

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa



**Validação de um algoritmo para
identificação de *Mycobacterium* spp. no
diagnóstico laboratorial**

Inês João dos Santos da Silva Rodrigues

Mestrado em Microbiologia Clínica

2011

A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de (data em que recaiu a aprovação).

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa



**Validação de um algoritmo para
identificação de *Mycobacterium* spp. no
diagnóstico laboratorial**

Inês João dos Santos da Silva Rodrigues
Mestrado em Microbiologia Clínica

**Dissertação orientada pela Doutora Luísa Jordão e
co-orientada pelo Professor Doutor Thomas Häscheid**

**Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da
exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer
responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos
conteúdos nele apresentados.**

**Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética do INSA e
Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Lisboa.**

A presente dissertação não foi redigida segundo o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa por opção do autor.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Resumo	vii
Abstract	ix
CAPITULO I – INTRODUÇÃO	1
1. A IMPORTÂNCIA DAS MNT NA SAÚDE PÚBLICA	1
1.1. Significado clínico das MNT	2
1.2. Pseudo-infecção	5
2. INFECÇÕES POR MNT MAIS FREQUENTES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS	7
2.1. Agentes etiológicos	9
2.2. Manifestações Clínicas e Epidemiologia	25
3. MÉTODOS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE MNT	29
3.1. Identificação Fenotípica	30
3.2. Identificação Molecular	32
CAPITULO II – OBJECTIVOS	42
CAPITULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

4.	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	43
4.1.	Natureza das amostras.....	43
4.2.	Relação entre distribuição de infecções de MNT e características do hospedeiro	44
5.	ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	48
6.	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	50
6.1.	Identificação das estirpes micobacterianas pela análise das sequências do gene <i>16S rRNA</i>	50
6.2.	Identificação das estirpes micobacterianas pela análise das sequências do gene <i>hsp65</i>	56
7.	ANÁLISE DE PADRÕES DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> AMPLIFICADO POR PCR (PRA)	60
7.1.	Análise dos perfis de restrição dos padrões PRA.....	60
8.	RESULTADOS GLOBAIS.....	67
	CAPITULO IV – Conclusão e perspectivas futuras	83
	CAPITULO V – Materiais e métodos	85
1.	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	85
2.	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA.....	85
2.1.	Cultura em meio sólido e manutenção das estirpes de MNT.....	85
2.2.	Preparação da suspensão bacilar.....	86
2.3.	Crescimento das culturas de MNT a diferentes temperaturas	86
2.4.	Tempo de crescimento das culturas de MNT.....	87
2.5.	Produção de pigmento das culturas de MNT	87

3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	88
3.1. Extração de ADN genómico.....	89
3.2. Amplificação de um fragmento do gene <i>hsp65</i>	90
3.3. Amplificação de um fragmento do gene <i>16S rRNA</i>	92
3.4. Sequenciação dos genes <i>hsp65</i> e <i>16S rRNA</i>	93
4. ANÁLISE DE PADRÕES DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>hsp65</i> AMPLIFICADO POR PCR (PRA)	95
4.1. Digestão do ADN com as enzimas de restrição BstEII e HaeIII.....	95
4.2. Análise da digestão do fragmento do gene <i>hsp65</i> pelas enzimas BstEII e HaeIII	95
CAPITULO VI – BIBLIOGRAFIA.....	97
Anexos	130

AGRADECIMENTOS

À Doutora Luísa Jordão, a minha profunda gratidão por ter aceite ser minha orientadora, bem como pela perseverança inabalável e generosidade que sempre demonstrou. Um agradecimento muito especial pelo seu esforço, sacrifício pessoal e permanente dedicação, assim como a confiança e estímulo com que me presenteou e que foram vitais para a realização deste trabalho. Agradeço ainda todo o conhecimento científico e o rigor com que o partilhou, que em muito contribuíram para enriquecer esta jornada. Um muito obrigado pela amizade e camaradagem demonstradas.

Ao Professor Doutor Thomas Hänscheid, agradeço a disponibilidade demonstrada para ser co-orientador neste trabalho.

À Doutora Susana David, minha orientadora na fase inicial deste trabalho, agradeço a disponibilidade demonstrada e a cedência dos iniciadores para a amplificação do gene *hsp65*.

Ao Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, na pessoa do responsável pela Investigação e Desenvolvimento, Doutor João Paulo Gomes, por terem autorizado a realização do trabalho experimental nas suas instalações, que conduziu a esta dissertação.

À Dra. Maria João Simões, responsável pelo Laboratório de Infecções Respiratórias, pelo apoio e por ter compreendido a importância que este trabalho tem para mim.

A todos os meus colegas, dos Laboratórios de Infecções Respiratórias e Microbiologia agradeço a compreensão e disponibilidade demonstradas nomeadamente, à Doutora Paula Lavado e ao Dr. João Rodrigues. Um agradecimento especial à Dra. Paula Cristovão pela sua amizade, cumplicidade, auxílio técnico e ensinamentos ao longo do tempo.

À Mestre Carla Silva pela sua amizade e comentários finais sobre o trabalho.

Aos colegas da Unidade de Tecnologia e Inovação, pela disponibilidade e apoio técnico na realização da sequenciação de todas as estirpes utilizadas neste trabalho.

À minha mãe, irmãos e cunhados por todo o incentivo e apoio durante esta jornada. Aos meus sogros, Margareta e Jaime pelo carinho, apoio e disponibilidade que sempre demonstraram, e que em muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos meus filhos, António, David e Alexandra, por serem a razão que me faz acreditar em lutar por um futuro melhor. Ao Miguel, por todo o amor, força e apoio que tens demonstrado ao longo destes anos e que muito contribuíram para superar os obstáculos que surgiram ao longo deste trabalho. Este foi um objectivo alcançado por ambos. Obrigado por seres quem és e de partilhares a vida comigo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
°C	Graus Celsius
CD4 ⁺	Cluster de Diferenciação 4
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
<i>g</i>	Aceleração da gravidade
H	Hora
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
INF- γ	Interferão gama
IL	Interleucina
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
kDa	Kilodaltons
LJ	Lowenstein-Jensen
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
min	Minuto
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>

PRA	<i>PCR Restriction-enzyme Analysis</i>
m/v	massa/volume
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
r.p.m.	Rotações por minuto
s	Segundo
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TNF- α	Factor de Necrose Tumoral alfa
T _m	Temperatura de fusão
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UTP	Uracilo trifosfato
VIH	Vírus da Imunodeficiência Adquirida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos diversos passos na interacção entre micobactéria/hospedeiro humano.	8
Figura 2. Distribuição das estirpes clínicas de acordo com a idade dos doentes.....	45
Figura 3. Análise electroforética do fragmento de 440 pb do gene <i>hsp65</i>	56
Figura 4. Análise dos perfis de restrição dos padrões PRA para identificar as espécies de <i>Mycobacterium</i>	61
Figura 5. Comparação da eficiência dos métodos moleculares usados isoladamente vs. combinados com métodos fenotípicos.....	77
Figura 6. Comparação entre os diferentes métodos moleculares vs. característica fenotípica.....	78
Figura 7. Algoritmo dos padrões PRA- <i>hsp65</i> baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene <i>hsp65</i> . Padrões BstEII: 440 pb; 320/130 pb.	135
Figura 8. Algoritmo dos padrões PRA- <i>hsp65</i> baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene <i>hsp65</i> . Padrões BstEII: 320/115 pb; 240/120/100 pb.	136
Figura 9. Algoritmo dos padrões PRA- <i>hsp65</i> baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene <i>hsp65</i> . Padrões BstEII: 235/210 pb.	137
Figura 10. Algoritmo dos padrões PRA- <i>hsp65</i> baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene <i>hsp65</i> . Padrões BstEII: 235/210 pb e 235/130/85 pb.	138
Figura 11. Algoritmo dos padrões PRA- <i>hsp65</i> baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene <i>hsp65</i> . Padrões BstEII: 235/120/100 pb e 235/120/85 pb.	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de microrganismos por grupo de risco.....	3
Tabela 2. Avaliação comparativa de factores epidemiológicos em infecções por MNT.	47
Tabela 3. Propriedades das estirpes de <i>Mycobacterium</i> estudadas.....	49
Tabela 4. Resultados da identificação pela sequenciação do gene <i>16S rRNA</i>	54
Tabela 5. Resultados da identificação pela sequenciação do gene <i>hsp65</i>	59
Tabela 6. Resultados da identificação das MNT pelo método PRA.....	63
Tabela 7. Sumário dos resultados da identificação pelos métodos moleculares	70
Tabela 8. <i>Primers</i> utilizados para amplificar o gene <i>hsp65</i>	91
Tabela 9. <i>Primers</i> utilizados para amplificar o fragmento do gene <i>16S rRNA</i>	93
Tabela 10. Classificação das espécies MNT de acordo com o risco de infecção em seres humanos (Grupos de Risco I e II).....	131
Tabela 11. Espécies MNT que ainda não foram classificadas (2011).	132
Tabela 12. Espécies de <i>Mycobacterium</i> pertencentes ao grupo de risco III	132
Tabela 13. Propriedades das estirpes de <i>Mycobacterium</i>	133
Tabela 14. Sumário dos resultados da identificação das estirpes de micobactérias pelos métodos moleculares e fenotípicos.	140

RESUMO

O aparecimento da pandemia do VIH na última década do século XX foi responsável pelo aumento do número de casos de tuberculose e também de infecções oportunistas por Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) nesta população. O maior número de casos foi devido a infecções por micobactérias do complexo *M. avium* (MAC).

Posteriormente, foi descrito que estas infecções eram frequentes noutros grupos da população que tinham em comum a existência de deficiências no sistema imunitário (e.g., transplantados, indivíduos com problemas do fórum oncológico). Paralelamente, começou a aumentar o número de MNT que eram consideradas como potenciais agentes etiológicos de infecções. Entre estas, salientamos o *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. malmoense* e *M. xenopi*.

Actualmente, as infecções por MNT são um grave problema de saúde pública, que afecta tanto os indivíduos imunodeprimidos como os imunocompetentes, cujo diagnóstico e tratamento são muito difíceis devido à elevada taxa de resistência aos fármacos actualmente disponíveis. Este facto conduz a uma situação paradoxal em que microrganismos classificados nas classes I e II sejam equiparados a microrganismos como o *M. tuberculosis* na sua vertente mais assustadora (estirpes multirresistentes).

O primeiro passo para a resolução dos problemas levantados por estas infecções é a implementação de métodos de diagnóstico eficazes e rápidos. Estes devem permitir ao clínico não só implementar rapidamente uma terapêutica eficaz, como evitar a propagação das infecções a outros membros da comunidade. Este trabalho pretende ser um contributo para alcançar este objectivo. Para tal,

identificámos de acordo com as directrizes vigentes, pelos menos dois métodos de biologia molecular e um método fenotípico, 54 estirpes de MNT (anos 2008-2009) pertencentes à colecção de estirpes bacterianas da Unidade de Micobactérias do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA. Os resultados obtidos pelos diferentes métodos foram comparados de forma a avaliar a sua eficácia. A comparação dos três métodos (PRA-*hsp65*, sequenciação do *hsp65* e do *16S rRNA*), combinado com algumas características fenotípicas chave (tempo de crescimento e produção de pigmento), demonstraram que a correcta identificação de estirpes isoladas necessita da combinação de pelo menos dois métodos.

Palavras-chave: MNT, *hsp65*, *16S rRNA*, PRA *hsp65*

ABSTRACT

The last decade of the 20th century was marked by the appearance of the HIV pandemic. Together with this plague came not only the resurgence of tuberculosis but also the appearance of opportunistic infections due to nontuberculous mycobacteria (NTM) mainly by members of *Mycobacterium avium* complex (MAC).

Later on these opportunistic infections were also often described in other groups of patients (e.g., organ transplanted and oncologic patients), which shared a compromised immune system. Concurrently, the number of NTM recognized as potential ethological agents of human diseases increased. Among these we highlight *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. malmoense* and *M. xenopi*.

Currently, NTM infections are an important health care problem, affecting both immunodepressed and immunocompetent individuals, with a difficult diagnose and treatment since NTM are highly resistant to the available drugs. This fact lead us to a paradoxical situation in which microorganisms rated as level 1 and 2, based on biohazard classification, represent a threat similar to *Mycobacterium tuberculosis* multidrug resistant strains.

The first step to overcome this problem is the implementation of fast and efficient diagnosis methods. This will enable the physician to diagnose and rapidly implement a therapeutical scheme in order to treat the patient and prevent the spread of the disease within the community. The present work intends to be a step forward to the achievement of this goal.

In the present work 54 NTM strains from the INSA, Infection Diseases Department bacterial collection (years 2008-2009) were identified at least by two molecular biology methods following accepted guidelines. The results rendered by

three different methods (PRA-*hsp65*, *16S rRNA* and *hsp65* sequection) were compared in order to analyze their performance in NTM identification. The main conclusion drawn from this work is that the correct identification of a NTM can only be achieved by the combination of at least two different methods. Usually is necessary to combine genotyping methods with the analysis of key phenotypic characteristics.

Keywords: NTM, *hsp65*, *16S rRNA*, PRA- *hsp65*

CAPITULO I – INTRODUÇÃO

1. A IMPORTÂNCIA DAS MNT NA SAÚDE PÚBLICA

As micobactérias são os agentes etiológicos de algumas das doenças infecciosas que tiveram maior impacto na saúde pública ao longo dos tempos. Entre estas encontra-se a lepra cujo agente etiológico, *M. leprae*, foi identificado em 1874 por Hansen, e a tuberculose causada pelo bacilo de Koch (*M. tuberculosis*) identificado pelo mesmo em 1882. A classificação taxonómica destes microrganismos remonta a 1896, com a descrição do género *Mycobacterium* por Lehmann e Neumann¹⁶⁶. O género foi integrado na família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* e classe *Actinomycetes*.

Os requisitos mínimos para a inclusão de uma espécie no género *Mycobacterium* são: i) a capacidade de resistir à descoloração quando tratados com álcool-ácido, ii) a presença de ácidos micólicos com cadeias carbonadas longas (60-90 átomos de carbono) que, ao serem clivadas por pirólise, originam ésteres metílicos de ácidos gordos com um número de átomos de carbono que varia entre 22 e 26 e iii) o conteúdo de Guanina e Citosina no ADN ser de 61-71 mol%, com a excepção do *M. leprae* que tem 54-57 mol%¹³⁸.

O género *Mycobacterium* inclui mais de 150 espécies entre as quais se encontram, para além do *M. tuberculosis* e *M. leprae*, espécies saprófitas geralmente ambientais, e.g., o *M. smegmatis*¹⁸¹. As últimas são actualmente designadas por Micobactérias Não Tuberculosas (MNT), tendo sido inicialmente

referidas como “microrganismos atípicos álcool-ácido resistentes” em 1935 num trabalho de Pinner¹³⁴.

As MNT são maioritariamente não patogénicas em indivíduos imunocompetentes; contudo são responsáveis por doenças oportunistas em sujeitos que apresentam diversas condições de predisposição¹⁸¹. Nos últimos anos, o impacto das infecções por estas micobactérias tem aumentado, principalmente em indivíduos imunocomprometidos^{35,68,91,100,181}. Estes doentes, incluindo os com transplantes de órgãos, são conhecidos por serem mais susceptíveis a infecções por micobactérias⁵³. Têm sido comunicados casos de infecções mistas por MNT e de surtos relacionados com alguns procedimentos como administração de injeções intramusculares, mesoterapia^{21,27,43,45,90,123,145,222}. Também têm sido descritos surtos no pós-operatório de várias cirurgias, nomeadamente, de tratamentos estéticos^{28,56,188,197}. Recentemente o *M. massiliense* esteve na origem de um caso de sépsis fatal¹⁸⁵.

Actualmente, o diagnóstico laboratorial de micobactérias é um desafio devido ao número crescente de novas espécies micobacterianas, ao impacto que têm na saúde pública e à emergência de estirpes resistentes aos antibióticos disponíveis.

1.1. Significado clínico das MNT

Os microrganismos são classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em diferentes grupos de risco que reflectem a sua virulência para um hospedeiro particular: o ser humano^{42,216}. Esta classificação, que deverá ser utilizada apenas para fins laboratoriais, é apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Classificação de microrganismos por grupo de risco.

Grupo de Risco I	Risco de infecção ausente ou baixo, tanto para o indivíduo como para a comunidade. Doenças nunca ou raramente descritas em adultos imunocompetentes. As espécies são geralmente classificadas como agentes oportunistas com baixa probabilidade de serem patogénicos.
Grupo de Risco II	Risco de infecção moderado para o indivíduo, mas baixo para a comunidade. As espécies são geralmente classificadas como potenciais agentes patogénicos ou oportunistas.
Grupo de Risco III	Risco de transmissão por via aérea, após a infecção a doença é grave e por vezes fatal. Alto risco para o indivíduo, mas moderado para a comunidade. Estas espécies são geralmente classificadas como agentes patogénicos estritos.
Grupo de Risco IV	Alto risco de infecção individual e da comunidade, sendo muitas vezes fatal. Não existem espécies de micobactérias incluídas neste grupo de risco.

(Adaptado de World Health Organization, 2004²¹⁶).

As micobactérias estão integradas nos grupos de risco I, II e III (ver o Anexo I) sendo por isso muitas vezes classificadas como saprófitas (*M. gastri*), potencialmente patogénicas (*M. fortuitum*) e estritamente patogénicas (*M. tuberculosis*). O isolamento de patogénicos estritos em amostras clínicas conduz, na maioria dos casos, à identificação do agente etiológico da doença. Em espécies potencialmente patogénicas e saprófitas, como é o caso das MNT, a sua presença numa amostra clínica não significa necessariamente que sejam o agente etiológico

da doença. Uma vez que as MNT são microrganismos ambientais e são resistentes a muitos dos desinfetantes utilizados a sua presença pode ser o resultado de uma contaminação, *e.g.*, das condutas de abastecimento de água, ou dum instrumento cirúrgico que não seja passível de esterilização pelo calor.

Para evitar erros de diagnóstico algumas instituições, *e.g.*, a Sociedade Torácica Americana, instituíram algumas regras para classificar uma MNT como agente etiológico de uma patologia. Por exemplo, numa infecção pulmonar, o diagnóstico microbiológico deve ser apoiado por sinais clínicos evidentes, como a exclusão de outras desordens (*e.g.*, tuberculose), evidência radiológica de infiltrados (doença nodular ou cavitária) e por mais do que um isolamento da micobactéria do mesmo doente⁶⁶. No caso de lesões fechadas é suficiente um único isolamento em amostras colhidas de forma asséptica¹⁰¹.

Nas últimas duas décadas, têm sido relatados vários casos isolados de doença por MNT, bem como de surtos relacionados com cuidados de saúde, tais como infecções múltiplas ou recorrentes associadas a um único estabelecimento ou procedimentos hospitalares e pseudo-surtos (presumíveis surtos devido a falsos positivos de culturas de MNT)⁶⁶.

Uma amostra colonizada por micobactérias não tem qualquer significado clínico. Esta colonização pode resultar do contacto com equipamentos (*e.g.*, endoscópios e cateteres intravenosos) contaminados com micobactérias. Contudo, na maior parte dos casos, a contaminação é veiculada através da água canalizada e do contacto do doente com micobactérias ambientais. Embora não seja obrigatório, a colonização pode evoluir para uma infecção. A colonização, bem como a infecção, pode ser transitória, intermitente ou prolongada.

Por último, a espécie de MNT isolada da amostra clínica pode ser o resultado de uma contaminação durante o processamento da amostra no laboratório. É importante fazer a distinção entre colonização, infecção e doença, e submeter a critérios rigorosos, a fim de determinar o significado clínico de um isolado micobacteriano de um espécime patológico.

1.2. Pseudo-infecção

A pseudo-infecção, definida como a existência de uma cultura positiva (evidência laboratorial) na ausência de sinais clínicos de infecção, é uma situação frequente para as MNT, podendo contudo, ocorrer também com membros do complexo *M. tuberculosis*¹⁰¹. As MNT raramente são a causa de doença. Para algumas espécies a probabilidade de serem isoladas de amostras clínicas como resultado duma contaminação, durante a recolha ou processamento laboratorial da mesma, é maior do que como agente etiológico. No entanto, mesmo estas espécies podem, em certas circunstâncias, causar doença. O clínico, portanto, deve sempre conhecer o contexto em que um isolado de MNT foi obtido para avaliar com precisão o significado clínico do mesmo e evitar desnecessárias intervenções terapêuticas⁶⁶.

Alguns exames médicos e procedimentos invasivos utilizados na recolha de amostras clínicas requerem o uso de equipamentos especiais, e.g., endoscópios gastrointestinais e broncoscópios. Como estes instrumentos são difíceis de esterilizar podem contaminar a amostra durante a sua recolha causando, deste modo, uma pseudo-infecção. Por outro lado, estes mesmos instrumentos, quando contaminados por micobactérias ambientais ou por outras espécies podem ser

responsáveis pela infecção do doente, havendo possibilidade de evoluir para doença e conseqüentemente proporcionar a disseminação de pequenos surtos.

Em geral, a contaminação de equipamentos médicos por *M. tuberculosis* tem a sua origem nos doentes. No caso das MNT a origem da contaminação reside maioritariamente na água canalizada, podendo ocorrer através de soluções usadas na desinfecção de endoscópios e durante a lavagem automática, entre outros¹⁷¹. No último caso, a contaminação pode resultar da presença de um biofilme no interior das máquinas⁶¹.

Tem sido sugerido que o tracto respiratório pode ser infectado com MNT sem evidência de doença, particularmente em doentes com doença respiratória crónica⁶⁶. Esta condição tem sido referida como "colonização" e foi descrita com mais frequência para as espécies do MAC. A colonização sem infecção (*i.e.*, sem invasão dos tecidos) é uma condição não comprovada para as MNT⁶⁶. Como estas podem ser isoladas devido a contaminação ambiental, incluindo a contaminação das amostras clínicas, em geral é necessário para fins de diagnóstico o isolamento de uma espécie em mais do que uma amostra do mesmo doente.

A diferenciação entre verdadeira infecção e pseudo-infecção é de extrema importância, uma vez que o tratamento de algumas infecções é demorado e muitas vezes complicado (*e.g.*, *M. xenopi*)⁶⁶.

Como as MNT são comuns no ambiente e resistentes aos desinfectantes vulgarmente utilizados, podem estar presentes em amostras não estéreis dos doentes, tais como expectoração e equipamentos médicos contaminados. Esta ubiquidade pode ter como consequência as pseudo-infecções. Assim, é de extrema

relevância diferenciar pseudo-infecção e estabelecer a relevância clínica do isolado de MNT⁶⁶.

2. INFECÇÕES POR MNT MAIS FREQUENTES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS

As infecções por micobactérias são influenciadas por múltiplos factores (Figura 1.) que condicionam o desfecho das mesmas. A patogénese associada a infecções por patogénicos estritos, como o *M. tuberculosis* e *M. leprae*, estão bem documentadas¹⁷⁵.

Contudo, tal não sucede com as infecções por MNT incluindo a infecção por *M. ulcerans*, o agente etiológico da úlcera de Buruli, que é a terceira infecção por micobactérias mais comum na população humana¹³⁶. Esta patologia tem uma distribuição geográfica confinada a países tropicais e africanos. Nos países ocidentais as infecções por MNT mais frequentes surgem na população imunodeprimida. A patogénese destas infecções, embora grandemente desconhecida, apresenta alguns denominadores comuns.

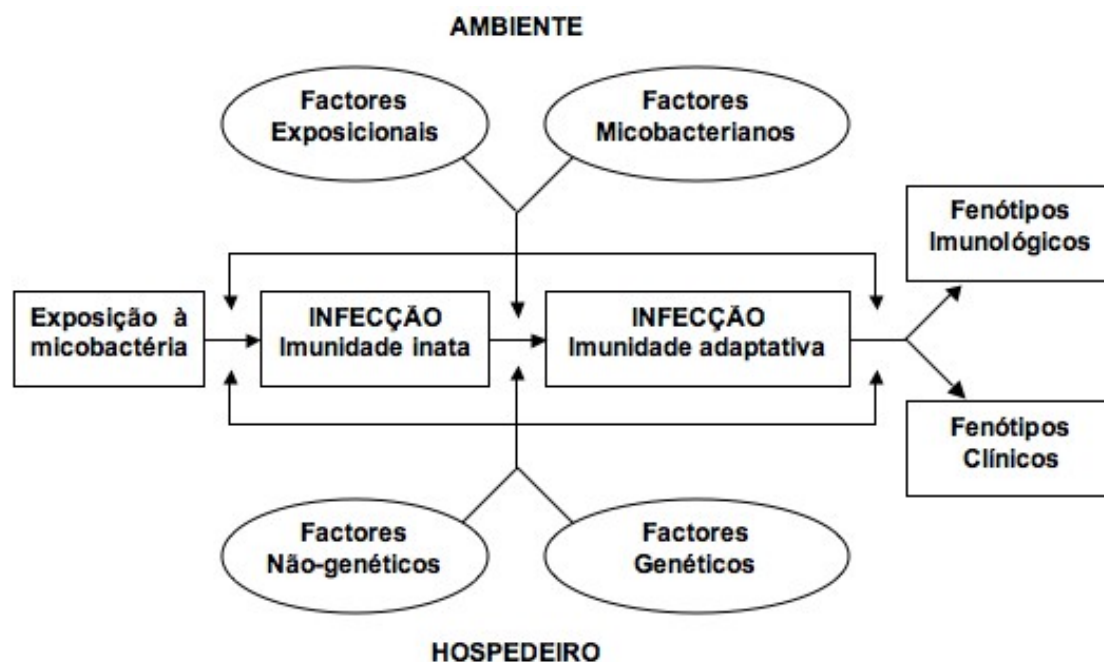


Figura 1. Representação esquemática dos diversos passos na interacção entre micobactéria/hospedeiro humano. (Adaptado de Casanova *et al*, 2002²⁹).

Em doentes infectados com VIH, as infecções disseminadas por MNT normalmente só ocorrem quando o número de linfócitos T CD4⁺ apresenta valores inferiores a 50 células por microlitro⁷⁷. Nos doentes não infectados pelo VIH este tipo de infecção tem sido associada a uma predisposição genética do hospedeiro. Esta resulta da existência de mutações nos genes do receptor de interferão (IFN)- γ , no receptor β -1 da interleucina (IL)-12 e na IL-12 p40 que inviabilizam a activação das cascatas de sinalização intracelular, nomeadamente as que conduzem à secreção do factor de necrose tumoral (TNF)- α que desempenha um papel chave no controlo das infecções micobacterianas^{29,55}. No conjunto, estes factos sugerem que a imunidade celular desempenha um papel fundamental na resistência do hospedeiro a infecções por micobactérias⁷⁷.

O elevado número de potenciais agentes etiológicos associado ao tropismo para diferentes órgãos leva ao aparecimento de manifestações clínicas distintas e dificulta a caracterização das infecções por MNT. Contudo, tanto os agentes etiológicos como as manifestações clínicas mais relevantes estão perfeitamente identificados, pelo que serão descritas de seguida.

2.1. Agentes etiológicos

2.1.1. *Mycobacterium abscessus*

Características gerais: Anteriormente denominado *M. chelonae* subsp. *abscessus*, foi reconhecida como nova espécie em 1992⁹⁷. O *M. abscessus* é uma micobactéria não-cromogénica de crescimento rápido, caracterizada pela sua incapacidade de crescer a 42°C. Cresce em meio sólido de MacConkey, em meio líquido com uma concentração de cloreto de sódio de cinco por cento, não produz nitrato redutase e é incapaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono. Esta micobactéria origina colónias mucóides morfologicamente idênticas às do *M. chelonae*.

Epidemiologia: O *M. abscessus* é uma micobactéria ambiental. É isolado maioritariamente de amostras de água canalizada, mas também pode ser encontrado em amostras de solo. Em humanos, causa infecções da pele e tecidos moles. É a segunda MNT mais frequentemente isolada em doentes com fibrose cística que padecem de infecções respiratórias, logo depois do *M. avium* e em infecções extra pulmonares, imediatamente ao *M. fortuitum*⁶⁶. A maioria dos casos de infecções por MNT que surgem após a administração de injectáveis estão associadas ao *M. abscessus*²²². Esta micobactéria foi responsável por surtos de

abcessos pós-injecção na Colômbia e em infecções no pós-operatório de lipoaspirações e lipoescultura na Venezuela^{26,125,198}.

2.1.2. *Mycobacterium asiaticum*

Características gerais: O *M. asiaticum* foi descrito pela primeira vez em 1971 por Weiszfeiler e colaboradores²⁰⁸. Esta MNT é um produtor fotocromógeno de crescimento lento, que pode ser diferenciado das restantes, pelo resultado positivo na hidrólise do Tween, e pelo resultado negativo na redução de niacina e nitrato.

Epidemiologia: Em 1983, na sequência de cinco casos de doença pulmonar, foi considerado patogénico para o Homem¹⁵.

2.1.3. Complexo *Mycobacterium avium*

Características gerais: O MAC é composto pelo *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. marseillense*, *M. vulneris* e *M. timonense*^{30,194}. São micobactérias de crescimento lento, não-cromogénicas ou escotocromogénicas e que não hidrolisam Tween 80. As colónias de *M. avium* são geralmente lisas, planas e transparentes; no entanto, é possível visualizar colónias opacas, principalmente quando cultivadas em meio Lowenstein-Jensen com períodos de incubação prolongada. Estas colónias tendem a desenvolver pigmentação amarela quando as culturas são mantidas à temperatura ambiente.

A espécie *M. avium* tinha, até recentemente, três subespécies diferentes: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *silvaticum*.

Estas três subespécies apresentam entre si diferenças fenotípicas, genotípicas e epidemiológicas^{138,180}. Recentemente, as estirpes de *M. avium* isoladas a partir de amostras humanas, foram classificadas numa nova subespécie: *M. avium* subsp. *hominissuis*¹¹⁹. O *M. avium* e o *M. intracellulare* podem ser distinguidas pela técnica de PRA (*PCR Restriction-enzyme Analysis*) do gene *hsp65*, porque ambas apresentam diferentes padrões de restrição^{99,129,176}.

Epidemiologia: O *M. avium* é isolado de amostras provenientes de ambientes antrópicos, como a água potável. Esta deverá ser uma das fontes de infecção mais comuns de doentes com SIDA por esta MNT. Vários estudos demonstraram a presença da mesma estirpe de *M. avium* em amostras de água canalizada e de doentes infectados colhidas no mesmo espaço físico^{121,199}. As espécies que integram o MAC não apresentam um tropismo exclusivo em termos de hospedeiro. Para além do Homem, são capazes de causar infecções em suínos e aves. Embora existam semelhanças entre as estirpes que infectam os seres humanos e os animais, a transmissão animais-humanos não parece ser relevante¹⁰¹. O *M. avium* é o agente etiológico da maioria das infecções em doentes com SIDA⁶⁶. Em contraste, o *M. intracellulare* tem sido encontrado com maior frequência em doentes que não padecem desta patologia. Por esta razão, é recomendada a diferenciação entre ambas as espécies, especialmente no contexto da infecção por VIH¹³⁵.

As doenças pulmonares, em doentes imunocompetentes, são mais frequentes quando existe uma lesão pulmonar prévia (fibrose cística, diminuição da função pulmonar) e linfadenite cervical, que é uma doença esporádica nas crianças. Em doentes imunocomprometidos, particularmente em doentes com SIDA, a manifestação mais comum são as infecções disseminadas associadas a uma

redução do número de linfócitos CD4⁺ circulantes.

O *M. chimaera* foi isolado de doentes com diversas patologias pulmonares, o *M. colombiense* de sangue e expectoração de doentes infectados com VIH e de gânglios linfáticos em crianças^{124,186,200}. O *M. arosiense* foi descrito numa criança imunocomprometida com lesões osteomielíticas disseminadas¹¹. A análise da sequência parcial do gene *rpoB* permitiu distinguir o *M. bouchedurhonense*, o *M. marseillense* e o *M. timonense* de isolados de doentes com doenças pulmonares¹³. O *M. vulneris* foi isolado de uma ferida ulcerada numa mulher e de um nódulo linfático numa criança¹⁹⁴.

