
MICOBACTÉRIAS: EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO

Letícia Muraro Wildner; ¹ *Christiane Lourenço Nogueira*, ¹ *Beatriz da Silva Souza*, ¹ *Simone Gonçalves Senna*, ¹ *Rosemeri Maurici da Silva* ^{1e2} e *Maria Luiza Bazzo* ¹

RESUMO

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com *Mycobacterium tuberculosis*, o que resulta em 2 milhões de mortes anualmente. No mundo, são registrados mais de 8 milhões de novos casos de tuberculose (TB) por ano e o Brasil ocupa o 19º lugar dentre os 23 países detentores da maior carga de TB. Os fatores determinantes para o controle desta doença incluem a detecção rápida, a terapia adequada e os meios para que sejam evitadas futuras transmissões. O diagnóstico convencional (baciloscopia e cultura do microrganismo) apresenta limitações quanto ao tempo de execução e à operacionalidade, visto que o resultado pode levar até 60 dias para ser liberado. Portanto, a importância da detecção precoce do bacilo se torna fundamental para o bloqueio da cadeia de transmissão da TB. Já as micobacterioses, doenças causadas pelas micobactérias não tuberculosas, também estão provocando um importante impacto em razão do aumento dos surtos de infecções cirúrgicas. A identificação rápida e específica destes microrganismos é importante para o diagnóstico e a consequente escolha do tipo de tratamento do paciente, que está diretamente relacionada com a espécie. Portanto, o conhecimento dos agentes etiológicos das doenças causadas pelas micobactérias e o diagnóstico sensível e específico permitem o tratamento adequado e, conseqüentemente, o bloqueio da cadeia de transmissão da TB e o controle dos surtos relacionados às micobactérias não tuberculosas.

DESCRITORES: Tuberculose. Micobactérias não tuberculosas.

-
- 1 Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina.
 - 2 Universidade do Sul da Santa Catarina (UNISUL), Florianópolis, Santa Catarina..

Endereço para correspondência: Maria Luiza Bazzo, Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias (LBMM), Departamento de Análises Clínicas (ACL), Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, s/nº, Bairro Trindade, Florianópolis, SC, Brasil. Caixa Postal 5199, CEP 88040-900. E-mail: mlbazzo@yahoo.com.br

Recebido para publicação em: 29/1/2011. Revisto em: 26/6/2011. Aceito em: 29/6/2011.

MICOBACTÉRIAS

As micobactérias são microrganismos que apresentam forma bacilar com dimensões que variam de 0,2µm a 0,6µm de largura e 1µm a 10µm de comprimento. São bacilos delgados, retos ou ligeiramente curvos, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e incapazes de formar esporos, conídeos ou cápsulas. O tempo de multiplicação é geralmente lento e apresenta grande variação dentro do gênero, o que permite dividi-las em micobactérias de crescimento rápido (crescimento visível em menos de sete dias) e em micobactérias de crescimento lento (crescimento visível em mais de sete dias) (Leão et al., 2004; Brasil, 2005; Barrera, 2007). As espécies, em sua maioria, são saprófitas, vivem e replicam-se em ambientes naturais, ao passo que uma pequena parcela adapta-se ao ambiente intracelular, tornando-se patógenos preferencialmente de vertebrados superiores (Barrera, 2007).

Embora classificadas como Gram-positivas, as micobactérias não são coradas pela coloração de Gram, mas pelos métodos de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun usualmente. Ambas as técnicas utilizam a carbolfucsina que confere coloração vermelha às micobactérias. Por resistirem ao descoramento subsequente com solução álcool-ácido, receberam a designação de “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) (Gutierrez et al., 2001; Rosemberg & Tarantino, 2002).

Esta característica tintorial deve-se ao alto teor de lipídios – cerca de 60% – que integra a sua parede celular, composta basicamente por uma membrana citoplasmática recoberta por espessa camada de peptidoglicano (ácido N-glicililmurâmico), o qual se encontra covalentemente ligado às cadeias de arabinogalactano (polissacarídeo) que, por sua vez, estão esterificadas na sua extremidade com ácidos graxos de cadeia longa, os ácidos micólicos. Há também proteínas e lipídios livres que não estão ligados covalentemente a este esqueleto basal (complexo arabinogalactano-peptideoglicano). Dentre estes, o ácido micólico é o principal responsável por conferir às micobactérias resistência à descoloração por álcool-ácido, assim como a resistência à ação de diversos agentes químicos e antibióticos e a capacidade de formar de biofilmes (Castro & Trabulsi, 1998; Rosemberg & Tarantino, 2002; Gumber et al., 2007).

TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO

Em 1896, Lehmann e Neumann propuseram a criação do gênero *Mycobacterium*, visando à inclusão dos bacilos da tuberculose e da hanseníase, até então classificados como *Bacterium tuberculosis* e *Bacterium leprae* (Goodfellow & Magee, 1997). Este gênero tem sofrido atualizações constantes e a ele pertencem 142 espécies e 11 subespécies. Faz parte da família *Mycobacteriaceae* juntamente com o gênero *Amycolicococcus* e está posicionado taxonomicamente na subordem *Corynebacterineae*, que pertence à ordem *Actinomycetales*, da subclasse

Actinobacteridae, da classe e do filo *Actinobacteria*, do domínio *Bactéria*. Esta taxonomia baseia-se em três critérios: resistência à descoloração por álcool-ácido, síntese de ácidos micólicos e porcentagem de citosina e guanina (C+G) do DNA genômico compreendida entre 61mol% e 71mol% (Wang et al., 2010; Brasil, 2005; Barrera, 2007; Euzeby, 2010).

O gênero *Mycobacterium* é constituído pelo *M. leprae*, por espécies que compõem o Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e outras micobactérias denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT) (Brosch et al., 2002; Ueki et al., 2004).

As micobactérias foram classificadas por Kazda, conforme a patogenicidade em seres humanos, em três grupos: *estritamente patogênicas*, *potencialmente patogênicas* e *raramente patogênicas* ou saprófitas. As espécies estritamente patogênicas incluem as do CMTB e *M. leprae*, as classificadas como potencialmente patogênicas e patógenos raros compreendem as MNT (Tabela 1) (Brasil, 2009b).

Tabela 1. Classificação da patogenicidade das espécies

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

Fonte: Brasil, 2008d.

COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) é composto por *M. tuberculosis*, que causa a tuberculose (TB) humana; *M. bovis*, responsável pela TB bovina; *M. bovis-Bacille Calmette-Guérin (BCG)* – derivado de *M. bovis* que, por cultivos sucessivos em meio de batata glicerinada com bile de boi perdeu sua virulência conservando, porém, a propriedade de proteção imunológica contra

M. tuberculosis e *M. bovis*, sendo utilizado na vacinação; *M. bovis* subsp *caprae*, causador da doença em caprinos; *M. africanum*, detectado em casos de TB humana no continente Africano; *M. microti*, que causa TB em roedores; *M. pinnipedii*, causador da TB em leões marinhos e em humanos; e *M. canettii*, variante de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália (Haddad et al., 2005).

