

## Análise de restrição enzimática do gene *hsp65* de isolados clínicos de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar em Teresina, Piauí\*

Restriction enzyme analysis of the *hsp65* gene in clinical isolates from patients suspected of having pulmonary tuberculosis in Teresina, Brazil

Maria das Graças Motta e Bona, Maria José Soares Leal,  
Liliane Maria Soares Martins, Raimundo Nonato da Silva,  
José Adail Fonseca de Castro, Semiramis Jamil Hadad do Monte

### Resumo

**Objetivo:** Identificar as espécies de micobactérias encontradas no escarro de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar e analisar o impacto dessas identificações na abordagem terapêutica. **Métodos:** Foram avaliados 106 pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar encaminhados para o serviço de pneumologia de um hospital público em Teresina, Piauí. Espécimes de escarro matinal foram avaliados quanto à presença de micobactérias por baciloscopia e cultura. Foram utilizadas PCR e análise de restrição enzimática do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*) para a identificação das cepas de micobactérias isoladas em cultura. **Resultados:** Foram analisadas 206 amostras de escarro. A idade dos pacientes variou de 15 a 87 anos, sendo 67% do gênero masculino. Tosse ocorreu em 100% dos casos. O padrão radiográfico predominante foi de lesão moderada, observada em 70%. A positividade no esfregaço foi de 76%, e isolamento em cultura ocorreu em 91% das culturas executadas. Testes tradicionais identificaram micobactérias não tuberculosas (MNT) em 9% dos isolados. O método PRA-*hsp65* confirmou esses dados, mostrando sete padrões de bandas capazes de identificar as espécies de MNT isoladas: *Mycobacterium kansasii*; *M. abscessus* 1; *M. abscessus* 2; *M. smegmatis*; *M. flavescens* 1; *M. gordonae* 5 e *M. gordonae* 7. Todos os pacientes com MNT tinham mais de 60 anos, e observaram-se bronquiectasias em 88% das radiografias. Houve dois casos de reinfecção, identificados inicialmente como infecção por *M. abscessus* e *M. kansasii*. **Conclusões:** As MNT causam infecção pulmonar em pacientes imunocompetentes, e a identificação das MNT é importante para estabelecer o diagnóstico correto e a decisão terapêutica mais adequada. O método PRA-*hsp65* é útil para identificar espécies de MNT e pode ser implantado em laboratórios de biologia molecular não especializados em micobactérias.

**Descritores:** Tuberculose; Micobactérias atípicas; Reação em cadeia da polimerase; Brasil.

### Abstract

**Objective:** To identify mycobacterial species in the sputum of patients suspected of having pulmonary tuberculosis and to determine the impact that the acquisition of this knowledge has on the therapeutic approach. **Methods:** We evaluated 106 patients suspected of having pulmonary tuberculosis and referred to the pulmonology department of a public hospital in the city of Teresina, Brazil. Morning sputum specimens were evaluated for the presence of mycobacteria by sputum smear microscopy and culture. We used PCR and restriction enzyme analysis of the *hsp65* gene (PRA-*hsp65*) to identify the strains of mycobacteria isolated in culture. **Results:** A total of 206 sputum samples were analyzed. Patient ages ranged from 15 to 87 years, and 67% were male. There was cough in 100% of the cases. The predominant radiographic pattern was moderate disease, observed in 70%. Smear positivity was 76%, and isolation in culture occurred in 91% of the cultures. Traditional tests identified nontuberculous mycobacteria (NTM) in 9% of the isolates. The PRA-*hsp65* method confirmed these data, showing seven band patterns that were able to identify the isolated species of NTM: *Mycobacterium kansasii*; *M. abscessus* 1; *M. abscessus* 2; *M. smegmatis*; *M. flavescens* 1; *M. gordonae* 5; and *M. gordonae* 7. All of the patients with NTM were over 60 years of age, and bronchiectasis was seen in 88% of the X-rays. There were two cases of reinfection, initially attributed to *M. abscessus* and *M. kansasii*. **Conclusions:** In immunocompetent patients, NTM can infect the lungs. It is important to identify the specific NTM in order to establish the correct diagnosis and choose the most appropriate therapeutic regimen. The PRA-*hsp65* method is useful in identifying NTM species and can be implemented in molecular biology laboratories that do not specialize in the identification of mycobacteria.