2.1.4. *Mycobacterium celatum*

Características gerais: O *M. celatum* foi descrito pela primeira vez em 1993, após ter sido isolado de várias amostras clínicas do tracto respiratório²⁴. As colónias têm sido descritas como não pigmentadas, mas a maioria das estirpes são amarelo pálido. O mais importante teste bioquímico distintivo parece ser a actividade arilsulfatase positiva. A ausência de crescimento a 45°C permite diferenciar esta espécie do *M. xenopi*.

Epidemiologia: O *M. celatum* está envolvido em infecções em doentes com SIDA. Recentemente foi descrito um caso de infecção pulmonar grave num doente, aparentemente imunocompetente¹³³.

2.1.5. *Mycobacterium chelonae*

Características gerais: Em 1953, foi isolada uma nova espécie de micobactérias, o *M. abscessus*, a partir da biópsia dum abscesso no joelho de um doente¹⁰¹. Na sequência dos estudos de Stanford e Pattyn, que tiveram como objecto estirpes isoladas de amostras de abscessos formados após a administração de injectáveis, surgiu oficialmente a designação de *M. chelonae*^{130,174}.

O *M. chelonae* é uma micobactéria não-cromogénica de crescimento rápido. As colónias são mucóides e surgem em menos de sete dias de incubação, utilizando meios de cultura convencionais (e.g., Lowenstein-Jensen e meio Midlebrook 7H11). As principais características bioquímicas são: resultado positivo em três dias para arilsulfatase, crescimento em meio de MacConkey sem cristal violeta, resultado negativo para a absorção do ferro e redução de nitrato.

Esta espécie deve ser diferenciada de outras espécies potencialmente patogénicas não pigmentadas de crescimento rápido, tais como o *M. fortuitum* e o *M. abscessus*, pois o tratamento pode variar de acordo com a espécie⁶⁶.

Epidemiologia: Esta espécie é abundante nos ambientes antrópicos, como a água canalizada, mas também tem sido isolada de outras amostras de água colhidas em lagos, rios, mar e sistemas de águas residuais. A sua presença ubíqua no ambiente explica o facto desta espécie ser um contaminante comum nos laboratórios. Devido à sua ubiquidade, pode contaminar soluções, dispositivos médicos e traumatismos cirúrgicos. Nos humanos está associada a infecções no aparelho respiratório, tecidos moles e infecções disseminadas, principalmente em doentes com factores de risco como o transplante renal, cirurgia e corticoterapia¹⁰¹. Recentemente foi

responsável por vários surtos após cirurgia oftalmológica por laser e procedimentos estéticos (cirurgia plástica, mesoterapia)^{32,153,202}.

2.1.6. *Mycobacterium fortuitum*

Características gerais: O *M. fortuitum* foi descrito por Costa da Cruz em 1938⁵⁸. É uma MNT ambiental, não-cromogénica de crescimento rápido. Esta micobactéria apresenta resultado positivo para os seguintes testes bioquímicos: arilsulfatase em três dias, crescimento em meio de McConKey sem cristal violeta, crescimento a 42°C e na presença de uma concentração de cloreto de sódio de cinco por cento e actividade de nitrato redutase. O *M. fortuitum* é incapaz de utilizar inositol e manitol como fontes de carbono. As colónias não são pigmentadas e apresentam aspecto rugoso.

Epidemiologia: Esta espécie tem sido isolada a partir de amostras de água canalizada, sistemas de distribuição de água e de diversos solos, em todo o mundo¹⁰¹. Nos seres humanos, é frequentemente associada a infecções cutâneas e mais raramente a doença pulmonar e infecção disseminada⁶⁶. É responsável por infecções após mamoplastia e outros procedimentos de cirurgia plástica, sendo também agente etiológico comum nas infecções do esterno após cirurgia cardíaca^{39,96,146,202}.

2.1.7. *Mycobacterium genavense*

Características gerais: O *M. genavense* foi isolado pela primeira vez, em 1992, a partir do sangue de um doente com SIDA²⁰. Esta micobactéria apresenta a

particularidade de ser incapaz de crescer em vários meios sólidos correntemente utilizados na identificação de micobactérias, como meio de Lowenstein-Jensen e meio Middlebrook 7H11. Esta característica faz com que muitos laboratórios não consigam identificar.

Epidemiologia: A fonte de infecção por *M. genavense* nos humanos é desconhecida, embora tenha sido proposto que à semelhança do *M. avium* tenha origem no intestino⁴⁶. O *M. genavense*, geralmente, causa doença em indivíduos com SIDA e pode ocorrer em combinação com outras micobactérias, como o *M. avium*⁶⁶. Um caso de infecção por *M. genavense* disseminada foi relatado por Hadad e colaboradores⁶⁷.

2.1.8. *Mycobacterium gordonae*

Características gerais: O *M. gordonae* é ubíquo no ambiente, tem crescimento lento e é escotocromogénico. Esta espécie hidrolisa Tween 80, não é capaz de reduzir o nitrato, sendo o teste da urease é negativo e o da catalase positivo. As colónias são lisas, com pigmentação amarela ou laranja. Embora consiga crescer no intervalo térmico compreendido entre 25 e 37°C, a temperatura de crescimento óptimo é 37°C. A análise das sequências do gene 16S *rRNA* demonstrou uma separação entre *M. gordonae* e o *M. asiaticum*^{148,174}. Como o *M. gordonae* é uma espécie muito polimórfica tem vários padrões de restrição PRA^{49,68,179}.

Epidemiologia: O *M. gordonae* é uma MNT ambiental, vulgarmente encontrada na água¹⁰¹. Esta espécie é o contaminante laboratorial mais comum em micobacteriologia⁶⁶. O *M. gordonae* pode causar infecções, especialmente em

indivíduos com deficiências no sistema imunitário, tais como: doentes com SIDA, submetidos a terapêutica com corticoesteróides, com carcinoma, submetidos a diálise peritoneal, transplantados e em crianças^{4,10,18,152,207}.

2.1.9. *Mycobacterium haemophilum*

Características gerais: *M. haemophilum* foi descrito pela primeira vez em 1978, como o agente etiológico de infecções cutâneas em doentes com doença de Hodgkin¹⁷⁰. É uma micobactéria de crescimento lento que tem requisitos especiais de crescimento, como a adição de ferro (hemina ou citrato de amónio férrico) ao meio de cultura. A temperatura óptima de crescimento varia entre 30-32°C, à semelhança do *M. marinum*.

Epidemiologia: *M. haemophilum* é um patogénico típico de doentes imunocomprometidos, particularmente aqueles com SIDA¹⁶⁵. A infecção por *M. haemophilum* também tem sido descrita em adultos imunocompetentes, ao nível da cervical, da mandíbula inferior e de nódulos pulmonares. Em crianças são observadas linfadenopatias^{7,158,211}.

2.1.10. *Mycobacterium kansasii*

Características gerais: Desde a descrição do *M. kansasii*, em 1955, têm surgido diversos relatos a documentam a sua presença em amostras de água¹⁰¹. Esta micobactéria de crescimento lento é fotocromogénica, cresce entre os 32-42°C, sendo 37°C a sua temperatura óptima. As principais características bioquímicas são a existência de reacção positiva para a catalase, urease, pirazinamidase, nitrato

redutase e hidrólise de Tween 80. A morfologia das colónias varia entre rugoso a liso com bordos irregulares.

Epidemiologia: O *M. kansasii* foi isolado principalmente de amostras de água canalizada e raramente a partir do solo. Embora esta MNT afecte principalmente homens caucasianos de meia-idade, pode afectar doentes adultos de qualquer sexo, raça ou idade. Os factores de risco para infecção por *M. kansasii* incluem: pneumoconiose, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), doença micobacteriana anterior e alcoolismo⁵.

Em áreas geográficas onde a infecção pelo VIH é comum, mesmo fora das áreas endémicas para a doença pulmonar por *M. kansasii*, a prevalência de *M. kansasii* pode ser elevada¹⁷.

2.1.11. *Mycobacterium malmoeense*

Características gerais: O *M. malmoeense* foi descrito em 1977, com base num conjunto único de características bioquímicas e de cultura partilhado por sete isolados¹⁶². A identificação laboratorial do *M. malmoeense* é, por vezes difícil, pois pode ser confundida com outras MNT de crescimento lento não pigmentadas, como o *M. gastri*, *M. avium* ou *M. shimoidei*. O resultado do teste de hidrólise de Tween 80 é positivo e permite a diferenciação rápida do MAC.

Epidemiologia: O *M. malmoeense* tem sido isolado de amostras de água de nascentes da Finlândia e do solo no Japão^{82,155}. Esta micobactéria é um patogénico que causa doença pulmonar, sendo muitas vezes responsável por infecções disseminadas em doentes imunocomprometidos²²¹.

2.1.12. *Mycobacterium marinum*

Características gerais: Foi descrito pela primeira vez em 1926, tendo sido isolado de peixes doentes e amostras colhidas em aquários. O *M. marinum* é uma micobactéria fotocromogénica de crescimento lento, que cresce entre 25-32°C. As colónias são lisas e planas e a pigmentação pode ser observada tanto a 25°C como a 32°C (após várias subculturas pode ser mantida a 37°C). As principais características bioquímicas são: redução de nitrato e catalase semi-quantitativa negativas, hidrólise de Tween 80 positiva (a maioria das estirpes), arilsulfatase e urease positivas.

Epidemiologia: O *M. marinum* é uma micobactéria ambiental, principalmente associada a infecções em peixes. Nos humanos, esta micobactéria é o agente etiológico do "granuloma da piscina" ou "granuloma do tanque de peixes"^{110,215}. O *M. marinum* está amplamente distribuído em ambientes aquáticos, em água doce e água salgada, especialmente em águas relativamente paradas ou estagnadas, como em tanques de aquacultura ou piscinas cuja água não tem cloro adicionado¹¹⁰. A infecção é geralmente adquirida através de uma lesão dos tecidos moles da mão num ambiente aquático. O *M. marinum* causa infecções dos tecidos moles envolvendo a pele e o osso^{8,85,110,215}.

2.1.13. *Mycobacterium mucogenicum*

Características gerais: Inicialmente foi classificado no grupo das micobactérias semelhantes ao *M. chelonae* uma vez que, bioquimicamente, é similar a este. A análise do gene 16S *rRNA* revelou a sua diversidade relativamente a outras

micobactérias, tendo sido proposto o nome de *M. mucogenicum*¹⁷³. Esta MNT é não-cromogénica, de crescimento rápido e as suas colónias têm aspecto suave e mucóide. O seu perfil de ácidos micólicos é semelhante ao de outras micobactérias de crescimento lento (*M. terrae*, *M. xenopi*), mas é único entre as micobactérias de crescimento rápido.

Epidemiologia: O *M. mucogenicum* é vulgarmente isolado de amostras de água canalizada. A maioria dos isolados apresenta colónias mucóides. Esta MNT pode ser o agente etiológico de infecções nosocomiais e, mais vulgarmente, de infecções pós-traumáticas de feridas²⁰⁴.

2.1.14. *Mycobacterium nonchromogenicum*

Características gerais: O *M. nonchromogenicum* foi descrito em 1965, por Tsukamura⁵⁸. É uma micobactéria não-cromogénica de crescimento lento que pertence ao complexo *M. terrae*¹⁸³. As principais características bioquímicas são a existência de reacção positiva para a hidrólise do Tween 80 e para a pirazinamidase e reacção negativa no teste de redução de nitrato. Esta micobactéria é caracterizada ainda pela existência de crescimento a 42°C.

Epidemiologia: O *M. nonchromogenicum* é uma micobactéria ambiental. Esta espécie é considerada como não patogénica, mas é o membro do complexo *M. terrae* mais frequentemente envolvido em infecções humanas, incluindo tenossinovite crónica após trauma¹⁴². Ridderhof e colaboradores concluíram que esta micobactéria é o único patogénico do complexo *M. terrae*¹⁴².

2.1.15. *Mycobacterium scrofulaceum*

Características gerais: O *M. scrofulaceum* foi isolado de lagos naturais, rios e aerossóis^{59,209}. Este microrganismo é uma micobactéria escotocromogénica de crescimento lento, cuja temperatura de crescimento óptima são os 37°C, não hidrolisa Tween 80 nem reduz os nitratos. Os testes da urease (93%) e catalase (31-99%) semi-quantitativa são, geralmente, positivos¹⁹¹. As colónias são lisas e a sua cor oscila entre o amarelo e o laranja.

Epidemiologia: *M. scrofulaceum* foi isolado a partir de amostras ambientais, maioritariamente de água de lagos e rios, em países com climas quentes. Nos últimos anos, o número de isolados tem vindo a diminuir. Esta tendência pode ser explicada pela descrição de novas espécies isoladas de gânglios linfáticos, que no passado poderiam ter sido confundidas com *M. scrofulaceum*⁶⁶. Esta MNT é um patogénico oportunista que tem sido associada a casos de linfadenite em crianças, infeções disseminadas, doenças pulmonares e infeções cutâneas^{79,108,159,214}.

2.1.16. *Mycobacterium shimoidei*

Características gerais: O *M. shimoidei* foi descrito, em 1975, no contexto duma infeção respiratória¹⁸⁹. Esta micobactéria partilha algumas características bioquímicas com outras espécies de micobactérias não-cromogénicas de crescimento lento, principalmente do *M. malmoense* e do complexo *M. terrae*. O *M. shimoidei* cresce a 45°C, mas não a 25°C e apresenta um resultado positivo para hidrólise de Tween 80 (10 dias).

Epidemiologia: A maioria dos isolados clínicos de *M. shimoidei* estão associados a

doença pulmonar cavitária^{115,182}. Na maioria dos casos os doentes tinham um historial de doença pulmonar pré-existente ou subjacente. Houve também um relato de doença disseminada num doente com SIDA⁶⁶.

2.1.17. *Mycobacterium simiae*

Características gerais: O *M. simiae* foi isolado pela primeira vez em 1965⁵⁸. O *M. simiae* é uma micobactéria fotocromogénica que cresce a 37°C, mas não a 45°C. Em alguns isolados clínicos o *M. simiae* pode assemelhar-se ao MAC, mas o teste de niacina permite a diferenciação destas espécies. É difícil diferenciar o *M. simiae* do *M. scrofulaceum* com base nos testes tradicionais, como a produção de niacina. No entanto, estas duas estirpes podem ser diferenciadas com base na produção de pigmento.

Epidemiologia: O *M. simiae* é geralmente um contaminante ambiental, raramente associada com doença humana⁶⁶. A maioria dos casos descritos são de doença pulmonar, embora também tenham sido descritos casos de infecção em doentes com SIDA^{66,195}.

2.1.18. *Mycobacterium smegmatis*

Características gerais: O *M. smegmatis* foi isolado pela primeira vez por Lustgarten e colaboradores, em 1885⁵⁸. Este microrganismo é uma MNT cromogénica de crescimento rápido. As suas principais características bioquímicas incluem o crescimento na presença duma concentração de cloreto de sódio de cinco por cento, teste da arilsulfatase negativo (3 dias), redução de nitrato positivo e crescimento a

45°C. Alguns autores mencionam o grupo *M. smegmatis* em que incluem as espécies recentemente descritas *M. wolinskyi* e *M. goodii*²².

Epidemiologia: O *M. smegmatis* raramente é a causa de uma infecção significativa. Esta MNT tem sido associada a linfadenite, celulite, osteomielite, ou infecções de ferida. Também tem sido associada a infecções do esterno após cirurgia cardíaca, bacteremia de cateter intravenosa, e abscesso da mama após mamoplastia de aumento²⁰³. O *M. smegmatis* raramente é o agente etiológico de doença pulmonar⁶⁵.

2.1.19. *Mycobacterium szulgai*

Características gerais: O *M. szulgai* é um patogénico comum em humanos e foi descrito pela primeira vez em 1972⁵⁸. É importante diferenciar o *M. szulgai* de outras micobactérias escotocromogénicas devido à sua patogenicidade. Esta micobactéria, de crescimento lento, é escotocromogénica a 37°C, mas fotocromogénica a 25°C. As suas características principais são a existência de resultados positivos nos testes de redução de nitrato e da presença de urease.

Epidemiologia: A doença pulmonar, indistinguível da causada por *M. tuberculosis*, é o tipo mais comum de infecção causada pelo *M. szulgai*⁶⁶. A infecção extrapulmonar devido a *M. szulgai* inclui casos de tenossinovite da mão, bursite do olécrano, osteomielite, ceratite, linfadenite cervical e infecção renal ou cutânea⁶⁶. Têm sido relatadas infecções disseminadas em doentes com SIDA e doentes imunocomprometidos⁶⁶.

2.1.20. *Mycobacterium terrae*

Características gerais: O *M. terrae* foi descrito pela primeira vez em 1966, sendo uma MNT não-cromogénica de crescimento lento⁵⁸. As principais características bioquímicas são: reacção positiva para a hidrólise Tween 80 e nitrataze, reacção negativa para arilsulfatase, urease e pirazinamidase, e ausência de crescimento a 42°C. As colónias são rugosas e não pigmentadas. Outras espécies, como o *M. hiberniae*, *M. nonchromogenicum*, *M. triviale* e recentemente, o *M. algericum*, *M. arupense*, *M. kumamotoense* e *M. senuense*, têm sido consideradas como pertencentes ao complexo *M. terrae*^{114,122,154,183}. No entanto, podem ser diferenciados com base nas características bioquímicas, análise de ácidos micólicos e sequenciação do gene *16S rRNA*⁶⁶.

Epidemiologia: O *M. terrae* é uma micobactéria ambiental que tem sido isolada de amostras de água, solo e vegetais. A sua recuperação a partir de amostras clínicas deve ser considerada como uma contaminação, a não ser que seja repetidamente isolado. No entanto, esta espécie tem sido descrita como causa de infecções em humanos, tais como infecções no joelho, sinoviais, pulmonares, e apenas raramente infecções disseminadas em doentes com SIDA¹⁰¹.

2.1.21. *Mycobacterium ulcerans*

Características gerais: *M. ulcerans* foi isolado pela primeira vez em 1948, da biópsia de uma úlcera¹⁰¹. Este microrganismo é uma micobactéria ambiental de crescimento lento, que pode ser ligeiramente pigmentada. Esta espécie cresce em meio de LJ, meio líquido MGITTM (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes,

EUA) ou meio Middlebrook 7H9 em condições de microaerofilia (2,5 - 5% de oxigénio). A temperatura de crescimento óptima é de 30°C. A técnica de PRA-*hsp65* permite a diferenciação entre o *M. ulcerans* tipo 2 e o *M. marinum* tipo 1.

Epidemiologia: O *M. ulcerans* causa lesões necróticas progressivas da pele e tecidos subjacentes, conhecida como úlcera de Buruli⁵⁹. A infecção ocorre através do contacto de áreas da pele, com feridas abertas, com água contaminada ou com o solo. As lesões são mais frequentes em crianças e jovens adultos, resultando muitas vezes em deformidades das extremidades dos membros⁶⁶.

2.1.22. *Mycobacterium xenopi*

Características gerais: O *M. xenopi* foi descrito pela primeira vez em 1959⁵⁸. A principal característica desta micobactéria reside na sua capacidade de crescer a 45°C. Esta micobactéria é ainda caracterizada por uma reacção positiva para a arilsulfatase e negativa para a hidrólise de Tween 80. Estas características são importantes porque *M. xenopi* pode ser erradamente identificado como *M. avium* ou *M. intracellulare*.

Epidemiologia: Foram descritas infecções extra-pulmonares e disseminadas em doentes imunocomprometidos, sendo a SIDA um factor de risco para infecções por *M. xenopi*¹⁶⁴. Haffner e colaboradores consideraram o *M. xenopi* como a espécie mais frequentemente identificada no laboratório de rotina⁶⁸.

2.2. Manifestações Clínicas e Epidemiologia

As MNT apresentam a capacidade de afectarem diferentes órgãos do hospedeiro, exibindo um tropismo diferente consoante a idade do mesmo. Nos adultos, a doença pulmonar crónica, infecção dos ossos, articulações e tendões são as patologias mais frequentes. Nas crianças, a pele e os nódulos linfáticos são os órgãos mais afectados. As principais patologias são as que descrevemos em seguida.

2.2.1. Infecções pulmonares

A doença pulmonar causada por MNT ocorre normalmente na doença estrutural pulmonar, tal como: DPOC, bronquiectasia, fibrose cística, pneumoconiose, prévia tuberculose, proteinose alveolar pulmonar e distúrbios de motilidade esofágica⁶⁶.

A doença pulmonar crónica é a manifestação clínica mais comum das MNT⁶⁶. As MNT isoladas com maior frequência nos EUA, são do complexo *M. avium* (MAC) seguido pelo *M. kansasii* e *M. abscessus*⁶⁶. Na Europa, são frequentes as infecções causadas por *M. xenopi* e, particularmente na Escandinávia e Grã-Bretanha, o principal agente etiológico é o *M. malmoense*^{73,84}. Os doentes com fibrose cística são mais susceptíveis a infecções bacterianas, sendo as crianças mais afectadas pelo *M. abscessus* e espécies próximas e os adultos por membros do MAC¹⁸¹.

Embora as micobactérias de crescimento lento sejam as principais responsáveis pelas doenças pulmonares e linfonodais, as MNT de crescimento rápido, em particular o *M. immunogenum*, são as espécies mais frequentemente

envolvidas na pneumonia por hipersensibilidade^{12,183}. O *M. bolletii* (actualmente reclassificado como *M. abscessus* subsp. *bolletii*) é um patogénico emergente, responsável por infecções do tracto respiratório em doentes com função respiratória comprometida, sendo muito resistente à claritromicina^{2,103}.

2.2.2. Infecções linfonodais

A linfadenite cervical localizada, causada por MNT, é mais comum em crianças. Nas crianças, com idades compreendidas entre um e cinco anos de idade, é observado um pico de incidência^{25,71,213}. Na ausência de infecção por VIH, a linfadenite raramente afecta adultos⁶⁶.

Nas últimas décadas foi observada uma importante mudança na etiologia da linfadenite cervical. O *M. scrofulaceum*, anteriormente considerado como a causa predominante da doença, passou a ser bastante raro, enquanto que 80% dos casos foram atribuídos às micobactérias do MAC²¹³. Na Escandinávia, Reino Unido, norte da Europa e Israel, tem vindo a aumentar a incidência desta doença devido ao *M. malmoense* e *M. haemophilum*^{41,73,112,221}. Verifica-se o aumento do número de isolamentos, a partir de biópsias de nódulos linfáticos, de espécies de MNT recentemente descritas, nomeadamente *M. lentiflavum* e o *M. bohemicum*^{80,132}.

2.2.3. Infecções na pele e tecidos moles

Embora praticamente todas as espécies de MNT tenham sido descritas como agentes etiológicos de doenças cutâneas, as espécies que mais frequentemente causam infecções localizadas na pele e tecido subcutâneo são o *M. fortuitum*, *M.*

abscessus, *M. chelonae*, *M. marinum* e *M. ulcerans*^{59,66,96}. As fontes mais comuns incluem o contacto com água contaminada ou peixes infectados, traumas e feridas cirúrgicas.

Embora a maioria das lesões cutâneas causadas por peixes infectados sejam pelo *M. marinum*, já foram descritos casos de infecções por *M. fortuitum* e *M. chelonae*¹⁸¹. O *M. ulcerans* é o agente etiológico da úlcera de Buruli, a doença mais comum a seguir à tuberculose e à lepra^{205,206}.

Muitas MNT de crescimento rápido estão frequentemente envolvidas em infecções pós-traumáticas ou pós-cirúrgicas, sendo as mais frequentes: *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*^{66,181}. As infecções nosocomiais da pele e tecidos moles, devidas a estas três espécies, são provocadas pelo uso prolongado de cateteres intravenosos ou peritoniais, lipoaspiração, feridas cirúrgicas após mamoplastias, *bypass* cardíaco e infecções na córnea após cirurgia por laser^{32,39,78,96,153,202}. No entanto, recentemente têm sido descritos casos que envolvem novas espécies, tais como *M. goodii* e *M. massiliense*^{22,28,56,197}.

2.2.4. Infecções nos ossos e articulações

As infecções que envolvem as articulações e os ossos são muitas vezes provenientes de traumas (e.g., fracturas expostas) ou intervenções cirúrgicas. Tanto as MNT de crescimento lento como as de crescimento rápido estão envolvidas neste tipo de infecções. Entre as de crescimento lento encontramos o *M. haemophilum*, *M. kansasii*, MAC, *M. asiaticum*, *M. flavescens*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, enquanto que entre as MNT de crescimento rápido temos o *M. thermoresistibile* e *M. goodii*^{22,66}.

O *M. marinum* e o MAC são frequentemente a causa da tenossinovite da mão, embora o *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. kansasii* também tenham sido descritos como agentes etiológicos desta infecção^{59,66,72,98}. O complexo *M. terrae* (especialmente, o *M. nonchromogenicum*) também já foi isolado de amostras de tecido sinovial da mão ou do pulso, e tende a ser associado a doença crónica⁶⁶.

Foi já observada osteomielite no esterno, após cirurgia de coração aberto causada por *M. abscessus* e *M. fortuitum* e após trauma contuso^{31,96,146,202}.

2.2.5. Infecções disseminadas

As infecções disseminadas por MNT começaram por ser detectadas, quase exclusivamente, em indivíduos gravemente imunocomprometidos, podendo a progressão da doença ser muito rápida ou mesmo fatal. Estas infecções estão entre as infecções mais comuns e graves em indivíduos num estágio avançado de infecção por VIH⁶⁶.

As micobactérias do MAC foram as primeiras a serem identificadas como agentes etiológicos de infecções oportunistas disseminadas em doentes com SIDA⁶⁴. A esmagadora maioria dos casos continuam a ser atribuída a micobactérias do MAC (90%). Em mais de 90% dos casos o agente etiológico é o *M. avium*^{64,74,75,77,127}. No entanto, o *M. genavense*, uma espécie de difícil diagnóstico devido à sua incapacidade para crescer em meios sólidos convencionais, é apontada como sendo o agente etiológico de 10% dos casos atribuíveis ao MAC¹³¹.

Excluindo as micobactérias do MAC, o *M. kansasii* é o agente etiológico mais comum destas infecções. Contudo, outras MNT como o *M. scrofulaceum*, *M.*

gordoniae, *M. haemophilum*, *M. genavense*, *M. celatum*, *M. conspicuum*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. malmoense* e *M. simiae*, também têm sido descritas como a causa de doença pulmonar ou disseminada em doentes com SIDA^{9,19,24,36,77,81,88,143,147,172}. São igualmente descritos casos de infecções mistas, ou seja, infecções causadas por mais do que uma MNT¹⁰⁹.

A incidência das infecções disseminadas em doentes infectados pelo VIH tem vindo a diminuir devido à introdução da terapia anti-retroviral de alta eficácia (HAART- *Highly Active Antiretroviral Therapy*) que permite a manutenção do número de linfócitos CD4 acima do nível de risco^{86,181}.

Porém, as infecções disseminadas por MNT têm sido descritas noutras populações de doentes adultos imunodeprimidos, tal como indivíduos com insuficiência renal, transplantados, com uso crónico de corticosteróide e leucemia⁶⁶. A frequência destas infecções permanece em ascensão, em doentes imunodeprimidos, por administração de fármacos imunossupressores ou por causas genéticas^{167,181}. Nestes casos, os agentes etiológicos mais frequentes são MNT de crescimento rápido como o *M. chelonae* e o *M. abscessus*^{44,201}. Contudo, outras espécies, incluindo MAC, *M. kansasii* e *M. haemophilum*, também podem causar estas infecções^{33,59,76,83,88,111,204}.

3. MÉTODOS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE MNT

O número de novas espécies de MNT tem aumentado nos últimos anos, o que constitui um desafio para a identificação das mesmas. Este aumento é devido sobretudo à evolução das técnicas de identificação molecular e a um melhor

conhecimento da genética micobacteriana. Neste contexto, é imperativo diferenciar os isolados ao nível da espécie de forma a definir a sua relevância clínica. Como Tortoli referiu, a taxonomia procariótica pode se dividida em dois grandes períodos: o primeiro, caracterizado pela utilização de estudos fenotípicos e o segundo, pelo estudo das características genotípicas¹⁸³.

Tradicionalmente, a identificação das espécies micobacterianas era baseada em diversos testes bioquímicos e características fenotípicas. Embora a maioria desses testes sejam de simples execução e não seja necessário equipamento sofisticado, esta abordagem é muito laboriosa e demorada (várias semanas). Além disso, muitas vezes origina resultados inconclusivos ou mesmo incorrectos, o que pode ter sérias consequências no diagnóstico clínico^{35,91,100,113,137}.

A detecção, em regiões muito conservadas, no genoma bacteriano de sequências hipervariáveis resultantes de omissões, inserções ou substituição de nucleótidos específicos de uma determinada espécie, constitui o fundamento da taxonomia genotípica¹⁸³. Estes métodos, que actualmente são economicamente acessíveis, apresentam a vantagem de serem muito mais rápidos e fiáveis do que os métodos tradicionais. Alguns destes métodos serão descritos a seguir.

3.1. Identificação Fenotípica

A identificação fenotípica consiste na determinação da velocidade de crescimento de unidades formadoras de colónias (UFC) em meios adequados, observação da produção de pigmentos pelas micobactérias e na realização de

vários testes bioquímicos. A avaliação da produção de niacina, da redução de nitratos, da hidrólise de Tween, do crescimento em meio sólido de MacConkey e da tolerância a várias concentrações de cloreto de sódio são exemplos de testes bioquímicos correntemente utilizados.

Embora estes testes já não sejam considerados suficientes para identificar micobactérias, quando usados isoladamente, ainda são importantes para complementar outros métodos de identificação. A prova disto é a existência de classificações para as MNT baseadas nos resultados obtidos nestes testes.

A classificação de Runyon para as MNT, constitui disso um exemplo. Os critérios de classificação são a velocidade de crescimento e a produção de pigmento no escuro ou somente após a exposição à luz. Com base nestes critérios, as MNT podem ser divididas em quatro grupos:

Grupo I: Crescimento lento – Fotocromogénicos: as culturas crescem activamente desenvolvendo pigmento amarelo quando expostas à luz, mas não produzem o pigmento no escuro. As culturas só se tornam visíveis após 2-6 semanas de incubação (e.g., *M. kansasii* e *M. marinum*);

Grupo II: Crescimento lento – Escotocromogénico: o pigmento é produzido tanto na ausência, como na presença de luz. As culturas necessitam de 2-6 semanas de incubação, antes de ocorrer crescimento visível (e.g., *M. scrofulaceum*, *M. gordonae* e *M. szulgai*);

Grupo III: Crescimento lento – Não-cromogénicas: este grupo inclui espécies potencialmente patogénicas e não patogénicas. A maioria não é pigmentada e

o seu crescimento é extremamente lento (e.g., *M. avium* / *M. intracellulare*, *M. xenopi* e *M. terrae*);

Grupo IV: Crescimento rápido - Caracterizado pela sua capacidade de crescer rapidamente, em 2-7 dias. As colónias podem ser pigmentadas ou não. A maioria tem aparência lisa, mas também podem ocorrer variantes rugosas (e.g., complexo *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. abscessus* e *M. chelonae*).

A caracterização das micobactérias por estas técnicas apresenta algumas desvantagens como sejam a morosidade e a obtenção de resultados inconclusivos. A análise dos lípidos das micobactérias por cromatografia em camada fina ou por cromatografia líquida de alta pressão, tem sido apontada como alternativa. Contudo, para que estes métodos sejam levados a bom porto requerem a existência de ferramentas de análise dedicadas e técnicos especializados⁵⁷.

3.2. Identificação Molecular

3.2.1. Sequenciação de ADN

Nas últimas décadas têm sido estudados no genoma micobacteriano, diversos alvos moleculares para identificar as espécies do género *Mycobacterium*.

O gene *16S rRNA* é universalmente considerado como o alvo molecular de primeira escolha, sendo a alternativa a este, o fragmento de 441 pb do gene *hsp65*^{116,144}. Como segunda escolha têm sido utilizadas outras regiões variáveis, tais como: região intergenética dos genes *16S-23S rRNA* na diferenciação de dois membros do MAC (*M. avium* e *M. intracellulare*) e o gene *rpoB* para MNT de crescimento rápido^{1,62,89,119}. Os alvos moleculares menos investigados incluem os

genes: *gyrB*, *recA*, *sodA*, *dnaJ1*, *secA*, *tuf*, *ssrA*, *smpB* e o gene que codifica a proteína 32-kDa^{16,50,87,117,118,169,177,217,223}.