As espécies descritas acima apresentam 99,9% de identidade genética, portanto estão incluídas em um mesmo complexo. Esta semelhança genotípica pode ser identificada pela hibridização do DNA, pela identidade de enzimas, por elementos comuns existentes no DNA, como a sequência 16S, a inserção IS6110 e uma sequência de bases repetitivas de DR (*direct repeated*). No entanto, apresenta diferenças quanto a reservatórios naturais, patogenicidade e características fenotípicas e epidemiológicas, como a transmissibilidade (Niemann et al., 2000; Brosch et al., 2002; Rosemberg & Tarantino, 2002; Cousins et al., 2003).

As espécies deste complexo são consideradas estritamente parasitárias, portanto não conseguem sobreviver no meio ambiente por longo período e, assim, causam TB no homem e/ou animais (Rosemberg & Tarantino, 2002).

TUBERCULOSE

A TB é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica que acomete principalmente os pulmões (TB pulmonar), podendo também atingir outros sítios anatômicos (TB extrapulmonar) ou ocorrer de maneira disseminada (TB miliar) (Pandolfi et al., 2007).

A transmissão dá-se por via aérea pela inalação de aerossóis produzidos pela pessoa infectada e portadora da TB pulmonar ativa, por meio de tosse, espirro ou fala. Os bacilos presentes nestas secreções são atomizados em gotículas microscópicas que, após sofrerem evaporação, permanecem em suspensão no ar, na forma de um núcleo infeccioso, de 2 a 10 micra de diâmetro, composto de 1 ou 2 bacilos. Após a inalação, as gotículas são levadas até a árvore brônquica e atingem os alvéolos, onde os bacilos iniciarão o processo patológico da doença, caso consigam ultrapassar os mecanismos de defesa inespecíficos e multiplicar-se dentro do macrófago alveolar (Mello, 2001; Pandolfi et al., 2007). Se isso ocorrer, será gerada uma reação inflamatória local que leva à formação de um foco pulmonar. A partir deste foco ocorrerá a disseminação linfática até o gânglio satélite (foco ganglionar) e, em seguida, a disseminação hematogênica para todo o organismo, podendo resultar em TB disseminada ou em formas pulmonares e extrapulmonares da doença. Portanto, o pulmão é o primeiro órgão a ser atingido pelos bacilos, além de possibilitar condições ideais para o seu crescimento; assim, em 90% das vezes a doença aí se localiza. Este processo infeccioso evolui com os bacilos que conseguiram passar pelas defesas inespecíficas do trato respiratório. Nos primeiros dias após a infecção, o organismo ainda não desenvolve a resposta imunológica específica importante para o bloqueio da multiplicação celular, chegando a 10^5

bacilos em cada foco de inoculação da infecção ao final de 15 dias (Campos, 2006). É importante ressaltar que a transmissibilidade inter-humana ocorre apenas na forma pulmonar, portanto as formas extrapulmonares não são transmissíveis (Gutierrez et al., 2001; Rosemberg & Tarantino, 2002; Campos, 2006).

A instalação de uma lesão progressiva está diretamente ligada ao grau da lesão pulmonar que, por sua vez, é proporcional à quantidade do inóculo do bacilo e à virulência da cepa e inversamente proporcional à resistência natural e adquirida do hospedeiro. Neste caso, aproximadamente 5% dos indivíduos infectados pela TB desenvolverão a doença num período de dois a cinco anos e, no restante da população infectada, o bacilo ficará dormente, podendo reativar-se tardiamente conforme as condições imunitárias do próprio hospedeiro (Mello, 2001; Campos, 2006; Lopes et al., 2006).

A epidemia pelo HIV favoreceu o aumento de novos casos de TB. Isso ocorreu porque a imunidade na TB é mediada pelo sistema imunológico celular, o qual está comprometido na infecção pelo HIV. Portanto, esta pandemia causa impacto no controle da TB e no aumento da frequência das formas graves, extrapulmonares e disseminadas na manifestação da Aids (Mello, 2001; Lopes et al., 2006). Em virtude das elevadas taxas de morbidade e mortalidade por TB em indivíduos HIV positivos, a detecção, o tratamento e a prevenção da TB tornaram-se prioridades nos programas nacionais de controle da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) (WHO, 2009).

Epidemiologia da TB

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, em 2007, a ocorrência de 9,27 milhões de novos casos de TB (uma média de 139 casos por 100.000 habitantes), dos quais 14,8% eram HIV positivos. A OMS classifica os países com alta carga de TB pelo número absoluto de novos casos da doença, sendo Índia, China, Indonésia, Nigéria e África do Sul os cinco primeiros da lista. O Brasil ocupa o 19º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo, com uma média de 48 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2009), sendo acometidos, principalmente, os homens em idade produtiva. Embora o tratamento da TB seja praticamente ambulatorial, a doença é a nona causa de hospitalização e a quarta de mortalidade no caso de doenças infecciosas, cuja taxa é de aproximadamente 5 mil mortes ao ano. Somente o estado de São Paulo notifica 18 mil casos anualmente, representando o maior número do Brasil (Bombarda, 2009).

Manifestações clínicas da TB

Alguns pacientes com TB pulmonar não demonstram nenhum indício da doença, outros apresentam sintomas aparentemente simples que são ignorados durante alguns meses ou anos. Contudo, na maioria dos casos, os sinais e sintomas

mais frequentes são tosse seca e contínua no início e, em seguida, com a presença de secreção por mais de três semanas, a qual se transforma, na maioria das vezes, em uma tosse produtiva purulenta ou hemoptise; astenia; febre baixa, geralmente vespertina; sudorese noturna; inapetência; palidez; emagrecimento acentuado; rouquidão e prostração. Nos casos graves, os pacientes podem apresentar dispneia; hemoptise maciça; colapso do pulmão e empiema pleural, se houver comprometimento dessa membrana, e pode ocorrer ainda dor torácica (Brasil, 2009a).

Dentre as formas extrapulmonares da doença, as mais frequentes são: pleural, linfática, osteoarticular, peritoneal, pericárdica, ganglionar, geniturinária, meníngea, oftálmica, cutânea e intestinal, embora praticamente qualquer local do organismo possa ser afetado pela doença. Dessas, a TB pleural é a forma mais comum no adulto imunocompetente e, em cerca de 20% dos casos, está associada com lesão pulmonar ativa. Deve-se considerar também a importância da neurotuberculose, que apresenta quadro clínico de meningite ou meningoencefalite (Rosemberg & Tarantino, 2002; Lopes et al., 2006).

