuram entre as mais isoladas, as do “Complexo” *M. avium* (MAC), que é composto pelas seguintes espécies: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. vulneris*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense* e *M. yongonense*. A relação filogenética entre as espécies do “Complexo” *M. avium* é mostrada na Figura 1 (NUNES-COSTA *et al.*, 2016; CALDAS *et al.*, 2014; TORTOLI, 2014; GRIFFITH *et al.*, 2007).

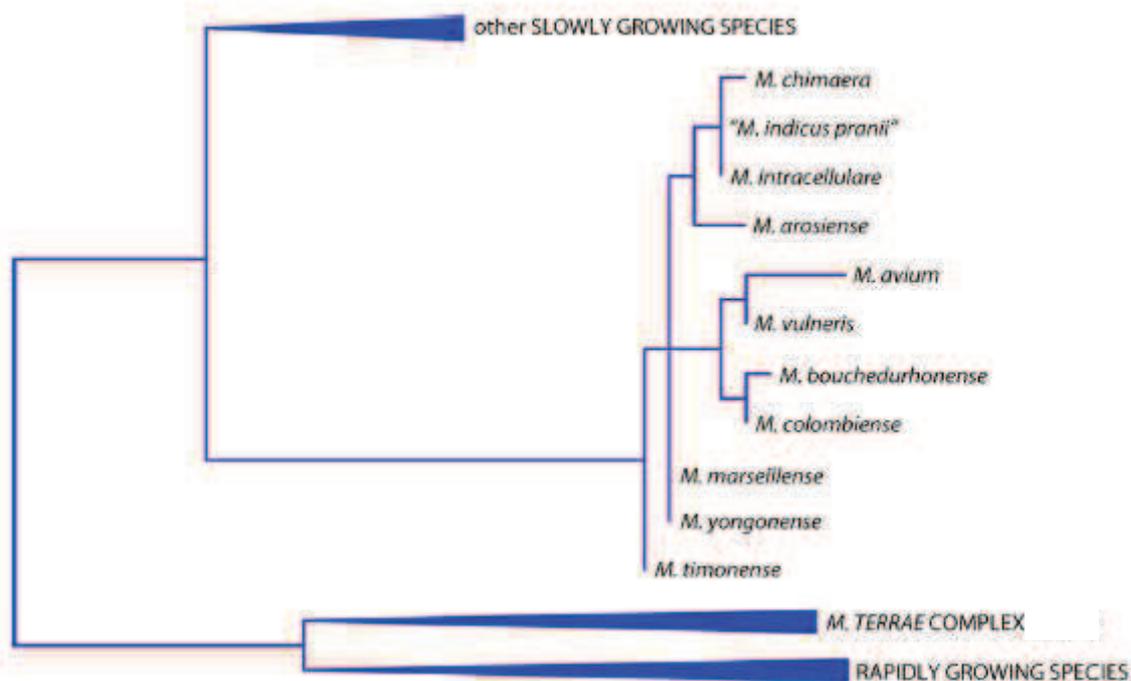


Figura 1. Árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA, para as espécies do “Complexo” *M. avium*. Fonte: Tortoli, 2014.

*Mycobacterium avium* foi descrito em 1901 por Chester, a partir de um isolamento em uma galinha doente. Apresenta colônias lisas e algumas vezes rugosas. A maioria das cepas são não cromogênicas e podem desenvolver pigmentação conforme envelhecem, porém algumas cepas são escotocromogênicas. São micobactérias de crescimento lento, que se desenvolvem a temperaturas de 25, 37 e 42 graus Celsius, sendo que a temperatura ótima é de 37° C. É dividido em três subespécies: *M. avium subsp. avium*; *M. avium subsp. silvaticum* e *M. avium subsp. paratuberculosis*. (TURENNE; WALLACE, JR.; BEHR, 2007; MURRAY *et al.*, 1995; WAYNE *et al.*, 1991; THOREL; KRICHEVSKY; LEVY-FREBAULT, 1990; SKERMAN; MCGOWAN; SNEATH, 1980).

*Mycobacterium intracellulare*, nomeado inicialmente como *Nocardia intracellularis* por Cuttino & McCabe, em 1949, foi isolado a partir de uma cepa proveniente de uma criança que veio a falecer com doença disseminada. Este microrganismo foi posteriormente renomeado como *Mycobacterium intracellulare* por Runyon, em 1965. Através da metodologia do PRA-*hsp65*, apresenta cinco diferentes subtipos (I ao V), sendo o subtipo I o mais frequentemente isolado (TURENNE; WALLACE, JR.; BEHR, 2007; SKERMAN; MCGOWAN; SNEATH, 1980).

*Mycobacterium chimaera* foi descrito em 2004 por Tortoli *et al.*, a partir de doze cepas provenientes de doze pacientes de hospitais na Itália. Todas as cepas foram isoladas a partir de material clínico pulmonar a exceção de uma que foi de urina. As sequências do gene 16SrRNA se mostraram idênticas nas doze cepas analisadas. Todos os pacientes eram idosos. Esse microrganismo apresenta colônias lisas e não pigmentadas, e crescem a 25 e 37 °C, porém não crescem a 45 °C. Possui o mesmo padrão de restrição que *M. intracellulare* tipo I, através da metodologia do PRA-*hsp65*.

*Mycobacterium colombiense* foi descrito em 2006 por Murcia *et al.*, a partir de cepas isoladas de quatro pacientes colombianos portadores de vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV). Suas colônias são rugosas e não pigmentadas cujo crescimento em meio de cultura pode ser observado com três semanas de incubação em 20 e 37 °C. Detém como característica bioquímica única, dentro do “Complexo” *M. avium*, teste positivo para hidrólise da uréia. Apresenta o mesmo padrão de restrição que

*M. avium* tipo II, através da metodologia do PRA-*hsp65*, porém apresenta uma sequência exclusiva do gene 16S rRNA.

*Mycobacterium vulneris* foi descrito na Holanda em 2009 por van Ingen *et al.*, a partir do isolamento em um paciente com lesões causadas pela mordida de um cão e em linfonodos de um outro paciente. As cepas foram caracterizadas por uma única diferença em um nucleotídeo no 16S rRNA gene, que apresentou 99% de identidade com *Mycobacterium colombiense*. Análise das sequências do gene *hsp65* e *rpoB* mostraram, respectivamente 97% de identidade com a cepa tipo de *M. avium* e 98% com a cepa tipo de *M. colombiense*. Possui colônias escotocromogênicas, que crescem as temperaturas de 25, 30 e 36 °C, sendo que a 36 °C em 28 dias e as demais temperaturas em um período maior de tempo. Não crescem a 42 °C.

*Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium timonense* e *Mycobacterium bouchedurhonense* foram descritos por Ben Salah *et al.* em 2009, a partir de materiais pulmonares isolados de diferentes pacientes na França. As cepas tipo dessas espécies mostraram grande identidade genética entre si e com as cepas tipo de *M. intracellulare*, *M. chimaera* e *M. colombiense*. Estas espécies possuem colônias não pigmentadas, apresentando crescimento em meio de cultura após 10 dias de incubação, a 30 °C. *M. marseillense* pode ser diferenciado bioquimicamente, das outras espécies do “Complexo” *M. avium*, por apresentar teste positivo para hidrólise do tween 80; assim como *M. bouchedurhonense* que é a única espécie do MAC a utilizar o citrato como única fonte de carbono.

*Mycobacterium arosiense*, descrito por Bang *et al.*, em 2008, foi isolado a partir de lesões disseminadas em uma criança com osteomielite. Apresenta colônias lisas e escotocromogênicas. O tempo de crescimento é de 14 dias de incubação em temperaturas de 36 a 42 °C, sendo esta última a temperatura ótima de crescimento. Possui como característica bioquímica única, dentro do “Complexo” *M. avium*, teste positivo para redução do nitrato. O sequenciamento dos genes 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* e da ITS (região do espaçador interno transcrito) mostra que a cepa tipo dessa espécie pode ser diferenciada das demais espécies de micobactérias.

*Mycobacterium yongonense*, descrito em 2013 por Kim *et al.*, isolado de um paciente com doença pulmonar na Coreia. Como todas as espécies do “Complexo” *M. avium* são de crescimento lento. Suas colônias são lisas e não pigmentadas, que se

desenvolvem nas temperaturas de 25 e 37 °C, sendo esta última a temperatura ótima de crescimento. Não crescem a 45 °C. A análise do gene 16S rRNA da cepa tipo dessa espécie, mostra uma grande similaridade com as cepas tipo das espécies *M. intracellulare*, *M. chimaera* e *M. marseillense*.

*Mycobacterium indicus pranii* é conhecido desde os anos setenta, entretanto só foi descrito como espécie por Saini *et al.* em 2009. Em virtude de apresentar atividade imunomodulatória tem sido estudado, em modelo animal visando a sua utilização no tratamento da tuberculose. Atualmente há uma discussão entre os pesquisadores sobre a real posição taxonômica desse microrganismo, se é uma espécie distinta de micobactéria, uma sub-espécie ou mesmo apenas uma cepa de *Mycobacterium intracellulare* (ALEXANDER; TURENNE, 2015; RAHMAN *et al.*, 2015; GUPTA *et al.*, 2012; FAUJDAR *et al.*, 2011; SAINI, *et al.* 2009).

Das espécies desse complexo, as mais importantes do ponto de vista clínico são: *M. avium* e *M. intracellulare*, sendo a primeira mais relacionada a doença disseminada e a segunda a pneumopatias (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Até o final dos anos oitenta do século passado, a doença pulmonar causada pelo “Complexo” *M. avium* era descrita por ocorrer principalmente em idosos do sexo masculino. Entretanto, em um estudo publicado em 1989, sobre doença pulmonar causada por MAC, Prince e colaboradores verificaram que 17 (81%) dos pacientes eram mulheres com idade média de 66 anos. Reich e Johnson, cunharam o termo Síndrome da senhora Wildermere, para este tipo de doença pulmonar que acometia principalmente mulheres a partir dos 60 anos de vida. Tal termo faz referência ao personagem da peça de Oscar Wilde: “O leque da senhora Wildemere”, na qual a personagem tem o fatigante hábito de suprimir a própria tosse tornando-se assim incapaz de eliminar as secreções das vias aéreas, e com isso predispondo-se a essa infecção. Tal enfermidade apresenta infiltrados nodulares, que na maioria das vezes acometem o lóbulo médio direito ou a língula (GRIFFITH *et al.*, 2007; CHALERMSKULRAT; GILBEY; DONOHUE, 2002; REICH; JOHNSON, 1992; PRINCE *et al.*, 1989).

Dentre as espécies que fazem parte do “Complexo” *M. avium*, *M. intracellulare* é a que está mais relacionada com doenças pulmonares, entretanto, este microrganismo pode acometer diversos órgãos, tanto em pessoas imunocomprometidas como em

imunocompetentes (ZHOU *et al.*, 2013; HARAHA *et al.*, 2012; SUHLING *et al.*, 2012; WON-YOUNG *et al.*, 2012; SUNG *et al.*, 2011; GRIFFITH *et al.*, 2007).