**Keywords:** Tuberculosis; Mycobacteria, atypical; Polymerase chain reaction; Brazil.

\* Trabalho realizado na Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI) Brasil.

Endereço para correspondência: Semiramis Jamil Hadad do Monte. Campus Ministro Petrônio Portela, Bloco 16, Bairro Ininga, CEP 64048-232, Teresina, PI, Brasil.

Tel. 55 86 32155691. Fax: 55 86 32155690. E-mail: libpi@ufpi.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí.

Recebido para publicação em 6/10/2010. Aprovado, após revisão, em 29/4/2011.

## Introdução

A tuberculose (TB) ainda é um dos principais problemas de saúde pública na maioria dos países. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectado por *Mycobacterium tuberculosis*. O Brasil ocupa o 14º lugar entre os 22 países com a maior incidência de TB, com 48 casos/100.000 habitantes em 2007.

<sup>(1)</sup> O aumento do número de casos de TB deve-se principalmente a pobreza, desnutrição grave, infecção por HIV, migração de pessoas infectadas, medidas de controle inadequadas, inaccessibilidade a tratamento farmacológico eficaz e dificuldade em monitorar o tratamento farmacológico.<sup>(2)</sup> Juntos, esses fatores são responsáveis pela disseminação de cepas resistentes, inclusive as formas multirresistentes.

<sup>(2)</sup> A presença de comorbidades, incluindo a infecção por HIV,<sup>(3)</sup> e o diagnóstico tardio são preocupações importantes e devem ser alvos de estratégias de controle da TB no Brasil, pois casos não diagnosticados de TB são uma grande fonte de transmissão da doença.<sup>(4)</sup>

Desde o advento do tratamento eficaz para TB na década de 1950, o isolamento de *M. tuberculosis* tornou-se rotineiro. Alguns dos casos inicialmente descritos como casos de infecção tuberculosa foram posteriormente reconhecidos como casos de infecção por micobactérias não tuberculosas (MNT).<sup>(5)</sup> Esses organismos são ubíquos; por isso, a exposição a eles é universal. Ainda não há evidência de transmissão de MNT de animais para humanos. Em humanos, supõe-se que a doença causada por MNT seja adquirida por meio de exposição a fatores ambientais, embora seja ainda necessário identificar uma fonte específica.<sup>(6,7)</sup> Em pacientes imunocompetentes, a incidência de doença pulmonar causada por MNT tem aumentado em todo o mundo.<sup>(5,6)</sup> Antes da pandemia da AIDS, atribuíam-se a maioria dos casos de doença pulmonar em indivíduos com bronquiectasia, DPOC, sequelas de TB ou pneumoconiose a espécies do complexo *M. avium-intracellulare*.<sup>(8)</sup>

O quadro clínico e as características radiológicas de infecções por MNT são frequentemente indistinguíveis daqueles observados em doença pulmonar causada por *M. tuberculosis*, sendo essencial que o diagnóstico baseie-se na identificação das espécies envolvidas. Um diagnóstico preciso da espécie envolvida pode ter impacto direto no

manejo clínico devido aos diferentes padrões de sensibilidade aos medicamentos. Portanto, a identificação precoce e precisa do agente causal é essencial para melhorar o manejo e os desfechos clínicos.<sup>(9)</sup>

A microbiologia é atualmente o padrão ouro para o diagnóstico de infecções por micobactérias. A identificação de BAAR em esfregaços de escarro é uma técnica simples, rápida e barata; entretanto, sua sensibilidade varia de 30% a 80% dependendo do isolamento em cultura, da prevalência local e da metodologia adotada.<sup>(10)</sup> Por outro lado, a cultura de escarro é um método extremamente sensível e específico, embora seja trabalhoso e demorado (28-60 dias para a obtenção do resultado).<sup>(11)</sup>

Vários estudos têm sugerido que técnicas moleculares são úteis para o diagnóstico etiológico da TB. Em 1993, um grupo de autores propôs um método molecular<sup>(12)</sup> baseado em PCR e análise de restrição enzimática do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*), um gene encontrado em todas as espécies de micobactérias com sequências de nucleotídeos específicas para cada espécie. Um método eficaz, amplamente utilizado e facilmente reproduzível que não necessita de microrganismos viáveis, PRA-*hsp65* permite a identificação de várias espécies de MNT em uma única reação.<sup>(9,12-14)</sup>