Tratamento da TB

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

O Ministério da Saúde preconizava esquemas de tratamento divididos em fase inicial e de continuação. O Esquema I, de primeira linha, era indicado para os casos novos sem tratamento prévio ou com tratamento anterior e cura há mais de cinco anos; consistia na associação de rifampicina, isoniazida e pirazinamida por dois meses, seguida de rifampicina e isoniazida por mais quatro meses. Em caso de retorno positivo após abandono do tratamento, adicionava-se o fármaco etambutol (Esquema IR). Se houvesse falência desses esquemas, utilizava-se a associação de estreptomicina, pirazinamida, etambutol e etionamida por três meses, seguida da combinação de etambutol e etionamida por mais nove meses (Esquema III) (Brasil, 2002).

Em outubro de 2010, foi implementado um novo esquema de tratamento, chamado DFC (dose fixa combinada), que combina quatro fármacos antituberculosos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) em um único comprimido. Este comprimido, que possui doses reduzidas de isoniazida, pirazinamida e etambutol, agora compõe o primeiro esquema de tratamento e elimina as etapas de tratamento IR e EIII. O uso desta medicação está preconizado para os primeiros 60 dias de terapia; o restante do tratamento (quatro meses) é feito com rifampicina e isoniazida, também em um único comprimido. Este tratamento reduz a quantidade de doses diárias, o que deve aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento e elevar os índices de cura (Brasil, 2010).

MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS (MNT)

O grupo das MNT inclui aquelas espécies de micobactérias que não são membros do CMTB. Inicialmente chamadas de micobactérias atípicas, elas receberam várias denominações: ambientais, oportunistas, micobactérias outras que não o bacilo da tuberculose (*Mycobacteria other than tubercle bacilli* – MOTT) e não tuberculosas (MNT), sendo esta denominação a mais utilizada e aceita na atualidade (Falkinham III, 1996; Dalcomo, 2001; Katoch, 2004).

As MNT estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas principalmente na água de reservatórios naturais (mananciais, lagoas, mares), de torneira, de piscinas e destilada (utilizada em diálise e soluções cirúrgicas); no solo, em pedras, aerossóis, vegetais, protozoários e em muitas espécies animais (Martin-Casabona et al., 2004; Katoch, 2004; Groote & Huitt, 2006; Primm et al., 2004). As MNT colonizam o corpo humano na forma saprófita de vida, podendo causar infecções ou doenças. São isoladas a partir de diversas partes do corpo como a pele, ouvido externo, narinas, orofaringe, gengivas, vagina, genitália externa tanto masculina como feminina, saliva, fezes, urina, além do escarro (Lopes et al., 2005; Lopes et al., 2006).

A maioria das MNT é capaz de multiplicar-se mesmo em condições de escassez nutricional, temperaturas extremas e pH baixo. Além disso, algumas espécies mostram-se resistentes ao glutaraldeído e aos processos de cloração utilizados para o tratamento de água de piscinas ou para o consumo humano e, ainda, possuem a capacidade de formar biofilme como um mecanismo de sobrevivência, características que favorecem o desenvolvimento de infecção (Dantec et al., 2002; Groote & Huitt, 2006).

Algumas das MNT encontram-se agrupadas no Complexo *M. avium* (MAC) (*M. avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*) e no Complexo *M. terrae* (*M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale*). Determinadas espécies de crescimento rápido foram reunidas em três grupos: Grupo *M. fortuitum*, Grupo *M. smegmatis* e Grupo *M. chelonae-abscessus*. Neste caso, o termo grupo é mais bem aceito do que o termo complexo em virtude dos fatores considerados para esta classificação: os aspectos clínicos da doença causada e a sensibilidade aos antimicrobianos (Brasil, 2008a).

O Grupo *M. fortuitum* compreende as espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense*, *M. boenickei* e *M. conceptionense*, espécies usualmente sensíveis a fluorquinolonas, doxiciclina, amicacina, imipenem, linezolida e sulfametoxazol. O Grupo *M. smegmatis* inclui as espécies *M. smegmatis*, *M. goodii* e *M. wolinskyi*, resistentes à claritromicina e sensíveis a quinolonas, amicacina, imipenem, linezolida e sulfametoxazol. O Grupo *M. chelonae-abscessus* abrange as espécies *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum*, *M. bolletii* e *M. massiliense*, frequentemente resistentes a fluorquinolonas, sulfametoxazol, doxiciclina e sensíveis a claritromicina, amicacina, tigeciclina e imipenem (Brasil, 2009b).

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

Micobacterioses

As micobacterioses são doenças causadas pelas MNT. Este grupo é responsável por infecções de pele e tecidos moles, infecções pulmonares crônicas e progressivas, linfadenite cervical pediátrica e infecções disseminadas, especialmente em casos avançados de Aids. A imunossupressão é um fator de risco para sua disseminação, embora muitos pacientes com micobacterioses não sejam imunossuprimidos (Rosemberg & Tarantino, 2002).

Diversos estudos sugerem que a transmissão interpessoal das MNT é rara. O homem não é o hospedeiro de escolha das MNT – as infecções ocorrem de forma oportunista –, já que estas são ubíquas no ambiente. Assim, as fontes ambientais, como inoculação por meio de traumas e inalação de aerossóis, e instrumentos contaminados são as formas mais importantes da sua transmissão, o que gera surtos hospitalares importantes (Marinho et al., 2008; Pedro et al., 2008).

A habilidade das MNT de crescimento rápido para sobreviver e multiplicar-se em fluidos aquosos e em alguns desinfetantes (como o glutaraldeído) as torna em potencial risco hospitalar (Duarte et al., 2009). Falhas nos procedimentos de limpeza, desinfecção e esterilização de instrumentos ou equipamentos têm sido apontadas como principais fatores desencadeantes do processo infeccioso. Com isso, pode ocorrer contaminação por quebra da barreira corneana, cutânea ou mucosa, decorrente de procedimentos médicos para fins terapêuticos (cirurgias laparoscópicas e endoscopia, por exemplo) ou para fins estéticos (cirurgias plásticas e implantes) (Martinez et al., 2007; Brasil, 2008b).

Epidemiologia das MNT

O aumento na prevalência do HIV contribuiu para o incremento das infecções por MNT. Essas infecções passaram a ter uma maior importância, o que levou à melhora no conhecimento desses microrganismos e ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais sensíveis. Tais fatores, somados a uma maior notificação, deram visibilidade a uma incidência mais alta dessas infecções (Dalcom, 2001; Henry et al., 2004; Field & Cowie, 2006). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou a notificação compulsória das infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido (MCR) em 2009 (Brasil, 2009b).

No período de 2000 a 2008, foram notificados, no Brasil, 2.139 casos de infecção por MCR, sendo 1.105 casos relatados no estado do Rio de Janeiro, 321 no Pará, 293 no Espírito Santo, 101 no Rio Grande do Sul, 70 em Goiás, 64 no Paraná, 47 no Mato Grosso, 37 em Minas Gerais, 23 em São Paulo, 23 no Distrito Federal, 9 na Bahia, 9 no Piauí, 9 no Mato Grosso do Sul, 5 em Sergipe, 5 em Santa Catarina, 3 em Alagoas, 2 em Pernambuco, 1 no Acre, 1 no Amazonas, 1 no Ceará, 1 no Maranhão, 1 em Rondônia e 1 no Tocantins (Reniss, 2009). O agente etiológico prevalente na maioria das cidades brasileiras foi *M. massiliense*, exceto nas infecções secundárias a mamoplastias de aumento, nas quais a maior prevalência foi de *M. fortuitum*. Outras espécies de MCR foram identificadas: *M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* e *M. wolinskyi* (Anvisa, 2009).