A virulência das MNT difere entre as espécies. Um trabalho realizado na Coréia do Sul analisou 323 pacientes com doença pulmonar causada por *M. avium* e 267 com doença pulmonar causada por *M. intracellulare*, concluindo que *M. intracellulare* se mostrou mais patogênico que *M. avium*. Além disso, determinadas cepas de algumas espécies apresentam virulência exacerbada, levando a doença pulmonar progressiva e apresentando um prognóstico ruim, como é o caso de *M. intracellulare* (TATEISHI Y., *et al.*, 2012; WON-JUNG K., *et al.*, 2012; TATEISHI Y., *et al.*, 2009).

Tortoli *et al.* (2004) sugerem que *M. chimaera* possui alta virulência, o que também foi observado por Liu *et al.* (2015), ao inocular uma cepa desta espécie em camundongos, isolada de material pulmonar de um paciente infectado. Em contrapartida, Boyle *et al.* (2015), acreditam que este microrganismo é menos virulento que *M. intracellulare*, pois ao estudar pacientes com infecção causada por *M. chimaera*, observaram que mais da metade destes possuíam alguma comorbidade que favorecia este tipo de micobacteriose, diferentemente do que ocorria com pacientes infectados por *M. intracellulare*. Esta conclusão foi compartilhada por Schweickert *et al.* (2008), ao verificar que apenas 3,3% (total 97) dos pacientes com isolamento de *M. chimaera*, apresentaram doença pulmonar, enquanto que todos aqueles que tiveram isolamento de *M. intracellulare*, apresentaram micobacteriose causada por este microrganismo.

A patogenicidade de *M. chimaera* permanece incerta, mas há relatos de casos de doenças pulmonares e de infecções em válvulas cardíacas (ACHERMANN *et al.*, 2013; COHEN-BACRIE *et al.*, 2011; BILLS *et al.*, 2009).

Variações no isolamento de MNT em diferentes regiões geográficas são observadas, aumentando a incidência de determinadas espécies em diferentes regiões do mundo e de regiões dentro de um mesmo país. Na Turquia, *M. abscessus* foi a espécie mais isolada nas regiões de Istambul e Malatya, enquanto que em Ankara e Samsun, os maiores isolamentos foram de *M. kumamotonense* e *M. gordonae*, respectivamente (TORTOLI, 2014; GUNAYDIN *et al.*, 2013; JANKOVIC *et al.*, 2013; FALKINHAM III, 1996).

Variações geográficas de espécies também foram observadas no MAC, e especificamente no que concerne a *M. intracellulare/M. chimaera*. Em um estudo de

2013, *M. avium* foi mais frequente nas Américas do Norte e do Sul, em contraste com *M. intracellulare*, mais isolado na região de Queensland na Austrália, e na África do Sul (BOYLE *et al.*, 2015; HOEFSLOOT *et al.*, 2013; WALLACE JR *et al.*, 2013; SCHWEICKERT *et al.*, 2008).

Em Portugal e no Brasil, o “Complexo” *M. avium* foi o mais isolado entre as MNT, e as regiões sul e sudeste apresentaram o maior percentual de isolamento em nosso país. Em Portugal, houve um maior isolamento de “Complexo” *M. avium* na região norte do que na região de Lisboa. Em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro, o “Complexo” *M. avium* foi o segundo mais isolado, sendo precedido por *M. kansasii* (NUNES-COSTA *et al.*, 2016; MELLO *et al.*, 2013; BARRETO; CAMPOS, 2000).

Além de variações geográficas entre as espécies de MNT identificadas pelo mundo, existem também variações em relação ao sexo dos pacientes. Na América do Norte, a maioria dos pacientes com infecções pulmonares causadas por MNT, tende a ser mulheres, com o percentual variando entre 55 a 66%, dependendo da região. A média de idade entre todos os pacientes foi de 68,2 variando entre 59 a 70 anos. Na Europa a média de idade dos pacientes com essas infecções foi de aproximadamente 62,5 e a maioria dos pacientes eram do sexo masculino (57%) (PREVOTS; MARRAS, 2015).

## 2.1 MÉTODOS LABORATORIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

As técnicas em laboratório para a caracterização de espécie podem ser fenotípicas e/ou moleculares. A utilização de métodos microbiológicos para esse intento que são utilizados rotineiramente são: velocidade de crescimento, produção de pigmento, crescimento em meio de cultura com agentes inibidores e provas bioquímicas (LÉVY-FRÉBAULT; PORTAELS, 1992).

Esses métodos são demorados e não permitem uma identificação inequívoca de algumas MNT, como as descritas a partir dos anos 90, cujos autores se fundamentaram principalmente em metodologias moleculares como o sequenciamento genético.

Entre os métodos moleculares, um dos mais utilizados é o que se baseia na análise de padrões de restrição do gene *hsp65* amplificado pela PCR (PRA-*hsp65*). Esta metodologia foi descrita por Telenti *et al.* em 1993, e se caracteriza por ser econômica e produzir resultados rápidos. Entretanto, algumas espécies apresentam um mesmo padrão de restrição, sendo necessário então nesses casos, a utilização de outras técnicas em conjunto com o PRA-*hsp65* para realizar a identificação em nível de espécie. A identificação feita através da metodologia do PRA-*hsp65* não permite a distinção entre *M. intracellulare* e *M. chimaera* da maioria das cepas.

O sequenciamento é amplamente utilizado na identificação de espécies de micobactérias. Nos últimos anos, vários estudos tem sido realizados com alvos genéticos como 16S rRNA, *recA*, *rpoB*, espaçador interno transcrito ITS, *sod*, *gyrB* ou *hsp65* (TORTOLI, 2014; SAJDUDA *et al.*, 2010).

O gene *hsp65* que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa, é altamente conservado entre as espécies micobacterianas. No entanto, também apresenta regiões hipervariáveis cujas sequencias são utilizadas para fins de identificação (TORTOLI, 2003).

O gene 16S rRNA é considerada uma molécula conservada, com alterações em algumas posições que são em alguns casos, espécie-específicas e portanto constitui em um dos genes mais utilizados (CHIMARA *et al.*, 2004).

A região ITS tem se mostrado de grande utilidade para a caracterização taxonômica de micobactérias, pois é menos conservada em comparação com outros genes como o 16S rRNA (GRAY *et al.*, 2014).

Não existe um valor de corte padrão bem estabelecido para a distância mínima utilizada na interpretação dos dados do sequenciamento. No entanto, autores como Tortoli (2010) e Hall *et al.* (2003) recomendam que seja utilizado o valor mínimo de 99% de similaridade como um valor de corte para a interpretação de resultados em relação ao gene 16S rRNA. Da mesma forma, é difícil estabelecer pontos de corte para outros genes, McNabb *et al.* (2004) sugerem que a confiança na identificação da sequencia do gene *hsp65* é melhor quando a sequencia corresponde a 100% de identidade, mas segundo ele identificações corretas podem ser realizadas quando o nível de identidade for superior a 97%.

### 3 JUSTIFICATIVA

A identificação das MNT em nível de espécie é importante para determinação correta do tratamento, além do conhecimento epidemiológico.

Em virtude de *M. intracellulare* e *M. chimaera* causarem doenças, principalmente pulmonares, faz-se necessária a busca por técnicas de diagnóstico para a identificação inequívoca em nível de espécie.

Pacientes tratados para infecções causadas por *M. chimaera* foram mais propensos a ter recaída, do que aqueles tratados para infecções em quais o agente etiológico era *M. intracellulare* (BOYLE *et al.* , 2015).

A identificação das espécies do "Complexo" *M. avium* está se tornando cada vez mais importante, pois faculta a possibilidade do conhecimento de possíveis fontes de infecção ambientais, da virulência desses microrganismos, das diferenças no prognóstico da doença, e inclusive de estratégias terapêuticas específicas. Além de nos permitir conhecer as espécies mais prevalentes, assim como sua distribuição epidemiológica (GRIFFITH *et al.*, 2015, PHILLEY *et al.*, 2014, GRIFFITH *et al.*, 2007).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GERAIS

Reavaliar pelo sequenciamento a identificação de cepas previamente caracterizadas como *M. intracellulare*/*M. chimaera*, nos anos de 2014 a 2015, através da metodologia do PRA-*hsp65*.

Analisar o perfil epidemiológico dos pacientes, diagnosticados com infecções causadas por *M. intracellulare*/*M. chimaera*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sequenciar diferentes alvos genéticos (ITS, 16S rRNA e *hsp65*) para a identificação de espécie dentre aquelas caracterizadas como *M. intracellulare*/*M. chimaera* através da metodologia do PCR e análise de restrição enzimática do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*).

Verificar quais os alvos genéticos são mais apropriados para a identificação de cepas de *M. intracellulare*/*M. chimaera*, para implantação de rotina de identificação dessas cepas no laboratório do Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF).

Identificar utilizando o sequenciamento qual a espécie mais prevalente de micobactéria dentre aquelas caracterizadas como *M. intracellulare*/*M. chimaera* através da metodologia do PRA-*hsp65*.

Determinar a região geográfica, sexo, idade e o material clínico de indivíduos diagnosticados com infecções causadas por *M. intracellulare*/*M. chimaera*.

Comparar o sitio clínico e as características demográficas e epidemiológicas entre os casos de *M. intracellulare*, *M. chimaera*, e outras MNT.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo a partir de levantamento de amostras identificadas como *M. intracellulare*/*M. chimaera* entre 2014 a 2015.

### 5.2 AMOSTRAS DO ESTUDO

Neste estudo, foram utilizadas todas as cepas armazenadas no Laboratório de Referência Nacional de Bacteriologia da Tuberculose e Micobacterioses Angela Maria Werneck do Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF/ENSP/FIOCRUZ), identificadas como *M. intracellulare*/*M. chimaera*, através da metodologia PRA-*hsp65* entre 2014 a 2015, perfazendo um total de 154 amostras a partir de 66 pacientes.

### 5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão destas amostras foram os critérios microbiológicos para caracterização de micobacteriose: pelo menos duas amostras de escarro positivas, ou um lavado brônquico, ou um lavado bronco-alveolar, ou uma amostra de sítio estéril, de acordo com as recomendações da *American Thoracic Society* (GRIFFITH *et al.*, 2007).

### 5.4- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas amostras cujo DNA não se mostrou adequado para a realização das PCR necessárias para os experimentos.

### 5.5 SEQUENCIAMENTO

#### 5.5.1 Extração de DNA

A extração foi realizada conforme descrito por Campos *et al.* em 2012, se dividindo em duas fases:

#### Fase A

A partir de um cultivo em meio de cultura de Lowenstein-Jensen foi emulsionado uma alça de crescimento bacteriano, e transferida para um microtubo com capacidade para 2 ml contendo 100 µl de Glass Beads (SIGMA-ALDRICH) com 106 µm de diâmetro. A mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto e em seguida adicionado 300 µl de TE-Triton 1% (pH 8.0), e novamente agitada em vórtex por 1 minuto. Após a agitação, os microtubos foram mantidos em repouso à temperatura ambiente por 8 minutos.