No entanto, estes *loci* não são detectados em todas as espécies ou não são suficientemente discriminatórios para diferenciar espécies intimamente relacionadas⁵⁰. Vários investigadores têm sugerido a análise de sequências de diversos genes como forma de aumentar o poder discriminatório. Dai e colaboradores fizeram a análise de sequências *multilocus* que incluíam os *loci rpoBC*, *dnaK* e *hsp65* e concluíram que é uma ferramenta robusta e precisa para a identificação das espécies de *Mycobacterium*⁵⁰.

A identificação de isolados clínicos pode ser realizada através da comparação das sequências de nucleótidos de bases de dados públicas, tais como: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.) recorrendo à aplicação BLAST, do inglês *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); EzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>); RIDOM, do inglês *The Ribosomal Differentiation of Microorganisms* (<http://rdna.ridom.de/>) e a base de dados *Web-Accessible Database of hsp65 Sequences from Mycobacterium Reference Strains* (<http://msis.mycobacteria.info>)^{14,37,51,70}.

A GenBank é a base de dados pública mais abrangente, contendo sequências de nucleótidos de 380 mil organismos, que foram livremente depositadas por vários laboratórios¹⁴.

A RIDOM é a base de dados de acesso público mais popular e contém cerca de 154 sequências 5' 16S-rDNA de micobactérias (posições na *E. coli* 54-510)⁷⁰. A EzTaxon contém cerca de 11 277 sequências do gene 16S *rRNA* de estirpes referência de todas as espécies procarióticas³⁷.

A base de dados *Web-Accessible Database of hsp65 Sequences from Mycobacterium Reference Strains*, doravante designada como Web Database, possui actualmente 153 espécies / subsespécies de referência de *Mycobacterium*⁵¹.

3.2.1.1 Gene 16S rRNA

O método de referência para a identificação molecular de micobactérias é a sequenciação do gene que codifica para a unidade ribossomal 16S rRNA^{68,183}.

A molécula 16S rRNA é muito conservada filogeneticamente, o que significa que alterações em determinadas posições são específicas para microrganismos ao nível de espécie, *i.e.*, o gene 16S rRNA apresenta polimorfismos inter-específicos.

As regiões hipervariáveis desta molécula são úteis na identificação ao nível da espécie pois existe uma elevada variabilidade inter-espécies e baixa variabilidade na mesma espécie. Foram identificadas duas regiões hipervariáveis no gene 16S rRNA: a região A (posições na *E. coli* 123-273) e a região B (posições na *E. coli* 430-500)¹⁴⁸. Embora a maioria das espécies apresentem sequências únicas na região hipervariável A, o *M. goodii* apresenta uma variabilidade intra-específica neste gene¹⁴⁸.

Como o número de locais polimórficos no género *Mycobacterium* é bastante baixo, as espécies intimamente relacionadas como o *M. kansasii* / *M. gastri*, *M. senegalense* / *M. farcinogenes* e *M. abscessus* / *M. chelonae*, têm sequências idênticas do gene 16S rRNA^{69,94,148-150,174}. Por outro lado, algumas espécies como o *M. ulcerans* / *M. marinum* e *M. malmoense* / *M. szulgai* possuem sequências com

elevado grau de similaridade, *i.e.*, como são praticamente homólogas, não são distinguíveis pela análise das regiões hipervariáveis^{148,150}.

Embora seja raro, algumas estirpes de micobactérias (complexo *M. terrae* e *M. celatum*) têm duas cópias do gene *16S rRNA* com diferentes sequências no mesmo organismo^{128,139}.

3.2.1.2 Gene *hsp65*

Para ser utilizado na identificação genotípica como marcador molecular um gene tem de apresentar uma elevada taxa de conservação inter-espécies.

O gene *hsp65*, que codifica a proteína de choque térmico de 65-kDa presente em todas as micobactérias, apresenta um elevado grau de variabilidade genética inter-espécies e possui um excepcional grau de conservação evolucionária^{38,68,144,178}. Devido a estas características, a sequenciação deste gene tem sido utilizada na identificação de espécies MNT em isolados clínicos^{116,144}.

Para a identificação de micobactérias de crescimento rápido, Ringuet e colaboradores fizeram a sequenciação parcial de um fragmento de 441 pb do gene *hsp65* e verificaram que as sequências de *M. abscessus*, *M. brumae*, *M. chelonae*, *M. chitae*, *M. confluentis*, *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. senegalense* e *M. smegmatis* eram únicas, o que permitia a distinção entre as mesmas¹⁴⁴. Num estudo semelhante, efectuado por McNabb e colaboradores, foram analisadas um total de 689 estirpes de MNT isoladas de amostras clínicas e 111 estirpes de referência, tendo demonstrado que este método é válido para identificar tanto micobactérias de crescimento rápido como de crescimento lento¹¹⁶.

Além disso, a sequenciação do *hsp65* permite diferenciar o *M. chelonae* do *M. abscessus*, duas espécies difíceis de identificar tanto por métodos clássicos como pela sequenciação do gene *16S rRNA*⁹².

3.2.1.3 16S-23S *Internal Transcribed Spacer* (ITS)

A análise da região intergenética dos genes *16S-23S rRNA* [*16S-23S rRNA internal transcribed spacer* (ITS)] representa um complemento à sequenciação do gene *16S rRNA* na diferenciação de espécies intimamente relacionadas. Estas sequências ITS, entre o *16S rRNA* e o *23S rRNA*, são conservadas na mesma espécie e apresentam polimorfismos inter-espécie, o que as torna um alvo molecular por excelência para a identificação¹⁵⁰.

O ITS do género *Mycobacterium* exibe variações de comprimento e, sobretudo, mostra um número razoável de substituições de bases e locais de inserção ou exclusão. Este elevado grau de variação na sequência do ITS permite a discriminação de espécies intimamente relacionadas, tais como o *M. kansasii* e o *M. gastri*. No entanto, esta metodologia não permite diferenciar o *M. marinum* do *M. ulcerans* porque ambos possuem sequências idênticas¹⁵⁰.

3.2.1.4 Gene *gyrB*

As sequências do gene *gyrB* constituem marcadores filogenéticos úteis na identificação ao nível da espécie de vários microrganismos, incluindo o *Mycobacterium*^{87,218–220}. Kasai e colaboradores analisaram as sequências *gyrB* de 43 isolados de 15 espécies diferentes (*M. africanum*, *M. asiaticum*, *M. avium*, *M.*

bovis, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoeense*, *M. marinum*, *M. microti*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai* e *M. tuberculosis*) e concluíram que as frequências de substituições eram comparáveis às das sequências ITS⁸⁷. Embora através da análise das sequências ITS não seja possível diferenciar quatro espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*), foi possível identificar substituições sinónimas nas sequências *gyrB* das mesmas⁸⁷.

3.2.1.5 Gene *rpoB*

O gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da ARN polimerase, teve como primeira abordagem enquanto marcador molecular na identificação de micobactérias, a análise de uma região de 705 pb (posições da *E. coli*, codões 482–715), em 10 espécies micobacterianas (cinco de crescimento rápido e cinco de crescimento lento)⁶³.

Posteriormente, foi efectuada uma análise comparativa de um fragmento de 342 pb do gene *rpoB*, em 44 estirpes de referência de micobactérias e 107 estirpes isoladas de amostras clínicas⁸⁹. Neste estudo, Kim e colaboradores conseguiram distinguir claramente as micobactérias de crescimento rápido das de crescimento lento, bem como, diferenciar o *M. kansasii* da espécie não patogénica *M. gastri*⁸⁹. Um outro grupo, liderado por Lee, estudou um fragmento de 360 pb (posições da *E. coli*, 902-1261) do gene *rpoB* e desenvolveu um método, baseado na análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e hibridação *dot-blot*, para diferenciar as micobactérias ao nível da espécie^{105,106}.

A análise da sequência *rpoB* pode ser usada em paralelo com os métodos de cultura tradicional e como complemento da análise do *16S rRNA*⁸⁹.

3.2.2. Testes baseados na técnica de PCR

Vários autores têm proposto métodos baseados na técnica de PCR para a identificação de micobactérias a partir de isolados clínicos.

A amplificação do gene *dnaJ* e posterior hibridação com sondas específicas permitiu a diferenciação entre o *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. kansasii*¹⁷⁷.

Fiss e colaboradores utilizando uma técnica de PCR, na qual incorporaram uracilo trifosfato (UTP) marcado com digoxigenina no gene *hsp65*, seguida por hibridação reversa *dot-blot* e detecção da quimioluminescência, identificaram o *M. tuberculosis* e o *M. avium*⁶⁰.

Através da utilização dos produtos da amplificação do gene *16S rRNA*, num ensaio de hibridação com sete sondas específicas, foi possível a detecção e identificação do *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. genavense* e *M. chelonae*⁵².

O desenvolvimento de uma técnica de PCR multiplex, com seis iniciadores para amplificar os genes *16S rRNA* e *MPB70*, permitiu a detecção e identificação das seguintes espécies de micobactérias: *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. intracellulare*, de acordo com os tamanhos dos fragmentos amplificados⁹⁵.

Vaneechoutte e colaboradores, combinaram a amplificação do gene *16S rRNA* com a sua digestão, utilizando as enzimas de restrição Cfol e Mbol. Esta estratégia

permitiu a diferenciação entre o *M. avium*, *M. chelonae*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. marinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. simiae*, *M. terrae* e das espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*¹⁹⁶.

3.2.3. Métodos baseados na análise de padrões de restrição do gene *hsp65* amplificado por PCR (PRA)

Kim e colaboradores, desenvolveram três métodos de PRA (PCR - Análise de Restrição Enzimática), para o gene *hsp65* (PRA-*hsp65*), que consistem na amplificação de fragmentos deste gene e posterior digestão por enzimas de restrição. A região do gene e as enzimas de restrição usadas variam consoante o método.

O primeiro destes métodos, agrupa as micobactérias em cinco grupos com padrões PRA distintos permitindo apenas a diferenciação das estirpes do complexo *M. tuberculosis* das MNT. Este método consiste na amplificação de um fragmento de 644 pb do gene *hsp65*, seguido de uma digestão enzimática com a endonuclease de restrição XhoI⁹².

O segundo método consiste igualmente na amplificação de uma região de 644 pb do gene *hsp65* e posterior digestão com três enzimas de restrição (AvaII, HphI, e HpaII). Tal permitiu a identificação de estirpes isoladas de amostras clínicas ao nível da espécie, bem como a distinção entre os membros do complexo *M. tuberculosis* e duas espécies do MAC (*M. avium* e *M. intracellulare*)⁹¹.

Uma terceira abordagem permite diferenciar o *M. tuberculosis* das MNT através de uma técnica de PCR duplex, em que são amplificados dois fragmentos do gene

hsp65 com tamanhos distintos (195 e 515 pb). A identificação das estirpes de MNT foi baseada na análise dos fragmentos resultantes da digestão dum fragmento de 515 pb, utilizando as enzimas de restrição (Avall e HaeIII)⁹³.

Telenti e colaboradores desenvolveram um método de diagnóstico diferencial para micobactérias, designado por PRA-*hsp65*, baseado na amplificação pela técnica de PCR de 441 pb do gene *hsp65*, seguido de digestão do produto amplificado com as enzimas de restrição BstE II e HaeIII¹⁷⁹. Através da análise dos padrões de restrição obtidos com ambas as endonucleases de restrição, este grupo propôs um algoritmo para identificar MNT ao nível da espécie e da subespécie¹⁷⁹.

Esta técnica tem sido utilizada por vários grupos na identificação de micobactérias, tendo sido descritos novos padrões PRA que permitem diferenciar outras espécies, sub-espécies e variantes alélicas^{23,47-49,54,68,99,129,168,178}. Contudo, esta metodologia não permite a diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis*¹⁷⁹.

Além dos padrões descritos na literatura, foi criada a base de dados electrónica PRASITE: *Identification of Mycobacteria* (<http://app.chuv.ch/prasite>) para auxiliar na interpretação dos resultados PRA. A base de dados PRASITE contém actualmente cento e setenta e cinco padrões PRA diferentes.

3.2.4. Testes comerciais de hibridação com sondas de ADN

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos métodos moleculares para a identificação rápida de espécies micobacterianas. Entre estes, encontrámos várias apresentações comerciais (sondas de ADN) que providenciam resultados rápidos

com uma sensibilidade e especificidade elevadas, mas que apenas identificam um número limitado de espécies^{35,68,91,113}. Assim, os testes comerciais disponíveis permitem aos laboratórios não especializados identificar correctamente as espécies mais frequentes¹⁸³. Entre os testes de identificação a partir de cultura destacamos alguns. O AccuProbe® *Mycobacterium* (Gen-Probe, Inc. San Diego, Califórnia), inclui sondas para a confirmação de MAC, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* e *M. kansasii*. Este sistema utiliza uma sonda de ADN de cadeia simples, marcada com um éster de acridínio (marcador quimioluminescente), que é complementar ao ARN ribossomal da micobactéria a identificar. A luminescência gerada pelo híbrido ADN/ARN marcado é medida num luminómetro.

O GenoType® *Mycobacterium* (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) permite a identificação das seguintes espécies de micobactérias clinicamente relevantes: *M. avium* spp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, o complexo *M. tuberculosis* e *M. xenopi*. Para além destas micobactérias, ainda é possível identificar algumas MNT menos comuns, tais como: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai* / *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* e *M. shimoidei*.

Esta técnica consiste na extracção de ADN, seguida de uma amplificação pela técnica de PCR-*multiplex* com iniciadores biotinilados e uma hibridação reversa.

CAPITULO II – OBJECTIVOS

A correcta identificação laboratorial das micobactérias, através de metodologias apropriadas, é essencial para o clínico fazer um diagnóstico preciso. Uma identificação “aproximada” pode levar à sub ou sobrevalorização do papel do isolado clínico. Por outro lado, a utilização de meios de cultura inadequados e/ou condições culturais incorrectas podem ser responsáveis pela ausência de crescimento de microrganismos, que poderão ser agentes etiológicos significativos. Devido à falta de fiabilidade dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos das MNT, é imperativo a sua identificação correcta ao nível da espécie para prevenir problemas tão graves como a emergência de estirpes resistentes a um ou a vários antibióticos.

Este trabalho, teve como objectivo avaliar a eficácia dos diferentes métodos moleculares (PRA e sequenciação dos genes *hsp65* e *16S rRNA*) e características fenotípicas (o tempo de crescimento e pigmentação), na correcta identificação das MNT. Para tal, foi realizado um estudo numa amostra de 54 estirpes de MNT da colecção de estirpes bacterianas da Unidade de Micobactérias do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA. Pretendemos também avaliar a relevância clínica das espécies identificadas, tendo em conta as patologias mais frequentemente provocadas por estes microrganismos.

Os resultados obtidos demonstram que as MNT só podem ser correctamente identificadas através da articulação de vários métodos com fundamentos distintos.

CAPITULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

4.1. Natureza das amostras

Neste trabalho foram estudadas 54 estirpes de MNT da colecção de estirpes bacterianas da Unidade de Micobactérias do Departamento de Doenças Infecciosas (DDI), do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), doravante designada por colecção. A análise da informação disponível na colecção sobre estas estirpes indica que em 63% dos casos as mesmas foram isoladas de amostras de natureza desconhecida (meio de cultura sólido ou líquido). Para as estirpes isoladas de amostras biológicas de natureza conhecida, observámos que 26% foram isoladas de amostras de expectoração, 7% de hemoculturas, 2% de secreções brônquicas e 2% de biópsias de pele.

Uma vez que na maioria dos casos a natureza da amostra é desconhecida, não pudemos, em rigor, tecer muitas considerações sobre a importância da mesma. Contudo, com base na informação disponível, podemos concluir que as MNT, embora apresentem tropismo para vários órgãos, têm particular apetência para o aparelho respiratório e são capazes de provocar bacterémias que poderão contribuir para a disseminação da infecção^{59,66,181}.

4.2. Relação entre distribuição de infecções de MNT e características do hospedeiro

O conhecimento dos principais grupos de risco e a sua distribuição etária na prevalência de infecções por MNT, é uma ferramenta importante no diagnóstico clínico. Esta parte do trabalho teve como objectivo relacionar a incidência de MNT com o sexo e a faixa etária do hospedeiro. Do total das 54 estirpes da colecção, só considerámos as que provinham de doentes diferentes (n=45).

Na amostra estudada, 71% das estirpes provinham de indivíduos do sexo masculino e 29% de indivíduos do sexo feminino. Estes resultados demonstram a predominância das infecções por MNT em indivíduos do sexo masculino¹³³.

De seguida, tentámos relacionar a incidência destas infecções com a faixa etária dos doentes. Neste caso, foi possível recolher informação apenas para 71% (n=32) da amostra estudada. Independentemente do sexo, o grupo com maior incidência destas infecções é constituído por indivíduos com mais de 75 anos. Nos restantes grupos etários, a incidência das infecções por MNT variou com o sexo dos indivíduos. No sexo feminino, o segundo grupo com maior incidência tinha idades compreendidas entre os 55 e 64 anos, enquanto, os indivíduos do sexo masculino estavam na faixa etária imediatamente a seguir (65-74 anos), como se pode observar na figura 2.

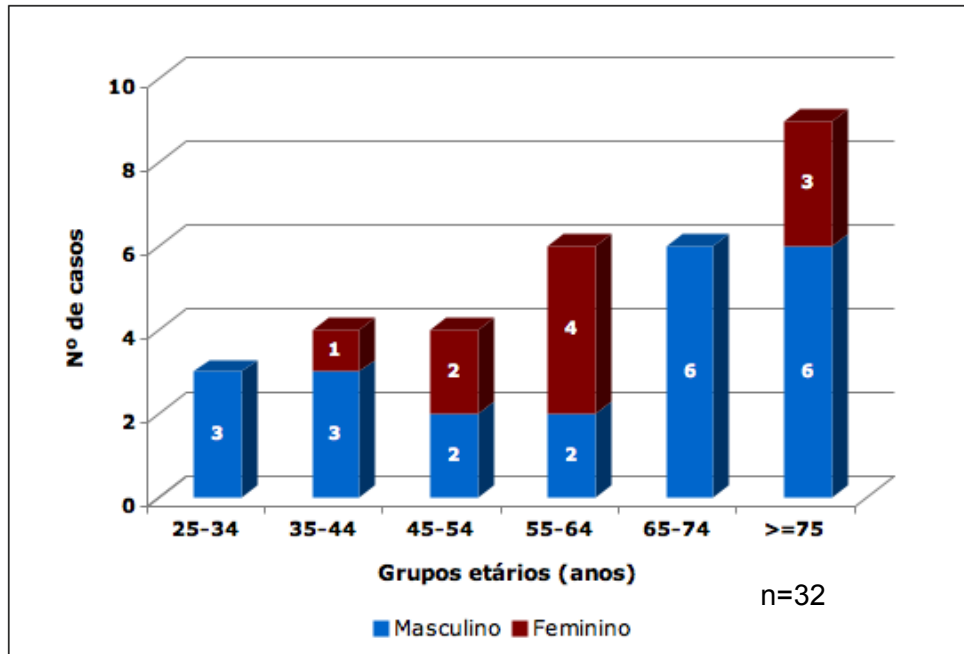


Figura 2. Distribuição das estirpes clínicas de acordo com a idade dos doentes.

O próximo passo consistiu numa tentativa de associação entre alguns factores epidemiológicos do hospedeiro com uma determinada espécie de MNT. Esta análise foi baseada na informação epidemiológica disponível na colecção (sexo, idade, e informação clínica quando disponível) e nos dados da literatura.

A observação da tabela 2 mostra que a espécie responsável pelo maior número de infecções é o *M. avium*. Uma vez que não é clinicamente relevante diferenciar o *M. avium* do *M. intracellulare*, embora o último seja pouco prevalente na amostra estudada, analisaremos as duas MNT em conjunto. De acordo com a informação disponível, todas as estirpes que constam da colecção foram isoladas de amostras provenientes de indivíduos imunodeprimidos com infecções respiratórias. Este facto está de acordo com o descrito na literatura⁶⁶.

Os nossos resultados, no que diz respeito à faixa etária, são discordantes do que está descrito na literatura, não se observando uma predominância da incidência

nos indivíduos com mais de 57 anos^{66,133}. Tal poderá resultar do facto de termos uma amostra reduzida e composta exclusivamente por indivíduos imunodeprimidos.

A segunda MNT com maior número de isolados foi o *M. gordonae*, que é o contaminante mais frequente em amostras clínicas⁶⁶. Os nossos resultados indicam que esta micobactéria apresenta uma distribuição idêntica em ambos os sexos e em todos os grupos etários. Além disso, este resultado é concordante com o de outro estudo desenvolvido em Portugal, numa amostra de doentes VIH negativos com infecção pulmonar⁶. O facto de existirem na nossa colecção vários isolados do mesmo doente, reforça a possibilidade de o *M. gordonae* ser o agente etiológico e não um contaminante.

As duas espécies de MNT, *M. chelonae* e *M. abscessus*, consideradas semelhantes entre si, juntamente com o *M. fortuitum*, foram identificadas na colecção o mesmo número de vezes. A sua distribuição por sexo e idade está de acordo com o descrito na literatura⁶⁶. Para o *M. abscessus*, existe ainda concordância com a natureza da amostra e a patologia associada (infecção pulmonar).

Da colecção constavam ainda outras 10 espécies de MNT, três delas tinham sido recentemente descritas pela primeira vez. O *M. kumamotonense* foi identificado pela primeira vez em 2007¹¹⁴, o *M. monacense*¹⁴⁰ e o *M. nebraskense*¹²⁰ foram identificados no ano anterior. Todas as 10 espécies foram isoladas a partir de amostras biológicas de indivíduos do sexo masculino. Uma delas, *M. marinum*, foi isolada de uma biópsia de pele, de acordo com a patogénese deste agente etiológico^{8,85,110,215}.

Tabela 2. Avaliação comparativa de factores epidemiológicos em infecções por MNT.

Micobactéria [‡]	Nº de casos / Sexo		Grupo etário	Número de estirpes
	Masculino	Feminino		
<i>M. abscessus</i>	0	1	A	1
<i>M. arupense</i>	1	0	A	2
	1	0	G	
<i>M. avium</i>	1	0	A	9
	2	1	B	
	1	0	C	
	0	2	D	
	0	1	F	
	0	1	G	
<i>M. chelonae</i>	1	0	A	4
	2	0	D	
	1	0	G	
<i>M. fortuitum</i>	3	0	F	5
	2	0	G	
<i>M. frederiksbergense</i>	1	0	F	1
	1	0	B	
<i>M. gordonae</i>	0	2	C	9
	0	1	D	
	1	0	E	
	1	0	F	
	2	1	G	
	1	0	E	
<i>M. intracellulare</i>	0	1	G	2
	1	0	F	
<i>M. kumamotonense</i>	1	0	F	1
<i>M. lentiflavum</i>	1	0	E	3
	2	0	G	
<i>M. marinum</i>	1	0	C	1
<i>M. monacense</i>	1	0	G	1
<i>M. nebraskense</i>	1	0	E	1
<i>M. nonchromogenicum</i>	1	0	E	1
<i>M. peregrinum</i>	1	0	G	1
<i>M. xenopi</i>	1	0	E	1

Legenda: [‡] Duas estirpes não foram incluídos nesta tabela por só ter sido possível a identificação ao nível do complexo (MAC e complexo *M. fortuitum*).

(A) 25-34 anos; (B) 35-44 anos; (C) 45-54 anos; (D) 55-64 anos; (E) 65-74 anos; (F) mais de 75 anos; (G) idade desconhecida.

5. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

Esta parte do trabalho consistiu na caracterização fenotípica das MNT, tendo sido avaliado o seu crescimento a diferentes temperaturas, a velocidade a que o mesmo ocorria e a capacidade de produzir pigmentos na presença e/ou ausência da luz.

As MNT foram cultivadas em meio de cultura adequado (LJ) e incubadas às várias temperaturas (30°, 37° e 42°C), até que fosse observado crescimento visível. Quando tal ocorria antes de completados 7 dias de incubação, a MNT era considerada de crescimento rápido. Se ocorresse após esse tempo, era classificada como MNT de crescimento lento.

A incubação às diferentes temperaturas foi efectuada em diferentes condições de luminosidade (presença/ausência de luz), de forma a permitir a classificação das micobactérias quanto à produção de pigmento.

As espécies de MNT que originaram colónias pigmentadas apenas na presença de luz foram classificadas como fotocromogénicas. As que produziram pigmento tanto na presença como na ausência de luz, foram classificadas como escotocromogénicas e as que não produziram pigmento, em nenhuma das condições, foram classificadas como não-cromogénicas.

A determinação das características fenotípicas, isoladamente ou mesmo conjugadas com testes bioquímicos, não permite a diferenciação de espécies de MNT integradas no mesmo complexo (e.g., MAC)³⁵. Contudo, estas características podem ser um contributo valioso para a identificação deste tipo de microrganismo quando conjugadas com os resultados de outros métodos, nomeadamente métodos

moleculares. Este procedimento permite ainda detectar eventuais contaminações por outros microrganismos.

A observação da tabela 3 mostra que foram identificadas 34 MNT de crescimento lento e 20 de crescimento rápido. Entre as espécies de crescimento lento, foram detectadas micobactérias escotocromogénicas, fotocromogénicas e não-cromogénicas; entre as de crescimento rápido apenas foram detectadas escotocromogénicas e não-cromogénicas¹. Estes resultados são concordantes com a classificação de Runyon¹⁵¹.

Tabela 3. Propriedades das estirpes de *Mycobacterium* estudadas.

i) Micobactérias de crescimento lento						
Classificação	Relações térmicas			Produção de pigmento		Total
	30°C	37°C	42°C	Obscuridade	Luminosidade	
Escotocromogénica	+	+	-	+	+	14
	+	+/-	-	+	+	1
Fotocromogénica	+	-	-	-	+	1
Não-cromogénica	+	+	+	-	-	2
	+	+	-	-	-	2
	-	+	+	-	-	1
	-	+	-	-	-	13

ii) Micobactérias de crescimento rápido						
Classificação	Relações térmicas			Produção de pigmento		Total
	30°C	37°C	42°C	Obscuridade	Luminosidade	
Escotocromogénica	+	+	+	+	+	1
	+	+	-	+	+	1
Não-cromogénica	+	+	+	-	-	7
	+	+	-	-	-	11

Legenda: (+) indica a existência de crescimento ou a produção de pigmento nas condições indicadas; (-) indica a ausência de crescimento ou a produção de pigmento nas condições indicadas

¹ As características fenotípicas de cada estirpe estudada são apresentadas no Anexo II.

A escassez de informação relativa à natureza da amostra, da qual algumas das estirpes da colecção foram isoladas, não nos permite interpretar a relevância clínica das mesmas.

6. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação das espécies de MNT foi realizada através da amplificação de um segmento do gene que codifica a proteína de choque térmico 65-kDa (*hsp65*) e de um segmento do gene que codifica para a unidade ribossomal *16SrRNA*, através das técnicas de PCR e sequenciação automática.

As sequências consenso geradas, dos genes *hsp65* e *16S rRNA*, de cada estirpe, foram comparadas com as sequências de nucleótidos de diversas bases de dados, nomeadamente da GenBank. As sequências consenso do gene *16S rRNA* foram ainda comparadas com as sequências da base de dados RIDOM e EzTaxon e as do gene *hsp65* na Web Database.

6.1. Identificação das estirpes micobacterianas pela análise das sequências do gene *16S rRNA*

A identificação das 54 estirpes com base na análise das sequências do gene *16S rRNA* foi realizada através de uma reacção de amplificação com iniciadores adequados, pela técnica de PCR em tempo real, de forma a amplificar um segmento que continha as duas regiões hipervariáveis no gene: A região A (posições na *E. coli* 123-273) e a região B (posições na *E. coli* 430-500)¹⁴⁸.

A análise das sequências do gene *16S rRNA* permitiram identificar 72% (n=39) das estirpes da colecção ao nível da espécie, *i.e.*, a sequência era única para apenas uma espécie de micobactéria. Para as restantes 28% (n=15), foram obtidas diferentes possibilidades de classificação ao nível da espécie. Estas estirpes pertenciam ao grupo *M. abscessus / M. chelonae*, MAC, complexo *M. fortuitum*, *M. ulcerans* e *M. marinum* (Tabela 4.).

Das 39 estirpes identificadas como uma única espécie, com similaridade entre 99-100%, trinta e três obtiveram o mesmo resultado nas três bases de dados (*M. avium*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. lentiflavum*, *M. monacense*, *M. nonchromogenicum* e *M. xenopi*). As restantes seis estirpes, obtiveram pelo menos um resultado diferente numa das bases de dados. Cinco das estirpes (*M. arupense*, *M. frederiksbergense*, *M. kumamotoense* e *M. nebraskense*), obtiveram resultados diferentes na base de dados RIDOM (respectivamente, *M. terrae*, *M. fluoroanthenvorans*, *M. terrae* e *M. malmoense*). Estes resultados podem ser explicados pelo facto desta base de dados não ser actualizada desde 2005 e as sequências destas espécies não estarem depositadas na mesma. A estirpe de *M. intracellulare*, obteve um resultado diferente para a base de dados EzTaxon (*M. chimaera*).

Esta técnica, por si só, não permitiu uma correcta identificação ao nível da espécie em 15 estirpes de MNT. A identificação destas estirpes resultou em mais do que uma espécie com similaridades que variaram entre 99-100%.

Destas, 10 estirpes foram identificadas como espécies pertencentes ao grupo *M. abscessus / M. chelonae* (*M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. chelonae*, *M. abscessus*

subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. massiliense* e *M. salmoniphilum*). O *M. bolletii* e *M. massiliense* (recentemente reclassificados como *M. abscessus* subsp. *bolletii*), o *M. abscessus* e o *M. chelonae*, não são diferenciados através das regiões hipervariáveis A e B do gene 16S *rRNA*^{3,94,103}. Estas espécies podem ser diferenciadas entre si através da sequenciação do gene *hsp65* e do PRA-*hsp65*¹⁴⁸. O *M. salmoniphilum* pode ser diferenciado dos restantes membros do complexo através da sequenciação do gene *hsp65*²¹⁰.

Duas das estirpes foram identificadas na base de dados Genbank, com uma variedade de espécies pertencentes ao MAC. Para a primeira, obtivemos 100% de similaridade para o MAC e 99% para *M. arosiense*, *M. bouchedurhonense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. intracellulare* e *M. vulneris*. No caso da segunda estirpe obtivemos, 99% de similaridade tanto para o MAC, como para as restantes espécies (*M. arosiense*, *M. colombiense*, *M. intracellulare* e *M. marseillense*). Nas outras bases de dados (RIDOM e Eztaxon), estas estirpes foram identificadas como *M. intracellulare* e *M. marseillense*.

As sequências 16S *rRNA*, de duas estirpes da coleção, permitiram a sua identificação como espécies pertencentes ao complexo *M. fortuitum*. A primeira estirpe, foi identificada na GenBank como *M. fortuitum*, *M. neworleansense* e *M. porcinum*; na RIDOM como *M. fortuitum* e *M. porcinum* e na EzTaxon como *M. neworleansense* e *M. porcinum*. A segunda estirpe, foi identificada como *M. peregrinum* e *M. septicum* tanto na GenBank como na RIDOM e apenas como *M. septicum* na Eztaxon.

A inexistência de diferenças nucleotídicas nas regiões hipervariáveis A e B, do *M. neworleansense* e do *M. porcinum*, não permite a sua distinção por este método¹⁶¹. A diferenciação entre ambos poderá ser conseguida através da observação minuciosa da textura das suas colónias. Quando incubados a 35°C, durante 2 dias em meio infusão de coração e cérebro, suplementado com 5% de sangue de coelho, o *M. porcinum* origina colónias convexas mucóide, com bordos regulares, enquanto o *M. neworleansense* origina colónias rugosas com bordos irregulares¹⁶¹.