Embora seja elevado o número de casos notificados de infecção por MCR, entre as espécies potencialmente patogênicas, as pertencentes ao MAC e *M. kansasii* (micobactérias de crescimento lento) são as mais comumente isoladas, ambas causam principalmente infecção pulmonar (Ueki et al., 2004; Field & Cowie, 2006; Marinho et al., 2008; Pedro et al., 2008). Além disso, o MAC é frequentemente responsável pela doença disseminada e pelo óbito em pacientes com Aids (Pedro et al., 2008). No Brasil, o tratamento depende de medicamentos fornecidos pelo Ministério da Saúde, portanto o registro do caso se torna obrigatório (Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo, 2005; Brasil, 2008d).

Manifestações clínicas das MNT

As MNT podem causar uma variedade de doenças em humanos e animais que diferem em gravidade e importância para a saúde pública de acordo com sua virulência. Geralmente as doenças disseminadas em pacientes com Aids estão associadas às espécies de crescimento lento, ao passo que as infecções pós-traumáticas são causadas por espécies de crescimento rápido. A Tabela 2 mostra as principais MNT e seus sítios mais e menos comuns de acometimento (Gentry, 2005; Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo, 2005).

O pulmão é o principal órgão acometido pelas MNT. A doença pulmonar ocorre pela inalação de aerossóis contendo os bacilos, geralmente em pacientes com doença pulmonar preexistente. Nestes casos a avaliação clínica é complexa, pois os sinais e os sintomas são variáveis, inespecíficos e similares aos da TB. Os pacientes geralmente apresentam sintomas como tosse crônica com expectoração, fadiga, febre, hemoptise e perda de peso. Estas micobacterioses infectam pacientes imunodeprimidos e portadores de doenças linfoproliferativas ou que fazem uso de drogas imunodepressoras. As espécies associadas à doença pulmonar no Brasil são *M. kansasii* e *M. avium* e, ocasionalmente, são identificadas as espécies *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. lentiflavum*, *M. abscessus* e *M. szulgai* (Koh et al., 2002; Gentry, 2005; Haddad et al., 2005).

Tabela 2. Principais espécies de MNT e seus sítios de acometimento

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

Fonte: Gentry, 2005; Duarte et al., 2009.

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

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

Tratamento das MNT

O tratamento das micobacterioses é bastante complexo, uma vez que elas são naturalmente resistentes ou têm pouca sensibilidade aos fármacos tuberculostáticos. Esta sensibilidade difere entre as espécies e entre cepas de uma mesma espécie. Por esta razão, muitos são os esquemas utilizados para o tratamento. Em um tratamento eficiente, é necessária inicialmente a identificação do agente causal, para que, de acordo com a sua sensibilidade, sejam escolhidos os fármacos a serem utilizados. Assim como no tratamento da TB, devem ser combinados pelo menos dois fármacos, visando evitar a seleção de cepas resistentes. Entretanto, na micobacteriose, o número de fármacos utilizados deve ser mantido por todo o tempo de tratamento, o qual não deve ser inferior a 18 meses. Dentre as micobactérias mais resistentes estão as do MAC, *M. fortuitum* e *M. chelonae*, que exigem, com frequência, poliquimioterapia com quatro a cinco fármacos (Gutierrez et al., 2001; Rosemberg & Tarantino, 2002; Pedro et al., 2008; ATS, 2007).

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE MICOBACTÉRIAS

No Brasil, o diagnóstico laboratorial das micobactérias é da competência do serviço público de saúde, sendo coordenado em cada estado pelos Laboratórios de Referência Estadual – Laboratórios Centrais (LACENs) (Brasil, 2008d).

Diagnóstico Convencional

Baciloscopia

A baciloscopia, exame básico para o achado laboratorial das micobactérias em espécimes biológicos, consiste na pesquisa direta de BAAR, geralmente pela coloração de Ziehl-Neelsen. Por ser uma metodologia de execução rápida, fácil, de baixo custo e que permite estimar o número de bacilos presentes na amostra clínica, favorece a ampla cobertura diagnóstica. Assim, identifica, no caso da TB, a principal fonte de infecção (pacientes bacilíferos), permitindo a pronta atuação na

interrupção da cadeia de transmissão. Além disso, a baciloscopia é muito importante para o acompanhamento do tratamento e para determinar se a terapia está sendo eficiente (Ganguly, 2002; Garg et al., 2003; Ramachadran & Paramasivan, 2003; Brasil, 2008a).

Nesta técnica o material clínico a ser selecionado depende da localização da infecção. A amostra é, primeiramente, fixada em uma lâmina e submetida à ação da fucsina a quente, etapa na qual todas as estruturas absorvem o corante. Em seguida, a lâmina é submetida à ação do álcool-ácido, que descora todas as estruturas celulares, exceto os BAAR. Para facilitar a microscopia, faz-se uma coloração de fundo com azul de metileno (Brasil, 2008d).

A baciloscopia apresenta como principal desvantagem a sensibilidade limitada, sendo necessários pelo menos 5.000 bacilos por mL de amostra para obter-se um resultado positivo e, além disso, requer habilidade e experiência do microscopista (Menon et al., 2000; Ganguly, 2002; Ramachadran & Paramasivan, 2003).

Cultura

A cultura é o método bacteriológico disponível mais sensível para o diagnóstico das infecções por micobactérias, detectando a partir de 10 bacilos/mL de amostra. Ela é realizada quando o paciente apresenta sintomatologia sugestiva, porém baciloscopia negativa. Assim, esta é a técnica que permite o diagnóstico de novos casos da forma pulmonar da doença quando a eliminação do bacilo ainda não é suficiente para apresentar resultado positivo na baciloscopia. É também realizada quando, após início do tratamento, o paciente não apresentar resposta terapêutica adequada ou para acompanhamento do tratamento quando o paciente apresentar resistência a múltiplas drogas (MDR). A partir da cultura, também é possível a identificação da micobactéria isolada e a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos (Ganguly, 2002; Kanufre, 2007; Brasil, 2008d).

Os espécimes utilizados para o isolamento de micobactérias podem ser provenientes de cavidades fechadas, como o líquido, sendo considerados amostras não contaminadas, ou apresentar flora microbiana associada, como o escarro, lavados, aspirados, urina e material de cavidade aberta. Os microrganismos contaminantes, por se desenvolverem muito mais rapidamente do que as micobactérias, impedem sua multiplicação. Por isso, devem ser eliminados dos espécimes contaminados pelo tratamento com agentes químicos, aos quais as micobactérias são conhecidamente mais resistentes. Já nos espécimes não contaminados, este tratamento não é necessário, desde que os mesmos tenham sido colhidos assepticamente e colocados em frasco estéril (Brasil, 2008d).