O diagnóstico etiológico preciso da espécie de micobactéria causadora da infecção é essencial para o manejo apropriado de infecções por micobactérias. Com base na hipótese de que o método PRA-*hsp65* é capaz de diferenciar *M. tuberculosis* de MNT para fins clínicos e terapêuticos, o objetivo do presente estudo foi identificar as espécies de micobactérias isoladas no escarro de pacientes com suspeita de TB pulmonar (TBP). Buscamos também determinar o impacto dessa identificação na abordagem terapêutica.

## Métodos

Entre janeiro e junho de 2007, 106 pacientes com suspeita de TBP foram encaminhados ao serviço de pneumologia de um hospital público na cidade de Teresina (PI). O critério de inclusão foi ser capaz de produzir escarro espontaneamente. Os critérios de exclusão foram estar em tratamento com tuberculostáticos no momento da coleta do escarro e ter recebido diagnóstico de TB extrapulmonar. O projeto foi

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (Protocolo no. CAAE 0124.0.045.000-06), em conformidade com a Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Após a avaliação clínica e radiográfica, foram coletadas amostras de escarro matinal espontâneo (duas de cada paciente). As amostras foram enviadas ao Laboratório Maria José Leal para diagnóstico microbiológico. As técnicas laboratoriais (baciloscopia e cultura de escarro) foram padronizadas conforme as normas e diretrizes descritas no Manual de Bacteriologia da Tuberculose publicado pelo Ministério da Saúde.<sup>(15)</sup> Esfregaços corados por Ziehl-Neelsen foram examinados microscopicamente para contagem semiquantitativa de BAAR e detecção do fator corda.<sup>(12,15)</sup> Para o isolamento de micobactérias, realizou-se cultura em meio Löwenstein-Jensen.<sup>(15)</sup> Quando duas culturas apresentavam resultado positivo, selecionava-se aquela com crescimento mais abundante de cepas de micobactérias para análise macroscópica, microscópica e bioquímica, bem como para genotipagem. A fenotipagem de cepas, para identificação presuntiva, incluiu triagem macroscópica (morfologia e pigmentação das colônias), análise microscópica (detecção do fator corda e identificação de microrganismos contaminantes) e análise bioquímica, esta última realizada por meio de um kit para identificação de *M. tuberculosis* (MTBAC; Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, Brasil). As cepas com colônias pigmentadas ou acromógenas lisas de crescimento rápido que não apresentaram formação de corda no exame microscópico foram presuntivamente classificadas em MNT.

A genotipagem foi realizada por meio de PRA-*hsp65*, conforme descrito anteriormente,<sup>(12)</sup> no Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí.

As amostras foram preparadas como segue: uma alça de crescimento de micobactérias em meio Löwenstein-Jensen foi suspensa em 1 mL de tampão Tris-EDTA (10 mM Tris e 1 mM EDTA; pH = 8) e inativada por calor durante 10 min a 80°C. Após a inativação, as bactérias foram centrifugadas durante 15 min. O sedimento foi suspenso novamente em 100 µL de Tris-EDTA e transferido para um tubo contendo pérolas

de vidro (Precellys<sup>®</sup>24; Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, França). As células suspensas foram desintegradas mecanicamente durante 2 min em um aparelho Precellys<sup>®</sup>24 (Bertin Technologies). Após uma etapa de 10 min de centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Todas as etapas de centrifugação foram realizadas a 13.000 rpm em tubos de microcentrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Adicionou-se um total de 5 µL de lisado a cada tubo de reação. A composição da mistura para PCR (50 µL) foi 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH = 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, glicerol a 10%, 200 mM (cada) desoxinucleotídeo trifosfato, 0,5 µM (cada) *primer* e 1,25 U *Taq* polimerase (HotStarTaq Plus DNA Polymerase; QIAGEN, Düsseldorf, Alemanha). A reação foi submetida a 45 ciclos de amplificação (1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C), seguidos de 10 min de extensão a 72°C. Os *primers* Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT) amplificaram um fragmento de 439 pb entre as posições dos nucleotídeos 398 e 836 da sequência genética publicada.<sup>(16)</sup>

A análise de restrição foi realizada com 15 µL de produtos de PCR digeridos separadamente com 5 U das enzimas de restrição *Bs*ÆII e *Hae*III, conforme as instruções do fabricante (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). A enzima *Bs*ÆII foi digerida por incubação a 60°C durante 1,5 h, e a *Hae*III foi digerida por incubação a 37°C durante 1,5 h.