#### Fase B

Foram transferidos 100 µl do tampão de lise (TE-Triton a 0,33%, Chelex 100 a 5% e Tween 20 a 0,17%) para um microtubo com capacidade de 0,5ml, e adicionados 50 µl da mistura obtida na Fase A da extração. Depois, o microtubo foi agitado em vórtex por 1 minuto.

Os microtubos foram aquecidos por 20 minutos, a 100°C e em seguida, submetidos a agitação em vórtex por 2 minutos e centrifugados a 13.000 rpm por 8 minutos, para a obtenção de duas fases distintas. O sobrenadante foi utilizado para realização da técnica da PCR.

#### 5.5.2 Reação da PCR – genes *16S* rRNA, *hsp65* e região ITS

A amplificação parcial do fragmento do gene *hsp65* de 441pb, foi realizada de acordo com o descrito por MacNabb *et al.* (2004), e se deu através do preparo de uma solução com 32,4 µL de água MiliQ estéril; 5 µL de tampão de reação 10x, 3µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 5 µL de glicerol, 0,4 µL de dNTPs (25mM), 0,2 µL da enzima *Taq* Polimerase (5U/µl) (LUDWIG BIOTEC) e 1 µL dos iniciadores Tb11 (5'-ACC AAC GAT GGT

GTG TCC AT-3') e Tb12 (5'- CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'), cujas concentrações iniciais foram de 50 pmoles/ $\mu$ L. Logo após, foi adicionado 2  $\mu$ L do DNA das amostras de micobactérias, para obter um volume final de 50  $\mu$ L. As reações de amplificação ocorreram em um termociclador Veriti Thermal Cycler (APPLIED BIOSYSTEMS–LIFE TECHNOLOGIES), com 45 ciclos de amplificação (1 min. a 94<sup>0</sup>C, 1 min. a 60<sup>0</sup> C e 1 min. a 72<sup>0</sup>C) e uma etapa de extensão (10 min. a 72<sup>0</sup>C).

A amplificação parcial do fragmento de ITS (região do espaçador interno transcrito) foi realizada de acordo com o descrito por Roth *et al.* (1998), e se deu através do preparo de uma solução com 32,4  $\mu$ L de água MiliQ estéril; 5  $\mu$ L de tampão de reação 10x, 3 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50mM), 5  $\mu$ L de glicerol (100x), 0,4  $\mu$ L de dNTPs (25mM), 0,2  $\mu$ L da enzima *Taq* Polimerase (5U/ $\mu$ l) (LUDWIG BIOTEC) e 1  $\mu$ L dos iniciadores Ec16S (5'- TTG TAC ACA CCG CCC GTC -3') e Mb23S (5'- TCT CGA TGC CAA GGC ATC CAC C -3'), cujas concentrações iniciais foram de 50 pmoles/ $\mu$ L. Logo após, foi adicionado 2  $\mu$ L do DNA das amostras de micobactérias, para obter um volume final de 50  $\mu$ L. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador Veriti Thermal Cycler (APPLIED BIOSYSTEMS–LIFE TECHNOLOGIES), com tempo de desnaturação inicial de 95<sup>0</sup>C por 5 min. e 38 ciclos de: 94<sup>0</sup>C por 1 min., anelamento a 62<sup>0</sup>C por 1 min. e extensão a 72<sup>0</sup>C por 1 min.

A amplificação parcial do fragmento 16S rRNA foi realizada de acordo com o descrito por Hall *et al.* (2003), e se deu através do preparo de uma solução com 32,4  $\mu$ L de água MiliQ estéril; 5  $\mu$ L de tampão de reação 10x, 3 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50mM), 5  $\mu$ L de glicerol (100x), 0,4  $\mu$ L de dNTPs (25mM), 0,2  $\mu$ L da enzima *Taq* Polimerase (5U/ml) (LUDWIG BIOTEC) e 1  $\mu$ L de cada iniciador 16SF (5'- TGG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') e 16SR (5'- TAC CGC GGC TGC TGG CAC -3'). Logo após, foi adicionado 2  $\mu$ L do DNA das amostras de micobactérias, para obter um volume final de 50  $\mu$ L. As reações de amplificação foram realizadas a partir da desnaturação inicial de 95<sup>0</sup>C por 5 min. e de 35 ciclos de amplificação (30 seg. a 95<sup>0</sup>C, 30 seg. a 62<sup>0</sup> C e 45 seg. a 72<sup>0</sup>C) e uma etapa de extensão (10 min. a 72<sup>0</sup>C).

### 5.5.3 Separação Eletroforética

A separação eletroforética dos fragmentos amplificados foi realizada em géis de agarose a 2%, em Tampão TBE 1X, em cubas (LOCCUS BIOTECNOLOGIA) LCH 13x15cm ou LCH 7x8cm. Em cada poço do gel foi adicionado e misturado os seguintes reagentes: 2  $\mu$ L de Tampão Azul de Bromofenol (ABF), 1  $\mu$ L do corante Gel Red (1:500) (BIOTIUM) e 5  $\mu$ L da amostra da PCR (cerca de 100 a 200 ng). Como controle, foi utilizado, em uma canaleta, o marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (EASY PATH). A separação eletroforética ocorreu a 90 Volts/cm por aproximadamente 1 hora. Depois disso, o gel foi retirado da cuba, e lavado em água corrente. Depois, cada gel foi transferido para um transiluminador e observado sob luz UV. As imagens dos géis foram digitalizadas com dispositivo de gel captura MiniBIS Pro (DNR BIO-IMAGING SYSTEMS).

A determinação aproximada do tamanho dos fragmentos foi estimada comparando-se a corrida da amostra em questão com a dos fragmentos do marcador de peso molecular.

### 5.5.4 Purificação dos produtos da PCR

A purificação dos produtos da PCR foi realizada com o ExoSAP-IT PCR Clean up Kit (AFFYMETRIX). Foi adicionado um volume de 2 $\mu$ L de ExoSAP-IT em cada poço de uma microplaca com 96 poços, e em seguida, adicionado 5  $\mu$ L de cada DNA alvo. Depois, ocorreu a centrifugação por 30 segundos a 13.000 rpm e posteriormente, colocada a placa em um termociclador por 15 min. a 37°C seguido de mais 15 min. a 80°C para a inativar as enzimas. Ao término, a placa foi centrifugada novamente por 30 segundos e em seguida, vedada com fita adesiva para ser estocada no freezer a -20°C até a sua utilização.

### 5.5.5 Reações de Sequenciamento

Foram preparadas duas reações separadas, uma para cada iniciador, contendo 1,5  $\mu$ L de Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS), 1,0

$\mu\text{L}$  do tampão de diluição 5X, água q.s.p., 4,0  $\mu\text{L}$  do iniciador Tb11 ou Tb12 (0,8 pmoles/ $\mu\text{L}$ ) e 2,0  $\mu\text{L}$  do produto da PCR purificado. Os três primeiros reagentes foram homogeneizados, para formar uma mistura para cada iniciador e colocada em cada um dos poços da microplaca. Depois, foram adicionados 2,0  $\mu\text{L}$  do produto da PCR purificado, então a placa foi levada ao termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (APPLIED BIOSYSTEMS), para ocorrer a reação de sequenciamento com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial de 96°C por 1 min. e 25 ciclos de amplificação (10 seg. a 96°C, 5 seg. a 50°C e 4 minutos. a 60°C).

#### 5.5.6 Precipitação dos produtos da Reação de Sequenciamento

Após a reação de extensão, os poços da placa passaram a conter o DNA e iniciadores não incorporados, por isso, foi necessário separar o DNA alvo desses outros compostos através da precipitação.

A placa, nesse momento foi submetida à breve centrifugação, até atingir 6.000 rpm, em microcentrífuga (EPPENDORF) e depois, foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75% em cada poço e agitado em vórtex por 10 segundos. A placa, então foi mantida em repouso por 15 minutos ao abrigo da luz. Após esse procedimento, foi centrifugada por 1 hora à 2.800 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 50  $\mu\text{L}$  de etanol 75% em cada poço da placa, e novamente centrifugada por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa colocada invertida sobre uma toalha de papel absorvente e centrifugada brevemente. Depois foi deixada ao abrigo da luz no termociclador MJ96+/MJ96G (BIOCYCLER) a 60°C por 10 minutos para a evaporação do álcool (a tampa do termociclador permaneceu aberta durante esse período).

#### 5.5.7 Desnaturação

Após o processo de precipitação, os produtos da reação de sequenciamento passaram pela etapa de desnaturação, que consiste na separação da dupla fita de DNA. Para isto, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de formamida HI-DI (APPLIED BIOSYSTEMS) em cada poço da placa e submetida à breve centrifugação (que é interrompida quando se atinge aproximadamente 600 rpm). A placa, então foi colocada no termociclador

MJ96+/MJ96G (BIOCYCLER) à 95°C por 3 minutos. Após a desnaturação, a placa foi colocada em um recipiente com gelo por 10 minutos e novamente submetida à breve centrifugação. Após esse procedimento foi levada ao sequenciador modelo 3130 (APPLIED BIOSYSTEMS) para a eletroforese.

#### 5.5.8 Análise de Sequencias

As sequencias obtidas foram editadas com o auxílio do programa Chromas Pro versão 1.42 (TECHNELYSIUM, PTY LTD), disponível na internet no endereço eletrônico ([www.technelysium.com.au/ChromasPro.html](http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html)). Posteriormente, as sequencias foram comparadas com sequencias provenientes de cepas tipo obtidas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) disponível na internet no endereço eletrônico (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 5.5.9 Análise filogenética

Para a distinção das espécies cujos resultados do sequenciamento dos três alvos genéticos foram discordantes foi construída uma árvore filogenética para determinar a real espécie de micobactéria a qual a amostra deve ser associada.

A análise filogenética foi construída de forma concatenada, a partir da sequencia obtida dos três alvos genéticos, utilizando o algoritmo de neighbor-joining e o software MEGA versão 7 e modelo de substituição Kimura 2-parametros. A topologia da árvore foi testada a partir da realização de 1000 repetições de bootstrap. Foi utilizada a sequencia da amostra mais antiga de cada paciente para a sua construção e a amostra tipo de *Mycobacterium abscessus* CIP 104536 foi utilizada como outgroup, para o enraizamento da arvore (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016; DEVULDER; PE'ROUSE DE MONTCLOS; FLANDROIS, 2005; KIMURA, 1980).

## 5.6 VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS

Foram analisadas as seguintes variáveis nesse estudo: sexo (masculino ou feminino), idade (de forma contínua e por faixa etária: de 20-39, 40-59 e +60), região do Brasil (Sul, Sudeste, Centro-oeste, Norte e Nordeste), sítio clínico das amostras (pulmonar ou extra pulmonar), espécie de MNT identificada (*M. intracellulare*, *M. chimaera* ou outra).

### 5.6.1 Fonte de Dados

Os dados relativos as cepas foram produzidos a partir de experimentos realizados com o DNA destas.

Foram acessados dados de amostras processadas no Centro de Referência Professor Hélio Fraga contidos no banco de dados do Gal (Gerenciador de Ambiente Laboratorial), disponível na página eletrônica (<https://gal.fiocruz.sus.gov.br/>).