As sequências de 16S *rRNA* das regiões hipervariáveis A e B não permitem diferenciar o *M. septicum* do *M. peregrinum*¹⁸³. Contudo, alguns métodos bioquímicos, nomeadamente a produção de ácido a partir de *i-mio*-inositol e a presença ou não de actividade da arilsulfatase, conjugados com o perfil de resistência a alguns antibióticos, permitem fazer a distinção entre estas espécies. O *M. peregrinum* e o *M. septicum* diferem entre si pela incapacidade do primeiro produzir ácido a partir do *i-mio*-inositol, apresentar teste de arilsulfatase positivo ao fim de 3 dias e ser resistente à eritromicina, minociclina, doxiciclina, vancomicina e tobramicina¹⁶¹.

Uma das estirpes da colecção foi identificada, nas três bases de dados utilizadas, como *M. marinum* e *M. ulcerans*. A distinção entre estas duas espécies pode ser efectuada através da observação da presença ou ausência de pigmento nas colónias. Neste caso particular, o *M. marinum* é fotocromogénico permitindo a sua diferenciação do *M. ulcerans*, que é não-cromogénico.

Tabela 4. Resultados da identificação pela sequenciação do gene *16S rRNA*.

Identificação por sequenciação do gene <i>16S rRNA</i> nas diferentes bases de dados					
GenBank ^a		RIDOM ^b		EzTaxon ^c	
Espécie(s) identificada(s) [N.º de estirpes]	Similar. (%)	Espécie(s) identificada(s) [N.º de estirpes]	Similar. (%)	Espécie(s) identificada(s) [N.º de estirpes]	Similar. (%)
<i>M. abscessus</i> <i>M. bolletii</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. massiliense</i> [8]	100	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [8]	100	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [2] <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> <i>M. chelonae</i> [6]	99-100
<i>M. arupense</i> [2]	100	<i>M. terrae</i> [2]	99	<i>M. arupense</i> [2]	99
<i>M. avium</i> [10]	100	<i>M. avium</i> [10]	100	<i>M. avium</i> [10]	99-100
<i>M. avium</i> complex [†] <i>M. arosiense</i> <i>M. bouchedurhonense</i> <i>M. chimaera</i> <i>M. colombiense</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. vulneris</i> [1]	100 99	<i>M. intracellulare</i> [1]	100	<i>M. marseillense</i> [1]	100
<i>M. avium</i> complex <i>M. marseillense</i> <i>M. arosiense</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. colombiense</i> [1]	99	<i>M. intracellulare</i> [1]	99	<i>M. marseillense</i> [1]	99
<i>M. frederiksbergense</i> [1]	100	<i>M. fluoroanthenivorans</i> [1]	100	<i>M. frederiksbergense</i> [1]	99
<i>M. gordonae</i> [11]	100	<i>M. gordonae</i> [11]	100	<i>M. gordonae</i> [11]	99-100

Tabela 4. Resultados da identificação pela sequenciação do gene *16S rRNA* (Continuação).

Identificação por sequenciação do gene <i>16S rRNA</i> nas diferentes bases de dados					
GenBank ^a		RIDOM ^b		EzTaxon ^c	
Espécie(s) identificada(s) [N.º de estirpes]	Similar. (%)	Espécie(s) identificada(s) [N.º de estirpes]	Similar. (%)	Espécie(s) identificada(s) [N.º de estirpes]	Similar. (%)
<i>M. chelonae</i> [2]	99-100	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [2]	99-100	<i>M. salmoniphilum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> [1] <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> <i>M. chelonae</i> [1]	99 99
<i>M. fortuitum</i> [6]	99-100	<i>M. fortuitum</i> [6]	99-100	<i>M. fortuitum</i> [6]	99-100
<i>M. fortuitum</i> <i>M. neworleansense</i> <i>M. porcinum</i> [1]	100	<i>M. fortuitum</i> <i>M. porcinum</i> [1]	100	<i>M. porcinum</i> <i>M. neworleansense</i> [1]	99
<i>M. intracellulare</i> [1]	100	<i>M. intracellulare</i> [1]	100/0	<i>M. chimaera</i> [1]	99
<i>M. kumamotonense</i> [1]	100	<i>M. terrae</i> [1]	99	<i>M. kumamotonense</i> [1]	100
<i>M. lentiflavum</i> [3]	100	<i>M. lentiflavum</i> [3]	100	<i>M. lentiflavum</i> [3]	100
<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> [1]	100	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> [1]	100	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> [1]	100
<i>M. nebraskense</i> [1]	100	<i>M. malmoense</i> [1]	99	<i>M. nebraskense</i> [1]	99
<i>M. monacense</i> [1]	99	<i>M. monacense</i> [1]	99	<i>M. monacense</i> [1]	99
<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	100	<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	100	<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	100
<i>M. peregrinum</i> <i>M. septicum</i> [1]	100	<i>M. peregrinum</i> <i>M. septicum</i> [1]	100	<i>M. septicum</i> [1]	100
<i>M. xenopi</i> [1]	99	<i>M. xenopi</i> [1]	99	<i>M. xenopi</i> [1]	99

Legenda: ‡ para o MAC a similaridade foi de 100% e para as restantes espécies foi de 99%. As bases de dados utilizadas na identificação das MNT estão disponíveis nos seguintes endereços electrónicos: ^a GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/); ^b RIDOM (<http://rdna.ridom.de/>); ^c EzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>).

6.2. Identificação das estirpes micobacterianas pela análise das sequências do gene *hsp65*

A identificação das 54 estirpes pela análise das sequências do gene *hsp65*, foi realizada através de uma reacção de amplificação com iniciadores adequados, pela técnica de PCR, de forma a amplificar um segmento de 440 pb do gene *hsp65*, que contém os nucleótidos de interesse. Na figura 3, podem ser observados os produtos de amplificação obtidos para algumas estirpes de MNT, separados por electroforese em gel de agarose.

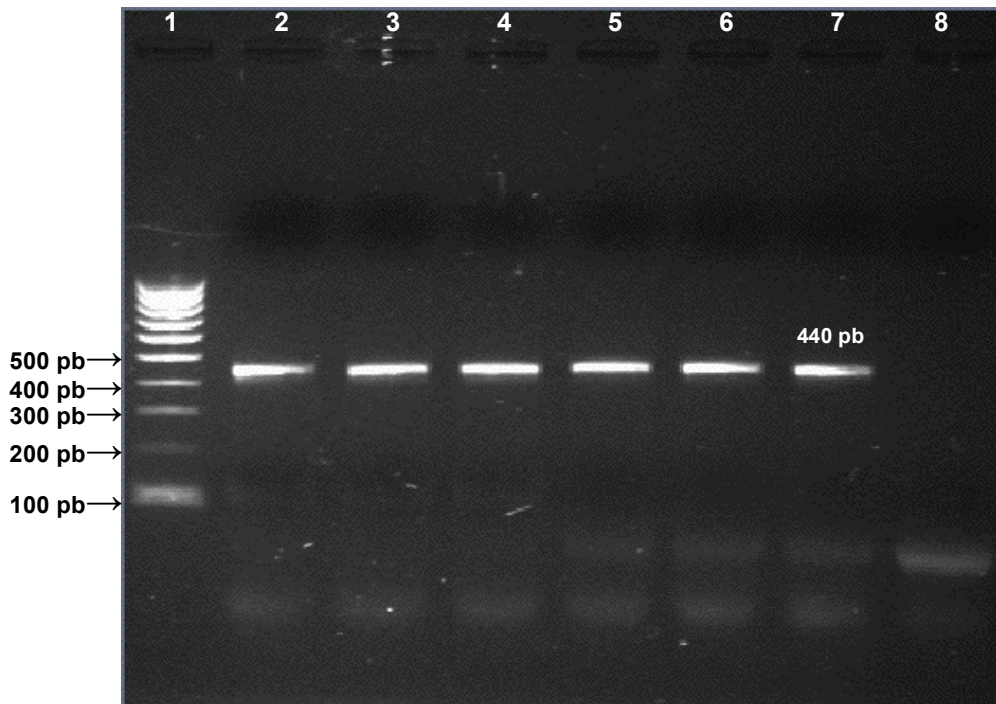


Figura 3. Análise electroforética do fragmento de 440 pb do gene *hsp65*.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR® Safe. A linha 1 corresponde à migração do marcador de peso molecular, com fragmentos de ADN compreendidos entre 100-1000pb, as linhas 2 a 7 aos fragmentos do gene *hsp65* (440pb) de diferentes amostras e a linha 8 ao controlo negativo.

A análise das 54 sequências de 440 pb do gene *hsp65* permitiu identificar de forma directa 76% (n=41) das estirpes, para os restantes 22% (n=12), a análise gerou a possibilidade de classificação em mais do que uma espécie. Do total das estirpes analisadas, esta abordagem não permitiu identificar apenas 2% (n=1) das mesmas (Tabela 5.).

As estirpes cuja identificação foi igual para ambas as bases de dados utilizadas foram: *M. arupense*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. lentiflavum*, *M. monacense*, *M. nebraskense*, *M. neoaurum*, *M. nonchromogenicum*, *M. peregrinum* e *M. xenopi*.

A análise do gene *hsp65* permite a diferenciação entre espécies intimamente relacionadas, tais como o *M. abscessus* e o *M. chelonae*⁹². No nosso estudo, 6 estirpes foram identificadas como *M. abscessus* na base de dados Web Database; contudo a análise das mesmas na GenBank não permitiu a diferenciação entre o *M. abscessus* e o *M. chelonae*. Este resultado pode ser atribuído ao facto de esta base de dados permitir o depósito de sequências sem a prévia validação da sua qualidade^{184,192}. Por outro lado, as estirpes de *M. chelonae* foram identificadas correctamente em ambas as bases de dados.

Embora esta metodologia tenha permitido identificar nove estirpes da colecção como *M. avium*, em dois casos a classificação só foi possível ao nível do MAC. Uma estirpe identificada como *M. gordonae* na análise da GenBank, foi identificada na base de dados *Web Database* como *M. triplex*. A espécie *M. gordonae* possui um elevado grau de heterogeneidade na sequência *hsp65*, o que torna difícil a sua correcta identificação^{35,68}. A diferenciação entre as duas espécies pode ser

efectuada através da análise de características fenotípicas. O *M. triplex* é uma espécie não-cromogénica, enquanto o *M. gordonae* é escotocromogénico.

Uma estirpe da colecção foi identificada como *M. kumamotonense* em ambas as bases de dados, mas na base de dados GenBank foi adicionalmente identificada como *M. hiberniae*. Estas espécies podem ser facilmente diferenciadas entre si pela ausência de pigmento do *M. kumamotonense*.

Para uma das estirpes, a sua identificação foi de *M. peregrinum* e *M. porcinum*, em ambas as bases e dados. Estas espécies podem ser diferenciadas pelo teste de redução de nitratos. O resultado do teste é positivo para o *M. peregrinum* e negativo para o *M. porcinum*^{97,190}.

Esta metodologia não permitiu identificar uma estirpe, cuja identificação foram as seguintes espécies: *M. pseudoshottsii*, *M. marinum* e *M. ulcerans*. O *M. pseudoshottsii*, possui sequências 16S rRNA e hsp65 muito similares ao *M. marinum* e *M. ulcerans*¹⁴¹. A diferenciação entre *M. marinum* e o *M. ulcerans* pode ser feita com base na classificação de Runyon, uma vez que o *M. marinum* é fotocromogénico. Como esta característica é partilhada com o *M. pseudoshottsii* é necessário recorrer a outros métodos para os diferenciar, tais como análise de ácidos micólicos. No nosso estudo, a identificação desta estirpe só foi possível pela análise da sequência 16S rRNA.

Os resultados obtidos por este método, foram inconclusivos para uma das estirpes, uma vez que se obteve apenas 94% de similaridade com as sequências depositadas nas bases de dados.

Tabela 5. Resultados da identificação pela sequenciação do gene *hsp65*.

Identificação por sequenciação do gene <i>hsp65</i> nas diferentes bases de dados			
GenBank ^a		Web Database ^b	
Espécie(s) identificada(s) [N.º de estirpes]	Similar. (%)	Espécie(s) identificada(s) [N.º de estirpes]	Similar. (%)
<i>M. abscessus</i> ; <i>M. chelonae</i> [6]	100	<i>M. abscessus</i> [6]	100
<i>M. arupense</i> [2]	100	<i>M. arupense</i> [2]	100
<i>M. avium</i> [9]	100	<i>M. avium</i> [9]	100
<i>M. avium</i> ; <i>M. avium</i> complex; <i>M. bouchedurhonense</i> [1]	100	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ; <i>M. bouchedurhonense</i> ; <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> ; <i>M. avium</i> ; [1]	100
<i>M. avium</i> ; <i>M. saskatchewanense</i> [1]	97	<i>M. triplex</i> ; <i>M. seoulens</i> ; <i>M. saskatchewanense</i> [1]	97
<i>M. chelonae</i> [4]	100	<i>M. chelonae</i> [4]	98-100
<i>M. fortuitum</i> [5]	100	<i>M. fortuitum</i> [5]	100/0
<i>M. gordonae</i> [10]	100	<i>M. gordonae</i> [10]	96-100
<i>M. gordonae</i> [1]	99	<i>M. triplex</i> [1]	96
<i>M. neoaurum</i> [1]	98	<i>M. neoaurum</i> [1]	98
<i>M. hiberniae</i> <i>M. kumamotonense</i> [1]	100	<i>M. kumamotonense</i> [1]	100
<i>M. intracellulare</i> [2]	100	<i>M. intracellulare</i> [2]	99-100
<i>M. lentiflavum</i> [3]	100	<i>M. lentiflavum</i> [3]	99-100
<i>M. marinum</i> ; <i>M. pseudoshottsi</i> ; <i>M. ulcerans</i> [1]	99	<i>M. marinum</i> <i>M. pseudoshottsi</i> [1]	99
<i>M. monacense</i> [1]	96	<i>M. monacense</i> [1]	95
<i>M. nebraskense</i> [1]	100	<i>M. nebraskense</i> [1]	100
<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	100	<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	100
<i>M. peregrinum</i> [1]	100	<i>M. peregrinum</i> [1]	100
<i>M. peregrinum</i> , <i>M. porcinum</i> [1]	100	<i>M. peregrinum</i> , <i>M. porcinum</i> [1]	99
<i>M. xenopi</i> [1]	100	<i>M. xenopi</i> [1]	100
Inconclusivo [1]	—	Inconclusivo [1]	—

Legenda: As bases de dados utilizadas na identificação das MNT estão disponíveis nos seguintes endereços electrónicos: ^a GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov); ^b Web-Accessible Database of *hsp65* Sequences from *Mycobacterium* Reference Strains (<http://msis.mycobacteria.info>).

7. ANÁLISE DE PADRÕES DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* AMPLIFICADO POR PCR (PRA)

O gene *hsp65* é importante para a identificação das MNT, não só através da sua sequenciação, anteriormente descrita, como também da sua digestão por enzimas de restrição específicas. Neste trabalho, utilizámos as enzimas BstEII e HaeIII, que integram o protocolo da versão clássica desta técnica.

7.1. Análise dos perfis de restrição dos padrões PRA

Os fragmentos amplificados de 440 pb do gene *hsp65*, foram submetidos a digestão com as endonucleases de restrição BstEII e HaeIII, que reconhecem respectivamente, os locais de restrição G \uparrow GTNACC e GG \uparrow CC. Os fragmentos foram comparados com os padrões de PRA descritos na literatura e da página electrónica PRASITE^{23,35,40,43,49,54,68,99,101,102,107,126,156,157,163,179,193}. No Anexo III, é descrito o algoritmo dos padrões PRA-*hsp65*, baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene *hsp65*, das estirpes da colecção.

Na figura 4, estão representados alguns dos padrões de restrição representativos dos nossos resultados.

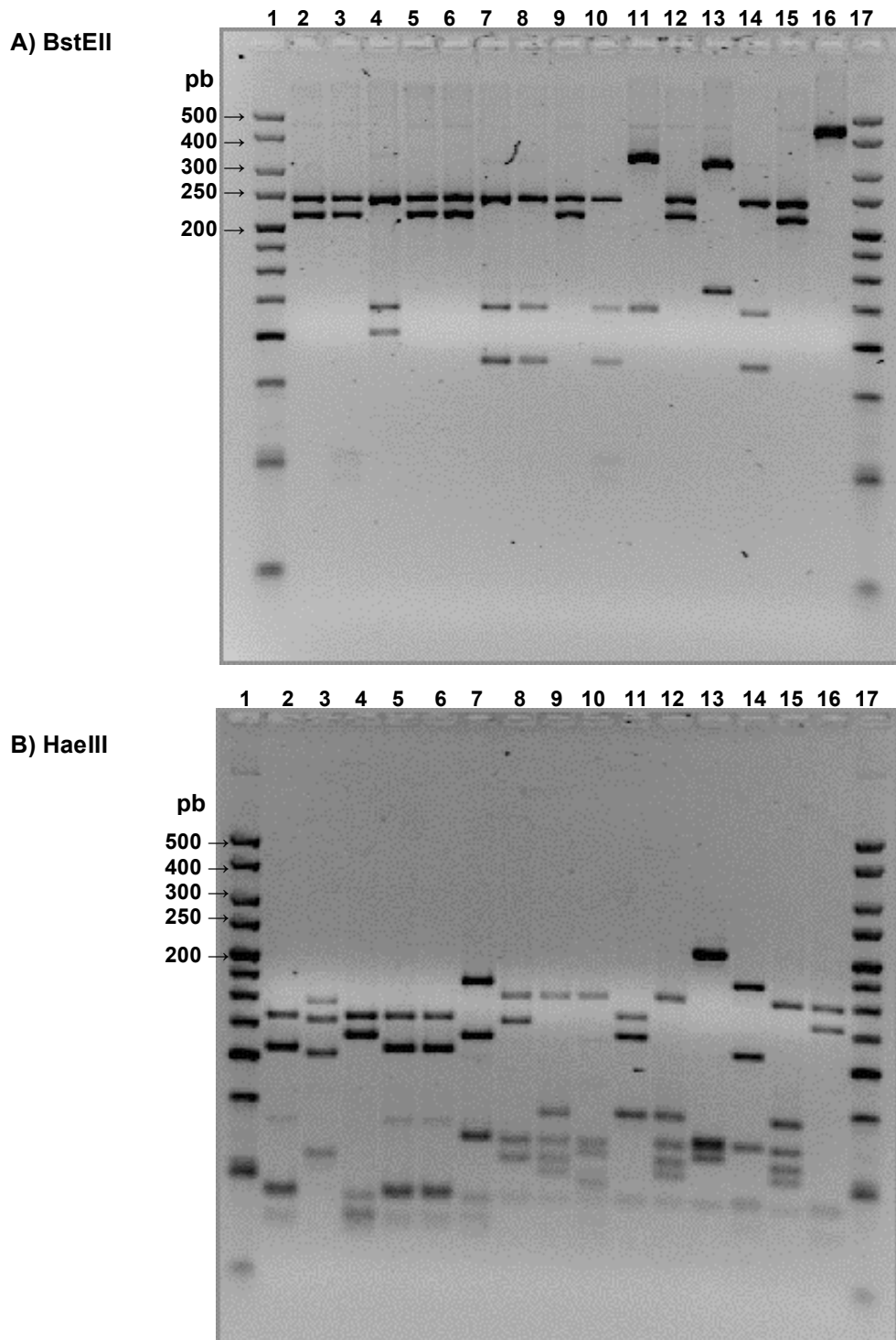


Figura 4. Análise dos perfis de restrição dos padrões PRA para identificar as espécies de *Mycobacterium*.

Electroforese em gel de agarose a 3%, corado com *SYBR® Safe*. As linhas 1 e 17 correspondem ao marcador de peso molecular, com fragmentos de ADN compreendidos entre 25-500pb. Em A) as linhas 2 a 16 correspondem aos padrões PRA após a digestão de diferentes amostras com a enzima BstEII. Em B) as linhas 2 a 16 correspondem aos padrões PRA após a digestão de diferentes amostras com a enzima HaeIII.

Os resultados obtidos, apenas por esta técnica, permitiram identificar 63% (n=34) das estirpes da colecção ao nível da espécie e foram inconclusivos (sem algoritmo descrito) em 6% (n=3) dos casos. Para as restantes estirpes, os resultados obtidos apresentaram problemas diversos. Em 28% dos casos (n=15), foram identificados padrões PRA que correspondem a mais do que uma espécie e em 2% (n=1), foram observados padrões PRA muito semelhantes em diferentes espécies.

Nos restantes 2% (n=1), foram detectados padrões PRA que conjugam os dois casos anteriormente descritos (Tabela 6.).

Das 34 estirpes identificadas apenas por este método (*M. abscessus*, *M. arupense*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* tipo 1,3 e 8, *M. nebraskense*, *M. nonchromogenicum*, *M. peregrinum* tipo 1 e *M. xenopi*), sete apresentaram padrões PRA que permitiam a identificação ao nível da subespécie. Cinco destas estirpes apresentaram padrões PRA correspondentes a *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ou *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* e duas estirpes com padrões *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *silvaticum*. Em nenhum dos casos foi possível a identificação inequívoca ao nível da subespécie, o que demonstra que esta técnica apresenta uma baixa resolução para distinguir os membros das referidas espécies. Contudo, em termos clínicos tal não é relevante, uma vez que não existe descrita qualquer distinção em termos de esquemas terapêuticos.

Tabela 6. Resultados da identificação das MNT pelo método PRA.

Nº de estirpes	Padrões PRA		Espécie(s) identificada(s)
	BstEII (pb)	HaeIII (pb)	
6	235-210	145-70-60-55	<i>M. abscessus</i> tipo 1
2	320-115	145-60-50	<i>M. arupense</i>
2	235-210	130-105	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> tipo 1 <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> tipo 1 <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> tipo 1
9	235-210	130-105-60	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> tipo 2 <i>M. colombiense</i> tipo 1
4	320-130	200-60-55-50	<i>M. chelonae</i> tipo 1
5	235-120-85	145-120-60-55	<i>M. fortuitum</i> tipo 1 <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> tipo 1
3	235-120-85	160-11-60	<i>M. gordonae</i> tipo 1
7	235-120-100	130-115	<i>M. gordonae</i> tipo 3
1	320-115	130-110-70-60	<i>M. gordonae</i> tipo 8
2	235-120-100	145-130-60	<i>M. intracellulare</i> tipo 1 <i>M. chimaera</i> tipo 1
1	320-115	130-110-70	<i>M. kumamotoense</i> tipo 1
	320-115	130-115-60	<i>M. gordonae</i> tipo 4
3	440	145-130	<i>M. lentiflavum</i> tipo 1 <i>M. florentinum</i> tipo 1 <i>M. simiae</i> tipo 5
1	235-210	145-105-80	<i>M. malmoense</i> tipo 2 <i>M. marinum</i> tipo 1 <i>M. ulcerans</i> tipo 1
	235-210	145-110-80	<i>M. pseudoshottsii</i> tipo 1
1	440	125-105-60	<i>M. nebraskense</i> tipo 1
1	235-120-85	145-60-55	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo 1
1	235-210	145-140-100-50	<i>M. peregrinum</i> tipo 1
1	235-210	140-125-100-50	<i>M. peregrinum</i> tipo 2
			<i>M. porcinum</i> tipo 1
			<i>M. septicum</i> tipo 1
1	235-120-85	160-105-60	<i>M. xenopi</i> tipo 1
3	—	—	Inconclusivo

Neste estudo, 15 estirpes tiveram padrões partilhados por uma ou mais espécie de *Mycobacterium* (*M. avium* subsp. *avium* tipo 2 e *M. colombiense* tipo 1; *M. intracellulare* tipo 1 e *M. chimaera* tipo 1; *M. lentiflavum* tipo 1, *M. florentinum* tipo 1 e *M. simiae* tipo 5; *M. peregrinum* tipo 2, *M. porcinum* tipo 1 e *M. septicum* tipo 1).

No caso das estirpes do MAC, este método não permite a diferenciação ao nível da espécie entre alguns elementos (*M. colombiense* / *M. avium* e *M. intracellulare* / *M. chimaera*), que apresentam padrões PRA idênticos.

No caso do *M. avium* / *M. colombiense*, a sequência 16S *rRNA* única do primeiro permite a sua diferenciação não só do *M. avium* como dos restantes membros do complexo¹²⁴. Já no caso do *M. intracellulare* / *M. chimaera* o gene 16S *rRNA* é idêntico não permitindo fazer a diferenciação. Contudo como as sequências do gene *hsp65* são distintas, apesar dos padrões de restrição idênticos, a diferenciação também é possível¹⁰⁴.

Os resultados da análise PRA para três estirpes da coleção, avançavam três possibilidades de classificação: *M. florentinum*, *M. lentiflavum* ou *M. simiae*. Embora o *M. florentinum* tenha uma sequência do gene *hsp65* única, tem um padrão PRA igual ao do *M. lentiflavum*, que pode ser diferenciado usando uma terceira enzima de restrição HhaI¹⁸⁷. Este é um caso em que a caracterização fenotípica, concretamente a produção de pigmento, complementa os resultados do método de identificação molecular e permite a diferenciação entre as três espécies. O *M. simiae* é fotocromogénico, o *M. lentiflavum* é escotocromogénico, apresentando colónias amarelas em oposição à ausência de pigmento nas colónias do *M. florentinum* (não-cromogénico).

Neste trabalho, tivemos ainda duas estirpes da colecção para as quais este método forneceu três hipóteses de classificação em espécies diferentes. No primeiro caso, a estirpe poderia ser classificada como *M. peregrinum* tipo 2, *M. septicum* tipo 1 ou *M. porcinum* tipo 1.

Como foi referido anterior neste trabalho (pág. 54), as sequências de 16S *rRNA* das regiões hipervariáveis A e B não permitem diferenciar o *M. septicum* do *M. peregrinum*¹⁸³. Contudo, alguns métodos bioquímicos, conjugados com o perfil de resistência a alguns antibióticos, permitem fazer a distinção entre estas espécies¹⁶⁰. Um terceiro teste bioquímico, a redução de nitratos, permite a diferenciação entre o *M. porcinum* e o *M. peregrinum*. O resultado do teste é positivo para o *M. peregrinum* e negativo para o *M. porcinum*^{97,190}.

Algumas espécies apresentam padrões PRA muito semelhantes. Neste estudo, tal foi observado para o *M. kumamotonense* tipo 1 e o *M. gordonae* tipo 4 que partilham o mesmo perfil de restrição para a enzima BstEII e que diferem apenas em 5-10 pb para a enzima HaeIII, respectivamente 130-110-70 e 130-115-60. Uma vez mais, a produção de pigmento foi crucial para a identificação ao nível da espécie. O *M. kumamotonense* é não-cromogénica e o *M. gordonae* é escotocromogénica.

Para uma das estirpes foi encontrado um padrão PRA que ,não só corresponde a mais do que uma espécie (*M. malmoense* tipo 2, *M. marinum* tipo 1 e *M. ulcerans* tipo 1), como ainda é muito semelhante a uma outra (*M. pseudoshottsii* tipo 1). A diferenciação entre *M. malmoense*, *M. marinum* e o *M. ulcerans* pode ser feita com base na classificação de Runyon, uma vez que apenas o *M. marinum* é

fotocromogénico. Como esta característica é partilhada com o *M. pseudoshottsii* tivemos que recorrer a outros métodos para os diferenciar. A sequência do gene *hsp65* também não permitiu discriminar as duas espécies, uma vez que diferem apenas num nucleótido. A distinção entre estas duas espécies só foi possível pela análise da sequência *16S rRNA*, conjuntamente com a característica fenotípica, produção de pigmento.

Esta técnica, como todas as técnicas baseadas na análise do ADN, apresenta a vantagem de ser mais célere do que os métodos de identificação clássica. Relativamente à análise das sequências, apresenta a vantagem de ser mais facilmente implementada num laboratório com poucos recursos tecnológicos e financeiros. Qualquer laboratório com capacidade para realizar amplificação de ADN, digestão do mesmo e separação dos fragmentos resultantes por electroforese a pode implementar.

Esta facilidade de implementação da técnica resultou em algumas desvantagens. A utilização de diferentes protocolos por diferentes laboratórios, não existindo uniformidade e.g., nos tempos de migração dos fragmentos, voltagens aplicadas, entre outros, resultou no aparecimento de diferentes algoritmos para uma mesma espécie, com igual sequência *hsp65* na região analisada^{23,54,68,100}.

O facto desta técnica se basear no reconhecimento de determinados locais de restrição e no tamanho dos fragmentos originados, independentemente da sua composição nucleotídica, acarreta algumas desvantagens. Um mesmo padrão PRA pode ser originado por espécies diferentes, independentemente da sua sequência do gene *hsp65* (440 pb) ser ou não diferente, desde que partilhem os mesmos locais

de restrição. Um padrão PRA semelhante pode resultar da digestão de sequências diferentes com locais de restrição distintos, para uma ou ambas as enzimas, que originam fragmentos com tamanhos semelhantes.

Outra dificuldade associada a esta técnica, deriva da existência de espécies com elevada taxa de polimorfismos nesta região, originando múltiplos padrões PRA para uma mesma espécie (e.g., *M. gordonae*), o que dificulta a interpretação dos resultados obtidos⁶⁸. A inexistência de padrões PRA para as novas espécies emergentes torna difícil a correcta identificação das mesmas^{35,68}.

8. RESULTADOS GLOBAIS

Nesta parte do trabalho, pretendemos comparar os resultados obtidos através das várias metodologias utilizadas na identificação das 54 estirpes da colecção, designadamente: sequenciação dos genes *16S rRNA* e *hsp65* e PRA-*hsp65*. Os resultados obtidos por cada uma das técnicas mencionadas são apresentados na tabela 7 e são descritos para cada estirpe no Anexo IV.

Das estirpes estudadas, não foi possível identificar, com a metodologia utilizada neste trabalho, duas estirpes até ao nível da espécie. Ambas foram identificadas como pertencentes a um complexo: MAC e complexo *Mycobacterium fortuitum*.

Apenas quatro espécies de MNT foram identificadas de forma inequívoca e concordante quer pela técnica de sequenciação dos genes *16S rRNA* e *hsp65* como pelo PRA-*hsp65*. As espécies incluídas neste grupo foram o *M. arupense*, *M. nebraskense*, *M. nonchromogenicum* e *M. xenopi*.

A sequenciação dos genes *16S rRNA* e *hsp65* permitiu identificar as estirpes pertencentes às seguintes espécies: *M. arupense*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. lentiflavum* e *M. monacense*, embora, aparentemente, os resultados não fossem concordantes.

Os resultados obtidos podem ser divididos em três categorias. Na primeira, colocamos as estirpes que obtiveram a mesma classificação para os dois genes em todas as bases de dados (*M. lentiflavum* e *M. monacense*). A segunda, inclui as espécies para as quais a classificação obtida para um dos genes foi discordante, pelo menos, numa das bases de dados utilizadas. Este é o caso do *M. arupense* que na base de dados RIDOM é classificado como *M. terrae*. Tal resulta de, nesta base de dados, não ter sido depositada nenhuma sequência de *M. arupense*, alertando para a necessidade de as bases de dados serem permanentemente actualizadas. No outro caso, enquadra-se uma estirpe classificada como *M. gordonae* em todas as bases de dados, excepto na Web Database, que a classificou como *M. triplex*. Esta estirpe foi identificada como *M. gordonae*, não com base nestes dados mas na análise PRA discutida mais adiante neste texto.

As duas estirpes para as quais o gene *hsp65* não apresentou capacidade discriminatória ao nível da espécie, foram incluídas na terceira categoria. Neste caso, a classificação ao nível da espécie foi atribuída com base nos resultados da sequenciação do gene *16S rRNA*. Uma estirpe cuja identificação final foi *M. avium*, foi identificada por este método como várias espécies pertencentes ao MAC. O outro caso foi um *M. fortuitum*, para o qual não foi possível obter uma identificação precisa, tendo o resultado final sido considerado inconclusivo. Esta estirpe

apresentou 100% de similaridade na GenBank, com uma estirpe identificada apenas ao nível do género, em células mononucleares do sangue periférico de um doente com SIDA. A análise do seu padrão PRA-*hsp65* também não foi conclusiva uma vez que não coincidiu com nenhum padrão descrito.

A análise dos resultados obtidos com o PRA-*hsp65* das estirpes acima referidas, originou para uma das espécies de MNT, identificada correctamente em todas as bases de dados pelas sequências de ambos os genes, um padrão PRA desconhecido. Uma possível explicação para este facto será a estirpe em causa, o *M. monacense*, apresentar algum polimorfismo que origine padrões PRA diferentes dos publicados, à semelhança do descrito para outras micobactérias (e.g., *M. gordonae*)⁶⁸.