Os produtos da digestão foram misturados a 4 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25% e sacarose a 40% em água) e colocados em géis preparados com agarose a 4% em tampão Tris-borato-EDTA (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA; pH = 8,0). Os marcadores do tamanho do DNA (DNA *ladders* de 50 pb e 25 pb) foram aplicados em três linhas (uma linha de 50 pb em cada extremo do gel e uma linha de 25 pb no centro). Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados em um transiluminador com luz UV e fotografados. Os padrões de PRA-*hsp65* foram interpretados com o auxílio de tabelas publicadas previamente.<sup>(17)</sup> Controles negativos e positivos – água e DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294; American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA), respectivamente – foram

incluídos em cada experimento. Os prontuários médicos dos pacientes foram revisados a fim de obter informações a respeito de diagnósticos prévios de TB, resultados positivos para BAAR e isolamentos prévios de *M. tuberculosis*, MNT ou ambos.

Para a análise dos dados, comparamos os fragmentos obtidos após o tratamento enzimático de *amplicons* com os padrões de restrição armazenados em um banco de dados eletrônico sobre PRA,<sup>(17)</sup> bem como com os padrões de *HaeIII* e *BstEII*, criando assim um algoritmo para diferenciar as espécies de MNT. Após a obtenção dos resultados clínicos, radiológicos, microbiológicos e moleculares, analisamos os dados por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

## Resultados

Dos 106 pacientes avaliados, 3 foram excluídos: 2 foram excluídos porque as amostras de escarro não foram suficientes para a análise e 1 foi excluído devido a contaminação de cultura. Dos 103 pacientes restantes, 94 receberam diagnóstico de TBP com base no isolamento de *M. tuberculosis* em amostras de escarro. Cepas de MNT foram isoladas nas amostras de escarro dos outros 9 pacientes. Apenas 2 pacientes foram considerados casos de reinfeção. A média de idade foi de 46,8 anos (variação: 15-87 anos), e indivíduos do sexo masculino predominaram (67%). Os dois sintomas mais comuns foram tosse e escarro purulento. A Tabela 1 mostra as características clínicas, radiológicas e microbiológicas dos pacientes.

Os testes bioquímicos empregados mostraram-se capazes de identificar *M. tuberculosis* e MNT. A média de idade foi significativamente maior entre os pacientes nos quais foram identificadas MNT do que

**Tabela 1** – Características clínicas, radiológicas e microbiológicas de pacientes com suspeita clínica de infecção pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* ou micobactérias não tuberculosas tratados em um centro de referência em pneumologia em Teresina (PI) entre janeiro e junho de 2007.

Variáveis		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Micobactérias não tuberculosas
		(%)	(%)
Características demográficas			
Gênero	Masculino	64 (62,13)	5 (4,85)
	Feminino	30 (29,12)	4 (3,88)
Idade, anos	< 25	22 (23,4)	-
	25-50	42 (44,7)	-
	> 50	30 (31,9)	9 (100)
Sintomas clínicos			
	Tosse	94 (100)	9 (100)
	Perda de peso	66 (70,21)	4 (44,4)
	Escarro purulento	85 (90,42)	9 (100)
	Febre vespertina	74 (78,72)	6 (66,6)
	Mal-estar	55 (58,51)	5 (55,5)
	Dispneia	55 (58,51)	4 (44,4)
	Dor torácica	55 (58,51)	3 (33,3)
	Sudorese noturna	46 (48,93)	2 (22,2)
Características radiológicas			
Doença	Minima	25 (26,59)	8 (88,89)
	Moderada	66 (70,21)	1 (11,11)
	Grave	3 (3,20)	-
Características microbiológicas			
Resultado da baciloscopia	Positivo	157(76)	18 (100)
	Negativo	46 (22)	-
Isolamento em cultura	Positivo	188 (91)	18 (100)
	Negativo	2 (1)	-