### 5.6.2 Análise de Dados

Foi realizada uma análise descritiva das variáveis do estudo através de medidas de tendência central (media, mediana e desvio padrão) para variáveis contínuas e de frequências relativas e absolutas para as variáveis categóricas. Foram realizados os testes estatísticos de Exato de Fisher quando indicado para variáveis contínuas e o teste qui-quadrado para as variáveis categóricas. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

Os dados foram estruturados e organizados em planilhas Microsoft Excel 2010 (MICROSOFT CORP., REDMOND, WA, USA) e para as análises estatísticas foi usado o Software estatístico *IBM SPSS* versão 20.0. Estes dados foram apresentados em forma de tabelas e gráficos.

## 6 ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de um estudo com número amostral grande (154 amostras de 66 pacientes) e de base de dados secundários, ou seja, o pesquisador responsável não teve nenhum contato direto com o paciente, consideramos que não era necessária a utilização de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aos sujeitos da pesquisa. Entretanto foi solicitada a anuência e a autorização para acesso ao banco de dados do GAL, ao chefe do departamento no qual foi realizada a pesquisa.

O estudo só foi iniciado após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fiocruz, sob o número na Plataforma Brasil : CAAE 54075216.3.0000.5240.

## 7 RESULTADOS

Foram sequenciados os três alvos genéticos (genes 16S rRNA, *hsp65* e a região ITS) das 154 amostras de 66 pacientes. Não foi observada variação no resultado da identificação entre amostras diferentes de um mesmo paciente. As amostras dos pacientes CRPHF 17, CRPHF 27 e CRPHF 57 foram excluídas do estudo pois o DNA das suas amostras não se mostraram apropriados para a realização da PCR e consequentemente do sequenciamento.

A análise das sequencias do gene *hsp65* mostraram, que do total de pacientes do estudo, 60 pacientes apresentaram maior identidade com a cepa tipo de *M. intracellulare* (variando de 99,05 - 100%). Três apresentaram maior identidade com a cepa tipo de *M. chimaera* (100%), 2 com a cepa tipo de *M. marseillense* (100%) e 1 com a cepa tipo de *M. timonense* (99,50%) (tabela 1).

O sequenciamento da região ITS evidenciou que 57 pacientes apresentaram maior identidade com a cepa tipo de *M. intracellulare* (variando de 95 - 100%), sendo que 48 desses tiveram identidade igual ou acima de 99%. Cinco com a cepa tipo de *M. chimaera* (99,78 - 100%), 2 com a cepa tipo de *M. marseillense* (99,64%), 1 com a cepa tipo de *M. timonense* (99,28%) e 1 com cepa tipo de *M. yongonense* ( 100%) (tabela 1).

Em relação ao gene 16S rRNA, verificamos que 57 pacientes tiveram maior identidade com a cepa tipo de *M. intracellulare* (98,81 - 100%), e desses 53 apresentaram identidade igual ou acima de 99%. Seis pacientes com a cepa tipo de *M. chimaera* (99,39 - 100%) e 3 com a cepa tipo de *M. timonense* (99,57 - 100%) (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado do Sequenciamento nos três alvos estudados.

Paciente	Número Amostras	<i>hsp65</i>	ITS	16S rRNA
CRPHF 1	1	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,74% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 2	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 3	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,64% de id com <i>M. marseillense</i> 5356591 <sup>T</sup>	99,79% de id com <i>M. timonense</i> 5351974 <sup>T</sup>
CRPHF 4	1	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 5	6	99,50% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 6	1	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 7	2	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98,77% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 8	2	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>	99,39% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>
CRPHF 9	2	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,57% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,72% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 10	2	99,50% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 11	5	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>

CRPHF 12	1	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 14	2	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,18% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,77% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 15	1	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. yongonense</i> 05-1390 <sup>T</sup>	99,40% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>
CRPHF 16	2	99,05% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98,52% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,40% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 18	10	100% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>	99,78% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>
CRPHF 19	1	99,50% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,35% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 20	1	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,56% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 21	2	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,36% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,36% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 22	2	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 23	3	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 24	2	99,50% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 25	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,72% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>

CRPHF 26	2	99,50% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 28	2	100% de id com <i>M. marseillense</i> 5356591 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,72% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 29	4	99,50% de id com <i>M. timonense</i> 5351974 <sup>T</sup>	99,28% de id com <i>M. timonense</i> 5351974 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. timonense</i> 5351974 <sup>T</sup>
CRPHF 30	1	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	96,43% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,77% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 31	2	98,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98,81% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 32	3	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 33	1	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 34	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,52% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 35	5	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,56% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 36	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 37	2	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98,92% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98,83% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 38	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>

CRPHF 39	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,74% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 40	1	99,05% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98,92% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98,82% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 41	2	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,57% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 42	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,72% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,77% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 43	2	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98% de id com <i>M.</i> <i>intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 44	3	100% de id com <i>M. marseillense</i> 5356591 <sup>T</sup>	99,64% de id com <i>M. marseillense</i> 5356591 <sup>T</sup>	99,57% de id com <i>M. timonense</i> 5351974 <sup>T</sup>
CRPHF 45	2	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 46	1	100% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>
CRPHF 47	2	99,50% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,72% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,57% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 48	2	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,12% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 49	1	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	95% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 50	3	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,77% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>

CRPHF 51	1	99,50% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 52	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 53	3	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 54	2	100% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>	99,78% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>	99,72% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>
CRPHF 55	3	99,50% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 56	2	99,50% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 55	1	99,05% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,13% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 58	2	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,72% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 59	4	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 60	4	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 61	3	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,62% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,53% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 62	1	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98,66% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>

CRPHF 63	3	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	98,89% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 64	2	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,49% de id com <i>M. chimaera</i> DSM 44623 <sup>T</sup>
CRPHF 65	1	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 66	2	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 67	1	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,72% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 68	5	99,75% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	100% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>
CRPHF 69	2	99,25% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,78% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>	99,78% de id com <i>M. intracellulare</i> ATCC13950 <sup>T</sup>

De 141 amostras isoladas de 59 pacientes (89,4%) apresentaram o mesmo resultado de identificação em todos os três alvos genéticos estudados. No entanto, 13 amostras isoladas de 7 pacientes (10,6%) apresentaram divergência de resultado em pelo menos um dos três alvos estudados, ou seja, o sequenciamento mostrou maior identidade com a cepa tipo de espécies diferentes (Tabela 2).

Tabela 2. Amostras que apresentaram resultados divergentes em um dos três alvos estudados.

Paciente	Amostra	<i>hsp65</i>	ITS	16S rRNA
CRPHF 3	PR128923	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. marseillense</i>	<i>M. timonense</i>
	PR128924	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. marseillense</i>	<i>M. timonense</i>
CRPHF 8	RS125933	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>	<i>M. chimaera</i>
	RS125934	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>	<i>M. chimaera</i>
CRPHF 15	RJ137519	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. yongonense</i>	<i>M. chimaera</i>
CRPHF 28	GO133510	<i>M. marseillense</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
	GO133511	<i>M. marseillense</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
CRPHF 44	TO100031	<i>M. marseillense</i>	<i>M. marseillense</i>	<i>M. timonense</i>
	TO100032	<i>M. marseillense</i>	<i>M. marseillense</i>	<i>M. timonense</i>
	TO100033	<i>M. marseillense</i>	<i>M. marseillense</i>	<i>M. timonense</i>
CRPHF 51	MA122148	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i>
CRPHF 64	PR 75243	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
	PR 75244	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>

Estes resultados divergentes foram resolvidos após a construção da árvore filogenética, que demonstrou qual era a espécie de micobactéria destas cepas. Os pacientes CRPHF28 (amostra GO133510) e CRPHF64 (amostra PR 75243), tiveram suas amostras caracterizadas taxonomicamente como *M. intracellulare*, os pacientes CRPHF8 (RS125933) e CRPHF51 (MA122148) como *M. chimaera*, os pacientes CRPHF3 (PR128923) e CRPHF44 (TO100031) como *M. marseillense* e o paciente CRPHF15 (RJ137519) como *M. yongonense* (Figura 2).

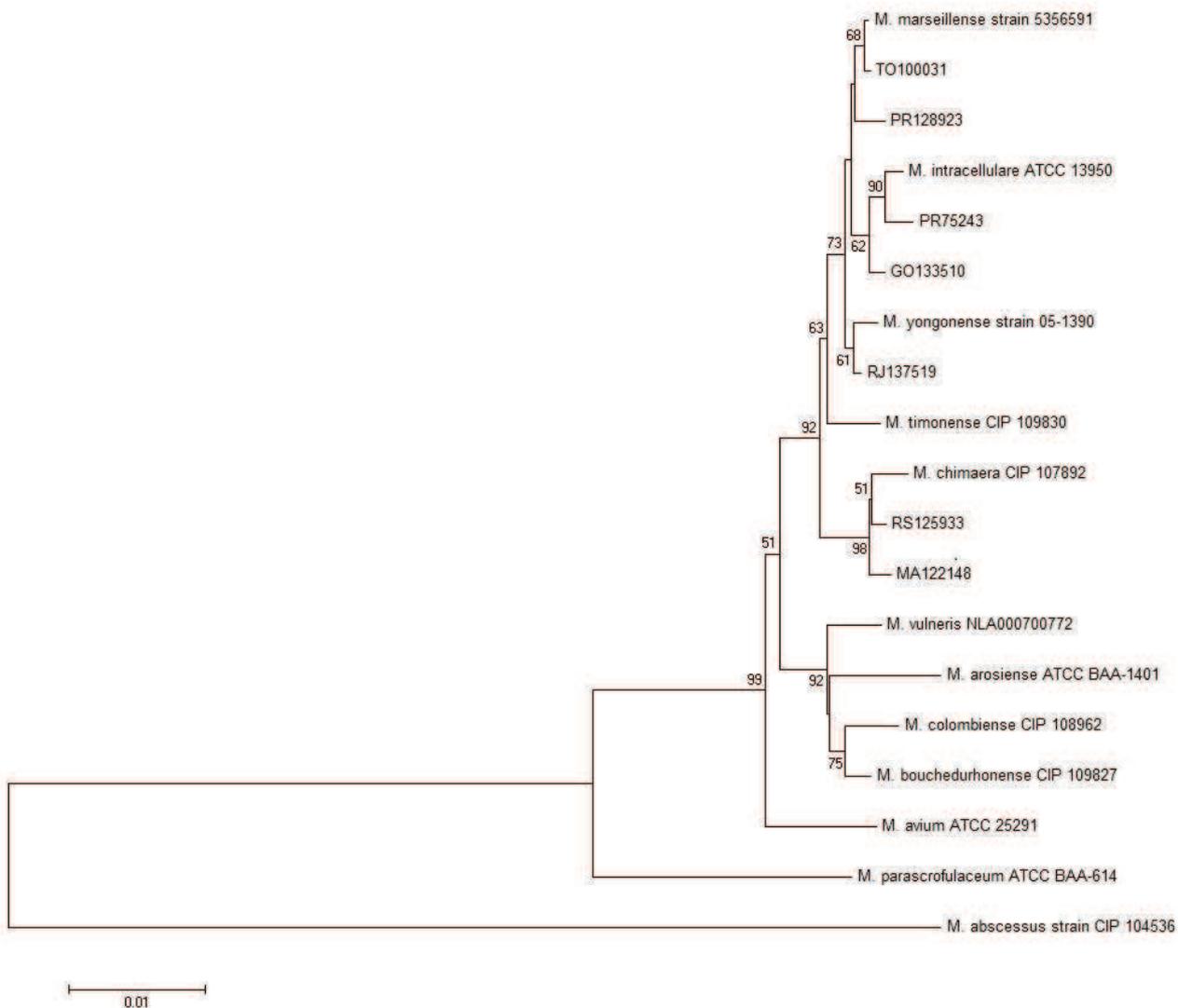


Figura 2. Árvore filogenética concatenada construída a partir das sequências dos genes, hsp65, 16S rRNA e da região ITS através da metodologia neighbour joining. Os valores de bootstrap foram calculados a partir de 1000 repetições e exibidos aqueles superiores a 50. A sequência de *M. abscessus* CIP 104536 foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. A barra indica o número de substituições por posição de nucleotídeos.