As estirpes identificadas como *M. avium*, *M. fortuitum* e *M. lentiflavum* apresentaram um padrão PRA que é partilhado por mais que uma espécie de micobactéria. Relativamente ao *M. gordonae*, o PRA-*hsp65* identificou correctamente todas as estirpes analisadas. Curiosamente, a estirpe que foi identificada como *M. triplex* na Web Database, possui o perfil de restrição do *M. gordonae* tipo 8.

Tabela 7. Sumário dos resultados da identificação pelos métodos moleculares

Sequenciação do gene <i>16S rRNA</i>			Sequenciação do gene <i>hsp65</i>		PRA- <i>hsp65</i>	Resultado
GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^d		
<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. bolletii</i> <i>M. massiliense</i> [6]	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [6]	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> <i>M. chelonae</i> [5] <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [1]	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [6]	<i>M. abscessus</i> [6]	<i>M. abscessus</i> 1 [6]	<i>M. abscessus</i> [6]
<i>M. arupense</i> [2]	<i>M. terrae</i> [2]	<i>M. arupense</i> [2]	<i>M. arupense</i> [2]	<i>M. arupense</i> [2]	<i>M. arupense</i> [2]	<i>M. arupense</i> [2]
<i>M. avium</i> [2]	<i>M. avium</i> [2]	<i>M. avium</i> [2]	<i>M. avium</i> [2]	<i>M. avium</i> [2]	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 1 <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 1 <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> 1 [2]	<i>M. avium</i> [2]
<i>M. avium</i> [8]	<i>M. avium</i> [8]	<i>M. avium</i> [8]	<i>M. avium</i> [7] <i>M. avium</i> <i>M. avium</i> complex <i>M. bouchedorhonense</i> [1]	<i>M. avium</i> [7] <i>M. bouchedorhonense</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> [1]	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 2 <i>M. colombiense</i> 1 [8]	<i>M. avium</i> [8]
<i>M. arosiense</i> <i>M. avium</i> complex <i>M. colombiense</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. marseillense</i> [1]	<i>M. intracellulare</i> [1]	<i>M. marseillense</i> [1]	<i>M. avium</i> <i>M. saskatchewanense</i> ^e [1]	<i>M. seoulens</i> <i>M. triplex</i> <i>M. saskatchewanense</i> ^e [1]	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 2 <i>M. colombiense</i> 1 [1]	<i>M. avium</i> complex [1]

Tabela 7. Sumário dos resultados da identificação pelos métodos moleculares (Continuação).

Sequenciação do gene <i>16S rRNA</i>			Sequenciação do gene <i>hsp65</i>		PRA- <i>hsp65</i>	Resultado
GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^d		
<i>M. chelonae</i> [2]		<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. salmoniphilum</i> [1]		<i>M. chelonae</i> [1]		
		<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> <i>M. chelonae</i> [1]		<i>M. chelonae</i> ^e [1]		
	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [4]	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [1]	<i>M. chelonae</i> [4]		<i>M. chelonae</i> 1 [4]	<i>M. chelonae</i> [4]
<i>M. abscessus</i> <i>M. bolletii</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. massiliense</i> [2]		<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [1]		<i>M. chelonae</i> [2]		
		<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. chelonae</i> [1]				
<i>M. fortuitum</i> [6]	<i>M. fortuitum</i> [6]	<i>M. fortuitum</i> [6]	<i>M. fortuitum</i> [5]	<i>M. fortuitum</i> [5]	<i>M. fortuitum</i> 1 <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> 1 [5]	<i>M. fortuitum</i> [6]
			Inconclusivo [1]	Inconclusivo [1]	Inconclusivo [1]	
<i>M. fortuitum</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. neworleansense</i> [1]	<i>M. fortuitum</i> <i>M. porcinum</i> [1]	<i>M. porcinum</i> <i>M. neworleansense</i> [1]	<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> [1]	<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> [1]	<i>M. peregrinum</i> 2 <i>M. porcinum</i> 1 <i>M. septicum</i> 1 [1]	<i>M. fortuitum</i> complex [1]

Tabela 7. Sumário dos resultados da identificação pelos métodos moleculares (Continuação).

Sequenciação do gene <i>16S rRNA</i>			Sequenciação do gene <i>hsp65</i>		PRA- <i>hsp65</i>	Resultado
GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^d		
<i>M. frederiksbergense</i> [1]	<i>M. fluoroanthenivorans</i> [1]	<i>M. frederiksbergense</i> [1]	<i>M. neoaurum</i> ^e [1]	<i>M. neoaurum</i> ^e [1]	Inconclusivo [1]	<i>M. frederiksbergense</i> [1]
<i>M. gordonae</i> [11]	<i>M. gordonae</i> [11]	<i>M. gordonae</i> [11]	<i>M. gordonae</i> [11]	<i>M. gordonae</i> [3] <i>M. gordonae</i> ^e [7] <i>M. triplex</i> ^e [1]	<i>M. gordonae</i> 1 [3] <i>M. gordonae</i> 3 [7] <i>M. gordonae</i> 8 [1]	<i>M. gordonae</i> [11]
<i>M. arosiense</i> <i>M. avium complex</i> <i>M. bouchedurhonense</i> <i>M. chimaera</i> <i>M. colombiense</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. vulneris</i> [1]	<i>M. intracellulare</i> [2]	<i>M. marseillense</i> [1]	<i>M. intracellulare</i> [2]	<i>M. intracellulare</i> [2]	<i>M. chimaera</i> 1 <i>M. intracellulare</i> 1 [2]	<i>M. intracellulare</i> [2]
<i>M. intracellulare</i> [1]		<i>M. chimaera</i> [1]				
<i>M. kumamotonense</i> [1]	<i>M. terrae</i> [1]	<i>M. kumamotonense</i> [1]	<i>M. kumamotonense</i> <i>M. hiberniae</i> [1]	<i>M. kumamotonense</i> [1]	<i>M. kumamotonense</i> 1 [1] <i>M. gordonae</i> 4 [1]	<i>M. kumamotonense</i> [1]
<i>M. lentiflavum</i> [3]	<i>M. lentiflavum</i> [3]	<i>M. lentiflavum</i> [3]	<i>M. lentiflavum</i> [3]	<i>M. lentiflavum</i> [3]	<i>M. florentinum</i> 1 <i>M. lentiflavum</i> 1 <i>M. simiae</i> 5 [3]	<i>M. lentiflavum</i> [3]

Tabela 7. Sumário dos resultados da identificação pelos métodos moleculares (Continuação).

Sequenciação do gene <i>16S rRNA</i>			Sequenciação do gene <i>hsp65</i>		PRA- <i>hsp65</i>	Resultado
GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^d		
<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> [1]	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> [1]	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> [1]	<i>M. marinum</i> <i>M. pseudoshottsi</i> <i>M. ulcerans</i> [1]	<i>M. marinum</i> <i>M. pseudoshottsi</i> [1]	<i>M. malmoense</i> 2 <i>M. marinum</i> 1 <i>M. ulcerans</i> 1 [1] <i>M. pseudoshottsii</i> 1 [1]	<i>M. marinum</i> [1]
<i>M. monacense</i> [1]	<i>M. monacense</i> [1]	<i>M. monacense</i> [1]	<i>M. monacense</i> ^e [1]	<i>M. monacense</i> ^e [1]	Inconclusivo [1]	<i>M. monacense</i> [1]
<i>M. nebraskense</i> [1]	<i>M. malmoense</i> [1]	<i>M. nebraskense</i> [1]	<i>M. nebraskense</i> [1]	<i>M. nebraskense</i> [1]	<i>M. nebraskense</i> 1 [1]	<i>M. nebraskense</i> [1]
<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	<i>M. nonchromogenicum</i> [1]	<i>M. nonchromogenicum</i> 1 [1]	<i>M. nonchromogenicum</i> [1]
<i>M. peregrinum</i> <i>M. septicum</i> [1]	<i>M. peregrinum</i> <i>M. septicum</i> [1]	<i>M. septicum</i> [1]	<i>M. peregrinum</i> [1]	<i>M. peregrinum</i> [1]	<i>M. peregrinum</i> 1 [1]	<i>M. peregrinum</i> [1]
<i>M. xenopi</i> [1]	<i>M. xenopi</i> [1]	<i>M. xenopi</i> [1]	<i>M. xenopi</i> [1]	<i>M. xenopi</i> [1]	<i>M. xenopi</i> 1 [1]	<i>M. xenopi</i> [1]

Legenda: As bases de dados utilizadas na identificação das MNT estão disponíveis nos seguintes endereços electrónicos: ^aGenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov); ^bRIDOM (<http://rdna.ridom.de/>); ^cEzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>) ^dWeb-Accessible Database of *hsp65* Sequences from *Mycobacterium Reference Strains* (<http://msis.mycobacteria.info>), ^eIdentificado uma percentagem de similariedade inferior a 99% e [n] corresponde ao número de estirpes.

Neste estudo, foi possível verificar algumas das limitações anteriormente mencionadas na identificação das seguintes estirpes: *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. frederiksbergense*, *M. intracellulare*, *M. kumamotonense*, *M. marinum* e *M. peregrinum*.

A sequenciação do fragmento (neste caso \approx 600 pb), com as regiões hipervariáveis A e B, do gene *16S rRNA*, não permitiu a diferenciação entre o *M. abscessus* e o *M. chelonae*, à excepção de duas estirpes de *M. chelonae* que foram correctamente identificadas na GenBank. A sequenciação do fragmento de 440 pb do gene *hsp65*, também não permitiu a distinção destas duas espécies na base de dados da GenBank, mas foi possível identificar correctamente todas as estirpes de *M. abscessus* na Web Database. As estirpes de *M. chelonae* foram diferenciadas em ambas as bases de dados, embora uma das estirpes tenha apresentado uma similaridade inferior a 99% na Web Database.

O PRA-*hsp65* permitiu identificar de forma inequívoca, todas as estirpes de *M. abscessus* e de *M. chelonae*.

A estirpe identificada como *M. frederiksbergense* pelo gene *16S rRNA*, obteve a identificação de *M. neoaurum* com o gene *hsp65*. Estas duas espécies são filogeneticamente próximas e escotocromogénicas, pelo que não são passíveis de diferenciação com base nas características fenotípicas. O padrão PRA foi igualmente inconclusivo. A identificação pelo gene *hsp65* foi de *M. neoaurum*, com similaridade de 98% na GenBank e Web Database, com 10 ou 8 pb de diferença, respectivamente. Deste modo, foi valorizada a identificação obtida através da sequência do gene *16S rRNA*, em que se obteve 100% de similaridade para o *M.*

frederiksbergense. Também neste caso, a base de dados RIDOM não tem nenhuma sequência de *M. frederiksbergense*.

Duas estirpes foram identificadas como *M. intracellulare*. O gene *hsp65* demonstrou ser mais preciso na identificação destas estirpes. Na sequenciação do gene *16S rRNA* foi observada alguma ambiguidade nos resultados. Embora ambas tenham sido identificadas na base de dados RIDOM como *M. intracellulare*, na EzTaxon uma foi identificada como *M. marseillense* e a outra como *M. chimaera* (ambas pertencentes ao MAC). Curiosamente, na GenBank, uma das estirpes foi identificada como *M. intracellulare*, enquanto a outra foi identificada como várias espécies de MNT todas pertencentes ao MAC. O padrão PRA de ambas as estirpes resultou em duas espécies: o *M. chimaera* tipo 1 e *M. intracellulare* tipo 1.

A estirpe identificada como *M. kumamotonense*, foi erradamente identificada como *M. terrae* na base de dados RIDOM, uma vez mais devido à falta de actualização da mesma. Quanto à identificação através da sequência do gene *hsp65*, esta estirpe foi identificada como *M. kumamotonense* em ambas as bases de dados, e adicionalmente como *M. hiberniae* na GenBank. A existência de padrões de restrição muito semelhantes é uma das limitações da técnica PRA, que pode induzir em erro na identificação da espécie em estudo. Neste caso, os padrões de restrição para a enzima BstEIII eram iguais e diferiam apenas em 5-10 pb para a enzima HaeIII. As espécies com os padrões de restrição semelhantes foram o *M. kumamotonense* tipo 1 e *M. gordonae* tipo 4. Neste caso, a produção de pigmento foi essencial para a correcta identificação ao nível da espécie. Tanto o *M. hiberniae*

como o *M. gordonae* são escotocromogênicas e o *M. kumamotonense* é não-cromogênico.

A produção pigmento também teve um papel crucial na identificação da estirpe identificada como *M. marinum*. Tanto a sequenciação dos genes *16S rRNA* e *hsp65*, como o PRA-*hsp65*, não permitiram uma identificação precisa para esta estirpe quando utilizados isoladamente. O *16S rRNA* não diferenciou entre *M. marinum* e *M. ulcerans* e a sequência do gene *hsp65* identificou adicionalmente como *M. pseudoshottsii*. Nesta estirpe, foi observado um padrão PRA que corresponde a mais do que uma espécie (*M. malmoense* tipo 2, *M. marinum* tipo 1 e *M. ulcerans* tipo 1) e um outro muito semelhante (*M. pseudoshottsii* tipo 1).

Sendo o *M. marinum* e o *M. pseudoshottsii* fotocromogênicos, a identificação desta estirpe foi feita através da análise da sequência *16S rRNA*, conjuntamente com a classificação de Runyon.

Por último, a estirpe de *M. peregrinum* obteve resultados ambíguos na identificação pelo gene *16S rRNA*: *M. septicum* na base de dados EzTaxon e *M. peregrinum* e *M. septicum* nas restantes bases de dados (GenBank e RIDOM). O gene *hsp65*, mais uma vez, demonstrou ter maior poder de resolução e tanto a sua sequenciação como o PRA, identificaram esta estirpe, sem ambiguidades como *M. peregrinum*.

A eficiência dos diferentes métodos moleculares (PRA-*hsp65* e sequenciação dos genes *hsp65* e *16S rRNA*) na identificação de MNT foi avaliada isoladamente e quando complementados com a avaliação duma característica fenotípica (produção ou ausência de pigmento).

Esta análise elegeu a sequenciação do gene *hsp65* como a técnica mais precisa (Figura 5.). Outra conclusão retirada foi que a análise da produção de pigmento, quando utilizada em conjunto com os métodos moleculares, potencia a precisão de identificação das estirpes para os diferentes métodos. A técnica que mais beneficiou desta associação foi o PRA-*hsp65*, que sofreu um incremento de 7% quando complementada com a característica fenotípica.

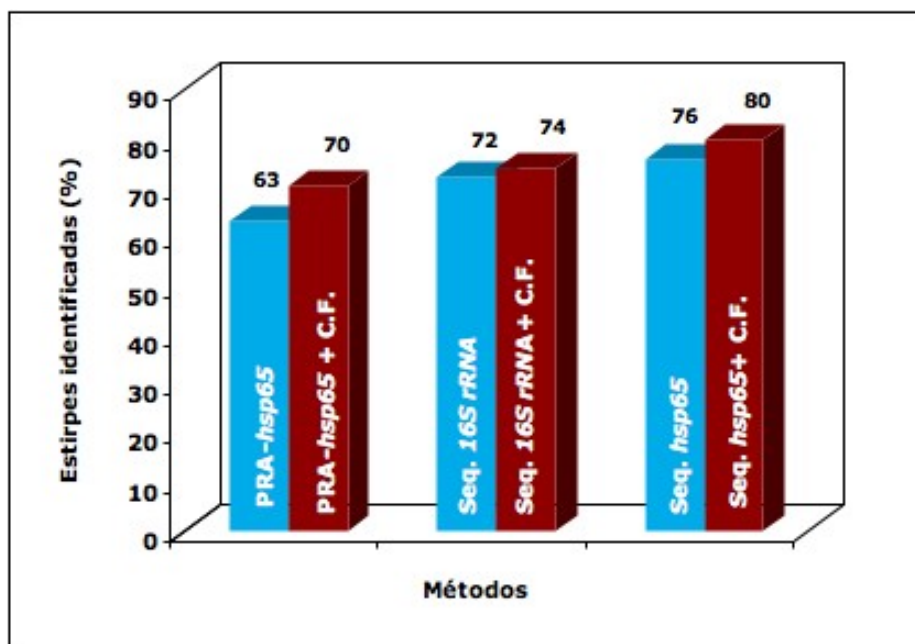


Figura 5. Comparação da eficiência dos métodos moleculares usados isoladamente vs. combinados com métodos fenotípicos.

Número de estirpes identificadas, expresso em percentagem, através da sequenciação do gene *16S rRNA* e gene *hsp65*, PRA-*hsp65*) e em conjunto com uma característica fenotípica (produção ou ausência de pigmentação).

Legenda: C.F. – característica fenotípica (presença ou ausência de pigmentação).

Quando se comparou a eficiência dos vários métodos moleculares entre si foi possível observar que a utilização de apenas um alvo molecular (gene *hsp65*) pelas diferentes técnicas, permitiu apenas identificar 89% das estirpes de MNT (Figura 6.).

A sequenciação dos genes *16S rRNA* e *hsp65*, quando utilizadas em conjunto, permitiram identificar 94% das estirpes estudadas. Este número não aumentou quando se combinaram os três métodos moleculares utilizados. Contudo, a utilização de características fenotípicas (neste caso, presença ou ausência de pigmentação) em conjunto com os métodos moleculares permitiu aumentar o número de estirpes identificadas.

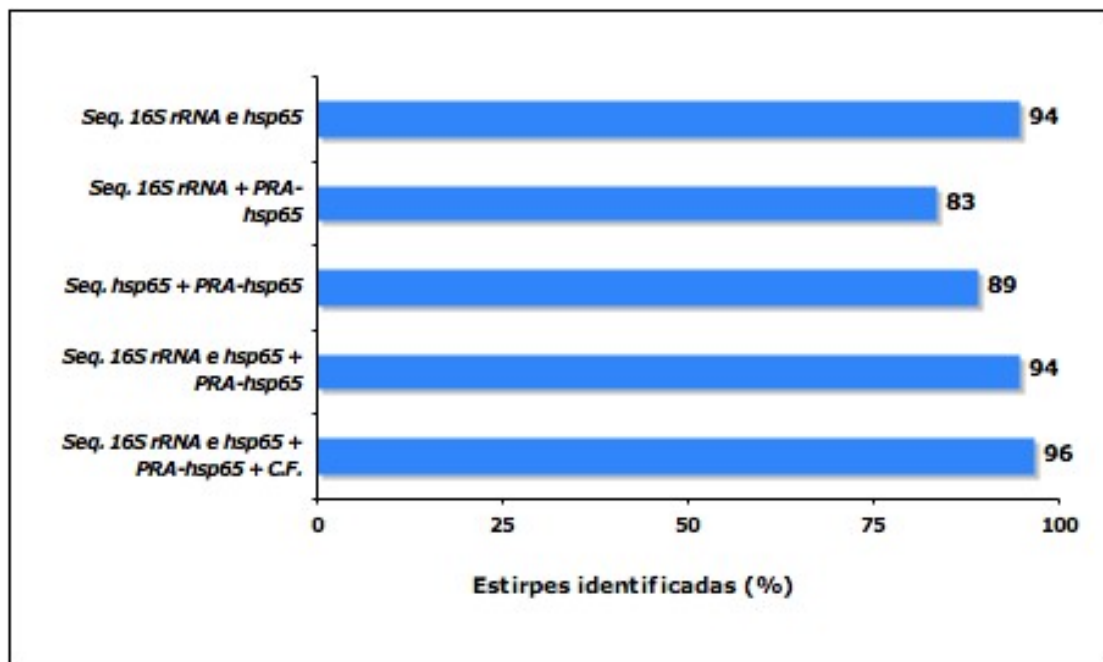


Figura 6. Comparação entre os diferentes métodos moleculares vs. característica fenotípica. Percentagem de identificação das estirpes através da sequenciação do gene *16S rRNA* e gene *hsp65*, PRA-*hsp65*) e em conjunto com uma característica fenotípica.

Legenda: C.F. – característica fenotípica (presença ou ausência de pigmentação).

O exposto anteriormente, demonstra claramente que as técnicas utilizadas apresentam limitações na identificação de MNT ao nível da espécie. Assim, para a identificação de espécies destes microrganismos, é necessário a utilização de mais do que um gene como marcador molecular e, muitas vezes, complementar a análise genotípica com a fenotípica. A sequenciação de fragmentos dos genes *16S rRNA* e

hsp65, não permite a diferenciação de algumas espécies de micobactérias. A sequenciação integral do gene permite a identificação de algumas MNT. Contudo, uma vez que algumas estirpes possuem sequências iguais ou idênticas (1 ou 2 nucleótidos de diferença) para um determinado gene, esta estratégia não é suficiente. Este facto realça a necessidade de utilizar vários marcadores moleculares em simultâneo.

O gene *hsp65* é outro marcador molecular muito utilizado que apresenta algumas vantagens sobre o gene *16S rRNA*. Entre elas, encontramos a capacidade de diferenciação entre espécies intimamente relacionadas, tais como o *M. abscessus* e o *M. chelonae*; *M. szulgai* e o *M. malmoense* e entre *M. kansasii* e o *M. gastri*⁹². Esta diferenciação é difícil de ser conseguida com a análise do gene *16S rRNA*, devido à pequena variação na sequência⁹⁴. A análise das sequências *16S rRNA* não permite a discriminação entre as seguintes espécies de MNT: *M. abscessus* / *M. chelonae*; *M. avium* / *M. intracellulare*; *M. peregrinum* / *M. septicum*; *M. kansasii* / *M. gastri*; *M. marinum* / *M. ulcerans*^{149,174,192,212}.

Embora seja raro, algumas estirpes de micobactérias (complexo *M. terrae* e *M. celatum*) têm duas cópias do gene *16S rRNA* com diferentes sequências no mesmo microrganismo^{128,139}. Nestes casos, é necessário ter alguns cuidados na interpretação dos resultados devido aos polimorfismos na sequência. A análise do gene *hsp65*, conhecido como um gene de cópia única, pode resolver esse problema.

As bases de dados utilizadas na interpretação dos resultados da sequenciação também levantaram alguns problemas. No nosso estudo, observámos que uma mesma sequência, duma determinada MNT, deu origem a diferentes classificações

ao nível da espécie, consoante a base de dados utilizada. Um outro problema, particularmente relevante para as novas espécies, reside na desactualização das bases de dados, nomeadamente da GenBank e da RIDOM¹⁸⁴.

De acordo com a descrição de Tortoli, as bases de dados genéticas podem ser agrupadas em dois grandes grupos: as controladas e as não controladas¹⁸⁴.

No nosso estudo, utilizámos bases de dados pertencentes a ambos os grupos. A GenBank pertence ao primeiro grupo e as restantes (RIDOM, EzTaxon e Web Database) ao segundo grupo.

As sequências submetidas na GenBank carecem de validação, tanto na qualidade das sequências, como na actualização da classificação taxonómica das micobactérias. Entre as deficiências encontradas, salientamos a existência de “espécies” com designações não validadas, espécies mal classificadas e em alguns casos a classificação ficou limitada ao género^{68,184,192}. Como não existe um controlo das sequências submetidas nesta base de dados, sequências idênticas podem dar percentagens de similaridade diferentes¹⁹². Deste modo, é possível obter uma identificação perfeita a partir de uma sequência com baixa qualidade. Além disso, esta base de dados contém uma enorme quantidade de sequências com falhas, o que pode levar a erros na identificação, porque mesmo que as sequências estejam correctas, a pontuação mais alta pode ser dada a uma sequência com similaridade de 99% se o tamanho do fragmento submetido for maior¹⁹².

Embora as bases de dados controladas incluam sequências com excelente qualidade e correctamente caracterizadas, a sua utilização é limitada devido à

desatualização das mesmas (RIDOM) e pela exclusão de sequências que não pertençam a estirpes de referência (EzTaxon e Web Database).

O *hsp65* pode ser utilizado não só em técnicas de sequenciação, mas também numa técnica designada por PRA. Esta técnica consiste na digestão enzimática do produto de amplificação do gene e na análise dos fragmentos resultantes. Embora o PRA-*hsp65* apresente a vantagem de ser uma técnica de baixo custo, que permite a diferenciação entre *M. abscessus* / *M. chelonae* e *M. fortuitum* / *M. peregrinum*⁵⁴ também apresenta algumas desvantagens. Entre estas, salientamos a falta de uniformidade nos protocolos para a electroforese, o que resulta no aparecimento de diferentes algoritmos para uma mesma espécie, com igual sequência *hsp65* na região analisada^{23,54,68,100}. Os algoritmos PRA publicados apresentam padrões que diferem dentro de uma faixa de 5-15 pb, o que torna a interpretação dos resultados dúbia³⁵.

Este método requer um *software* apropriado para determinar o tamanho dos fragmentos, expresso em pb, resultantes da digestão pelas enzimas. Esta ferramenta é particularmente importante para a análise dos fragmentos originados pela enzima HaeIII, que estão dependentes de polimorfismos que originam fragmentos menores que 200 pb⁵⁴.

A existência de espécies com elevada taxa de polimorfismos na região de interesse, o que origina múltiplos padrões PRA para uma mesma espécie (e.g., *M. gordonae*), dificulta a interpretação dos resultados obtidos⁶⁸. As espécies com significado clínico, como o *M. avium* e o *M. kansasii*, têm entre 5 a 6 padrões PRA distintos. Esta variabilidade pode resultar numa elevada frequência de padrões

ambíguos e de difícil interpretação³⁵. Outras dificuldades resultam da existência de padrões de restrição partilhados por mais que um espécie, de padrões PRA semelhantes para espécies diferentes e na inexistência de padrões PRA para as novas espécies emergentes, o que torna difícil a correcta identificação das mesmas^{35,68,100}.

Um laboratório que pretenda implementar a técnica PRA-*hsp65* para a identificação de MNT, deve começar por analisar estirpes de referência representativas das principais espécies isoladas localmente^{34,49} e validar o seu protocolo (preparação do gel, marcadores de peso molecular apropriados e condições de corrida)¹⁰⁰. Os tamanhos das bandas dos fragmentos devem ser determinados através de *software* adequado (*e.g.*, *QuantityOne*)⁵⁴. Os padrões obtidos devem ser comparados com os algoritmos publicados na literatura ou que constam do PRASITE, a fim de resolver pequenas diferenças e construir uma tabela personalizada para utilização interna. A análise PRA-*hsp65* é mais rápida e fidedigna que os métodos fenotípicos, sendo particularmente eficaz na resolução das espécies patogénicas mais comuns³⁵. No entanto, é possível aumentar a precisão da identificação por esta técnica, através da análise de certas características fenotípicas (*e.g.*, produção de pigmento)¹⁰⁰.

CAPITULO IV – Conclusão e perspectivas futuras

A correcta identificação das estirpes de MNT presentes em amostras clínicas é crucial para o diagnóstico. Uma vez que estes microrganismos são maioritariamente ambientais, o laboratório deve informar o médico do contexto em que a amostra foi colhida, de forma a que este possa avaliar a relevância clínica do mesmo.

Do ponto de vista da análise laboratorial este trabalho demonstrou que um resultado fidedigno só é conseguido através da combinação de metodologias diferentes. Todos os métodos actualmente disponíveis, tanto os baseados nas características genóticas como nas fenotípicas, apresentam vantagens e desvantagens que foram discutidas anteriormente. Contudo, quando combinados, permitem superar algumas das desvantagens e maximizar as vantagens. Por exemplo, enquanto o PRA-*hsp65* pode falhar na identificação de algumas estirpes, outras podem não ser correctamente identificadas pela sequenciação de fragmentos do gene *16S rRNA* ou do *hsp65*. As características culturais básicas, apesar da sua morosidade (taxa de crescimento e produção de pigmento), podem ajudar na confirmação da identificação molecular, na detecção de culturas mistas, e classificação de espécies com padrões PRA-*hsp65* iguais.

Um aspecto muito relevante para o sucesso na identificação das MNT reside na formação dos analistas. Estas micobactérias são microrganismos emergentes cujo número aumenta continuamente. Assim, o analista deve estar permanentemente actualizado relativamente às alterações taxonómicas e

familiarizado não só com as técnicas laboratoriais, mas também com as ferramentas maioritariamente informáticas, que permitem a interpretação dos resultados.

A principal conclusão deste trabalho é que após ter sido estabelecido no laboratório um procedimento para a identificação de MNT constituído por um conjunto de metodologias validadas é crucial a criação duma base de dados robusta com todos os resultados obtidos. Esta base de dados permitirá ao laboratório não só validar os seus próprios resultados como proceder à sua actualização quando *e.g.*, são identificadas novas espécies com relevância clínica.

CAPITULO V – Materiais e métodos

1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram estudadas 54 estirpes isoladas de 45 doentes diferentes, tendo como critério de selecção não pertencerem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. As estirpes de MNT utilizadas neste estudo foram isoladas em Portugal, durante os anos de 2008 e 2009 e integram a colecção de estirpes bacterianas do DDI-INSA.

2. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

A correcta identificação das micobactérias depende da pureza das culturas. Uma cultura micobacteriana contaminada pode originar resultados falso-positivos ou negativos nos testes de identificação. O recurso à coloração de Ziehl-Neelsen de um esfregaço da cultura permite verificar se a mesma está contaminada e se é composta ou não por bacilos ácido-álcool resistente (BAAR).

2.1. Cultura em meio sólido e manutenção das estirpes de MNT

Um tubo contendo a estirpe conservada a -80°C foi descongelado e semeado, em duplicado, em meio de Lowenstein-Jensen (LJ). A incubação foi efectuada às temperaturas de 30, 37 e 42°C até se observar um crescimento visível. Um dos tubos foi utilizado para extracção de ADN e preparação da cultura para avaliação

das características fenotípicas e o outro para congelar a estirpe de forma a repor a colecção.

A manutenção das culturas foi efectuada através da transferência de uma ansa de colónias de MNT do meio de LJ para um tubo de criopreservação contendo 300 µl de água destilada estéril e armazenadas a -80°C até posterior utilização. Nestas condições as micobactérias permanecem viáveis durante anos.

2.2. Preparação da suspensão bacilar

A partir de UFC em meio sólido, foi feita uma suspensão com o cerca de 12×10^8 UFC/ml (MacFarland 4). As colónias foram colocadas num tubo estéril com cerca de 15 esferas de vidro (5 mm de diâmetro) e foram homogeneizadas suavemente com o auxílio de um vórtex durante cerca de 30 s. De seguida foram adicionados 0,5 ml de água destilada estéril e a suspensão foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex durante 10 s. Por fim foram adicionados mais 4,5 ml de água destilada estéril e foi repetido o procedimento de homogenização. Esta suspensão bacilar foi utilizada para a determinação da produção de pigmento, presença ou ausência de crescimento às temperaturas de 30, 37 e 42°C e tempo de crescimento.

2.3. Crescimento das culturas de MNT a diferentes temperaturas

Para determinar as relações térmicas das MNT foi verificada a presença ou ausência de crescimento de culturas incubadas a diferentes temperaturas. Para tal, foram inoculados 0,2 ml da suspensão bacilar em três tubos contendo meio de LJ.

Estes tubos foram incubados às temperaturas de 30, 37 e 42°C até ser observado crescimento visível.

2.4. Tempo de crescimento das culturas de MNT

O tempo de crescimento deve ser determinado em culturas com colónias bem isoladas, i.e., sem desenvolvimento confluyente. Deste modo, foi ajustada a turvação da suspensão bacilar anteriormente preparada, juntando água destilada estéril até igualar a opacidade do padrão nº1 da escala de MacFarlan. Foram inoculados 0,2 ml da suspensão em três tubos contendo meio de LJ e incubados às temperaturas de 30, 37 e 42°C. O aparecimento de colónias nos tubos foi verificado com uma periodicidade semanal. As culturas que apresentaram crescimento visível em menos de 7 dias foram registadas como micobactérias de crescimento rápido. Aquelas para as quais o crescimento foi detectado após mais de 7 dias foram registadas como MNT de crescimento lento.

2.5. Produção de pigmento das culturas de MNT

A produção de pigmento e as condições de aparecimento são propriedades características das micobactérias. As espécies cujas colónias adquirem cor (que pode variar do amarelo ao laranja) quando expostas à luz são designadas por fotocromogénicas; as escotocromogénicas produzem pigmento quando cultivadas tanto na ausência como na presença da luz e as não-cromogénicas apresentam colónias geralmente não pigmentadas (cor creme) tanto na ausência como na presença da luz.