naqueles em que se identificou *M. tuberculosis* (64,1 vs. 46,8 anos;  $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas entre os pacientes com *M. tuberculosis* e aqueles com MNT no que tange a sintomas clínicos e gênero. Entretanto, todos os pacientes que apresentaram MNT também apresentaram achados radiológicos de bronquiectasia, esfregaço positivo para BAAR e isolamento em cultura. Dos isolados submetidos a PRA-*hsp65*, 91,0% apresentaram um padrão de *BstEII* ou *HaeIII* para *M. tuberculosis*. O método PRA-*hsp65* identificou sete cepas de MNT: *M. kansasii*; *M. abscessus* 1; *M. abscessus* 2; *M. smegmatis*; *M. flavescens* 1; *M. gordonae* 5 e *M. gordonae* 7.<sup>(17)</sup> Os padrões de bandas são apresentados na Tabela 2. Como ocorrera na infecção primária, *M. abscessus* 1 e *M. kansasii* foram identificadas nas amostras de escarro dos 2 pacientes com reinfeção. Todas as cepas de MNT identificadas por PRA-*hsp65* foram também identificadas como MNT pelos testes de ácido p-nitrobenzoico e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico.

O esquema terapêutico básico (a combinação rifampicina-isoniazida-pirazinamida) falhou em 2 dos 103 pacientes estudados. Os 2 pacientes foram previamente tratados com etionamida, pirazinamida, etambutol e estreptomina, e o tratamento falhou. *M. kansasii* e *M. abscessus* 1 foram isoladas nas amostras de escarro desses pacientes. Além disso, ambas as espécies haviam sido isoladas em amostras de escarro coletadas anteriormente desses pacientes, apoiando o diagnóstico. O paciente no qual *M. kansasii* foi isolada em cultura foi tratado com claritromicina (500 mg v.o. a cada 12 h) e etambutol durante 12 meses. A avaliação de acompanhamento

revelou remissão clínica completa. O paciente tornou-se assintomático 1 ano após o início do tratamento e assim permaneceu após a suspensão da claritromicina. O paciente no qual *M. abscessus* 1 foi isolada não apresentou resposta clínica a nenhum dos vários esquemas terapêuticos iniciados com base nos resultados de testes de sensibilidade. O paciente permaneceu sintomático até o óbito, que ocorreu 5 anos após o diagnóstico de doença pulmonar causada por MNT. *M. abscessus* 2 foi isolada em 1 paciente. Embora não tenha sido hospitalizado, o paciente recebeu tratamento empírico com o esquema rifampicina-isoniazida-pirazinamida durante 2 meses enquanto aguardávamos os resultados da identificação molecular. Como o paciente permaneceu sintomático, o esquema rifampicina-isoniazida-pirazinamida foi substituído por claritromicina (500 mg/12 h durante 18 meses) e amicacina (15 mg • kg<sup>-1</sup> • dia<sup>-1</sup> administrados por via intravenosa a cada 12 h durante 15 dias), seguidos das mesmas doses de claritromicina e amicacina administradas às segundas, quartas e sextas durante 2 meses. Após 18 meses, o paciente apresentou-se assintomático e os resultados da cultura foram negativos. O tratamento foi, portanto, suspenso. Devido a fatores socioeconômicos, os outros 7 pacientes com suspeita de TB foram hospitalizados e tratados com o esquema rifampicina-isoniazida-pirazinamida enquanto aguardávamos os resultados da cultura de escarro. Esses pacientes também permaneceram sintomáticos. Os resultados da identificação molecular por PRA-*hsp65* foram os seguintes: *M. gordonae*, em 3 pacientes; *M. flavescens*, em 1; *M. smegmatis*, em 1; *M. kansasii*, em 1

**Tabela 2** – Identificação molecular, por meio de PCR e análise de restrição enzimática do gene *hsp65*, de espécies de micobactérias isoladas em cultura de amostras clínicas coletadas de pacientes com tuberculose pulmonar tratados em um centro de referência em pneumologia em Teresina (PI) entre janeiro e junho de 2007.