Após o sequenciamento e a análise filogenética foi evidenciado que dos 66 pacientes investigados, 57 (86,4%) foram identificados como *M. intracellulare*, 5 (7,6%) como *M. chimaera*, 2 (3,0%) como *M. marseillense*, 1 (1,5%) como *M. timonense* e 1 (1,5%) como *M. yongonense* (Figura 3).

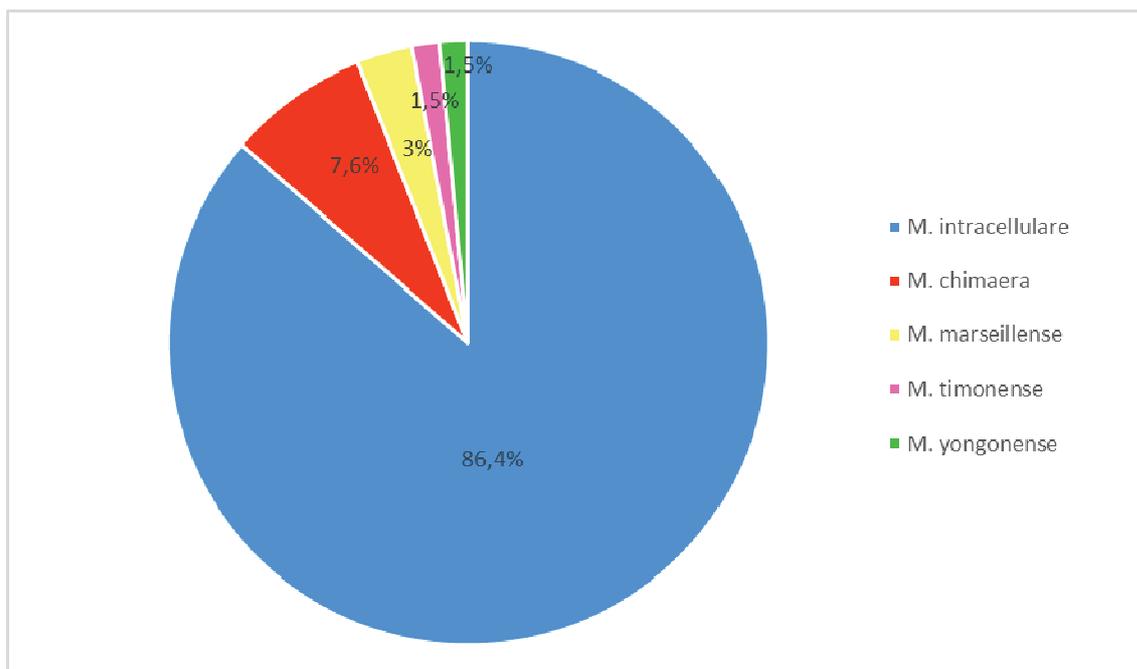


Figura 3. Gráfico das espécies identificadas através da técnica do sequenciamento e árvore filogenética.

De acordo com o sítio de isolamento, 153 amostras eram espécimes de origem pulmonar e apenas 1 era proveniente de material extra pulmonar (líquor).

Em relação a região geográfica, 21 (31,8%) pacientes foram provenientes da região sul, seguido de 16 (24,2%) do sudeste, 15 (22,7%) do centro-oeste, 13 (19,7%) do nordeste, e 1 (1,5%) paciente da região norte (Figura 4).

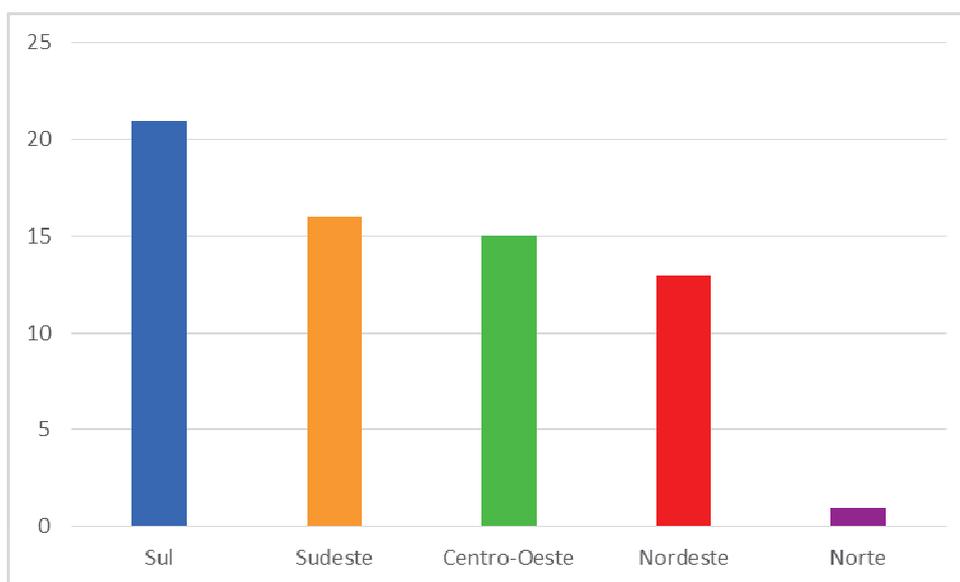


Figura 4. Gráfico da distribuição geográfica dos pacientes do estudo.

Dos 66 pacientes analisados, 45 (68,2%) eram do sexo masculino e 21 (31,8%) do sexo feminino.

A idade dos pacientes variou de 26 a 87 anos, sendo que a média foi de 62 anos e a mediana 61,5 anos. A média de idade foi maior entre os indivíduos do sexo feminino 65,9 (DP:  $\pm 14,98$ ) anos e 60,2 (DP:  $\pm 13,9$ ) anos para o sexo masculino. Já a mediana para mulheres foi 67 anos e para os homens 59 anos (Figura 5). A análise da diferença entre idade e sexo apresentou uma significância *borderline* (Teste Exato de Fisher: p-valor= 0,055).

A análise da idade por região geográfica, mostrou que a média e a mediana foram muito semelhantes entre todas as regiões, sendo levemente maior na região sudeste. A região norte, contribuiu com apenas um paciente de 80 anos (Figura 6).

As médias de idade entre as diferentes espécies, foram muito próximas, variando entre 55,6 a 63,5, sendo que os pacientes que tiveram suas amostras identificadas como *M. chimaera*, obtiveram a média e mediana mais baixas (Figura 7). Não apresentando diferença significativa ao comparar as médias por espécie (Teste Exato de Fisher: p-valor= 0,10)



Figura 5. Boxplot da idade (anos) por sexo, Brasil, 2014 a 2015.

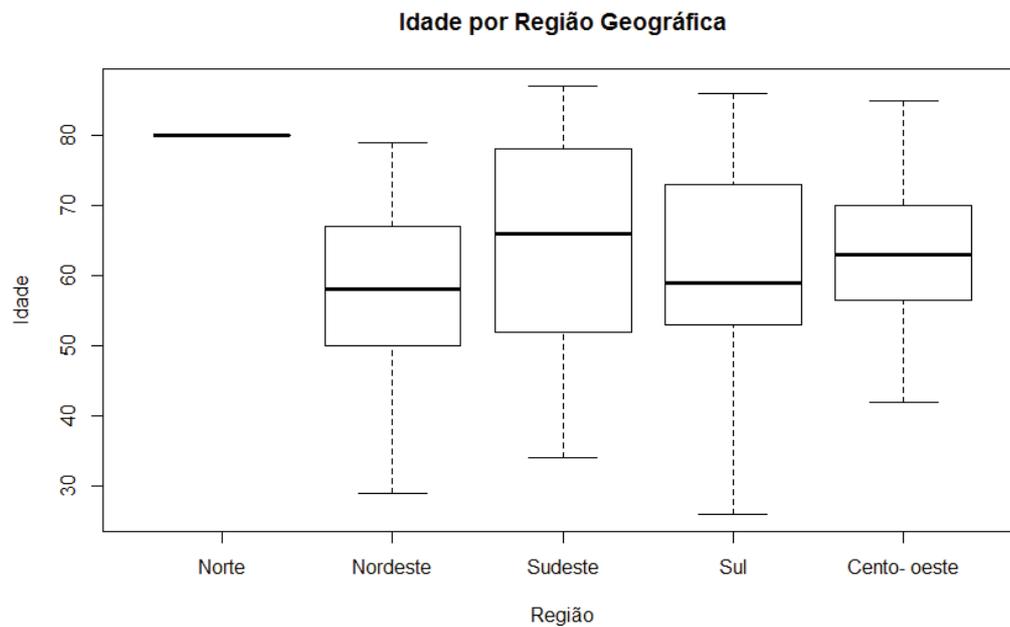


Figura 6. Boxplot da idade (anos) por região geográfica, Brasil, 2014 a 2015.

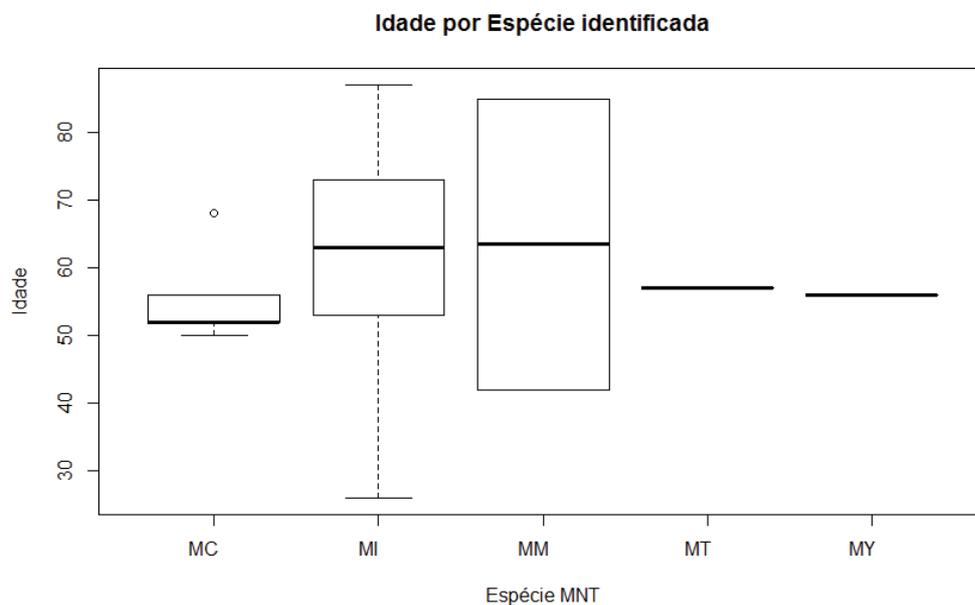


Figura 7. Boxplot da idade (anos) por espécie de micobactéria, Brasil, 2014 a 2015.