Para a maioria das micobactérias, a temperatura ótima de crescimento varia de 35° a 37°C. Para seu crescimento, podem ser utilizados os meios sólidos, como Löwenstein-Jensen (LJ) e o Middlebrook 7H10 e 7H11, e os meios líquidos, como Kirchner e o caldo Middlebrook 7H9 (Menon et al., 2000; Ganguly, 2002;

Kanufre, 2007; Brasil, 2008d). Nos meios sólidos, a morfologia colonial é variável, podendo ser lisa ou rugosa – mesmo em isolados da mesma espécie –, pigmentada ou não pigmentada. Esse pigmento, usualmente não difusível, pode variar do amarelo ao alaranjado, sendo normalmente decorrência da síntese de β -carotenos (Leão et. al, 2004). As leituras devem ser realizadas 48 horas após a semeadura e a incubação (para verificar se houve contaminação) e, posteriormente, de sete em sete dias até completar oito semanas (Brasil, 2008d).

Como o tempo de crescimento bacilar varia de duas a seis semanas, a cultura apresenta como desvantagem o tempo necessário para a liberação do resultado. Por isso, foram desenvolvidos sistemas semiautomáticos e automatizados que reduzem o tempo de emissão do resultado para uma a quatro semanas. Esses sistemas utilizam ensaios radiométricos e/ou colorimétricos para a detecção de CO_2 produzido e O_2 consumido durante o crescimento bacilar (Ganguly, 2002; Kanufre, 2007).

Identificação Fenotípica

A identificação fenotípica da espécie de micobactérias é baseada em testes bioquímicos e características de crescimento. Ela é feita a partir do primo-cultivo, que deve estar em crescimento ativo de três a quatro semanas. É, também, necessária a verificação da ausência de contaminação e um número de colônias superior a 20, exceto em líquidos estéreis, como líquor. A sequência de métodos para identificação é composta de testes para separação do CMTB das MNT, diferenciação das espécies do CMTB e identificação das MNT (Brasil, 2008d).

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

Para a diferenciação das espécies do CMTB, podem ser realizados os seguintes testes: crescimento em meio LJ com glicerol e LJ com piruvato de sódio, inibição de crescimento em meio com hidrazida do ácido tiofeno 2-carboxílico (TCH), estreptomina e cicloserina, preferência pelo oxigênio, pirazinamidase, teste de redução de nitrato, urease e niacina (Brasil, 2008d).

A identificação das espécies das MNT pode ser feita pelos testes de produção de pigmento, crescimento a 45°C e a 25°C, determinação do tempo de crescimento em LJ, meio Sauton com ácido pícrico e em ágar comum, inibição de crescimento em meio com NaCl 5%, arilsulfatase, hidrólise do Tween 20, β -galactosidase, redução do telurito de potássio (Brasil, 2008d).

As principais limitações do método fenotípico consistem na demora para obtenção de resultados, na dificuldade de diferenciação de diversas espécies e nos resultados duvidosos que podem ser apresentados por alguns testes bioquímicos, além de serem trabalhosos. Considerando estes aspectos, os LACENs realizam apenas os testes para diferenciação entre o CMTB e as MNT (PNB e niacina) e o TCH para diferenciar *M. tuberculosis* (resistente) dos outros membros do CMTB (sensíveis). Quando os resultados diferem dos esperados para CMTB, a cultura em LJ é encaminhada, para identificação da espécie, ao Laboratório de Referência Nacional, o Centro de Referência Professor Hélio Fraga no Rio de Janeiro (Brasil, 2008d). No caso das MNT, deve-se ter cautela em atribuir-lhes a responsabilidade pela etiologia da doença, visto que podem significar uma contaminação ambiental e não uma infecção real. Assim, o Centro de Referência Professor Hélio Fraga emitiu, em 2009, uma nota técnica regulamentando o envio de cepas para identificação, com o propósito de confirmar os casos de micobacterioses. São consideradas infecções por MNT casos que apresentarem uma amostra com cultura positiva proveniente de sítio estéril ou duas ou mais amostras com cultura positiva, com mais de dez colônias, proveniente de sítio não estéril (Brasil, 2009b).

Diagnóstico molecular

A necessidade de um teste rápido para o diagnóstico laboratorial das micobactérias levou ao desenvolvimento dos métodos moleculares para a detecção e identificação das espécies, diretamente de amostras clínicas ou a partir das colônias isoladas em cultivo (Mello et al., 2005). Entre as técnicas utilizadas para o diagnóstico, encontram-se aquelas que promovem a amplificação do material genético, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e suas variações (*Nested-PCR* e *Multiplex-PCR*, por exemplo). E, para a identificação das espécies, há as técnicas que empregam sondas genéticas (Sistema *AccuProbe*, por exemplo), sequenciamento de DNA a partir de produtos de PCR, análises com enzima de restrição (como o PRA-*hsp65*) e o HMA (*Heteroduplex Mobility Assay* – Ensaio de mobilidade eletroforética de fitas heteroduplas).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica da PCR baseia-se na amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA. Esta reação ocorre em ciclos, que são compostos por três etapas: desnaturação, pareamento e extensão. A desnaturação do DNA requer uma

temperatura suficientemente alta (90°C - 95°C) para desfazer as ligações do tipo ponte de hidrogênio que mantêm as fitas unidas. Nesta etapa, as fitas simples servirão como molde de DNA, as quais irão se ligar (hibridizar) aos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) na etapa denominada pareamento, em temperatura em torno de 50°C a 65°C. Em seguida, ocorre a extensão da fita de DNA por meio da adição de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) pela enzima *Taq* DNA polimerase. Esta adição ocorre a partir da região de pareamento de cada iniciador, no sentido 5'-3', em temperatura de, aproximadamente, 72°C. À medida que os ciclos se repetem, os *primers* e os dNTP vão sendo consumidos e o número de novas fitas de DNA se expande de modo exponencial (Sambrook & Russel, 2001).

A escolha do DNA alvo e a definição dos *primers* dentro da sequência do DNA são fatores determinantes para a especificidade da PCR. No caso das micobactérias, a sequência de DNA amplificada pode ser comum a todas as bactérias do gênero ou ser específica para uma espécie ou complexo. Um exemplo deste último caso é a inserção *IS6110*, sequência mais comumente utilizada para amplificação específica do DNA do CMTB.

A maioria dos protocolos utiliza a sequência repetitiva de inserção *IS6110*, de 1.350 pares de bases, presente nas espécies do Complexo *M. tuberculosis* com diferentes números de cópias e integradas em vários sítios cromossômicos (Hermans et al., 1990; van Soolingen et al., 1991, Assis et al., 2007). Por estar presente em várias cópias no genoma, este alvo molecular promove um aumento na sensibilidade da técnica, o que representa uma vantagem sobre os demais alvos. Entretanto, a desvantagem está na existência de isolados de *M. tuberculosis* que perderam as sequências *IS6110*, o que tem sido observado principalmente na Ásia (Yuen et al., 1993).