Espécies de micobactérias	(n/N)	Perfis de bandas	
		<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(94/103)	235-115-85	150-125-70
<i>M. kansasii</i> 1	(2/103)	235-210	130-105-80
<i>M. abscessus</i> 1	(1/103)	235-210	145-70-60-55
<i>M. abscessus</i> 2	(1/103)	235-210	200-70-60-50
<i>M. smegmatis</i>	(1/103)	235-130/85	145-125-60
<i>M. flavescens</i> 1	(1/103)	440	140-60-55
<i>M. gordonae</i> 5	(1/103)	235-210	125-110
<i>M. gordonae</i> 7	(2/103)	235-115-100	155-110-60



e *M. abscessus* 2, em 1. Devido a problemas operacionais, não foi possível realizar um teste de sensibilidade; não obstante, o esquema terapêutico foi alterado. Para os 3 pacientes nos quais *M. gordonae* foi isolada em cultura, o esquema antibiótico foi alterado para claritromicina (500 mg/12 h). No primeiro mês de tratamento, os pacientes apresentaram melhora clínica significativa. No sexto mês, as culturas apresentaram resultado negativo. O tratamento durou 12 meses, ao final do qual os pacientes apresentaram-se completamente assintomáticos. O paciente no qual *M. flavescens* foi isolada em cultura não apresentou melhora durante os 2 primeiros meses de terapia. Após a presença de *M. flavescens* ter sido revelada pelo método PRA-*hsp65*, a terapia-padrão foi suspensa e administrou-se claritromicina (500 mg v.o. a cada 12 h) durante 1 ano. O paciente apresentou remissão clínica completa 1 mês após o início do tratamento e permaneceu assintomático após a suspensão da claritromicina. Os pacientes nos quais *M. smegmatis* e *M. kansasii* foram isoladas em cultura foram tratados com claritromicina (500 mg v.o. a cada 12 h) e etambutol (1.000 mg/dia v.o.) durante 12 meses. Todos os 7 pacientes apresentaram remissão clínica completa 1 ano após o início do tratamento. Podemos, portanto, afirmar que todos os pacientes estavam infectados, e não colonizados, já que apresentaram resposta satisfatória às mudanças no esquema terapêutico.

## Discussão

No presente estudo, 9% dos isolados foram MNT, e as cepas mais comuns foram *M. gordonae* e *M. kansasii*. O intervalo máximo entre o isolamento em cultura e a identificação da espécie por PRA-*hsp65* foi de 24 h, o que é impossível quando se utilizam testes químicos e de crescimento. O tempo necessário para que testes desse tipo identifiquem as espécies de maneira definitiva varia de várias semanas a 2 meses, uma vez que vários desses testes exigem crescimento macroscópico de colônias em cultura para que possam ser interpretados.<sup>(9-11,13-15)</sup> A fim de distinguir o complexo *M. tuberculosis* de MNT, foram utilizados os métodos convencionais, isto é, os testes de ácido p-nitrobenzoico e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico. Foram necessárias 4 semanas para a obtenção dos resultados.

Estudos têm identificado novas espécies de MNT, e mais de 140 espécies são atualmente conhecidas; portanto, a identificação de espécies por meio de técnicas convencionais é uma tarefa árdua e demorada que exige vários testes laboratoriais e recursos humanos altamente qualificados.<sup>(9,13)</sup> Embora tanto o método PRA-*hsp65* como os métodos clássicos consumam a mesma quantidade de tempo nas etapas iniciais, o método PRA-*hsp65* apresenta uma grande vantagem sobre os métodos clássicos em etapas posteriores. Na verdade, o método PRA-*hsp65* é capaz de identificar micobactérias 24 h após o isolamento em cultura. Por outro lado, são necessários até 60 dias para que os métodos clássicos identifiquem micobactérias após o isolamento em cultura.<sup>(9,10,12)</sup>

Ainda não se sabe qual é a real prevalência de MNT no Brasil.<sup>(18-20)</sup> Sabe-se, entretanto, que MNT podem ser isoladas no meio ambiente, colonizar as superfícies mucosas de indivíduos imunocompetentes e causar infecção.<sup>(20)</sup> Por conseguinte, é possível que um único isolamento de MNT não indique infecção. É, portanto, obrigatório utilizar critérios para diferenciar colonização de infecção.<sup>(21)</sup>