MC- *M. chimaera*; MI- *M. intracellulare*; MM- *M. marseillense*; MT- *M. timonense*; MY- *M. yongonense*.

Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos quando foram comparadas as espécies identificadas com as variáveis do estudo (Tabela 3). Entretanto, ao analisarmos a distribuição dos casos segundo sexo por região geográfica identificou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 4$ ; p-valor=0,004). Na maioria das regiões foram mais frequentes os casos entre os indivíduos do sexo masculino, entretanto, na região nordeste foi mais frequente entre o sexo feminino, com o percentual de 76,9% (Tabela 4).

Tabela 3. Características clínico-epidemiológicas segundo sexo, faixa etária, região, material clínico por espécies identificadas, Brasil, 2014 a 2015.

	Espécie identificada										Total	Teste $\chi^2$	p-valor
	M.chimaera		M.intracellulare		M.marseillense		M.timonense		M.yongonense				
<b>Sexo</b>	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		$\chi^2 =$	
Feminino	2	40,0	18	31,6	1	50	0	0	0	0	0	3,699	0,448
Masculino	3	60,0	39	68,4	1	50	1	100	1	100	0		
<b>Faixa etária</b>												$\chi^2 =$	
20-39	0	0,0	4	7,0	0	0	0	0	0	0	0	7,066	0,53
40-59	4	80,0	20	35,1	1	50	1	100	1	100	0		
60+	1	20,0	33	57,9	1	50	0	0	0	0	0		
<b>Região</b>												$\chi^2 =$	
Centro-oeste	2	40,0	12	21,1	1	50	0	0	0	0	0	16	0,729
Norte	0	0,0	1	1,8	0	0	0	0	0	0	0		
Nordeste	2	40,0	10	17,5	0	0	1	100	0	0	0		
Sul	1	20,0	19	33,3	1	50	0	0	0	0	0		
Sudeste	0	0,0	15	26,3	0	0	0	0	1	100	0		
<b>Material clínico</b>												$\chi^2 =$	
Extra pulmonar	0	0,0	1	1,8	0	0	0	0	0	0	0	4	0,997
Pulmonar	5	100,0	56	98,2	2	100	1	100	1	100	0		
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>100</b>	<b>57</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>66</b>		

Tabela 4. Características clínico-epidemiológicas segundo sexo, faixa etária, espécie identificada, material clínico por região geográfica, Brasil, 2014 a 2015.

	REGIÃO GEOGRÁFICA												Teste $\chi^2$	p-valor
	Centro-Oeste		Norte		Nordeste		Sul		Sudeste		Total			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>Sexo</b>													$\chi^2 = 4$	<b>0,004*</b>
Feminino	3	20,0	0	0	10	76,9	4	19,0	4	25,0	<b>21</b>	<b>31,8</b>		
Masculino	12	80,0	1	100	3	23,1	17	81,0	12	75,0	<b>45</b>	<b>68,2</b>		
<b>Faixa etária (anos)</b>													$\chi^2 = 8$	0,867
20-39	0	0,0	0	0	1	7,7	2	9,5	1	6,3	<b>4</b>	<b>6,1</b>		
40-59	6	40,0	0	0	6	46,2	10	47,6	5	31,3	<b>27</b>	<b>40,9</b>		
60+	9	60,0	1	100	6	46,2	9	42,9	10	62,5	<b>35</b>	<b>53,0</b>		
<b>Material biológico</b>													$\chi^2 = 4$	0,703
Pulmonar	15	100,0	1	100	13	100,0	20	95,2	16	100,0	<b>65</b>	<b>98,5</b>		
Extra-Pulmonar	0	0,0	0	0	0	0,0	1	4,8	0	0,0	<b>1</b>	<b>1,5</b>		
<b>Espécie identificada</b>													$\chi^2 = 16$	0,705
M.chimaera	2	13,3	0	0	2	15,4	1	4,8	0	0,0	<b>5</b>	<b>7,6</b>		
M.intracellulare	12	80,0	1	100	10	76,9	19	90,5	15	93,8	<b>57</b>	<b>86,4</b>		
M.marseillense	1	6,7	0	0	0	0,0	1	4,8	0	0,0	<b>2</b>	<b>3,0</b>		
M.timonse	0	0,0	0	0	1	7,7	0	0,0	0	0,0	<b>1</b>	<b>1,5</b>		
M.yongonense	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0	1	6,3	<b>1</b>	<b>1,5</b>		
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>13</b>	<b>100</b>	<b>21</b>	<b>100</b>	<b>16</b>	<b>100</b>	<b>66</b>	<b>100</b>		

## 8 DISCUSSÃO

*M. intracellulare*/ *M. chimaera* é comumente encontrado no Brasil, entretanto são escassos os trabalhos em nosso país que façam a distinção dessas espécies proximamente relacionadas. Costa *et al.* em 2010, relataram 16 cepas provenientes de cinco pacientes identificados através da metodologia do PRA-*hsp65* que, após análise por sequenciamento, exibiram maior similaridade com *M. intracellulare*. Cândido *et al.*, em 2014, encontraram duas amostras também identificados através da metodologia do PRA-*hsp65*, cuja identificação após o sequenciamento foi atribuída a espécie *M. marseillense*.

Schweickert *et al.* (2008), em um trabalho realizado na Alemanha observaram que dos 166 isolamentos identificados primeiramente como *M. intracellulare*, 143 (86%) eram na verdade cepas da espécie *M. chimaera*, 20 (12%) *M. intracellulare* e 3 (1,8%) de outras espécies do MAC, após a identificação ser feita por sequenciamento.

Wallace Jr. *et al.* (2013) analisaram, nos Estados Unidos, 54 isolamentos pulmonares identificados anteriormente como *M. intracellulare*. Após a realização do sequenciamento verificaram, que 49 (90.7%) eram realmente cepas da espécie *M. intracellulare*, 4 (7.4%) *M. chimaera*, e 1 (1.8%) *M. avium*. Em um outro estudo, também realizado nos Estados Unidos, com os isolados pulmonares de MAC de 488 pacientes verificou-se, através da metodologia do sequenciamento que 54% eram cepas de *M. avium*, 28% de *M. chimaera* e 18% de *M. intracellulare* (BOYLE, 2015).

Assim sendo, desses trabalhos internacionais, o realizado por Wallace Jr. *et al.* (2013) foi o único que apresentou resultados semelhantes ao nosso, considerando que encontraram também como espécie predominante, *M. intracellulare* com valor percentual muito próximo ao que encontramos em nosso estudo. Da mesma forma, a segunda espécie mais encontrada foi *M. chimaera*, com valor quase igual ao que verificamos.

Existem somente dois casos de relatos de doenças causadas por *M. marseillense* descritos na literatura. O primeiro ocorreu em um paciente com infecção pulmonar na Itália, porém, só cinco anos depois do diagnóstico, após a realização do sequenciamento, o seu verdadeiro agente etiológico foi identificado, pois este havia sido

anteriormente caracterizado como *M. intracellulare*. O outro caso, também de origem pulmonar, aconteceu na Coreia em um paciente com lúpus sistêmico eritematoso, que como no caso anterior, só teve a identificação de espécie caracterizada após a realização do sequenciamento, pois a metodologia utilizada inicialmente não havia sido capaz de identificar qual era a espécie de micobactéria (GROTOLLA *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014). Esses fatos reforçam a necessidade da utilização do sequenciamento para a identificação em nível de espécie de micobactérias geneticamente similares, como é o caso do “Complexo” *M. avium*.

No Brasil, em um estudo no Rio de Janeiro em pacientes com fibrose cística, com idade variando de 0 a 18 anos, somente duas amostras dessa espécie foram identificadas (CÂNDIDO *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, identificamos dois casos de *M. marseillense* cujos pacientes em questão, também apresentaram infecções pulmonares. Em ambos os casos, os pacientes eram do sexo feminino, diferentemente do ocorrido nos casos acima relatados, sendo que a idade dos pacientes por nós estudados, foram de 85 e 42 anos e no relato da Itália 65 e na Coreia de 56 anos.

*M. timonense* foi identificado nas culturas de líquido sinovial e biópsia de um paciente no Equador com artrite e AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) com 44 anos, havendo nesse caso também a necessidade do sequenciamento para a identificação da espécie de MNT (ZURITA *et al.*, 2014). No Brasil, foi relatada uma amostra de *M. timonense*, cuja identificação prévia através da metodologia do PRA-*hsp65* havia sido atribuída a *M. fortuitum tipo 2* (CÂNDIDO *et al.*, 2014). No nosso estudo, a única cepa encontrada desta espécie foi proveniente de um paciente do sexo masculino, de 57 anos e o material clínico era de origem pulmonar.

O resultado mais expressivo que observamos, foi a identificação de uma cepa da espécie *M. yongonense* causando infecção em um paciente do sexo masculino com 56 anos, que apresentava infecção pulmonar. Essa espécie foi descrita em 2013, a partir de um paciente com doença pulmonar, na Coreia. No mesmo ano, houve um relato na Itália de duas pacientes, ambas com 74 anos que apresentaram infecção pulmonar causada por essa micobactéria. Até onde sabemos, não houveram outros relatos de doenças causadas por *M. yongonense* (KIM, *et al.*, 2013; TORTOLI, *et al.*, 2013), dessa forma, relatamos pela primeira vez essa espécie no continente americano.

A árvore filogenética permitiu a identificação de todas as amostras que apresentaram resultados divergentes, pois todas elas se distribuíram em clados compostos por uma única cepa tipo, apesar dos valores de bootstrap encontrados, não serem na sua maioria altos (acima de 90).

Todos os alvos estudados parecem ser úteis para a identificação de espécies desse grupo, visto que 92,4% do total dos pacientes tiveram suas amostras identificadas através do sequenciamento dos genes *hsp65* e 16S rRNA. A região ITS apresentou valores ainda superiores, pois 100% dos pacientes tiveram suas amostras identificadas através do sequenciamento dessa região. Para esse cálculo consideramos os resultados encontrados em todas as amostras, mesmo naquelas as quais foi verificada valores de identidade baixos. Nesse caso, a identificação foi confirmada pelos valores de identidade dos outros dois alvos ou através da análise filogenética.