Quando a sequência amplificada é comum ao gênero, o diagnóstico é *Mycobacterium* sp. Neste caso, a região 16S do DNA ribossômico (rDNA) é um importante alvo de identificação por ser altamente conservada e conter diferenças na sequência de nucleotídeos específicas de um grupo ou espécie. Por esta razão, este produto amplificado também pode ser utilizado para uma posterior identificação molecular da espécie da micobactéria (Hughes et al., 1993; Katoch, 2004; Assis et al., 2007; Botinelly et al., 2007; Wu et al., 2008; Macente & Ribeiro, 2009).

Em relação às técnicas convencionais, a PCR apresenta algumas vantagens como a redução do tempo de liberação do resultado (o tempo necessário para a realização da PCR é, em média, de um dia e o das técnicas convencionais varia entre quatro e oito semanas) e mínima a manipulação das bactérias, pois não há necessidade de cultivo e crescimento de microrganismos, o que proporciona maior segurança ao laboratório (Macente & Ribeiro, 2009). Por outro lado, apesar desta metodologia ser rápida e específica, sua sensibilidade ainda é inferior à da cultura e a possibilidade de amplificar material genético de microorganismo não viável desfavorece a sua utilização no acompanhamento terapêutico (Kanufre, 2007).

PCR seguida de análise de restrição – PCR-PRA *hsp65* (*Polymerase Chain Reaction Restriction Enzyme Pattern Analysis* do gene *Heat Shock Protein* de 65 kDa)

Telenti e colaboradores descreveram, em 1993, o método PRA *hsp65*, o qual diferencia a maioria das espécies de MNT, mas não as do CMTB. Este método baseia-se na amplificação, pela PCR, de um fragmento de 439 pares de base (pb) do gene *Heat Shock Protein* de 65 kDa (*hsp65*), que contém epítomos específicos comuns a várias espécies de micobactérias. Os iniciadores utilizados são Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGCCAT) e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCT). O produto amplificado é digerido com duas enzimas de restrição, *BstE II* e *Hae III*, e os fragmentos obtidos são visualizados por eletroforese em gel de agarose. As diferentes espécies de micobactérias apresentam padrões de restrição diferentes e a definição da espécie é possível comparando-se esses padrões com um algoritmo (Telenti et al., 1993; Chimara et al., 2008).

Este método apresenta como principais vantagens sua alta especificidade, a obtenção do resultado em poucas horas e o fato de requerer somente equipamentos básicos de PCR e de eletroforese em gel de agarose. Entretanto, algumas vezes são observadas espécies que apresentam perfil de PRA ainda não descrito na literatura, outras apresentam um perfil compartilhado por mais de uma espécie ou, ainda, é possível verificar que uma mesma espécie pode apresentar mais de um perfil de restrição, fatos que constituem limitações (Brasil, 2008d; Chimara et al., 2008).

No estudo realizado no Rio de Janeiro, foram analisadas 177 amostras clínicas e ambientais para validar o método PRA-*hsp65* como método de identificação e diagnóstico de MNT. Este método molecular complementar de diagnóstico foi escolhido justamente pela eficácia que tem demonstrado em outros laboratórios de rotina do país e em diversos estudos publicados no mundo (Rocha et al., 2002). Silva e colaboradores (2001) utilizaram o método na identificação de amostras clínicas de MNT no Instituto Adolfo Lutz. Foram analisadas 83 amostras da rotina do laboratório de micobactérias e o PRA-*hsp65* mostrou-se concordante em 91,5% com os métodos bioquímicos. Em 2002, o PRA-*hsp65* foi utilizado para identificar MNT de amostras clínicas de vários estados do Brasil, com o objetivo de avaliar o desempenho do método nos diversos laboratórios do país. No estudo, foram utilizadas mais de 50 espécies e este método de identificação obteve melhores resultados que os métodos tradicionais e os *kits* comerciais (Rocha et al., 2002). Este é um dos métodos utilizados pelo Laboratório de Referência Nacional para identificação das MNT a partir das culturas enviadas pelos LACENs, previamente identificadas como não pertencentes ao CMTB (Brasil, 2008d).

MMSA – Ensaio de Mobilidade Eletroforética de Fitas Heteroduplas de Micobactérias ou *Micobacteria Mobility Shifty Assay*

O ensaio de mobilidade eletroforética de fitas heteroduplas (HMA) baseia-se na detecção da micro-heterogeneidade de sequências nucleotídicas, pelo

fato de que sequências de DNA com divergência de pares de bases podem, em gel de poliacrilamida, apresentar diferenças de migração por causa das diferenças conformacionais. Para sua realização, o fragmento de DNA, amplificado pela PCR, é misturado ao DNA amplificado de uma amostra padrão e submetido à desnaturação para separação das fitas. Dois segmentos de DNA, idênticos ou não, são reunidos e, após a desnaturação, são submetidos a um processo para que ocorra hibridização. Quando os fragmentos possuírem a mesma sequência nucleotídica, o pareamento ocorrerá com 100% de complementariedade e haverá a revelação de apenas uma banda na corrida eletroforética. Já no caso de dois fragmentos não idênticos, a hibridização não será totalmente complementar, produzindo, assim, três diferentes fitas duplas: duas formadas por fitas 100% complementares (homoduplex), que representam apenas o reparamento das fitas de cada fragmento, e um par de fitas não idênticas, chamado heteroduplex. Este par heteroduplex, em razão da alça formada no local onde ocorre a não complementariedade da(s) base(s), deverá apresentar mobilidade eletroforética mais lenta. A revelação da reação é feita em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes. Pode-se observar a presença de quatro tipos de banda: uma, na base do gel, correspondente a fitas homoduplas; uma ou mais, no meio do gel, representando a(s) fita(s) heterodupla(s) específica(s); acima destas, fitas simples e, no ápice do gel, fitas heteroduplas inespecíficas (Delwart et al., 1994; Waléria-Aleixo et al., 2000; Bazzo, 2006, Carvalho et al., 2007).

No HMA para identificação de espécies de micobactérias (MMSA), é amplificada, por PCR, uma região gênica comum a todas as micobactérias, o 16S rDNA. Para a realização desta técnica, é necessária também a amplificação do DNA de cepas padrão de diferentes espécies de micobactérias. Cada padrão é misturado separadamente com a amostra teste a ser identificada e esta mistura é desnaturada e hibridizada. Após a corrida eletroforética em PAGE, a formação de fitas homoduplas indica a complementariedade da amostra teste com a amostra padrão com a qual foi testada. Por outro lado, fitas heteroduplas são formadas quando não há complementariedade entre as fitas pareadas, o que significa que a amostra teste e o padrão não têm a mesma sequência de nucleotídeos. Para controle da reação, a amostra teste deve ser submetida ao MMSA isoladamente, sem a mistura com o padrão, devendo apresentar fita homodupla (Waléria-Aleixo et al., 2000, Bazzo, 2006).