Espera-se um aumento substancial da ocorrência de MNT como agentes etiológicos de infecção pulmonar e cutânea, principalmente em idosos com DPOC<sup>(7,22)</sup> e infecção hospitalar. Estudos demonstraram que MNT não só colonizam como invadem tecidos, causando infecção.<sup>(23-25)</sup> Entretanto, não é fácil fazer essa distinção. Os critérios para tal foram padronizados pela *American Thoracic Society*.<sup>(7,26)</sup>

Em nosso estudo, espécies que haviam sido identificadas nos mesmos pacientes (*M. abscessus* 1 e *M. kansasii*) foram identificadas em apenas 2 casos, os quais foram considerados, portanto, casos de reinfeção. É interessante notar que esses pacientes eram do sexo feminino, não haviam sido submetidos a nenhum procedimento endoscópico e apresentaram bronquiectasia.

Um bom controle epidemiológico exige identificação rápida e precisa do agente etiológico. Portanto, para complementar os métodos convencionais, é fundamental desenvolver novas estratégias bioquímicas para a identificação de micobactérias. Nesse contexto, o método PRA-*hsp65* é uma opção atraente, pois é rápido, preciso e reprodutível.

Além disso, pode ser realizado em laboratórios equipados para microbiologia e biologia molecular. Essas características aceleram os resultados dos testes e permitem um manejo melhor. Portanto, o método PRA-*hsp65* pode ser uma adição valiosa à bateria de testes diagnósticos para infecções por micobactérias. Nesse cenário, a incorporação de um método de biologia molecular que possa ser realizado em laboratórios de diagnóstico clínico torna-se cada vez mais relevante. A escolha do esquema terapêutico para o tratamento da TB não deve ser baseada exclusivamente nos resultados da pesquisa de BAAR, pois o tratamento para TB é longo e exige que o microrganismo seja erradicado a fim de evitar o desenvolvimento e a disseminação de formas multirresistentes oriundas de um tratamento inicial inapropriado.

No Brasil e em outros países em desenvolvimento, nos quais a incidência de TB é elevada, é prática comum iniciar o tratamento com tuberculostáticos antes da identificação das micobactérias, particularmente em casos de baciloscopia positiva. Entretanto, os médicos devem estar atentos à possibilidade de que talvez não haja resposta clínica, já que MNT são comuns, como se demonstrou no presente estudo. A identificação correta das espécies de MNT é crucial, uma vez que outros antimicrobianos específicos terão que ser selecionados com base na identificação das espécies e nos resultados de testes de sensibilidade.<sup>(19,27)</sup> Nesse contexto, PRA-*hsp65* é o método mais apropriado, pois é capaz de identificar as espécies de MNT 24 h após seu isolamento em cultura. Por outro lado, o método convencional de identificação das espécies de MNT (o qual se baseia em propriedades químicas e de crescimento) necessita de mais de 30 dias. Como os resultados de PRA-*hsp65* são mais rápidos, é possível iniciar o tratamento com o esquema terapêutico apropriado mais rapidamente.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que é possível implantar o método PRA-*hsp65* para a identificação de micobactérias em um laboratório de biologia molecular não especializado. Embora se reconheça que o método PRA-*hsp65* não deve ser considerado um substituto para outros testes usados para diagnosticar TB, o método é uma ferramenta diagnóstica adicional para investigar a etiologia da doença, especialmente em indivíduos que não

apresentam resposta clínica a tuberculostáticos. O método pode contribuir para uma identificação mais rápida de micobactérias em laboratórios públicos, otimizando assim o manejo dos casos.

## Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer aos pacientes, à Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária e ao Hospital Getúlio Vargas. Agradecemos também a Miguel Pires de Moura a permissão para conduzirmos o estudo na instituição; a Dra. Karla Valéria Batista Lima sua assistência durante a implantação do método PRA-*hsp65*; a Dr. Maria José Soares Leal a permissão para executarmos os procedimentos microbiológicos para isolamento e identificação de micobactérias em seu laboratório e à Universidade Federal do Piauí a aprovação da implantação do método PRA-*hsp65* no Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular.