Dessa forma, a região ITS parece ser o melhor alvo genético para a identificação desse grupo de espécies. Esse resultado está de acordo com o relatado por Torloli (2010) e Mijs *et al.* (2002), que se referem a essa região como especialmente útil na diferenciação de espécies do “Complexo” *M. avium*. O que nos leva a propor, a partir dos resultados obtidos, o seguinte fluxograma para identificação de cepas de *M. intracellulare*/*M. chimaera*, no Laboratório de Referência Nacional de Bacteriologia da Tuberculose e Micobacterioses Angela Maria Werneck do Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF/ENSP/FIOCRUZ).

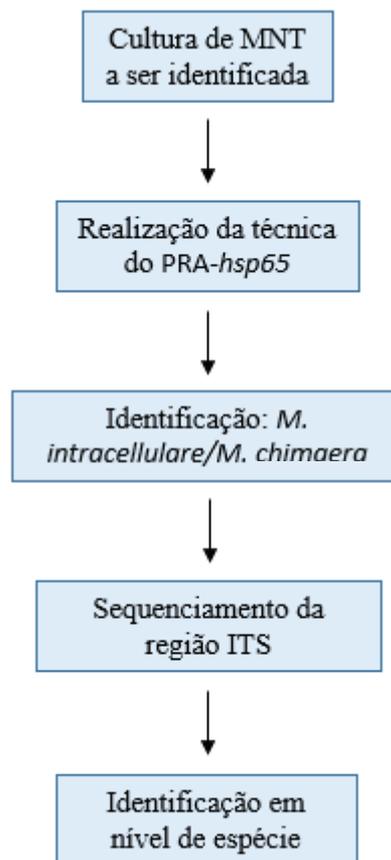


Figura 8. Fluxograma para identificação através da técnica do sequenciamento da região ITS de cepas de *M. intracellulare/ M. chimaera*.

Em relação aos dados epidemiológicos de indivíduos com infecções causadas por *M. intracellulare/ M. chimaera*, Boyle *et al.* (2015), observaram que entre os pacientes por eles estudados, com doença pulmonar causada pelo "Complexo" *M. avium*, aqueles que tiveram suas amostras identificadas como *M. intracellulare* 66 (82%) eram mulheres e 15 (18%) homens. Enquanto que nos pacientes infectados por *M. chimaera*, 73 (58%) eram do sexo feminino e 53 (42%) do sexo masculino. A média de idade entre todos os pacientes com micobacteriose causada por *M. intracellulare* foi de 65,1 anos e de 62,1 para aqueles com *M. chimaera*.

Kin *et al.* (2013) relataram que entre 70 pacientes com doença pulmonar, nos quais o agente etiológico identificado foi *M. intracellulare*, 44 (62,9%) eram mulheres e 23 (37,1%) homens. A média de idade entre o total de pacientes estudados foi de 61 anos.

Um recente estudo realizado na Coréia do Sul, com 11 pacientes apresentando micobacteriose pulmonar causada por *M. chimaera*, constatou que a média de idade era de 59 anos e que 7 (64%) eram mulheres (MOON, *et al.*, 2016).

Nesses três últimos estudos citados, a média de idade foi muito similar entre eles, e também em relação ao nosso trabalho, que foi de 62 anos. Entretanto a maioria dos casos daqueles trabalhos ocorreram em mulheres, diferentemente do que por nós foi observado. Porém quando se considera a distribuição dos casos segundo sexo por região geográfica, notamos que a região nordeste teve a predominância dos casos entre pacientes do sexo feminino.

Em nosso país, não há estudos que analisem dados epidemiológicos de pacientes infectados por *M. intracellulare*/ *M. chimaera*. Porém, considerando todas as MNT, um estudo realizado no Rio de Janeiro verificou que entre 173 pacientes com micobacteriose pulmonar, 62% eram do sexo masculino, e a média de idade considerando ambos os sexos foi de 55 anos. Em um outro estudo no Pará, com 29 pacientes acometidos de doença pulmonar causada por MNT, 72% eram do sexo feminino e a média de idade para todos os pacientes foi de 52,3 anos. Esse último estudo, referente aos achados de MNT no Pará, no que se refere a sexo, foi semelhante ao encontrado em nosso estudo, que demonstrou um maior adoecimento por *M. intracellulare*/ *M. chimaera* entre as mulheres da região nordeste do Brasil (PREVOTS; MARRAS, 2015; FUSCO DA COSTA, *et al.*, 2013; MELLO, *et al.*, 2013).

Barreto e Campos (2000), realizaram trabalho no qual analisaram amostras enviadas ao CRPHF para identificação de MNT. Estes, relataram que dos 431 pacientes estudados, a maioria eram provenientes da região sudeste (34,02%), seguidos pelos pacientes da região sul (23,6%), centro-oeste (17,86%), nordeste (16,4%) e norte (8,12%). É interessante notar, que mais da metade desses pacientes acometidos por infecção causadas por MNT nos anos de 1994 a 1999, eram das regiões sul/sudeste (57,6%). Encontramos resultados semelhantes com as amostras de *M. intracellulare*/ *M. chimaera* (56%), em nosso estudo, realizado 16 anos depois. Segundo Barreto e Campos (2000), o maior percentual de isolamento nessas regiões se deve, possivelmente à maior cobertura laboratorial.

Nossa casuística mostrou que 99,3% das amostras eram provenientes de sítio pulmonar. Na maioria dos trabalhos que estudaram *M. intracellulare* e *M. chimaera*, as

cepas estudadas eram de origem pulmonar. Estes dados, reforçam a idéia que estes microrganismos estão mais relacionados a micobacterioses pulmonares. Entretanto, outros órgãos podem ser acometidos por estes microrganismos. (MOON *et al.*, 2016 ; ACHERMANN *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2013; HARAHA *et al.*, 2012; SUHLING *et al.*, 2012; WON-YOUNG *et al.*, 2012; COHEN-BACRIE *et al.*, 2011; SUNG *et al.*, 2011; BILLS *et al.*, 2009; TORTOLI *et al.*, 2009; GRIFFITH *et al.*, 2007).

Ao compararmos as espécies identificadas com as variáveis do estudo, observamos que não houveram resultados estatisticamente significativos, p- valor de 0,448 a 0,997. Acreditamos que esse fato ocorreu em virtude do pequeno número de cepas identificadas como *M. chimaera*, *M. marseillense*, *M. timonense* e *M. yongonense*.

É importante assinalar algumas limitações do nosso estudo, entre as quais, a ausência de mais variáveis com características epidemiológicas no GAL, uma vez que esse sistema foi pensado na lógica de gerenciamento de amostras laboratoriais do país e não para vigilância epidemiológica (JESUS *et al.*, 2013). Outra limitação é a parcial representatividade nacional das amostras de pacientes de MNT, uma vez que as amostras do laboratório do CRPHF não representam o universo de amostras de MNT de todas as unidades federativas do Brasil, pois nem todos os estados enviam amostras. Por fim, a última limitação é a possível subnotificação de casos de MNT no Brasil, cuja magnitude é impossível de ser estimada em função da carência de estudos comprovando-a.

## 9 CONCLUSÃO

*M. intracellulare* foi a espécie mais encontrada nesse trabalho. Outras espécies foram também identificadas, *M. chimaera*, *M. marseillense*, *M. timonense* e *M. yongonense*, porém com percentuais mais baixos.

Relatamos pela primeira vez no continente americano um paciente com infecção causada por *M. yongonense*.

Todos os alvos estudados mostraram-se úteis na identificação de espécies do grupo *M. intracellulare/ M. chimaera*, no entanto a região ITS mostrou-se especialmente eficaz. A utilização de vários alvos genéticos em conjunto demonstrou particular importância para a identificação quando o alvo estudado apresentou valores baixos de identidade com a cepa tipo. A análise filogenética mostrou, também, importância na identificação de amostras nas quais diferentes alvos apresentaram resultados divergentes.

Os dados epidemiológicos da nossa população de estudo, demonstraram que a média de idade encontrada, foi muito semelhante a observada por outros pesquisadores. Além disso, a grande maioria das amostras clínicas eram de origem pulmonar.

A maioria dos pacientes dos quais as cepas de *M. intracellulare/ M. chimaera* foram estudadas, eram provenientes das regiões Sul e Sudeste. Em todas as regiões, houve uma predominância do sexo masculino, com exceção da região Nordeste onde predominou o sexo feminino.

Existem poucos estudos que investigaram os casos de MNT nacionalmente e ainda mais escassos os que analisaram *M. intracellulare/ M. chimaera*. Esse fato aumenta a relevância do nosso trabalho, que visa em parte, suprir a carência desse tipo de estudo no Brasil.

## REFERÊNCIAS

ACHERMANN Y., *et al.* Prosthetic valve endocarditis and bloodstream infection due to *Mycobacterium chimaera*. **Journal Clinical Microbiology**. v.51, n.6, p.1769-1773, 2013.

ALEXANDER D.C., TURENNE C.Y. “*Mycobacterium indicus pranii*” is a strain of *Mycobacterium intracellulare*. **MBio**. v. 6, n.2, e00013-15, 2015.

ALTSCHUL S. F., *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v. 25, p. 3389–3402, 1997.

BANG D., *et al.* *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, p. 2398–2402, 2008.

BARRETO A.M.W., CAMPOS C.E.D. Micobactérias “não tuberculosas” no Brasil. **Boletim de Pneumologia Sanitária**. v.8, n.1, jan/ jun. Rio de Janeiro, 2000.

BEN SALAH I., *et al.* *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 2803–2808, 2009.

BERGEY D.H. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2<sup>a</sup> ed., v.5, parte A, 2012.

BILLS N.D., *et al.* Molecular identification of *Mycobacterium chimaera* as a cause of infection in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.63, p.292-295, 2009.

BOYLE D.P., *et al.* Comparison of clinical features, virulence, and relapse among *Mycobacterium avium* Complex species. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.191, p.1310-1317, 2015.

BRASIL/ MS/ CENTRO DE REFERENCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, 2005.

BROSCH R., *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, p.3684-3689, 2002.

CALDAS P.C.S., *et al.* Description of a new *Mycobacterium intracellulare* pattern of PCR restriction enzyme analysis of *hsp65* gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious disease**. v.79, p.240-241, 2014.

CAMPOS C.E.D., *et al.* First isolation of *Mycobacterium Kyorinense* from clinical specimens in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. v.50, n.7, p.2477-2478, 2012.

CANDIDO P.H.C., *et al.* Multidrug-Resistant Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Cystic Fibrosis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 58 n. 8 p. 2990–2997, 2014.

CHALERMSKULARAT W., GILBEY J.G., DONOHUE J.D. Nontuberculous mycobactetria in women, young and old. **Clinics and Chest Medicine**. v.23, p. 675-686, 2002.

CHESTER F.D. **A manual of determinative bacteriology**. The Macmillan Co., New York. 1901.

CHIMARA, E. *et al.* Molecular characterization of *Mycobacterium kansasii* isolates in the state of São Paulo between 1995-1998. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v.99, n.7, p. 739-743, Nov 2004.