A partir da suspensão padronizada (MacFarlan 1) foram efectuadas diluições decimais até 10^{-3} . Para tal, foram adicionados 0,5 ml da suspensão inicial a 4,5 ml de água destilada (10^{-1}). Para a diluição 10^{-2} , foram adicionados 0,5 ml da diluição 10^{-1} a 4,5 ml de água destilada e assim sucessivamente.

Foram semeados 2 tubos de LJ com 0,2 ml de da diluição 10^{-3} de modo a se obterem culturas bem isoladas. Os tubos foram embrulhados com papel de alumínio e incubados às diferentes temperaturas (30°, 37° e 42°C).

Quando se observou crescimento visível, o tubo incubado na obscuridade foi exposto à luz, com a tampa desenroscada. A exposição à luz numa lâmpada fluorescente colocada a cerca de 30 cm de altura foi mantida durante duas horas. De seguidamente o tubo foi novamente colocado, meio roscado, na estufa. Foi registado se ocorreu formação de pigmento nas culturas mantidas na presença de luz. No dia seguinte o aspecto das UFC dos dois tubos foi comparado e foi registado se aparecia ou não pigmentação nas culturas mantidas na obscuridade.

3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para a identificação das espécies micobacterianas foi efectuada a amplificação e sequenciação de um segmento do gene que codifica a proteína de choque térmico 65-kDa (*hsp65*) e de um segmento do gene que codifica para a unidade ribossomal *16SrRNA* através das técnicas de PCR e sequenciação automática.

3.1. Extracção de ADN genómico

A extracção de ADN genómico foi realizada utilizando o kit comercial *QIAamp® DNA Mini* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

A extracção de ADN genómico de cada estirpe foi realizada a partir da cultura em meio sólido LJ. Em resumo, as culturas foram transferidas com o auxílio de uma ansa para um tubo estéril rolhado, ressuspendidas em 180 µl de tampão ATL e incubadas durante 10 min a 95°C. De seguida foram adicionados 20 µl de Proteinase K. O tubo foi incubado a 56°C até lise completa (1-2h). Após a lise celular, foram adicionados 200 µl de tampão AL. O conteúdo do tubo foi homogeneizado, por agitação no vórtex e foi a incubar a 70°C por 10 min. Após esse período foram adicionados 200 µl de etanol 96-100%. O conteúdo do tubo foi homogeneizado, por agitação no vórtex e transferido na totalidade para uma coluna *QIAamp Mini Column* com um tubo colector de 2 ml e centrifugado a 6.000 *xg* (Centrifuga 5415D, Eppendorf) durante 1 min. O tubo colector foi descartado e a coluna tranferida para um tubo colector limpo ao qual se adicionou 250 µl de tampão AW1. Este foi centrifugado como anteriormente. Este procedimento foi repetido mais uma vez após o que se adicionaram, por duas vezes, 250 µl de tampão AW2 e se centrifugou primeiro a 6.000 *xg*, 1 min e depois a 16.000 *xg*, 3 min. O tubo colector foi então rejeitado e a coluna tranferida para um tubo colector limpo. Foi efectuada uma nova centrifugação (6.000 *xg*, 1 min) para eliminar qualquer vestígio de solução de lavagem. Para a eluição do ADN, a coluna foi transferida para um tubo cónico de 1,5 ml com tampa, foram adicionados 50 µl de tampão AE e centrifugou-se (6.000 *xg*, 1 min). O ADN extraído foi conservado a -20°C até ao momento da utilização.

3.2. Amplificação de um fragmento do gene *hsp65*

Os iniciadores (doravante designados por *primers*) utilizados para amplificar o fragmento de 440 pb do gene *hsp65* (entre as posições 398 e 836 da sequência publicada) são descritos na tabela 8¹⁷⁹.

A mistura para a reacção de PCR foi preparada, numa câmara de fluxo laminar vertical (Telstar Mini V/PCR), para um volume final de 50 µl. A sua composição era a seguinte: 5 µl (entre 10-50 ng) de ADN; 10% de Glicerol; tampão de PCR 1X [(10 mM Tris-HCl pH8,3; 50 mM KCL; 1,5 mM MgCl₂; 0,001% (p/v) gelatin) (Applied Biosystems Inc., Foster City, EUA)]; 1,5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems Inc., Foster City, EUA); 200 µM de cada dNTP (Bioline Ltd, Londres, Reino Unido); 0,5 µM de cada *primer* (Invitrogen S.A, Barcelona, Espanha); 1U Taq *DNA Polimerase* (Applied Biosystems Inc., Foster City, EUA) e um volume de água destilada estéril suficiente para perfazer o volume final de 50 µl. Em cada ensaio foi usado um controlo negativo no qual o volume de ADN foi substituído por água destilada.

A reacção de amplificação foi realizada num Termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems Inc., Foster City, EUA) e consistiu numa desnaturação inicial (5 min a 94°C), precedido de 45 ciclos constituídos por uma desnaturação (1 min a 94°C), uma hibridação dos *primers* (1 min a 60°C) e uma extensão (1 min a 72°C) e, com um ciclo de extensão final (10 min a 72°C). O produto amplificado foi conservado a -20°C até à sua utilização.

Tabela 8. *Primers* utilizados para amplificar o gene *hsp65*

Primer	Sequência 5'→3'	Tm (°C)	Referência
Tb11	ACCAACGATGGTGTGTCCAT	63,68	179
Tb12	CTTGTCGAACCGCATACCCT	63,73	

A eficiência da amplificação foi avaliada através duma electroforese dos produtos de amplificação num gel de agarose 1,5% (m/v) (Invitrogen S.A, Barcelona, Espanha) corado com *SYBR® Safe* (Invitrogen S.A, Barcelona, Espanha). Em cada poço foram aplicados 7 µl de amostra ou de um marcador de peso molecular *HyperLadder™ IV* (100 - 1000 pb) (Bioline Ltd, Londres, Reino Unido). As amostras são constituídas por 3 µl de cada produto amplificado, 2 µl de tampão de aplicação (0,25% Azul bromofenol; 0,25% Xileno cianol; 15% Ficoll; 120 mM EDTA) e 2 µl H₂O; e o controlo por 0,5 µl de marcador de peso molecular, 2 µl de tampão de aplicação e 4,5 µl de água.

A migração do ADN no gel foi efectuada em tampão Tris/Borato/EDTA pH 8 (doravante designado por TBE: 4,45 mM Tris-base; 4,45 mM ácido bórico; 0,125 mM EDTA;) com uma voltagem constante de 100 V (Fonte de alimentação - Pharmacia) durante cerca de 30 min. No final, o gel foi observado no Transiluminador *Gel Doc 2000* (Bio Rad Laboratories Ltd.) e a sua imagem foi registada. O produto de PCR foi utilizado para sequenciação e digestão enzimática com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*.

3.3. Amplificação de um fragmento do gene *16S rRNA*

Os *primers* (Tabela 9) utilizados na amplificação do fragmento de 976 pb do gene *16S rRNA* foram desenhados com recurso ao software *Beacon Designer 7.0* (Premier Biosoft International, Palo Alto, USA).

A reacção de PCR foi realizada num termociclador *Light Cycler* versão 5.32 (Roche Biochemicals, Mannheim, Germany). A reacção de amplificação foi realizada num volume final de 15 µl contendo: 2 µl DNA master *SYBR Green* [*DNA Master SYBR Green Kit* (Roche Diagnostic)]; 4 mM MgCl₂; 0,3 µM de cada *primer* (Invitrogen S.A, Barcelona, Espanha); 5 µl (≈ 25 ng) de ADN e um volume de água destilada estéril que permita perfazer o volume final da reacção. Em cada ensaio foram introduzidos um controlo negativo e um controlo positivo constituídos por água destilada e ADN de uma estirpe de referência *Mycobacterium avium* (ATCC 25291).

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial (10 min a 95°C) seguida de 32 ciclos de hibridação (5 s a 61°C) e extensão (39 s a 72°C) com aquisição da fluorescência emitida a 530 nm, seguido de um programa de curvas de fusão (doravante designado por *melting*) durante 30 s a 60°C. A amplificação terminou com o arrefecimento durante 30s a 40°C. O produto amplificado foi conservado a -20°C até à sua utilização.

A confirmação da eficiência da amplificação foi feita através da análise das curvas de amplificação e de *melting*.

Tabela 9. *Primers* utilizados para amplificar o fragmento do gene *16S rRNA*

<i>Primer</i>	Sequência 5' → 3'	T _m (°C)	Posição (pb) ⁱ
16S F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	63,61	8 a 27
16S R	GTAAGGTTCTKCGCGTTGC	63,64	984 a 966

ⁱ no gene *16S rRNA* da *Escherichia coli*

3.4. Sequenciação dos genes *hsp65* e *16S rRNA*

Os produtos de amplificação obtidos foram purificados com o kit *JETQUICK PCR Purification Spin* (Genomed GmbH, Löhne, Alemanha), segundo instruções do fabricante. Resumidamente, para 30 µl de amostra adicionou-se 120 µl da solução H1 (tampão de ligação à coluna). O volume total foi transferido para uma coluna de purificação, centrifugado a 18.000 xg (Centrífuga 5415D, Eppendorf) durante 1 min, tendo sido rejeitado o eluído. Foi realizada outra centrifugação (1 min a 15.000 xg) e desprezou-se o eluído. Foram adicionados 500 µl da solução H2 (tampão de lavagem) reconstituída previamente com etanol à coluna e centrifugou-se (1 min a 15.000 xg). A coluna de purificação foi depois transferida para um tubo colector de 1,5 ml ao qual se adicionou 30 µl de tampão TE (tampão de eluição). Este foi centrifugado 2 min a 15.000 xg. O produto purificado foi conservado a -20°C até à sua utilização.

Os produtos purificados foram posteriormente sujeitos a sequenciação enzimática. Os *primers* utilizados na reacção e sequenciação foram os descritos nas tabelas 8 e 9. Para o gene *16S rRNA* (mais de 600 pb) foram preparadas duas misturas, uma com o *primer forward*, outra com o *primer reverse*.

A reacção de sequenciação foi realizada para um volume final de 10 µl contendo 2 µl de *Big Dye® Terminator* 1.1 (Applied Biosystems, Inc.), 1 µl de cada *primer* (0,5 µM), um volume de ADN compreendido entre 0,5 e 7 µl correspondendo a 2,5 a 10 ng de ADN purificado e água destilada estéril, quando necessária para completar o referido volume. O programa de sequenciação consistiu num ciclo inicial de desnaturação (30 s a 96°C), seguido de 25 ciclos constituídos por uma desnaturação (10 s a 96°C), uma hibridação (5 s a 50°C) e uma extensão (4 min a 60°C). Estas reacções foram realizadas num termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied BioSystems, Inc.).

Após a reacção de sequenciação os produtos foram centrifugados a baixa rotação e sujeitos a sequenciação automática num sequenciador *ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Inc.) na Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA.

As sequências de nucleótidos dos genes *hsp65* e *16S rRNA*, foram analisadas recorrendo ao programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

As sequências consenso geradas, de cada estirpe, foram comparadas com as sequências de nucleótidos da base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) recorrendo à aplicação BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)¹⁴. Adicionalmente, as sequências consenso do gene *16S rRNA* serão comparadas com as sequências da base de dados EzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>) e RIDOM - *The Ribosomal Differentiation of Microorganisms* (<http://rdna.ridom.de/>) e as do gene *hsp65* na base dados *Web-*

Accessible Database of hsp65 Sequences from Mycobacterium Reference Strains
(<http://msis.mycobacteria.info>)^{37,51,70}.

4. ANÁLISE DE PADRÕES DE RESTRIÇÃO DO GENE *hsp65* AMPLIFICADO POR PCR (PRA)

4.1. Digestão do ADN com as enzimas de restrição BstEII e HaeIII

Após a amplificação, procedeu-se à digestão dos produtos de PCR, positivos para a presença dos fragmentos de 440 pb do gene *hsp65*, com a endonuclease de restrição BstEII (Roche Diagnostic) que reconhece o local de restrição G↑GTNACC e com a endonuclease de restrição HaeIII (Roche Diagnostic) que reconhece o local de restrição GG↑CC.

A mistura reaccional, para cada enzima, foi realizada num volume final de 15 µl contendo: 1,25 µl de tampão da enzima [10X *SuRE/Cut Buffer M* (HaeIII) ou *B* (BstEII) (Roche Diagnostic)]; 0,5 µl de enzima de restrição (BstEII ou HaeIII); 10 µl de ADN e água destilada estéril. A digestão foi efectuada durante 90 minutos em tubos selados, de forma a minimizar as perdas por evaporação, a 60°C para a enzima BstE ou a 37°C para a enzima HaeIII.

4.2. Análise da digestão do fragmento do gene *hsp65* pelas enzimas BstEII e HaeIII

A eficiência da digestão do fragmento do gene *hsp65* foi efectuada através da monitorização da migração das amostras (10 µl dos produtos da reacção

adicionados de 4 µl de tampão de aplicação) e do controlo (marcador de peso molecular *HyperLadder™ V* com fragmentos de ADN de 25-500 pb (Bioline Ltd, Londres, Reino Unido), num gel a 3,0% de *MetaPhor® Agarose* (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.) em tampão TBE 0,5X. A migração foi efectuada a 120V (Fonte de alimentação - Pharmacia) durante cerca 2,5h. O gel foi corado com 5 µl de *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (10,000x) (Invitrogen S.A, Barcelona, Espanha) e visualizado no Transiluminador *Gel Doc 2000* (Bio Rad Laboratories Ltd.) tendo a sua imagem sido registada. De forma a minimizar erros no cálculo dos tamanhos dos fragmentos das amostras inerentes à migração das amostras no gel procedeu-se à aplicação do marcador em ambas as extremidades do gel.

Os tamanhos das bandas dos fragmentos foram estimados através do programa *QuantityOne 4.3.0* (Bio Rad Laboratories Ltd.), cuja normalização foi feita usando o marcador de peso molecular como referência. Os fragmentos foram comparados com os padrões de PRA descritos na literatura e através da página electrónica PRASITE^{23,35,40,43,49,54,68,99,101,102,107,126,156,157,163,179,193}.

CAPITULO VI – BIBLIOGRAFIA

1. Adékambi, T., P. Colson, e M. Drancourt. 2003. *rpoB* - based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. J. Clin. Microbiol 41:5699-5708.
2. Adékambi, T., e M. Drancourt. 2009. *Mycobacterium bolletii* respiratory infections. Emerging Infect. Dis 15:302-305.
3. Adékambi, T., M. Reynaud-Gaubert, G. Greub, M.-J. Gevaudan, B. La Scola, D. Raoult, e M. Drancourt. 2004. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. J. Clin. Microbiol 42:5493-5501.
4. Aguado, J. M., J. L. Gómez-Garcés, A. Manrique, e F. Soriano. 1987. Pulmonary infection by *Mycobacterium gordonae* in an immunocompromised patient. Diagn. Microbiol. Infect. Dis 7:261-263.
5. Ahn, C. H., J. R. Lowell, G. D. Onstad, E. H. Shuford, e G. A. Hurst. 1979. A demographic study of disease due to *Mycobacterium kansasii* or *M. intracellulare - avium* in Texas. Chest 75:120-125.
6. Amorim, A., R. Macedo, A. Lopes, I. Rodrigues, e E. Pereira. 2010. Non-tuberculous mycobacteria in HIV-negative patients with pulmonary disease in Lisbon, Portugal. Scand. J. Infect. Dis 42:626-628.
7. Armstrong, K. L., R. W. James, D. J. Dawson, P. W. Francis, e B. Masters. 1992. *Mycobacterium haemophilum* causing perihilar or cervical lymphadenitis in healthy children. J. Pediatr 121:202-205.

8. Aubry, A., O. Chosidow, E. Caumes, J. Robert, e E. Cambau. 2002. Sixty-three cases of *Mycobacterium marinum* infection: clinical features, treatment, and antibiotic susceptibility of causative isolates. Arch. Intern. Med 162:1746-1752.
9. Ausina, V., J. Barrio, M. Luquin, M. A. Sambeat, M. Gurgui, G. Verger, e G. Prats. 1988. *Mycobacterium xenopi* infections in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Intern. Med 109:927-928.
10. Bagarazzi, M. L., B. Watson, I. K. Kim, M. Hogarty, e K. L. McGowan. 1996. Pulmonary *Mycobacterium gordonae* infection in a two-year-old child: case report. Clin. Infect. Dis 22:1124-1125.
11. Bang, D., T. Herlin, M. Stegger, A. B. Andersen, P. Torkko, E. Tortoli, e V. O. Thomsen. 2008. *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 58:2398-2402.
12. Beckett, W., M. Kallay, A. Sood, Z. Zuo, e D. Milton. 2005. Hypersensitivity pneumonitis associated with environmental mycobacteria. Environ. Health Perspect 113:767-770.
13. Ben Salah, I., C. Cayrou, D. Raoult, e M. Drancourt. 2009. *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 59:2803-2808.
14. Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, e E. W. Sayers. 2011. GenBank. Nucleic Acids Res 39:D32-37.
15. Blacklock, Z. M., D. J. Dawson, D. W. Kane, e D. McEvoy. 1983. *Mycobacterium asiaticum* as a potential pulmonary pathogen for humans. A

- clinical and bacteriologic review of five cases. *Am. Rev. Respir. Dis* 127:241-244.
16. Blackwood, K. S., C. He, J. Gunton, C. Y. Turenne, J. Wolfe, e A. M. Kabani. 2000. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol* 38:2846-2852.
 17. Bloch, K. C., L. Zwerling, M. J. Pletcher, J. A. Hahn, J. L. Gerberding, S. M. Ostroff, D. J. Vugia, e A. L. Reingold. 1998. Incidence and clinical implications of isolation of *Mycobacterium kansasii*: results of a 5-year, population-based study. *Ann. Intern. Med* 129:698-704.
 18. Bonnet, E., P. Massip, R. Bauriaud, L. Alric, e J. C. Auvergnat. 1996. Disseminated *Mycobacterium gordonae* infection in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis* 23:644-645.
 19. Böttger, E. C. 1994. *Mycobacterium genavense*: an emerging pathogen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 13:932-936.
 20. Böttger, E. C., A. Teske, P. Kirschner, S. Bost, H. R. Chang, V. Beer, e B. Hirschel. 1992. Disseminated "*Mycobacterium genavense*" infection in patients with AIDS. *Lancet* 340:76-80.
 21. Branger, B., A. Gouby, R. Oulès, J. P. Balducchi, G. Mourad, J. Fourcade, C. Mion, F. Duntz, e M. Ramuz. 1985. *Mycobacterium haemophilum* and *Mycobacterium xenopi* associated infection in a renal transplant patient. *Clin. Nephrol* 23:46-49.
 22. Brown, B. A., B. Springer, V. A. Steingrube, R. W. Wilson, G. E. Pfyffer, M. J. Garcia, M. C. Menendez, B. Rodriguez-Salgado, K. C. Jost, S. H. Chiu, G. O. Onyi, E. C. Böttger, e R. J. Wallace. 1999. *Mycobacterium wolinskyi* sp. nov.

- and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol* 49 Pt 4:1493-1511.
23. Brunello, F., M. Ligozzi, E. Cristelli, S. Bonora, E. Tortoli, e R. Fontana. 2001. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol* 39:2799-806.
 24. Butler, W. R., S. P. O'Connor, M. A. Yakrus, R. W. Smithwick, B. B. Plikaytis, C. W. Moss, M. M. Floyd, C. L. Woodley, J. O. Kilburn, e F. S. Vadney. 1993. *Mycobacterium celatum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol* 43:539-548.
 25. Cabria, F., M.-V. Torres, J.-I. García-Cía, M.-N. Dominguez-Garrido, J. Esteban, e M. S. Jimenez. 2002. Cervical lymphadenitis caused by *Mycobacterium lentiflavum*. *Pediatr. Infect. Dis. J* 21:574-575.
 26. Camargo, D., C. Saad, F. Ruiz, M. E. Ramirez, M. Lineros, G. Rodriguez, E. Navarro, B. Pulido, e L. C. Orozco. 1996. Iatrogenic outbreak of *M. chelonae* skin abscesses. *Epidemiol Infect* 117:113-119.
 27. Carbonne, A., F. Brossier, I. Arnaud, I. Bougmiza, E. Caumes, J.-P. Meningaud, S. Dubrou, V. Jarlier, E. Cambau, e P. Astagneau. 2009. Outbreak of nontuberculous mycobacterial subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections. *J. Clin. Microbiol* 47:1961-1964.
 28. Cardoso, A. M., E. Martins de Sousa, C. Viana-Niero, F. Bonfim de Bortoli, Z. C. Pereira das Neves, S. C. Leão, A. P. Junqueira-Kipnis, e A. Kipnis. November. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. *Microbes and Infection* 10:1552-1557.

29. Casanova, J.-L., e L. Abel. 2002. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunol* 20:581-620.
30. Cayrou, C., C. Turenne, M. A. Behr, e M. Drancourt. 2010. Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. *Microbiology* 156:687 -694.
31. Chan, E. D., P. M. Kong, K. Fennelly, A. P. Dwyer, e M. D. Iseman. 2001. Vertebral osteomyelitis due to infection with nontuberculous *Mycobacterium* species after blunt trauma to the back: 3 examples of the principle of locus minoris resistentiae. *Clin. Infect. Dis* 32:1506-1510.
32. Chandra, N. S., M. F. Torres, K. L. Winthrop, D. A. Bruckner, D. G. Heidemann, H. M. Calvet, M. Yakrus, B. J. Mondino, e G. N. Holland. 2001. Cluster of *Mycobacterium chelonae* keratitis cases following laser in-situ keratomileusis. *Am. J. Ophthalmol* 132:819-830.
33. Chetchotisakd, P., P. Mootsikapun, S. Anunnatsiri, K. Jirarattanapochai, C. Choonhakarn, A. Chaiprasert, P. N. Ubol, L. J. Wheat, e T. E. Davis. 2000. Disseminated infection due to rapidly growing mycobacteria in immunocompetent hosts presenting with chronic lymphadenopathy: a previously unrecognized clinical entity. *Clin. Infect. Dis* 30:29-34.
34. Cheunoy, W., T. Prammananan, A. Chaiprasert, e S. Foongladda. 2005. Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: two amplified targets, *hsp65* and *rpoB* , for identification of cultured mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51:165-71.
35. Chimara, E., L. Ferrazoli, S. Y. M. Ueky, M. C. Martins, A. M. Durham, R. D. Arbeit, e S. C. Leão. 2008. Reliable identification of mycobacterial species by

- PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. BMC Microbiol 8:48.
36. Chocarra, A., A. Gonzalez Lopez, M. F. Breznes, A. Canut, J. Rodriguez, e J. M. Diego. 1994. Disseminated infection due to *Mycobacterium malmoense* in a patient infected with human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis 19:203-204.
 37. Chun, J., J.-H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B. K. Kim, e Y.-W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57:2259 -2261.
 38. Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev 17:840-62, table of contents.
 39. Clegg, H. W., M. T. Foster, W. E. Sanders Jr, e W. B. Baine. 1983. Infection due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex after augmentation mammoplasty: clinical and epidemiologic features. J. Infect. Dis 147:427-433.
 40. Cloud, J. L., J. J. Meyer, J. I. Pounder, K. C. Jost, A. Sweeney, K. C. Carroll, e G. L. Woods. 2006. *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 56:1413-1418.
 41. Cohen, Y. H., J. Amir, S. Ashkenazi, T. Eidlitz-Markus, Z. Samra, L. Kaufmann, e A. Zeharia. 2008. *Mycobacterium haemophilum* and lymphadenitis in immunocompetent children, Israel. Emerging Infect. Dis 14:1437-1439.

42. Collins, C. H., J. M. Grange, e M. D. Yates. 1997. Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice, 2nd ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, England.
43. Cooksey, R. C., J. H. de Waard, M. A. Yakrus, I. Rivera, M. Chopite, S. R. Toney, G. P. Morlock, e W. R. Butler. 2004. *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 54:2385-2391.
44. Cooper, J. F., M. J. Lichtenstein, B. S. Graham, e W. Schaffner. 1989. *Mycobacterium chelonae*: a cause of nodular skin lesions with a proclivity for renal transplant recipients. *Am. J. Med* 86:173-177.
45. Correa, N. E., J. C. Cataño, G. I. Mejía, T. Realpe, B. Orozco, S. Estrada, A. Vélez, L. Vélez, P. Barón, A. Guzmán, e J. Robledo. 2010. Outbreak of mesotherapy-associated cutaneous infections caused by *Mycobacterium chelonae* in Colombia. *Jpn. J. Infect. Dis* 63:143-145.
46. Coyle, M. B., L. C. Carlson, C. K. Wallis, R. B. Leonard, V. A. Raisys, J. O. Kilburn, M. Samadpour, e E. C. Böttger. 1992. Laboratory aspects of "Mycobacterium genavense," a proposed species isolated from AIDS patients. *J. Clin. Microbiol* 30:3206-3212.
47. Da Silva, C. F., S. Y. Ueki, D. de C. Geiger, e S. C. Leão. *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43:25-8.
48. Da Silva Rocha, A., C. da Costa Leite, H. M. Torres, A. B. de Miranda, M. Q. Pires Lopes, W. M. Degrave, e P. N. Suffys. 1999. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *J Microbiol Methods* 37:223-9.

49. da Silva Rocha, A., A. M. Werneck Barreto, C. E. Dias Campos, M. Villas-Bôas da Silva, L. Fonseca, M. H. Saad, W. M. Degrave, e P. N. Suffys. 2002. Novel allelic variants of *Mycobacteria* isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. *J Clin Microbiol* 40:4191-6.
50. Dai, J., Y. Chen, S. Dean, J. G. Morris, M. Salfinger, e J. A. Johnson. 2011. Multiple-Genome Comparison Reveals New Loci for *Mycobacterium* Species Identification. *J Clin Microbiol* 49:144-153.
51. Dai, J., Y. Chen, e M. Lauzardo. 2011. Web-Accessible Database of *hsp65* Sequences from *Mycobacterium* Reference Strains. *J. Clin. Microbiol* 49:2296-2303.
52. De Beenhouwer, H., Z. Liang, P. De Rijk, C. Van Eekeren, e F. Portaels. 1995. Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. *J. Clin. Microbiol* 33:2994-2998.
53. Delaney, V., N. Sumrani, J. H. Hong, e B. Sommer. 1993. Mycobacterial infections in renal allograft recipients. *Transplant. Proc* 25:2288-2289.
54. Devallois, A., K. S. Goh, e N. Rastogi. 1997. 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* 35:2969-73.
55. Dorman, S. E., e S. M. Holland. 2000. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:321-333.
56. Duarte, R. S., M. C. S. Lourenço, L. de S. Fonseca, S. C. Leão, E. de L. T. Amorim, I. L. L. Rocha, F. S. Coelho, C. Viana-Niero, K. M. Gomes, M. G. da

- Silva, N. S. de O. Lorena, M. B. Pitombo, R. M. C. Ferreira, M. H. de O. Garcia, G. P. de Oliveira, O. Lupi, B. R. Vilaça, L. R. Serradas, A. Chebabo, E. A. Marques, L. M. Teixeira, M. Dalcolmo, S. G. Senna, e J. L. M. Sampaio. 2009. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. J. Clin. Microbiol 47:2149-2155.
57. Duffey, P. S., L. S. Guthertz, e G. C. Evans. 1996. Improved rapid identification of mycobacteria by combining solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography analysis of BACTEC cultures. J. Clin. Microbiol 34:1939-1943.
58. Euzéby, J. P. J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>].
59. Falkinham, J. O. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev 9:177-215.
60. Fiss, E. H., F. F. Chehab, e G. F. Brooks. 1992. DNA amplification and reverse dot blot hybridization for detection and identification of mycobacteria to the species level in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 30:1220-1224.
61. Fraser, V. J., M. Jones, P. R. Murray, G. Medoff, Y. Zhang, e R. J. Wallace Jr. 1992. Contamination of flexible fiberoptic bronchoscopes with *Mycobacterium chelonae* linked to an automated bronchoscope disinfection machine. Am. Rev. Respir. Dis 145:853-855.
62. Frothingham, R., e K. H. Wilson. 1993. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol 175:2818-2825.
63. Gingeras, T. R., G. Ghandour, E. Wang, A. Berno, P. M. Small, F. Drobniowski, D. Alland, E. Desmond, M. Holodniy, e J. Drenkow. 1998. Simultaneous

- genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res* 8:435-448.
64. Greene, J. B., G. S. Sidhu, S. Lewin, J. F. Levine, H. Masur, M. S. Simberkoff, P. Nicholas, R. C. Good, S. B. Zolla-Pazner, A. A. Pollock, M. L. Tapper, e R. S. Holzman. 1982. *Mycobacterium avium -intracellulare*: a cause of disseminated life-threatening infection in homosexuals and drug abusers. *Ann. Intern. Med* 97:539-546.
65. Griffith, D. E., W. M. Girard, e R. J. Wallace Jr. 1993. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am. Rev. Respir. Dis* 147:1271-1278.
66. Griffith, D. E., T. Aksamit, B. A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S. M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt, M. F. Iademarco, M. Iseman, K. Olivier, S. Ruoss, C. F. von Reyn, R. J. Wallace Jr, e K. Winthrop. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 175:367-416.
67. Hadad, D. J., S. C. Smole, C. C. Martins, C. Erica, S. Y. Ueki, M. C. Palhares, R. D. Arbeit, e A. C. Pignatari. 2003. Disseminated *Mycobacterium genavense* in an HIV-infected patient from South America. *Int. J. Tuberc. Lung Dis* 7:502-503.
68. Häfner, B., H. Haag, H.-K. Geiss, e O. Nolte. 2004. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. *Mol Cell Probes* 18:59-65.

69. Hamid, M. E., A. Roth, O. Landt, R. M. Kroppenstedt, M. Goodfellow, e H. Mauch. 2002. Differentiation between *Mycobacterium farcinogenes* and *Mycobacterium senegalense* Strains Based on 16S-23S Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences. *J Clin Microbiol* 40:707-711.
70. Harmsen, D., S. Dostal, A. Roth, S. Niemann, J. Rothgänger, M. Sammeth, J. Albert, M. Frosch, e E. Richter. 2003. RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC Infect Dis* 3:26.
71. Hazra, R., C. D. Robson, A. R. Perez-Atayde, e R. N. Husson. 1999. Lymphadenitis due to nontuberculous mycobacteria in children: presentation and response to therapy. *Clin. Infect. Dis* 28:123-129.
72. Hellinger, W. C., J. D. Smilack, J. L. Greider Jr, S. Alvarez, S. D. Trigg, N. S. Brewer, e R. S. Edson. 1995. Localized soft-tissue infections with *Mycobacterium avium* / *Mycobacterium intracellulare* complex in immunocompetent patients: granulomatous tenosynovitis of the hand or wrist. *Clin. Infect. Dis* 21:65-69.
73. Henriques, B., S. E. Hoffner, B. Petrini, I. Juhlin, P. Wåhlén, e G. Källénus. 1994. Infection with *Mycobacterium malmoense* in Sweden: Report of 221 Cases. *Clinical Infectious Diseases* 18:596 -600.
74. Horsburgh, C. R., Jr. 1991. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med* 324:1332-1338.
75. Horsburgh, C. R., Jr, J. Gettings, L. N. Alexander, e J. L. Lennox. 2001. Disseminated *Mycobacterium avium* complex disease among patients infected with human immunodeficiency virus, 1985-2000. *Clin. Infect. Dis* 33:1938-1943.