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

O MMSA apresenta como desvantagens a necessidade de ter espécies de micobactérias para serem utilizadas como padrão e o fato de que as amostras devem ser testadas com cada padrão separadamente. Quando a infecção é causada por mais de uma espécie de micobactérias, a identificação não é possível, visto que haverá

formação de fitas heteroduplas em todas as reações, inclusive na amostra testada isoladamente. Além disso, esta técnica não diferencia as espécies do CMTB, visto que apresentam 99,9% de similaridade genética e 100% de similaridade na região 16S rDNA (Böddinghaus et al., 1990; Waléria-Aleixo et al., 2000, Bazzo, 2006). Este método vem sendo pesquisado e utilizado para identificação das espécies de micobactérias no estado de Santa Catarina, apresentando resultados comparáveis aos demais métodos moleculares de identificação com a vantagem de ser rápido, possibilitando a identificação de micobactérias em 24 horas a partir do escarro ou em 6 horas a partir da cultura. Quando comparado ao método PRA-*hsp65*, demonstrou concordância de 91%. É um método de execução rápida capaz de identificar as principais micobactérias patogênicas a partir da cultura e diretamente do escarro, constituindo uma ferramenta molecular de triagem das espécies aplicável na rotina dos laboratórios clínicos (Bazzo, 2006).

Ensaio Capilia

O ensaio Capilia[®] TB é baseado na análise das proteínas secretadas do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Os antígenos de *M. tuberculosis* têm sido utilizados para o diagnóstico rápido e específico de diferenciação das espécies do complexo. O antígeno MPB64 é utilizado no ensaio imunocromatográfico (ICA, Capilia) para diferenciação rápida do Complexo *M. tuberculosis* diretamente de culturas líquidas em meio 7H9, incluindo as culturas do BACTEC e MGIT com especificidade e sensibilidade superiores a 96%. Neste teste podem ocorrer resultados falso-negativos em virtude da baixa quantidade de bactérias nas culturas ou mutações no gene *MPB64*. O antígeno 6 (ESAT-6, 6 kDa) e a proteína 10 (CFP-10, 10 kDa) também podem ser utilizados no ensaio Capilia, pois são antígenos específicos para o Complexo *M. tuberculosis* e são secretados na fase inicial de crescimento das micobactérias. Estes antígenos são utilizados nos testes QuantiFERON TB Gold e T-spot para o diagnóstico rápido da tuberculose latente ou ativa em amostras de sangue. Esses ensaios são rápidos, podem ser realizados diretamente da cultura líquida de *M. tuberculosis* ou direto de amostras clínicas como o sangue. São baseados num sistema composto por uma pequena membrana e uma reação colorimétrica para visualização dos resultados, possuem controles negativos e positivos, contudo alcançam melhor aproveitamento quando realizados diretamente de culturas positivas, pois o agravante dos possíveis falso-negativos pode prejudicar os resultados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico e o tratamento da tuberculose, assim como das micobacterioses, é fundamental para o controle da cadeia de transmissão das doenças e a formação de biofilmes micobacterianos. A tuberculose é uma doença

negligenciada que possui tratamento adequado desde que seja corretamente diagnosticada. Os programas de controle e de tratamento da doença promovem seu controle na população. Já as micobacterioses estão diretamente relacionadas com as adaptações destes microrganismos e suas interações com o ambiente, além da formação de biofilmes que podem estar relacionados com os surtos hospitalares, mas para isso é preciso conhecer o comportamento destes microrganismos.

ABSTRACT

Mycobacteria: epidemiology and diagnosis

It is estimated that one third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, resulting in 2 million deaths annually. More than 8 million new cases of tuberculosis (TB) are registered per year worldwide, and Brazil ranks 19th among the top 23 countries with the highest rates of TB. The determining factors for the control of this disease include early detection, appropriate therapy and measures for avoiding transmission. The conventional diagnoses (smear and microorganism culture) have time limitations for implementation and operation, since the result may take up to 60 days to be released. Therefore, early detection is critical for blocking the chain of TB transmission. Mycobacterial diseases caused by nontuberculous mycobacteria are also having a major impact due to increased outbreaks of surgical infections. Thereby, the rapid and specific identification of microorganisms is important for the diagnosis, which will determine the type of treatment (treatment according to species). Knowledge of etiologic agents of mycobacterial diseases, as well as sensitive and specific diagnosis allows proper treatment by blocking the chain of TB transmission and controlling nontuberculous mycobacteria outbreaks.

KEY WORDS: Tuberculosis. Nontuberculous mycobacteria.

REFERÊNCIAS

1. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica Conjunta nº01/2009 SVS/MS e ANVISA. Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento, 2009.
2. Assis NCS, Lopes ML, Cardoso NC, Costa MM, Sousa CO, Lima KVB. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. *J Bras Patol Med Lab* 43: 1-7, 2007.
3. ATS - American Respiratory Society. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Med Care* 175: 367-416, 2007.
4. Barrera L. The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care*. 3ª ed Disponível em: www.tuberculosis textbook.com, 2007. Acesso em: ago/2009.

5. Bazzo ML. Método de identificação e caracterização de micobactérias para uso em diagnóstico de rotina nos laboratórios de saúde e determinação da resistência. [Doctoral thesis]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
6. Böddinghaus B, Rogall T, Florhr T, Blocker H, Bottger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 28: 1751-1759, 1990.
7. Bombarda S. Aspectos atuais e perspectivas futuras da Tuberculose. *Pneumologia Paulista* 22: 5, 2009.
8. Botinelly L, Fujimoto M, Salem JI, Ogusku MM, Ferreira LCL. Evaluation of Marchetti PCR amplification assay to the diagnosis of cutaneous and lymph node tuberculosis from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Bras Patol Med Lab* 43: 195-291, 2007.
9. Brasil. Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde. *Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica*. 1ª ed. Brasília, 2002.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Manual de Bacteriologia da tuberculose*. 3ª ed. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.saude.mt.gov.br/portal>, 2008a. Acesso em: ago/2009.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Nota técnica 08/08/2008*. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.pdf, 2008b. Acesso em: ago/2009.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias*. Brasília, 2008d.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Guia da Vigilância Epidemiológica. Tuberculose: informações gerais. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31081, 2009a. Acesso em: ago/2009.
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica conjunta Nº 01/2009. *Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento*, 2009b. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacterias/nota_tecnica_conjunta.pdf. Acesso em: nov/2009.
15. Brasil. Ministério da Saúde / Fundação Nacional da Saúde. Vigilância Epidemiológica. *Informe Técnico da Tuberculose*. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tb_julho10_certo_22_07_2010.pdf, 2010. Acesso em: jul/2010.
16. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3684-3689, 2002.
17. Campos HS. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. *Pulmão* 15: 29-35, 2006.
18. Carvalho WSC, Miranda SS, Pesquero JL, Gomes MA. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. *Rev Bras Cienc Farm* 43: 31-38, 2007.
19. Castro AFP, Trabulsi LR. Micobactérias e Nocardias. In: Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeia S. *Microbiologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 187-197.
20. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leão SC. 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: 1-12, 2008.
21. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodriguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1305-1314, 2003.
22. Dalcomi MP. Micobacterioses Atípicas. In: Silva LCC. *Condutas em pneumologia*. Rio de Janeiro (RJ): Revinter 1, 2001. p. 445-451.