COHEN-BACRIE S., *et al.* *Mycobacterium chimaera* pulmonary infection complicating cystic fibrosis: a case report. **Journal of Medical Case Reports.** v.5, p.473, 2011.

COSTA A. R. F., *et al.* Identificação genotípica de membros do complexo *Mycobacterium avium* isolados de infecções pulmonares no Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde.** v. 1, n. 3, p. 35-42, 2010.

CUTTINO J. T., MCCABE A. M. Pure granulomatous nocardiosis: A new fungus disease distinguished by intracellular parasitism. **American Journal of Clinical Pathology.** v.25, p. 1-34, 1949.

DAVID S., *et al.* Identificação molecular pelo método spoligotyping de estirpes do “Complexo” *Mycobacterium tuberculosis* isoladas no Hospital Fernando Fonseca. **Revista Portuguesa da Pneumologia.** v.10, parte3, p.193-204, 2004.

DEVULDER, G.; PE'ROUSE DE MONTCLOS, M.; FLANDROIS, J. P. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 55, p. 293-302, 2005.

EUZÉBY J.P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature.** Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr>. Acesso em: out/2015.

FALKINHAM III J.O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 9, n. 2, p.177-215, 1996.

FALKINHAM III J.O. Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. **Future Microbiology.** v. 5, p.951-960, 2010.

FAUJDAR J., *et al.* *Mycobacterium Indicus Pranii* as Stand-Alone or Adjunct Immunotherapeutic in Treatment of Experimental Animal Tuberculosis. **The Indian Journal of Medical Research.** v. 134, n. 5, p. 696-703, 2011.

FUSCO DA COSTA A.R., *et al.* Occurrence of nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in an endemic area of tuberculosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**.v. 7, e2340, 2013.

GRAY T.J., *et al.* Improved identification of rapidly growing mycobacteria by a 16S-23S internal transcribed spacer region PCR and capillary gel electrophoresis. **PLoS One**. v. 9, n. 7, e102290, 2014.

GRIFFITH D.E., *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nonbubertuclous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.175, n.4, p. 367-416, 2007.

GRIFFITH D.E., BROWN-ELLIOTT B.A., WALLACE JR R.J. Hit the Road, MAC, and don't you come back no more. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 191, n.11, p.1222-1224, 2015.

GROTTOLA A., *et al.* Pulmonary Disease Caused by *Mycobacterium marseillense*, Italy. **Emerging Infectious Diseases**. v. 20, n. 10, 2014.

GUNAYDIN M., *et al.* Distribution of nontuberculous mycobacteria strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 12, p. 1-6, 2013.

GUPTA A., *et al.* Efficacy of *Mycobacterium Indicus Pranii* Immunotherapy as an Adjunct to Chemotherapy for Tuberculosis and Underlying Immune Responses in the Lung. **PLoS ONE**. v.7, n.7, e39215, 2012.

HALL L., *et al.* Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41 n. 4, p 1447-1453, 2003.

HARAKA F., *et al.* *Mycobacterium intracellulare* infection in non-HIV infected patient in a region with a high burden of tuberculosis. **British Medical Journal Case Reports**. 2012.

HOEFSLOOT W., *et al.* The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: A NTM-NET collaborative study. **European Respiratory Journal**. v. 42, n. 6, p. 1604-1613, 2013.

JANKOVIC M. *et al.* Geographical distribution and clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria in Croatia. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**. v. 6, n. 17, p.836–841, 2013.

JESUS R., *et al.* Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial: relato de experiência de uma ferramenta transformadora para a gestão laboratorial e vigilância em saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 22, n. 3, p. 525-529, 2013.

KAZDA J. The chronology of mycobacteria and the development of mycobacterial ecology. In: Kazda, J.; Pavlik, I; Falkinham III, J.O. Hruska, K. **The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health**. 2<sup>a</sup> ed. London: Springer, p. 01-12, 2009.

KIM B., *et al.* *Mycobacterium yongonense* sp. nov., a slow-growing non-chromogenic species closely related to *Mycobacterium intracellulare*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 63, p. 192–199, 2013.

KIM S., *et al.* First case of nontuberculous mycobacterial lung disease caused by *Mycobacterium marseillense* in a patient with systemic lupus erythematosus. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 79, p. 355–357, 2014.

KIM S.Y., *et al.* Genotyping of *Mycobacterium intracellulare* isolates and clinical characteristics of lung disease. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 17, n. 5, p. 669–675, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. v. 16, p. 111-120, 1980.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. v. 33, p.1870-1874, 2016.

LÉVY-FRÉBAULT V.V., PORTAELS F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.42, p.315-323, 1992.

LIU G., *et al.* Bacteriological and virulence study of a *Mycobacterium chimaera* isolate from a patient in China. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.107, p.901-909, 2015.

MCNABB A., *et al.* Assessment of partial sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.7, p. 3000-3011, 2004.

MELLO, K.G.C., *et al.* Clinical and Therapeutic Features of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Brazil, 1993–2011. **Emerging Infectious Diseases**. v. 19, n. 3, p. 393-399, 2013.

MIJS W, *et al.* Molecular evidence to support a proposal to reserve the de-signation *Mycobacterium avium subsp. avium* for bird-type isolates and *M. avium subsp. hominis-suis*' for the human/porcine type of *M. avium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 52, p. 1505-1518, 2002.

MOON S.M., *et al.*, Clinical characteristics and treatment outcomes of pulmonary disease caused by *Mycobacterium chimaera*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.09.016>

MURCIA M. I., *et al.* *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 2049–2054, 2006.

MURRAY R.P., *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, 6.ed, Washington DC, 1995.

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

PHILLEY J.V., *et al.* Clinical And Laboratory Features Of Respiratory Isolates of *Mycobacterium chimaera*. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.189, p.A 4129, 2014.

PREVOTS D.R., MARRAS T.K. Epidemiology of Human Pulmonary Infection with Nontuberculous Mycobacteria A Review. **Clinical Chest Medicine**. v.36, p. 13–34, 2015.

PRINCE D.S., *et al.* Infection with *Mycobacterium avium* Complex in patients without predisposing conditions. **New England Journal of Medicine**. v.321, p.863-868, 1989.

RAHMAN S.A., *et al.* Reply to “*Mycobacterium indicus pranii*” is a strain of *Mycobacterium intracellulare*: “*M. indicus pranii*” is a distinct strain, not derived from *M. intracellulare*, and is an organism at an evolutionary transition point between a fast grower and slow grower. **MBio**. v.6, n.2, e00352-15, 2015.

RAMOS J.P., *et al.* *Mycobacterium fragae* sp. nov., a non-chromogenic species isolated from human respiratory specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.63, p.2583-258, 2013.

REICH J.M., JOHNSON R.E. *Mycobacterium avium* Complex pulmonary disease presenting as an isolated lingular or middle lobe pattern. **Chest**. v.101, p.1605-1609, 1992.

ROTH A., *et al.* Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, n.1, p. 139–147, 1998.

RUNYON E. H. Pathogenic mycobacteria. **Advances in Tuberculosis Research**. v. 14, p. 235 – 287, 1965.

SAINI V., *et al.* Polyphasic taxonomic analysis establishes *Mycobacterium indicus pranii* as a distinct species. **PloS One**. v. 4, n.7, e6263, 2009.

SAJDUDA, A., *et al.* *hsp65* PCR - restriction analysis (PRA) with capillary electrophoresis in comparison to three other methods for identification of *Mycobacterium* species. **Journal of Microbiological Methods** v. 80, n. 2, p.190-197, 2010.

SCHWEICKERT B., *et al.* Occurrence and clinical relevance of *Mycobacterium chimaera* sp. nov., Germany. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, n 9, p.1443-1446, 2008.

SKERMAN V.B.D., MCGOWAN V., SNEATH P.H.A. Approved Lists of Bacterial Names. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 30, p. 225-420, 1980.

SUHLING H., *et al.* *Mycobacterium intracellulare* bacteraemia in a double lung transplant patient. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 16, n. 12, p. 1710–1711, 2012.

SUNG K. H., *et al.* An Unusual Case of Post Operative Spondylitis Caused by *Mycobacterium Intracellulare* in an Immunosuppressed Patient. **Journal of Korean Neurosurgical Society**. v. 50, p. 460-463, 2011.

TATEISHI Y., *et al.* Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. **Microbial Pathogenesis**. v. 46, p. 6-12, 2009.

TATEISHI Y., *et al.* Whole-Genome Sequence of the Hypervirulent Clinical Strain *Mycobacterium intracellulare*. **Journal of Bacteriology**. v. 194, n. 22, p. 6336, 2012.

TELENTI, A. *et al.* Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.2, p.175-178, 1993.

THOREL M., KRICHEVSKY M., LEVY-FREBAULT V.V. Numerical Taxonomy of Mycobactin-Dependent Mycobacteria, Emended Description of *Mycobacterium avium*, and Description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 40, n. 3, p. 254-260, 1990.

TORTOLI E., *et al.* Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp.nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.54, p.1277-1285, 2004.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1900s. **Clinical Microbiology Reviews**. v.16, n.2, p. 319-354, 2003.

TORTOLI, E. Standard operating procedure for optimal identification of mycobacteria using 16S rRNA gene sequences. **Standards in Genomic Sciences**. v. 3, p. 145-152, 2010.

TORTOLI E., *et al.* *Mycobacterium yongonense* in Pulmonary Disease, Italy. **Emerging Infectious Diseases**. v. 19, n. 11, 2013.

TORTOLI E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. **Clinical Microbiology Reviews**. v.27, n.4, p.727-752, 2014.

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

VAN INGEN J., *et al.* Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59, p. 2277–2282, 2009.

VAN INGEN J. Microbiological Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. **Clinics in Chest Medicine**. v.36, n.1, p. 43-54, 2015.

WALLACE JR R.J., *et al.* Absence of *Mycobacterium intracellulare* and presence of *Mycobacterium chimaera* in household water and biofilm samples of patients in the United States with *Mycobacterium avium* complex respiratory disease. **Journal of Clinical Microbiology**. V.51, n.6, p. 1747-1752, 2013.

WAYNE L. J., *et al.* Fourth report of the cooperative, open-ended study of slowly growing Mycobacteria by the international working group on mycobacterial taxonomy. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 41, n. 4, p. 463-472, 1991.

WOLINSKY E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **American Review of Respiratory Diseases**. v. 119, p. 107–159, 1979.

WON-JUNG K., *et al.* Clinical Significance of the Differentiation Between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in *M avium* Complex Lung Disease. **Chest**. v.142, n. 6, p. 1482–1488, 2012.

WON-YOUNG K., *et al.* Disseminated Mycobacterium intracellulare Infection in an Immunocompetent Host. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**. v. 72, n. 5, p. 452–456, 2012.

ZHOU L., *et al.* Cutaneous *Mycobacterium intracellulare* Infection in an Immunocompetent Person. **Acta Dermato-Venereologica**. v. 93, p. 711–714, 2013.

ZURITA J., *et al.* Characterization of the first report of Mycobacterium timonense infecting an HIV patient in an Ecuadorian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 20, n. 12, 2014.