76. Horsburgh, C. R., Jr, U. G. Mason 3rd, D. C. Farhi, e M. D. Iseman. 1985. Disseminated infection with *Mycobacterium avium - intracellulare*. A report of 13 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 64:36-48.
77. Horsburgh, C. R., Jr, e R. M. Selik. 1989. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am. Rev. Respir. Dis* 139:4-7.
78. Hoy, J. F., K. V. Rolston, R. L. Hopfer, e G. P. Bodey. 1987. *Mycobacterium fortuitum* bacteremia in patients with cancer and long-term venous catheters. *Am. J. Med* 83:213-217.
79. Hsueh, P. R., T. R. Hsiue, J. J. Jarn, S. W. Ho, e W. C. Hsieh. 1996. Disseminated infection due to *Mycobacterium scrofulaceum* in an immunocompetent host. *Clin. Infect. Dis* 22:159-161.
80. Huber, J., E. Richter, L. Binder, M. Maass, R. Eberl, e W. Zenz. 2008. *Mycobacterium bohemicum* and cervical lymphadenitis in children. *Emerging Infect. Dis* 14:1158-1159.
81. Huminer, D., S. Dux, Z. Samra, L. Kaufman, A. Lavy, C. S. Block, e S. D. Pitlik. 1993. *Mycobacterium simiae* infection in Israeli patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis* 17:508-509.
82. Iivanainen, E., P. J. Martikainen, P. Väänänen, e M. L. Katila. 1999. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. *J. Appl. Microbiol* 86:673-681.
83. Ingram, C. W., D. C. Tanner, D. T. Durack, G. W. Kernodle Jr, e G. R. Corey. 1993. Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria. *Clin. Infect. Dis* 16:463-471.

84. Jenkins, P. A., e I. A. Campbell. 2003. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium xenopi* in HIV-negative patients: five year follow-up of patients receiving standardised treatment. *Respir Med* 97:439-444.
85. Jernigan, J. A., e B. M. Farr. 2000. Incubation period and sources of exposure for cutaneous *Mycobacterium marinum* infection: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis* 31:439-443.
86. Karakousis, P. C., R. D. Moore, e R. E. Chaisson. 2004. *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet Infect Dis* 4:557-565.
87. Kasai, H., T. Ezaki, e S. Harayama. 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J. Clin. Microbiol* 38:301-308.
88. Kiehn, T. E., e M. White. 1994. *Mycobacterium haemophilum*: An emerging pathogen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:925-931.
89. Kim, B. J., S. H. Lee, M. A. Lyu, S. J. Kim, G. H. Bai, G. T. Chae, E. C. Kim, C. Y. Cha, e Y. H. Kook. 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol* 37:1714-1720.
90. Kim, H.-Y., Y.-J. Yun, C. G. Park, D. H. Lee, Y. K. Cho, B. J. Park, S.-I. Joo, E.-C. Kim, Y. J. Hur, B.-J. Kim, e Y.-H. Kook. 2007. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. *J. Clin. Microbiol* 45:3127-3130.
91. Kim, H., S.-H. Kim, T.-S. Shim, M.-na Kim, G.-H. Bai, Y.-G. Park, S.-H. Lee, C.-Y. Cha, Y.-H. Kook, e B.-J. Kim. 2005. PCR restriction fragment length

- polymorphism analysis (PRA) - algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. J Microbiol Methods 62:199-209.
92. Kim, H., S.-H. Kim, T.-S. Shim, M.-na Kim, G.-H. Bai, Y.-G. Park, S.-H. Lee, G.-T. Chae, C.-Y. Cha, Y.-H. Kook, e B.-J. Kim. 2005. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). Int J Syst Evol Microbiol 55:1649-56.
93. Kim, H.-J., H.-S. Mun, H. Kim, E.-J. Oh, Y. Ha, G.-H. Bai, Y.-G. Park, C.-Y. Cha, Y.-H. Kook, e B.-J. Kim. 2006. Differentiation of Mycobacterial species by *hsp65* duplex PCR followed by duplex-PCR-based restriction analysis and direct sequencing. J Clin Microbiol 44:3855-62.
94. Kirschner, P., B. Springer, U. Vogel, A. Meier, A. Wrede, M. Kiekenbeck, F. C. Bange, e E. C. Böttger. 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J. Clin. Microbiol 31:2882-2889.
95. Kulski, J. K., C. Khinsoe, T. Pryce, e K. Christiansen. 1995. Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. J. Clin. Microbiol 33:668-674.
96. Kuritsky, J. N., M. G. Bullen, C. V. Broome, V. A. Silcox, R. C. Good, e R. J. Wallace Jr. 1983. Sternal wound infections and endocarditis due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex. Ann. Intern. Med 98:938-939.
97. Kusunoki, S., e T. Ezaki. 1992. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus*

- (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol 42:240-245.
98. Lahey, T. 2003. Invasive *Mycobacterium marinum* infections. Emerging Infect. Dis 9:1496-1498.
 99. Leão, S. C., M. R. Briones, M. P. Sircili, S. C. Balian, N. Mores, e J. S. Ferreira-Neto. 1999. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR - restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol 37:2592-2597.
 100. Leão, S. C., A. Bernardelli, A. Cataldi, M. Zumarraga, J. Robledo, T. Realpe, G. I. Mejía, M. A. da Silva Telles, E. Chimara, M. Velazco, J. Fernandez, P. A. Rodrigues, M. I. Guerrero, C. I. León, T. B. Porras, N. Rastogi, K. S. Goh, P. Suffys, A. da Silva Rocha, D. dos Santos Netto, V. Ritacco, B. López, L. Barrera, J. C. Palomino, A. Martin, e F. Portaels. 2005. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. J Microbiol Methods 61:193-9.
 101. Leão, S. C., A. Martin, G. I. Mejía, J. C. Palomino, J. Robledo, F. Portaels, e Telles, Maria Alice da Silva. 2004. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Vanden BROELLE, Brugge.
 102. Leão, S. C., J. L. M. Sampaio, A. Martin, J. C. Palomino, e F. Portaels. 2005. Profiling *Mycobacterium ulcerans* with *hsp65*. Emerging Infect. Dis 11:1795-1796.
 103. Leão, S. C., E. Tortoli, J. P. Euzéby, e M. J. Garcia. 2011. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and

- reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 61:2311-2313.
104. Lebrun, L., F.-X. Weill, L. Lafendi, F. Houriez, F. Casanova, M. C. Gutierrez, D. Ingrand, P. Lagrange, V. Vincent, e J. L. Herrmann. 2005. Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium* - *Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. J. Clin. Microbiol 43:2567-2574.
105. Lee, H., H. J. Park, S. N. Cho, G. H. Bai, e S. J. Kim. 2000. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. J. Clin. Microbiol 38:2966-2971.
106. Lee, H., H.-E. Bang, G.-H. Bai, e S.-N. Cho. 2003. Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. J. Clin. Microbiol 41:2213-2218.
107. Legrand, E., K. S. Goh, C. Sola, e N. Rastogi. 2000. Description of a novel *Mycobacterium simiae* allelic variant isolated from Caribbean AIDS patients by PCR-restriction enzyme analysis and sequencing of *hsp65* gene. Mol. Cell. Probes 14:355-363.
108. LeMense, G. P., A. B. VanBakel, A. J. Crumbley 3rd, e M. A. Judson. 1994. *Mycobacterium scrofulaceum* infection presenting as lung nodules in a heart transplant recipient. Chest 106:1918-1920.
109. Lévy-Frébault, V., B. Pangon, A. Buré, C. Katlama, C. Marche, e H. L. David. 1987. *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium avium* - *M. intracellulare*

- mixed infection in acquired immune deficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol* 25:154-157.
110. Lewis, F. M. T., B. J. Marsh, e C. F. von Reyn. 2003. Fish tank exposure and cutaneous infections due to *Mycobacterium marinum*: tuberculin skin testing, treatment, and prevention. *Clin. Infect. Dis* 37:390-397.
111. Lichtenstein, I. H., e R. R. MacGregor. 1983. Mycobacterial infections in renal transplant recipients: report of five cases and review of the literature. *Rev. Infect. Dis* 5:216-226.
112. Lindeboom, J. A., J. M. Prins, E. S. Bruijnesteijn van Coppenraet, R. Lindeboom, e E. J. Kuijper. 2005. Cervicofacial Lymphadenitis in Children Caused by *Mycobacterium haemophilum*. *Clinical Infectious Diseases* 41:1569-1575.
113. Martin, A., C. Uwizeye, K. Fissette, P. De Rijk, J. C. Palomino, S. Leao, e F. Portaels. 2007. Application of the *hsp65* PRA method for the rapid identification of mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium. *J Microbiol Methods* 71:39-43.
114. Masaki, T., K. Ohkusu, H. Hata, N. Fujiwara, H. Iihara, M. Yamada-Noda, P. H. Nhung, M. Hayashi, Y. Asano, Y. Kawamura, e T. Ezaki. 2006. *Mycobacterium kumamotonense* sp. Nov. recovered from clinical specimen and the first isolation report of *Mycobacterium arupense* in Japan: Novel slowly growing, nonchromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium terrae* complex. *Microbiol. Immunol* 50:889-897.

115. Mayall, B., V. Gurtler, L. Irving, A. Marzec, e D. Leslie. 1999. Identification of *Mycobacterium shimoidei* by molecular techniques: case report and summary of the literature. *Int. J. Tuberc. Lung Dis* 3:169-173.
116. McNabb, A., D. Eisler, K. Adie, M. Amos, M. Rodrigues, G. Stephens, W. A. Black, e J. Isaac-Renton. 2004. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol* 42:3000-11.
117. Mignard, S., e J.-P. Flandrois. 2008. A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 58:1432-1441.
118. Mignard, S., e J.-P. Flandrois. 2007. Identification of *Mycobacterium* using the EF-Tu encoding (*tuf*) gene and the tmRNA encoding (*ssrA*) gene. *J. Med. Microbiol* 56:1033-1041.
119. Mijs, W., P. de Haas, R. Rossau, T. Van der Laan, L. Rigouts, F. Portaels, e D. van Soolingen. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and "*M. avium* subsp. *hominissuis*" for the human/porcine type of *M. avium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1505 - 1518.
120. Mohamed, A. M., P. C. Iwen, S. Tarantolo, e S. H. Hinrichs. 2004. *Mycobacterium nebraskense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 54:2057-2060.

121. Montecalvo, M. A., G. Forester, A. Y. Tsang, G. du Moulin, e G. P. Wormser. 1994. Colonisation of potable water with *Mycobacterium avium* complex in homes of HIV-infected patients. *Lancet* 343:1639.
122. Mun, H.-S., J.-H. Park, H. Kim, H.-K. Yu, Y.-G. Park, C.-Y. Cha, Y.-H. Kook, e B.-J. Kim. 2008. *Mycobacterium senuense* sp. nov., a slowly growing, non-chromogenic species closely related to the *Mycobacterium terrae* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:641-646.
123. Munayco, C. V., C. G. Grijalva, D. R. Culqui, J. L. Bolarte, L. A. Suárez-Ognio, N. Quispe, R. Calderon, L. Ascencios, M. Del Solar, M. Salomón, F. Bravo, e E. Gotuzzo. 2008. Outbreak of persistent cutaneous abscesses due to *Mycobacterium chelonae* after mesotherapy sessions, Lima, Peru. *Rev Saude Publica* 42:146-149.
124. Murcia, M. I., E. Tortoli, M. C. Menendez, E. Palenque, e M. J. Garcia. 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 56:2049-2054.
125. Murillo, J., J. Torres, L. Bofill, A. Ríos-Fabra, E. Irausquin, R. Istúriz, M. Guzmán, J. Castro, L. Rubino, e M. Cordido. 2000. Skin and wound infection by rapidly growing mycobacteria: an unexpected complication of liposuction and liposculpture. The Venezuelan Collaborative Infectious and Tropical Diseases Study Group. *Arch Dermatol* 136:1347-1352.
126. Neonakis, I. K., Z. Gitti, F. Kontos, S. Baritaki, E. Petinaki, M. Baritaki, V. Liakou, L. Zerva, e D. A. Spandidos. 2010. *Mycobacterium arupense*

- pulmonary infection: antibiotic resistance and restriction fragment length polymorphism analysis. *Indian J Med Microbiol* 28:173-176.
127. Nightingale, S. D., L. T. Byrd, P. M. Southern, J. D. Jockusch, S. X. Cal, e B. A. Wynne. 1992. Incidence of *Mycobacterium avium - intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Infect. Dis* 165:1082-1085.
128. Ninet, B., M. Monod, S. Emler, J. Pawlowski, C. Metral, P. Rohner, R. Auckenthaler, e B. Hirschel. 1996. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J. Clin. Microbiol.* 34:2531-2536.
129. Oliveira, R. S., M. P. Sircili, S. Y. Ueki, M. A. Telles, B. Schnabel, M. R. Briones, e S. C. Leão. 2000. PCR-restriction enzyme analysis of a bone marrow isolate from a human immunodeficiency virus-positive patient discloses polyclonal infection with two *Mycobacterium avium* strains. *J. Clin. Microbiol* 38:4643-4645.
130. Pattyn, S. R., J. Vandepitte, F. Portaels, e A. De Muynck. 1971. Cases of *Mycobacterium borstelense* and *M. abscessus* infection observed in Belgium. *J. Med. Microbiol* 4:145-149.
131. Pechère, M., M. Opravil, A. Wald, J. P. Chave, M. Bessesen, A. Sievers, R. Hein, J. von Overbeck, R. A. Clark, e E. Tortoli. 1995. Clinical and epidemiologic features of infection with *Mycobacterium genavense*. Swiss HIV Cohort Study. *Arch. Intern. Med* 155:400-404.
132. Piersimoni, C., G. Goteri, D. Nista, A. Mariottini, G. Mazzealli, e S. Bornigia. 2004. *Mycobacterium lentiflavum* as an emerging causative agent of cervical lymphadenitis. *J. Clin. Microbiol* 42:3894-3897.

133. Piersimoni, C., e C. Scarparo. 2008. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *The Lancet Infectious Diseases* 8:323-334.
134. Pinner, M. Atypical acid-fast microorganisms. III. Chromogenic acid-fast bacilli from human beings. IV. Smooth growing tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.* 32:424-445.
135. Portaels, F. 1995. Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin. Dermatol* 13:207-222.
136. Portaels, F., M. T. Silva, e W. M. Meyers. 2009. Buruli ulcer. *Clin. Dermatol* 27:291-305.
137. Pourahmad, F., K. D. Thompson, A. Adams, e R. H. Richards. 2009. Comparative evaluation of Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis (PRA) and sequencing of heat shock protein 65 (*hsp65*) gene for identification of aquatic mycobacteria. *J Microbiol Methods* 76:128-35.
138. Rastogi, N., E. Legrand, e C. Sola. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. - Off. Int. Epizoot* 20:21-54.
139. Reischl, U., K. Feldmann, L. Naumann, B. J. M. Gaugler, B. Ninet, B. Hirschel, e S. Emler. 1998. 16S rRNA Sequence Diversity in *Mycobacterium celatum* Strains Caused by Presence of Two Different Copies of 16S rRNA Gene. *J. Clin. Microbiol.* 36:1761-1764.
140. Reischl, U., H. Melzl, R. M. Kroppenstedt, T. Miethke, L. Naumann, A. Mariottini, G. Mazzarelli, e E. Tortoli. 2006. *Mycobacterium monacense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 56:2575-2578.

141. Rhodes, M. W., H. Kator, A. McNabb, C. Deshayes, J.-M. Reyrat, B. A. Brown-Elliott, R. Wallace, K. A. Trott, J. M. Parker, B. Lifland, G. Osterhout, I. Kaattari, K. Reece, W. Vogelbein, e C. A. Ottinger. 2005. *Mycobacterium pseudoshottsii* sp. nov., a slowly growing chromogenic species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 55:1139-1147.
142. Ridderhof, J. C., R. J. Wallace Jr, J. O. Kilburn, W. R. Butler, N. G. Warren, M. Tsukamura, L. C. Steele, e E. S. Wong. 1991. Chronic tenosynovitis of the hand due to *Mycobacterium nonchromogenicum*: use of high-performance liquid chromatography for identification of isolates. *Rev. Infect. Dis* 13:857-864.
143. Ries, K. M., G. L. White Jr, e R. T. Murdock. 1990. Atypical mycobacterial infection caused by *Mycobacterium marinum*. *N. Engl. J. Med* 322:633.
144. Ringuet, H., C. Akoua-Koffi, S. Honore, A. Varnerot, V. Vincent, P. Berche, J. L. Gaillard, e C. Pierre-Audigier. 1999. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 37:852-7.
145. Rivera-Olivero, I. A., A. Guevara, A. Escalona, M. Oliver, R. Pérez-Alfonzo, J. Piquero, O. Zerpa, e J. H. de Waard. 2006. Soft-tissue infections due to non-tuberculous mycobacteria following mesotherapy. What is the price of beauty. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin* 24:302-306.
146. Robicsek, F., P. C. Hoffman, T. N. Masters, H. K. Daugherty, J. W. Cook, J. G. Selle, C. U. Mauney, e P. Hinson. 1988. Rapidly growing nontuberculous mycobacteria: a new enemy of the cardiac surgeon. *Ann. Thorac. Surg* 46:703-710.
147. Rodriguez-Barradas, M. C., J. Clarridge, e R. Darouiche. 1992. Disseminated *Mycobacterium fortuitum* disease in an AIDS patient. *Am. J. Med* 93:473-474.

148. Rogall, T., T. Flohr, e E. C. Böttger. 1990. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J. Gen. Microbiol* 136:1915-1920.
149. Rogall, T., J. Wolters, T. Flohr, e E. C. Böttger. 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 40:323-330.
150. Roth, A., M. Fischer, M. E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig, e H. Mauch. 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S *rRNA* gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* 36:139-47.
151. Runyon, E. H. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North Am* 43:273-290.
152. Rusconi, S., A. Gori, L. Vago, G. Marchetti, e F. Franzetti. 1997. Cutaneous infection caused by *Mycobacterium gordonae* in a human immunodeficiency virus-infected patient receiving antimycobacterial treatment. *Clin. Infect. Dis* 25:1490-1491.
153. Safraneck, T. J., W. R. Jarvis, L. A. Carson, L. B. Cusick, L. A. Bland, J. M. Swenson, e V. A. Silcox. 1987. *Mycobacterium chelonae* wound infections after plastic surgery employing contaminated gentian violet skin-marking solution. *N. Engl. J. Med* 317:197-201.
154. Sahraoui, N., M. Ballif, S. Zelleg, N. Yousfi, C. Ritter, U. Friedel, B. Amstutz, D. Yala, F. Boulahbal, D. Guetarni, J. Zinsstag, e P. M. Keller. 2011. *Mycobacterium algericum* sp. nov., a novel rapidly growing species related to the *Mycobacterium terrae* complex and associated with goat lung lesions.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61:1870 - 1874.
155. Saito, H., H. Tomioka, K. Sato, H. Tasaka, e S. Dekio. 1994. *Mycobacterium malmoense* isolated from soil. Microbiol. Immunol 38:313-315.
156. Sajduda, A., A. Martin, F. Portaels, e J. C. Palomino. 2010. *hsp65* PCR-restriction analysis (PRA) with capillary electrophoresis in comparison to three other methods for identification of *Mycobacterium* species. Journal of Microbiological Methods 80:190-197.
157. Sampaio, J. L. M., D. N. Junior, D. de Freitas, A. L. Hofling-Lima, K. Miyashiro, F. L. Alberto, e S. C. Leao. 2006. An Outbreak of Keratitis Caused by *Mycobacterium immunogenum*. J. Clin. Microbiol. 44:3201-3207.
158. Samra, Z., L. Kaufmann, A. Zeharia, S. Ashkenazi, J. Amir, J. Bahar, U. Reischl, e L. Naumann. 1999. Optimal detection and identification of *Mycobacterium haemophilum* in specimens from pediatric patients with cervical lymphadenopathy. J. Clin. Microbiol 37:832-834.
159. Sanders, J. W., A. D. Walsh, R. L. Snider, e E. E. Sahn. 1995. Disseminated *Mycobacterium scrofulaceum* infection: a potentially treatable complication of AIDS. Clin. Infect. Dis 20:549.
160. Schinsky, M. F., M. M. McNeil, A. M. Whitney, A. G. Steigerwalt, B. A. Lasker, M. M. Floyd, G. G. Hogg, D. J. Brenner, e J. M. Brown. 2000. *Mycobacterium septicum* sp. nov., a new rapidly growing species associated with catheter-related bacteraemia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 50 Pt 2:575-581.
161. Schinsky, M. F., R. E. Morey, A. G. Steigerwalt, M. P. Douglas, R. W. Wilson, M. M. Floyd, W. R. Butler, M. I. Daneshvar, B. A. Brown-Elliott, R. J. Wallace,

- M. M. McNeil, D. J. Brenner, e J. M. Brown. 2004. Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 54:1653-1667.
162. SCHRODER, K. H., e I. JUHLIN. 1977. *Mycobacterium malmoense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 27:241-246.
163. Selvarangan, R., W.-K. Wu, T. T. Nguyen, L. D. C. Carlson, C. K. Wallis, S. K. Stiglich, Y.-C. Chen, K. C. Jost Jr, J. L. Prentice, R. J. Wallace Jr, S. L. R. Barrett, B. T. Cookson, e M. B. Coyle. 2004. Characterization of a novel group of mycobacteria and proposal of *Mycobacterium sherrisii* sp. nov. *J. Clin. Microbiol* 42:52-59.
164. Shafer, R. W., e M. F. Sierra. 1992. *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, and other nontuberculous mycobacteria in an area of endemicity for AIDS. *Clin. Infect. Dis* 15:161-162.
165. Shah, M. K., A. Sebti, T. E. Kiehn, S. A. Massarella, e K. A. Sepkowitz. 2001. *Mycobacterium haemophilum* in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis* 33:330-337.
166. Shinnick, T. M., e R. C. Good. 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:884-901.
167. Skogberg, K., P. Ruutu, P. Tukiainen, e V. V. Valtonen. 1995. Nontuberculous mycobacterial infection in HIV-negative patients receiving immunosuppressive therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 14:755-763.

168. Smole, S. C., F. McAleese, J. Ngampasutadol, C. F. Von Reyn, e R. D. Arbeit. 2002. Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by restriction and sequence analysis of *hsp65*. J Clin Microbiol 40:3374-80.
169. Soini, H., E. C. Böttger, e M. K. Viljanen. 1994. Identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene. J. Clin. Microbiol 32:2944-2947.
170. Sompolinsky, D., A. Lagziel, D. Naveh, e T. Yankilevitz. 1978. *Mycobacterium haemophilum* sp. nov., a New Pathogen of Humans. Int J Syst Bacteriol 28:67-75.
171. Spach, D. H., F. E. Silverstein, e W. E. Stamm. 1993. Transmission of Infection by Gastrointestinal Endoscopy and Bronchoscopy. Annals of Internal Medicine 118:117 -128.
172. Springer, B., E. Tortoli, I. Richter, R. Grünewald, S. Rüscher-Gerdes, K. Uschmann, F. Suter, M. D. Collins, R. M. Kroppenstedt, e E. C. Böttger. 1995. *Mycobacterium conspicuum* sp. nov., a new species isolated from patients with disseminated infections. J. Clin. Microbiol 33:2805-2811.
173. Springer, B., E. C. Böttger, P. Kirschner, e R. J. Wallace. 1995. Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae* -Like Organism Based on Partial Sequencing of the 16S rRNA Gene and Proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 45:262-267.
174. Stahl, D. A., e J. W. Urbance. 1990. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. J. Bacteriol. 172:116-124.

175. Stone, A. C., A. K. Wilbur, J. E. Buikstra, e C. A. Roberts. 2009. Tuberculosis and leprosy in perspective. *Am. J. Phys. Anthropol* 140 Suppl 49:66-94.
176. Swanson, D. S., V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, R. Frothingham, e J. M. Musser. 1997. Subspecific differentiation of *Mycobacterium avium* complex strains by automated sequencing of a region of the gene (*hsp65*) encoding a 65-kilodalton heat shock protein. *Int. J. Syst. Bacteriol* 47:414-419.
177. Takewaki, S.-I., K. Okuzumo, I. Manabe, M. Tanimura, K. Miyamura, K.-I. Nakahara, Y. Yazaki, A. Ohkubo, e R. Nagai. 1994. Nucleotide Sequence Comparison of the Mycobacterial *dnaJ* Gene and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacterial Species. *Int J Syst Bacteriol* 44:159-166.
178. Taylor, T. B., C. Patterson, Y. Hale, e W. W. Safranek. 1997. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* 35:79-85.
179. Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Böttger, e T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31:175-8.
180. Thorel, M. F., M. Krichevsky, e V. V. Lévy-Frébault. 1990. 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. *Int. J. Syst. Bacteriol* 40:254-260.

181. Tortoli, E. 2009. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin. Microbiol. Infect* 15:906-910.
182. Tortoli, E., e M. T. Simonetti. 1991. Isolation of *Mycobacterium shimoidei* from a patient with cavitary pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol* 29:1754-1756.
183. Tortoli, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16:319-54.
184. Tortoli, E. Standard operating procedure for optimal identification of mycobacteria using 16S rRNA gene sequences. *Stand Genomic Sci* 3:145-152.
185. Tortoli, E., R. Gabini, I. Galanti, e A. Mariottini. 2008. Lethal *Mycobacterium massiliense* Sepsis, Italy. *Emerg Infect Dis* 14:984-985.
186. Tortoli, E., L. Rindi, M. J. Garcia, P. Chiaradonna, R. Dei, C. Garzelli, R. M. Kroppenstedt, N. Lari, R. Mattei, A. Mariottini, G. Mazzarelli, M. I. Murcia, A. Nanetti, P. Piccoli, e C. Scarparo. 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 54:1277-1285.
187. Tortoli, E., L. Rindi, K. S. Goh, M. L. Katila, A. Mariottini, R. Mattei, G. Mazzarelli, S. Suomalainen, P. Torkko, e N. Rastogi. 2005. *Mycobacterium florentinum* sp. nov., isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1101-1106.
188. Toy, B. R., e P. J. Frank. 2003. Outbreak of *Mycobacterium abscessus* infection after soft tissue augmentation. *Dermatol Surg* 29:971-973.
189. Tsukamura, M., H. Shimoide, e W. B. Shaefer. 1975. A possible new pathogen of group iii Mycobacteria. *J. Gen. Microbiol* 88:377-380.

190. Tsukamura, M., H. Nemoto, e H. Yugi. 1983. *Mycobacterium porcinum* sp. nov., a Porcine Pathogen. *Int J Syst Bacteriol* 33:162-165.
191. Turenne, C. Y., V. J. Cook, T. V. Burdz, R. J. Pauls, L. Thibert, J. N. Wolfe, e A. Kabani. 2004. *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium simiae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 54:1543-1551.
192. Turenne, C. Y., L. Tschetter, J. Wolfe, e A. Kabani. 2001. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol* 39:3637-3648.
193. Turenne, C., P. Chedore, J. Wolfe, F. Jamieson, K. May, e A. Kabani. 2002. Phenotypic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of *Mycobacterium elephantis* from Human Specimens. *J Clin Microbiol* 40:1230-1236.
194. van Ingen, J., M. J. Boeree, K. Kösters, A. Wieland, E. Tortoli, P. N. R. Dekhuijzen, e D. van Soolingen. 2009. Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 59:2277-2282.
195. Vandercam, B., J. L. Gala, J. Gerain, J. Degraux, A. Bourlond, B. Colebunders, C. Pirard, e F. Portaels. 1998. About two cases of *Mycobacterium simiae* infection in AIDS: review of the pathogenicity. *Acta Clin Belg* 53:206-212.
196. Vaneechoutte, M., H. De Beenhouwer, G. Claeys, G. Verschraegen, A. De Rouck, N. Paepe, A. Elaichouni, e F. Portaels. 1993. Identification of *Mycobacterium* species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol* 31:2061-2065.

197. Viana-Niero, C., K. V. B. Lima, M. L. Lopes, M. C. da S. Rabello, L. R. Marsola, V. C. R. Brilhante, A. M. Durham, e S. C. Leão. 2008. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *J. Clin. Microbiol* 46:850-855.
198. Villanueva, A., R. V. Calderon, B. A. Vargas, F. Ruiz, S. Aguero, Y. Zhang, B. A. Brown, e J. Wallace. 1997. Report on an Outbreak of Postinjection Abscesses Due to *Mycobacterium abscessus*, Including Management with Surgery and Clarithromycin Therapy and Comparison of Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction. *Clinical Infectious Diseases* 24:1147-1153.
199. von Reyn, C. F., J. N. Maslow, T. W. Barber, J. O. Falkinham 3rd, e R. D. Arbeit. 1994. Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 343:1137-1141.
200. Vuorenmaa, K., I. Ben Salah, V. Barlogis, H. Chambost, e M. Drancourt. 2009. *Mycobacterium colombiense* and pseudotuberculous lymphadenopathy. *Emerging Infect. Dis* 15:619-620.
201. Wallace, R. J., Jr, B. A. Brown, e G. O. Onyi. 1992. Skin, soft tissue, and bone infections due to *Mycobacterium chelonae chelonae*: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. *J. Infect. Dis* 166:405-412.
202. Wallace, R. J., Jr, J. M. Musser, S. I. Hull, V. A. Silcox, L. C. Steele, G. D. Forrester, A. Labidi, e R. K. Selander. 1989. Diversity and sources of rapidly

- growing mycobacteria associated with infections following cardiac surgery. *J. Infect. Dis* 159:708-716.
203. Wallace, R. J., Jr, D. R. Nash, M. Tsukamura, Z. M. Blacklock, e V. A. Silcox. 1988. Human disease due to *Mycobacterium smegmatis*. *J. Infect. Dis* 158:52-59.
204. Wallace, R. J., Jr, J. M. Swenson, V. A. Silcox, R. C. Good, J. A. Tschen, e M. S. Stone. 1983. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev. Infect. Dis* 5:657-679.
205. Walsh, D. S., E. C. Dela Cruz, R. M. Abalos, E. V. Tan, G. P. Walsh, F. Portaels, e W. M. Meyers. 2007. Clinical and histologic features of skin lesions in a cynomolgus monkey experimentally infected with *Mycobacterium ulcerans* (Buruli ulcer) by intradermal inoculation. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 76:132-134.
206. Walsh, D. S., F. Portaels, e W. M. Meyers. 2008. Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 102:969-978.
207. Weinberger, M., S. L. Berg, I. M. Feuerstein, P. A. Pizzo, e F. G. Witebsky. 1992. Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case and critical review of the literature. *Clin. Infect. Dis* 14:1229-1239.
208. Weiszfeiler, G., V. Karasseva, e E. Karczag. 1971. A new *Mycobacterium* species: *Mycobacterium asiaticum* n. sp. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 18:247-252.
209. Wendt, S. L., K. L. George, B. C. Parker, H. Gruft, e J. O. Falkinham 3rd. 1980. Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria. III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. *Am. Rev. Respir. Dis* 122:259-263.

210. Whipps, C. M., W. R. Butler, F. Pourahmad, V. G. Watral, e M. L. Kent. 2007. Molecular systematics support the revival of *Mycobacterium salmoniphilum* (ex Ross 1960) sp. nov., nom. rev., a species closely related to *Mycobacterium chelonae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 57:2525-2531.
211. White, D. A., T. E. Kiehn, A. Y. Bondoc, e S. A. Massarella. 1999. Pulmonary nodule due to *Mycobacterium haemophilum* in an immunocompetent host. Am. J. Respir. Crit. Care Med 160:1366-1368.
212. Williams, K. J., C. L. Ling, C. Jenkins, S. H. Gillespie, e T. D. McHugh. 2007. A paradigm for the molecular identification of *Mycobacterium* species in a routine diagnostic laboratory. J. Med. Microbiol. 56:598-602.
213. Wolinsky, E. 1995. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. Clin. Infect. Dis 20:954-963.
214. Wolinsky, E. 1979. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am. Rev. Respir. Dis 119:107-159.
215. Wolinsky, E., F. Gomez, e F. Zimpfer. 1972. Sporotrichoid *Mycobacterium marinum* infection treated with rifampin-ethambutol. Am. Rev. Respir. Dis 105:964-967.
216. World Health Organization. 2004. Laboratory Biosafety Manual, 3rd ed. World Health Organization, Geneve.
217. Yamada-Noda, M., K. Ohkusu, H. Hata, M. M. Shah, P. H. Nhung, X. S. Sun, M. Hayashi, e T. Ezaki. 2007. *Mycobacterium* species identification--a new approach via *dnaJ* gene sequencing. Syst. Appl. Microbiol 30:453-462.