## Referências

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing: WHO Report 2009. Geneva: World Health Organization; 2009.
2. Maher D, Raviglione M. Global epidemiology of tuberculosis. Clin Chest Med. 2005;26(2):167-82, v.
3. Rao VK, Iademarco EP, Fraser VJ, Kollef MH. The impact of comorbidity on mortality following in-hospital diagnosis of tuberculosis. Chest. 1998;114(5):1244-52.
4. Belo MT, Luiz RR, Hanson C, Selig L, Teixeira EG, Chalfoun T, et al. Tuberculosis and gender in a priority city in the state of Rio de Janeiro, Brazil. J Bras Pneumol. 2010;36(5):621-5.
5. Ruyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North AM. 1959;43(1):273-90.
6. Falkinham JO 3rd. Nontuberculous mycobacteria in the environment. Clin Chest Med. 2002;23(3):529-51.
7. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(4):367-416. Erratum in: Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(7):744-5.
8. Hadad DJ, Palhares MC, Placco AL, Domingues CS, Castelo Filho A, Ferrazoli L, et al. Mycobacterium avium complex (MAC) isolated from AIDS patients and the criteria required for its implication in disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1995;37(5):375-83.
9. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev. 2003;16(2):319-54.
10. Sommers HM, McClatchy JK. Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1983.
11. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Atlanta: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control; 1985.

12. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):175-8.
13. Leão SC, Bernardelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods.* 2005;61(2):193-9.
14. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2969-73.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Centro de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Centro de Vigilância em Saúde, Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública; 2005.
16. Shinnick TM. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 1987;169(3):1080-8.
17. Praside [homepage on the Internet]. Lausanne: Hospices Cantonaux; c1999 [updated 2007 Sep 15; cited 2010 Aug 12]. Available from: <http://app.chuv.ch/praside/index.html>.
18. Matos ED, Santana MA, de Santana MC, Mamede P, de Lira Bezerra B, Panão ED, et al. Nontuberculosis mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference center in Bahia: clinical epidemiological aspects. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(4):296-304.
19. Pedro HS, Pereira MI, Goloni MR, Ueki SY, Chimara E. Nontuberculous mycobacteria isolated in São José do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005. *J Bras Pneumol.* 2008; 34(11):950-5.
20. Zamarioli LA, Coelho AG, Pereira CM, Nascimento AC, Ueki SY, Chimara E. Descriptive study of the frequency of nontuberculous mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol.* 2008;34(8):590-4.
21. Centro de Vigilância Epidemiológica "Alexandre Vranjac" [homepage on the Internet]. São Paulo: Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. [cited 2006 Jul 15]. *Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento.* [Adobe Acrobat document, 29p.] Available from: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/tb/MNT\\_Final\\_9-12-05a.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/tb/MNT_Final_9-12-05a.pdf)
22. Guide SV, Holland SM. Host susceptibility factors in mycobacterial infection. *Genetics and body morphotype.* *Infect Dis Clin North AM.* 2002;16(1):163-86.
23. Tanaka E, Amitani R, Niimi A, Suzuki K, Murayama T, Kuze F. Yield of computed tomography and bronchoscopy for the diagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(6):2041-6.
24. Moore EH. Atypical mycobacterial infection in the lung: CT appearance. *Radiology.* 1993;187(3):777-82.
25. Jeong YJ, Lee KS, Koh WJ, Han J, Kim TS, Kwon OJ. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in immunocompetent patients: comparison of thin-section CT and histopathologic findings. *Radiology.* 2004;231(3):880-6.
26. Ueki SY, Martins MC, Telles MA, Virgílio MC, Giampaglia CM, Chimara E, et al. *Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo.* *J Bras Patol Med Lab.* 2005;41(1):1-8.
27. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. *Korean J Radiol.* 2002;3(3):145-57.

## ***Sobre os autores***

---

### ***Maria das Graças Motta e Bona***

Professora Adjunta. Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI) Brasil.

### ***Maria José Soares Leal***

Professora. Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI) Brasil.

### ***Liliane Maria Soares Martins***

Professora Assistente. Universidade Estadual do Piauí – UESPI – Teresina (PI) Brasil.

### ***Raimundo Nonato da Silva***

Biólogo Molecular. Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI) Brasil.

### ***José Adail Fonseca de Castro***

Pesquisador, Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí – UFPI – e Professor Adjunto II, Universidade Estadual do Piauí – UESPI – Teresina (PI) Brasil.

### ***Semiramís Jamil Hadad do Monte***

Professora Associada III. Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina (PI) Brasil.