218. Yamamoto, S., P. J. Bouvet, e S. Harayama. 1999. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol* 49 Pt 1:87-95.
219. Yamamoto, S., e S. Harayama. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol* 61:1104-1109.
220. Yamamoto, S., e S. Harayama. 1996. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int. J. Syst. Bacteriol* 46:506-511.
221. Zaugg, M., M. Salfinger, M. Opravil, e R. Lüthy. 1993. Extrapulmonary and disseminated infections due to *Mycobacterium malmoense*: case report and review. *Clin. Infect. Dis* 16:540-549.
222. Zhibang, Y., Z. BiXia, L. Qishan, C. Lihao, L. Xiangquan, e L. Huaping. 2002. Large-Scale Outbreak of Infection with *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* after Penicillin Injection. *J Clin Microbiol* 40:2626-2628.
223. Zolg, J. W., e S. Philippi-Schulz. 1994. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *J. Clin. Microbiol* 32:2801-2812.

ANEXOS

Anexo I: Classificação das espécies de MNT de acordo com o risco de infecção

Tabela 10. Classificação das espécies MNT de acordo com o risco de infecção em seres humanos (Grupos de Risco I e II).

Grupo de Risco I		Grupo de Risco II	
<i>M. agri</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. lentiflavum</i>
<i>M. aichiense</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. lepraemurium</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. murale</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. malmoense</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. boenickei</i>	<i>M. marinum</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. monacense</i>
<i>M. bohemicum</i>	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. brisbanense</i>	<i>M. montefiorensis</i>
<i>M. botniense</i>	<i>M. parmense</i>	<i>M. canariensis</i>	<i>M. mucogenicum</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. neworleansense</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
<i>M. chlorophenicum</i>	<i>M. poriferae</i>	<i>M. chimaera</i>	<i>M. novocastrense</i>
<i>M. chubuense</i>	<i>M. psychrotolerans</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. palustre</i>
<i>M. confluentis</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. elephantis</i>	<i>M. parascrofulaceum</i>
<i>M. cookii</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. paratuberculosis</i>
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. sphagni</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. porcinum</i>
<i>M. doricum</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. saskatchewanense</i>
<i>M. duvalii</i>	<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. gastris</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. fallax</i>	<i>M. tokaiense</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. senegalense</i>
<i>M. frederiksbergense</i>	<i>M. triviale</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. septicum</i>
<i>M. gadium</i>	<i>M. tusciae</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. shimoidei</i>
<i>M. gilvum</i>	<i>M. vanbaalenii</i>	<i>M. heckeshornense</i>	<i>M. shottsii</i>
<i>M. gordonae</i>		<i>M. heidelbergense</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. hassiacum</i>		<i>M. houstonense</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. hiberniae</i>		<i>M. immunogenum</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. hodleri</i>		<i>M. interjectum</i>	<i>M. triplex</i>
<i>M. holsaticum</i>		<i>M. intermedium</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. komossense</i>		<i>M. intracellulare</i>	<i>M. wolinskyi</i>
<i>M. lacus</i>		<i>M. kansasii</i>	<i>M. xenopi</i>
<i>M. madagascariense</i>		<i>M. kubicae</i>	

Tabela 11. Espécies MNT que ainda não foram classificadas (2011).

<i>M. algericum</i>	<i>M. nebraskense</i>
<i>M. aromaticivorans</i>	<i>M. noviomagense</i>
<i>M. arosiense</i>	<i>M. pallens</i>
<i>M. arupense</i>	<i>M. phocaicum</i>
<i>M. aubagnense</i>	<i>M. pseudoshottsii</i>
<i>M. bolletii</i>	<i>M. pyrenivorans</i>
<i>M. colombiense</i>	<i>M. riadhense</i>
<i>M. conceptionense</i>	<i>M. rufum</i>
<i>M. cosmeticum</i>	<i>M. rutilum</i>
<i>M. crocinum</i>	<i>M. salmoniphilum</i>
<i>M. europaeum</i>	<i>M. senuense</i>
<i>M. florentinum</i>	<i>M. seoulense</i>
<i>M. fluoranthenvivorans</i>	<i>M. setense</i>
<i>M. insubricum</i>	<i>M. sherrisii</i>
<i>M. kumamotonense</i>	<i>M. shinjukuense</i>
<i>M. kyorinense</i>	<i>M. stomatepieae</i>
<i>M. llatzerense</i>	<i>M. vulneris</i>
<i>M. massiliense</i>	

Tabela 12. Espécies de *Mycobacterium* pertencentes ao grupo de risco III

Grupo de Risco III
<i>M. bovis</i>
<i>M. leprae</i>
<i>M. microti</i>
<i>M. pinnipedii</i>
<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. ulcerans</i>

Anexo II – Características fenotípicas das estirpes estudadas

Tabela 13. Propriedades das estirpes de *Mycobacterium*.

ID	Relações térmicas			Cresc. + 7 dias	Pigmento		Class. Runyon
	30°C	37°C	42°C		Obsc.	Lum.	
E1	-	+	-	+	-	-	CLN
E2	+	+	-	-	-	-	CRN
E3	+	+	+	-	-	-	CRN
E4	+	+	-	+	+	+	CLE
E5	-	+	-	+	-	-	CLN
E6	-	+	-	+	-	-	CLN
E7	+	+	-	+	+	+	CLE
E8	+	+	+	-	-	-	CRN
E9	+	+	-	-	-	-	CRN
E10	+	+	+	+	-	-	CLN
E11	+	+	+	+	-	-	CLN
E12	+	+	-	-	-	-	CRN
E13	+	+	-	-	-	-	CRN
E14	-	+	+	+	-	-	CLN
E15	+	+	-	-	-	-	CRN
E16	+	+	-	+	+	+	CLE
E17	+	+	-	+	+	+	CLE
E18	+	+	-	+	+	+	CLE
E19	+	+	-	+	+	+	CLE
E20	+	+	+	-	-	-	CRN
E21	+	+	+	-	-	-	CRN
E22	+	+/-	-	+	+	+	CLE
E23	+	+	-	+	-	-	CLN
E24	-	+	-	+	-	-	CLN
E25	+	+	-	+	+	+	CLE
E26	+	+	+	-	-	-	CRN
E27	+	+	+	-	+	+	CRE
E28	+	+	-	+	+	+	CLE
E29	+	+	-	+	+	+	CLE
E30	+	+	-	+	+	+	CLE

Tabela 13. Propriedades das estirpes de *Mycobacterium* (Continuação).

ID	Relações térmicas			Cresc. + 7 dias	Pigmento		Class. Runyon
	30°C	37°C	42°C		Obsc.	Lum.	
E31	-	+	-	+	-	-	CLN
E32	+	+	-	-	-	-	CRN
E33	+	+	-	-	+	+	CRE
E34	+	+	-	-	-	-	CRN
E35	+	+	-	+	+	+	CLE
E36	+	+	-	+	-	-	CLN
E37	+	+	-	-	-	-	CRN
E38	+	+	-	-	-	-	CRN
E39	+	+	-	+	+	+	CLE
E40	+	+	+	-	-	-	CRN
E41	-	+	-	+	-	-	CLN
E42	+	+	-	+	+	+	CLE
E43	-	+	-	+	-	-	CLN
E44	-	+	-	+	-	-	CLN
E45	-	+	-	+	-	-	CLN
E46	-	+	-	+	-	-	CLN
E47	-	+	-	+	-	-	CLN
E48	-	+	-	+	-	-	CLN
E49	+	-	-	+	-	+	CLF
E50	+	+	-	-	-	-	CRN
E51	+	+	-	-	-	-	CRN
E52	+	+	-	+	+	+	CLE
E53	-	+	-	+	-	-	CLN
E54	+	+	+	-	-	-	CRN

Legenda: ID: identificação da estirpes; + resultado positivo; - resultado negativo; CLE (Crescimento Lento Escotocromogénica); CLF (Crescimento Lento Fotocromogénica); CLN (Crescimento Lento Não-cromogénica); CRE (Crescimento Rápido Escotocromogénica); CRN (Crescimento Rápido Não-cromogénica).

Anexo III – Algoritmo dos padrões PRA-*hsp65*

BstEII	HaeIII		Espécie	Tipo	Class. Runyon			
440	195	90	60	<i>M. confluentis</i>	1	CRN		
	180	145		<i>M. gilvum</i>	1	CRE		
	175	90	60	<i>M. gadium</i>	1	CRE		
	175	90		<i>M. tusciae</i>	1	CLE		
	170	130		<i>M. triviale</i>	1	CLN		
	160	90	60	<i>M. vaccae</i>	1	CRE		
	160	85	55	<i>M. flavescens</i>	3	CRE		
	145	130		<i>M. florentinum</i>	1	CLN		
	145	130		<i>M. lentiflavum</i>	1	CLE		
	145	130		<i>M. simiae</i>	5	CLF		
	145	90	60	50	<i>M. komossense</i>	1	CRE	
	145	90	60		<i>M. parafortuitum</i>	1	CRE	
	145	70	60	55	<i>M. brumae</i>	1	CRN	
	140	100	60	50	<i>M. holsaticum</i>	1	CRE/CRN	
	140	60	50		<i>M. novocastrense</i>	1	CRF	
	140	55	50		<i>M. flavescens</i>	1	CRE	
	135	130	65		<i>M. duvalii</i>	1	CRE	
	130	115	70	60	<i>M. aurum</i>	2	CRE	
	130	105	70		<i>M. szulgai</i>	1	CLE	
	125	105	60		<i>M. nebraskense</i>	1	CLE	
320	130	265	130		<i>M. leprae</i>	1		
		200	70	60	55	<i>M. immunogenum</i>	2	CRN
		200	60	55	50	<i>M. chelonae</i>	1	CRN
		160	110			<i>M. haemophilum</i>	1	CLN
		145	70	60	55	<i>M. immunogenum</i>	1	CRN
		140	130	50		<i>M. elephantis</i>	1	CRE
		140	95	80		<i>M. cosmeticum</i>	1	CRE
		140	90	80		<i>M. canariasense</i>	1	CRN
		140	65	60		<i>M. mucogenicum</i>	1	CRN
		130	115	60	50	<i>M. botniense</i>	1	CLE
		125	95	80		<i>M. lacus</i>	1	CLN

Figura 7. Algoritmo dos padrões PRA-*hsp65* baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene *hsp65*. Padrões BstEII: 440 pb; 320/130 pb.

Coluna 1 e 2: tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição BstEII e HaeIII. Coluna 3: nome da espécie de Mycobacterium. Coluna 4: tipo de padrão PRA-*hsp65*. Coluna 5: CLE-Crescimento Lento Escotocromogénica; CLF-Crescimento Lento Fotocromogénica; CLN-Crescimento Lento Não-cromogénica; CRE-Crescimento Rápido Escotocromogénica; CRN-Crescimento Rápido Não-cromogénica. (Adaptado de³⁵).

BstEII	HaeIII			Espécie	Tipo	Class. Runyon			
	245	140		<i>M. fluoranthenvorans</i>	1	CRN			
	195	70	60	<i>M. aichiense</i>	1	CRE			
	185	145		<i>M. fallax</i>	1	CRN			
	185	140		<i>M. terrae</i>	2	CLN			
	180	160	55	<i>M. frederiksbergense</i>	1	CRE			
	180	130		<i>M. terrae</i>	1	CLN			
	175	90	60	<i>M. sphagni</i>	1	CRN			
	170	140		<i>M. neoaurum</i>	1	CRE			
	170	140		<i>M. parafortuitum</i>	2	CRN			
	160	125	60	<i>M. rhodesiae</i>	1	CRE			
	145	140	60	<i>M. diernhoferi</i>	1	CRE			
	145	130	60	<i>M. montefiorensis</i>	1	CLN			
	145	130	50	<i>M. triplex</i>	1	CLN			
	145	130		<i>M. cookii</i>	1	CLE			
320	145	130		<i>M. lentiflavum</i>	2	CLE			
115	145	130		<i>M. simiae</i>	4	CLF			
	145	80	60	<i>M. aubagnense</i>	1	CRN			
	145	65	60	<i>M. mucogenicum</i>	2	CRN			
	145	65	60	<i>M. phocaicum</i>	1	CRN			
	145	60	50	<i>M. arupense</i>	1	CLN			
	140	135	50	<i>M. pulveris</i>	1	CRN			
	140	90	60	<i>M. chitae</i>	1	CRN			
	140	90	60	<i>M. mucogenicum</i>	3	CRN			
	140	90	60	<i>M. nonchromogenicum</i>	2	CLN			
	140	60	50	<i>M. terrae</i>	3	CLN			
	130	115	60	<i>M. gordonae</i>	4	CLE			
	130	110	70	<i>M. gordonae</i>	8	CLE			
	130	110	70	<i>M. kumamotoense</i>	1	CLN			
	130	95	75	<i>M. kansasii</i>	5	CLF			
	125	105		<i>M. genavense</i>	1	CLN			
240	120	100	130	70	45	10	<i>M. noviomagense</i>	1	CLN

Figura 8. Algoritmo dos padrões PRA-*hsp65* baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene *hsp65*. Padrões BstEII: 320/115 pb; 240/120/100 pb.

Coluna 1 e 2: tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição BstEII e HaeIII. Coluna 3: nome da espécie de *Mycobacterium*. Coluna 4: tipo de padrão PRA-*hsp65*. Coluna 5: CLE-Crescimento Lento Escotocromogénica; CLF-Crescimento Lento Fotocromogénica; CLN-Crescimento Lento Não-cromogénica; CRE-Crescimento Rápido Escotocromogénica; CRN-Crescimento Rápido Não-cromogénica. (Adaptado de³⁵).

BstEII	HaeIII		Espécie	Tipo	Class. Runyon		
	225	110	<i>M. shottsii</i>	1	CLN		
	200	90	60	<i>M. moriokaense</i>	1	CRN	
	200	70	60	50	<i>M. abscessus</i>	2	CRN
	200	70	60	50	<i>M. bolletii</i>	1	CRN
	200	70	60	50	<i>M. massiliense</i>	1	CRN
	190	105	80	<i>M. ulcerans</i>	2	CLN/CLE	
	185	130	<i>M. genavense</i>	2	CLN		
	185	130	<i>M. simiae</i>	1	CLF		
	180	135	70	50	<i>M. thermoresistibile</i>	1	CRE
	180	100	50	<i>M. hassiacum</i>	1	CRE	
	160	95	50	<i>M. poriferae</i>	1	CRE	
	160	60	50	<i>M. austroafricanum</i>	1	CRE	
	160	60	50	<i>M. vanbaalenii</i>	1	CRE	
	155	140	<i>M. simiae</i>	2	CLF		
	145	140	100	50	<i>M. peregrinum</i>	1	CRN
	145	140	75	<i>M. parascrofulaceum</i>	5	CLE	
	145	130	95	<i>M. scrofulaceum</i>	1	CLE	
	145	130	60	<i>M. parmense</i>	1	CLE	
	145	130	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	3	CLN		
	145	130	<i>M. interjectum</i>	1	CLE		
235	210				<i>M. intermedium</i>	1	CLF
					<i>M. intracellulare</i>	3	CLN
					<i>M. saskatchewanense</i>	1	CLE
					<i>M. seoulense</i>	1	CLE
					<i>M. simiae</i>	6	CLF
					<i>M. pseudoshottsii</i>	1	CLF
					<i>M. malmoense</i>	2	CLN
					<i>M. marinum</i>	1	CLF
					<i>M. ulcerans</i>	1	CLN/CLE
					<i>M. bohemicum</i>	1	CLE
					<i>M. abscessus</i>	1	CRN
					<i>M. peregrinum</i>	2	CRN
					<i>M. porcinum</i>	1	CRN
					<i>M. septicum</i>	1	CRN
					<i>M. boenickei</i>	1	CRN
					<i>M. senegalense</i>	3	CRE
					<i>M. terrae</i>	4	CLN
					<i>M. intracellulare</i>	2	CLN
					<i>M. kubicae</i>	1	CLE
					<i>M. chlorophenolicum</i>	1	CRE
					<i>M. chubuense</i>	1	CRE
					<i>M. conspicuum</i>	1	CLE

Figura 9. Algoritmo dos padrões PRA-*hsp65* baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene *hsp65*. Padrões BstEII: 235/210 pb.

Coluna 1 e 2: tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição BstEII e HaeIII. Coluna 3: nome da espécie de Mycobacterium. Coluna 4: tipo de padrão PRA-*hsp65*. Coluna 5: CLE-Crescimento Lento Escotocromogénica; CLF-Crescimento Lento Fotocromogénica; CLN-Crescimento Lento Não-cromogénica; CRE-Crescimento Rápido Escotocromogénica; CRN-Crescimento Rápido Não-cromogénica. (Adaptado de³⁵).

BstEII		HaeIII		Espécie	Tipo	Class. Runyon					
235	210	140	90	60	<i>M. obuense</i>	1	CRE				
		140	80	60	50	<i>M. phlei</i>	1	CRE			
		130	115			<i>M. gordonae</i>	5	CLE			
		130	115			<i>M. heidelbergense</i>	1	CLN			
		130	115			<i>M. interjectum</i>	2	CLE			
		130	105	80	60	<i>M. branderi</i>	1	CLN			
		130	105	80		<i>M. kansasii</i>	1	CLF			
		130	105	60		<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	2	CLN			
		130	105	60		<i>M. colombiense</i>	1	CLN			
		130	105			<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	1	CLN			
		130	105			<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	1	CLN			
		130	105			<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	1	CLN			
		130	95	80		<i>M. parascrofulaceum</i>	3	CLE			
		130	95			<i>M. palustre</i>	1	CLE			
		130	80	60		<i>M. celatum</i>	1	CLN/CLE			
		120	115	110		<i>M. intracellulare</i>	4	CLN			
		115	105			<i>M. asiaticum</i>	1	CLF			
		235	130	85		180	160		<i>M. doricum</i>	1	CLE
						175	80		<i>M. aurum</i>	1	CRE
						160	145	60		<i>M. agri</i>	1
	160				90	60		<i>M. monacense</i>	1	CRE	
	145				140	100	60	<i>M. peregrinum</i>	3	CRN	
	145				130			<i>M. simiae</i>	3	CLF	
	145				125	60		<i>M. goodii</i>	1	CRN	
	145				125	60		<i>M. mageritense</i>	1	CRN	
	145				125	60		<i>M. smegmatis</i>	1	CRN	
	145				100	50		<i>M. alvei</i>	1	CRN	
	145				80	60		<i>M. murale</i>	1	CRN	
	140				125	60	50	<i>M. senegalense</i>	2	CRE	
	140				125	60		<i>M. wolinski</i>	1	CRN	
	140				120	95		<i>M. gordonae</i>	6	CLE	
	140				105	70		<i>M. shimodei</i>	1	CLN	
	140				80	60		<i>M. hodleri</i>	1	CRE	
	140				80	60		<i>M. tokaiense</i>	1	CRE	
	130				105	80		<i>M. celatum</i>	2	CLN/CLE	
	130				105	70		<i>M. gastri</i>	1	CLN	
	130				105	70		<i>M. kansasii</i>	6	CLF	
	130	105			<i>M. kansasii</i>	2	CLF				
	130	95	70		<i>M. kansasii</i>	3	CLF				
	130	95			<i>M. parascrofulaceum</i>	4	CLE				

Figura 10. Algoritmo dos padrões PRA-*hsp65* baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene *hsp65*. Padrões BstEII: 235/210 pb e 235/130/85 pb.

Coluna 1 e 2: tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição BstEII e HaeIII. Coluna 3: nome da espécie de *Mycobacterium*. Coluna 4: tipo de padrão PRA-*hsp65*. Coluna 5: CLE-Crescimento Lento Escotocromogénica; CLF-Crescimento Lento Fotocromogénica; CLN-Crescimento Lento Não-cromogénica; CRE-Crescimento Rápido Escotocromogénica; CRN-Crescimento Rápido Não-cromogénica. (Adaptado de³⁵).

BstEII	HaeIII		Espécie	Tipo	Class. Runyon				
235	120	100	160 115 60	<i>M. gordonae</i>	9	CLE			
			160 105 60	<i>M. heckeshornense</i>	1	CLE			
			155 110	<i>M. gordonae</i>	7	CLE			
			145 130 60	<i>M. chimaera</i>	1	CLN			
			145 130 60	<i>M. intracellulare</i>	1	CLN			
			145 130	<i>M. lentiflavum</i>	3	CLE			
			145 105 80	<i>M. malmoense</i>	1	CLN			
			140 125 100	<i>M. brisbanense</i>	1	CRN			
			140 60	<i>M. hiberniae</i>	1	CLE			
			130 115	<i>M. gordonae</i>	3	CLE			
			130 110 95	<i>M. gordonae</i>	10	CLE			
			235	120	85	215 110	<i>M. gordonae</i>	2	CLE
						180 140 50	<i>M. senegalense</i>	4	CRE
160 115 60	<i>M. gordonae</i>	1				CLE			
160 105 60	<i>M. xenopi</i>	1				CLN			
150 130 70	<i>M. tuberculosis complex</i>	1				CLN			
145 130	<i>M. sherrisii</i>	1				CLN			
145 120 60 55	<i>M. fortuitum</i>	1				CRN			
145 120 60 55	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	1				CRN			
145 60 55	<i>M. nonchromogenicum</i>	2				CLN			
140 125 60 55	<i>M. conceptionense</i>	1				CRN			
140 125 60 55	<i>M. farcinogenes</i>	1				CLN			
140 125 60 50	<i>M. houstonense</i>	1				CRN			
140 125 60 50	<i>M. neworleanense</i>	1				CRN			
140 125 60 50	<i>M. senegalense</i>	1				CRE			
140 120 60 55	<i>M. fortuitum</i>	2				CRN			
140 95	<i>M. parascrofulaceum</i>	1				CLE			
135 90 85	<i>M. fortuitum</i>	3				CRN			
130 115 75 60	<i>M. kansasii</i>	4				CLF			
130 95	<i>M. lentiflavum</i>	4	CLE						
130 95	<i>M. parascrofulaceum</i>	2	CLE						

Figura 11. Algoritmo dos padrões PRA-*hsp65* baseados na análise dos fragmentos de 441 pb do gene *hsp65*. Padrões BstEII: 235/120/100 pb e 235/120/85 pb. Coluna 1 e 2: tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição BstEII e HaeIII. Coluna 3: nome da espécie de Mycobacterium. Coluna 4: tipo de padrão PRA-*hsp65*. Coluna 5: CLE-Crescimento Lento Escotocromogénica; CLF-Crescimento Lento Fotocromogénica; CLN-Crescimento Lento Não-cromogénica; CRE-Crescimento Rápido Escotocromogénica; CRN-Crescimento Rápido Não-cromogénica. (Adaptado de³⁵).

Anexo IV- Resultados da identificação das estirpes

Tabela 14. Sumário dos resultados da identificação das estirpes de micobactérias pelos métodos moleculares e fenotípicos.

ID.	Métodos moleculares						Métodos fenotípicos						Resultado final
	16S rRNA			hsp65		PRA-hsp65	Cresc. em 7 dias	Relações térmicas (°C)			Pigmento	Classif.	
	GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^b			30	37	42			
E1	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. - <i>avium</i> 2 <i>M. colombiense</i> 1	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>
E2	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>	<i>M. salmoniphilum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. chelonae</i>
E3	<i>M. fortuitum</i> <i>M. neworleansense</i> <i>M. porcinum</i>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. porcinum</i>	<i>M. neworleansense</i> <i>M. porcinum</i>	<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i>	<i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i>	<i>M. peregrinum</i> 2 <i>M. porcinum</i> 1 <i>M. septicum</i> 1	+	+	+	+	N	CRN	<i>M. fortuitum</i> complex
E4	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> ^e	<i>M. gordonae</i> 3	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>
E5	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. - <i>avium</i> 2 <i>M. colombiense</i> 1	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>
E6	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. - <i>avium</i> 2 <i>M. colombiense</i> 1	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>
E7	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> 1	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>

Tabela 14. Sumário dos resultados da identificação das estirpes de micobactérias pelos métodos moleculares e fenotípicos (continuação)

ID.	Métodos moleculares						Métodos fenotípicos					Resultado final	
	16S rRNA			hsp65		PRA-hsp65	Cresc. em 7 dias	Relações térmicas (°C)			Pigmento		Classif.
	GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^b			30	37	42			
E8	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> 1	+	+	+	+	N	CRN	<i>M. fortuitum</i>
						<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> 1							
E9	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. abscessus</i>
	<i>M. bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>									
	<i>M. chelonae</i>		<i>M. chelonae</i>										
	<i>M. massiliense</i>												
E10	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i> 1	-	+	+	+	N	CLN	<i>M. nonchromogenicum</i>
E11	<i>M. kumamotonense</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. kumamotonense</i>	<i>M. kumamotonense</i>	<i>M. kumamotonense</i>	<i>M. kumamotonense</i> 1	-	+	+	+	N	CLN	<i>M. kumamotonense</i>
					<i>M. hiberniae</i>								
E12	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. abscessus</i>
	<i>M. bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>									
	<i>M. chelonae</i>												
	<i>M. massiliense</i>												

Tabela 14. Sumário dos resultados da identificação das estirpes de micobactérias pelos métodos moleculares e fenotípicos (continuação)

ID.	Métodos moleculares						Métodos fenotípicos					Resultado final	
	16S rRNA			hsp65		PRA-hsp65	Cresc. em 7 dias	Relações térmicas (°C)			Pigmento		Classif.
	GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^b			30	37	42			
E13	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. chelonae</i>
	<i>M. bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>										
	<i>M. chelonae</i>												
	<i>M. massiliense</i>												
E14	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i> 1	-	-	+	+	N	CLN	<i>M. xenopi</i>
E15	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> v	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. abscessus</i>
	<i>M. bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>									
	<i>M. chelonae</i>		<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>										
	<i>M. massiliense</i>												
E16	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1	-	+	+	-	A	CLE	<i>M. lentiflavum</i>
						<i>M. florentinum</i> 1							
						<i>M. M. simiae</i> 1							
E17	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> ^e	<i>M. gordonae</i> 3	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>
E18	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> ^e	<i>M. gordonae</i> 3	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>

Tabela 14. Sumário dos resultados da identificação das estirpes de micobactérias pelos métodos moleculares e fenotípicos (continuação)

ID.	Métodos moleculares						Métodos fenotípicos					Resultado final	
	16S rRNA			hsp65		PRA-hsp65	Cresc. em 7 dias	Relações térmicas (°C)			Pigmento		Classif.
	GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^b			30	37	42			
E25	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1 <i>M. florentinum</i> 1 <i>M. simiae</i> 1	-	+	+	-	E	CLE	<i>M. lentiflavum</i>
E26	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	+	+	+	+	N	CRN	<i>M. fortuitum</i>
E27	<i>M. monacense</i>	<i>M. monacense</i>	<i>M. monacense</i>	<i>M. monacense</i>	<i>M. monacense</i> ^e	Inconclusivo	+	+	+	+	A	CRE	<i>M. monacense</i>
E28	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> ^e	<i>M. gordonae</i> 3	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>
E29	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> ^e	<i>M. gordonae</i> 3	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>
E30	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> ^e	<i>M. gordonae</i> 3	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>
E31	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 2 <i>M. bouchedurhonense</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> complex <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> <i>M. bouchedurhonense</i>	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>

Tabela 14. Sumário dos resultados da identificação das estirpes de micobactérias pelos métodos moleculares e fenotípicos (continuação)

ID.	Métodos moleculares						Métodos fenotípicos					Resultado final	
	16S rRNA			hsp65		PRA-hsp65	Cresc. em 7 dias	Relações térmicas (°C)			Pigmento		Classif.
	GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^b			30	37	42			
E32	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. abscessus</i>
	<i>M. bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>									
	<i>M. chelonae</i>		<i>M. chelonae</i>										
	<i>M. massiliense</i>												
E33	<i>M. frederiksbergense</i>	<i>M. fluoroanthenvivorans</i>	<i>M. frederiksbergense</i>	<i>M. neoaurum</i> ^e	<i>M. neoaurum</i> ^e	Inconclusivo	+	+	+	-	A/L	CRE	<i>M. frederiksbergense</i>
E34	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. abscessus</i>
	<i>M. bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>									
	<i>M. chelonae</i>		<i>M. chelonae</i>										
	<i>M. massiliense</i>		<i>M. immunogenum</i>										
E35	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. triplex</i> ^e	<i>M. gordonae</i> 8	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>
E36	<i>M. arupense</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. arupense</i>	<i>M. arupense</i>	<i>M. arupense</i>	<i>M. arupense</i> 1	-	+	+	-	N	CLN	<i>M. arupense</i>
E37	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. septicum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. peregrinum</i>
	<i>M. septicum</i>	<i>M. septicum</i>											

Tabela 14. Sumário dos resultados da identificação das estirpes de micobactérias pelos métodos moleculares e fenotípicos (continuação)

ID.	Métodos moleculares						Métodos fenotípicos					Resultado final	
	16S rRNA			hsp65		PRA-hsp65	Cresc. em 7 dias	Relações térmicas (°C)			Pigmento		Classif.
	GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^b			30	37	42			
E38	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. abscessus</i>
	<i>M. bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. chelonae</i>									
	<i>M. chelonae</i>		<i>M. chelonae</i>										
	<i>M. massiliense</i>												
E39	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1	-	+	+	-	A	CLE	<i>M. lentiflavum</i>
						<i>M. florentinum</i> 1							
						<i>M. simiae</i> 5							
E40	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> 1	+	+	+	+	N	CRN	<i>M. fortuitum</i>
E41	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 2	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>
						<i>M. colombiense</i> 1							
E42	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> 1	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>
E43	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 2	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>
						<i>M. colombiense</i> 1							
E44	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 2	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>
						<i>M. colombiense</i> 1							

Tabela 14. Sumário dos resultados da identificação das estirpes de micobactérias pelos métodos moleculares e fenotípicos (continuação)

ID.	Métodos moleculares						Métodos fenotípicos						Resultado final
	16S rRNA			hsp65		PRA-hsp65	Cresc. em 7 dias	Relações térmicas (°C)			Pigmento	Classif.	
	GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^b			30	37	42			
E45	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 2 <i>M. colombiense</i> 1	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>
E46	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 1 <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 1 <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> 1	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>
E47	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 1 <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 1 <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> 1	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i>
E48	<i>M. avium</i> complex <i>M. arosiense</i> <i>M. colombiense</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. marseillense</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. marseillense</i>	<i>M. avium</i> <i>M.</i> <i>saskatchewanense</i> ^e	<i>M. triplex</i> <i>M. seoulens</i> <i>M.</i> <i>saskatchewanense</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 2 <i>M. colombiense</i> 1	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. avium</i> complex
E49	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. pseudoshottsi</i>	<i>M. marinum</i> <i>M. pseudoshottsi</i>	<i>M. malmoense</i> 2 <i>M. marinum</i> 1 <i>M. ulcerans</i> 1	-	+	-	-	N	CLF	<i>M. marinum</i>

Tabela 14. Sumário dos resultados da identificação das estirpes de micobactérias pelos métodos moleculares e fenotípicos (continuação)

ID.	Métodos moleculares						Métodos fenotípicos					Resultado final	
	16S rRNA			hsp65		PRA-hsp65	Cresc. em 7 dias	Relações térmicas (°C)			Pigmento		Classif.
	GenBank ^a	RIDOM ^b	EzTaxon ^c	GenBank ^a	Web Database ^b			30	37	42			
E50	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> <i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> ^e	<i>M. chelonae</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. chelonae</i>
E51	<i>M. abscessus</i> <i>M. bolletii</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. massiliense</i>	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> <i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> 1	+	+	+	-	N	CRN	<i>M. chelonae</i>
E52	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> 1	-	+	+	-	A/L	CLE	<i>M. gordonae</i>
E53	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> 1 <i>M. chimaera</i> 1	-	-	+	-	N	CLN	<i>M. intracellulare</i>
E54	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> 1 <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> 1	+	+	+	+	N	CRN	<i>M. fortuitum</i>

Legenda: (+) indica a existência de crescimento nas condições indicadas; (-) indica a ausência de crescimento nas condições indicadas; (N) não-cromogénica; (A) amarela; (L) laranja. As bases de dados utilizadas na identificação das MNT estão disponíveis nos seguintes endereços electrónicos:

^aGenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov); ^bRIDOM (<http://rdna.ridom.de/>); ^cEzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>); ^dWeb-Accessible Database of hsp65 Sequences from Mycobacterium Reference Strains (<http://msis.mycobacteria.info>) e ^eIdentificado uma percentagem de similariedade inferior a 99%.