23. Dantec L, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vicente V. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 68: 5318-5325, 2002.
24. Delwart EL, Sheppard HW, Walker BD, Goudsmit J, Mullins JI. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Evolution In Vivo Tracked by DNA Heteroduplex Mobility Assays. *J Virol* 8: 6672-6683, 1994.
25. Duarte RS, Lourenço MC, Fonseca L de S, Leão SC, Amorim Ede L, Rocha IL, Coelho FS, Viana-Niero C, Gomes KM, da Silva MG, Lorena NS, Pitombo MB, Ferreira RM, Garcia MH, de Oliveira GP, Lupi O, Vilaça BR, Serradas LR, Chebabo A, Marques EA, Teixeira LM, Dalcolmo M, Senna SG, Sampaio JL. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol* 47: 2149-2155, 2009.
26. Euzéby JP. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr>. Acesso em: jul/2010.
27. Falkingham III JO. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 9: 77-215, 1996.
28. Field SK, Cowie RL. Lung Disease Due to the More Common Nontuberculous Mycobacteria. *Chest* 129: 1653-1672, 2006.
29. Fontana RS. As micobactérias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. *Rev Bras Enferm* 61: 371-376, 2008.
30. Ganguly NK. What is new in diagnosis of tuberculosis? Part I: techniques for diagnosis of tuberculosis. *ICMR Bulletin* 32, 2002. Disponível em: <http://icmr.nic.in/buang02.pdf>. Acesso em: ago/2009.
31. Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D, Singh R, Malhotra D, Ramnani VK, Prasad GBKS, Chandra R, Frazino M, Colizzi F, Bisen PS. Diagnosis of Tuberculosis: Available Technologies, Limitations, and Possibilities. *J Clin Lab Anal* 17: 155-163, 2003.
32. Gentry CA. Atypical Mycobacteria. In: Schumockv GT, Brundage D, Chessman K, Dunsworth T, Fagan S, Kelly W, Rathburn R, Richie D, Semla T, Vasquez E, Zarowitz B. *Pharmacotherapy Self-Assessment Program – Infectious Diseases II*. 5.ed. Kansas City: American College of Clinical Pharmacy, 2005.
33. Goodfellow M, Magee JG. Taxonomy of Mycobacterium. In: *Mycobacteria I Basic Aspects v. I*. New York: Chapman and Hall Medical Microbiology Series, v.1, 1997. p. 99-126.
34. Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* 42: 1.756-1.763, 2006.
35. Gumber S, Taylor DL, Whittington RJ. Protein extraction from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Comparison of methods for analysis by sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis, native PAGE and surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *J Microbiol Meth* 68: 115-127, 2007.
36. Gutierrez RS, Santos BR, Espina CAA, Azambuja HCP, Silva LCC. Tuberculose. In: Silva LCC. *Condutas em pneumologia*. Rio de Janeiro (RJ): Revinter 1: 2001. p. 412-444.
37. Haddad DJ, Ide J, Ferrazoli L, Seiscento M, Telles MAS, Maria Martins C, Leite OM, Ueki SYM. *Micobacterioses: Recomendações para o diagnóstico e tratamento*. Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo. Coordenação de Doenças Infecciosas, 2005. p.29.
38. Henry MT, Inamdar L, O'riordain D, Schweiger M, Watson JP. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *Eur Respir J* 23: 741-746, 2004.
39. Hermans PWM, Schuitema, ARJ, van Soolingen D, Versteynen CPHJ, Bik EM, Thole JER, Kolk AHJ, van Embden JDA. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28: 1.204-1.213, 1990.
40. Hughes MS, Skuce RA, Beck LA, Neill SD. Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. *J Clin Microbiol* 31: 3.216-3.222, 1993.
41. Jarzembowski JA, Young MB. Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Arch Pathol Lab Med* 132: 1.333-1.341, 2008.

42. Kanufre KA. Tuberculose pulmonar: aumento da eficiência diagnóstica pela associação de métodos microbiológicos e imunológicos para pesquisa de anticorpos IgG anti - *Mycobacterium tuberculosis* por *Western blotting* e interferon-gama. 141 f. [Tese Doutorado em Fisiopatologia Experimental] – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
43. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res* 120: 290-304, 2004.
44. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Diseases in Immunocompetent Patients. *Korean J Radiol* 3: 145-157, 2002.
45. Leão SC, Martin A, Meija GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS, Portaels F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. 1. ed. European Commission, International Cooperation for Developing Countries, 2004. Disponível em: <http://www.esmycobacteriology.eu/PDF%20files/foreword.pdf>. Acesso em: out/2009.
46. Lopes ML, Lima KVB, Leão SC, Sousa MS, Santi LQ, Loureiro ECB. Micobacterioses associadas a procedimentos médicos invasivos em Belém (nota prévia). *Rev Para Med* 19: 87-89, 2005.
47. Lopes AJ, Capone D, Mogami R, Tessarolo B, Cunha DL, Capone RB, Siqueira HR, Jansen JM. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão* 15: 253-261, 2006.
48. Macente S, Ribeiro FHM. Diagnóstico molecular de *M. tuberculosis*. *Saud Pesq* 2: 225-231, 2009.
49. Marinho A, Fernandes G, Carvalho T, Pinheiro D, Gomes I. Micobactérias atípicas em doentes sem síndrome de imunodeficiência adquirida. *Rev Port Pneumol* 14: 323-337, 2008.
50. Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Ostergaard Thomsen V, Curcio M, Fauville-Dufaux M, Feldman K, Havelkova M, Katila M-L, Köksalan K, Pereira MF, Rodrigues F, Pfyffer GE, Portaels F, Rosselló Urgell J, Rüscher-Gerdes S, Tortoli E, Vincent V, Watt B. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multicountry retrospective survey. *Int J Tubercul Lung Dis* 8: 1.186-1.193, 2004.
51. Martínez S, Mcadams HP, Batchu CS. The many faces of pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. *Am J Roentgenol* 189: 177-186, 2007.
52. Mello FCQ. Modelos Preditivos para o diagnóstico de Tuberculose Pulmonar Paucibacilar. 2001. 186 f. [Tese Doutorado em Clínica Médica] – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
53. Mello FCQ, Fonseca-Costa JA. Utilidade da biologia molecular no diagnóstico da tuberculose. *J Bras Pneumol* 31: 188-190, 2005.
54. Menon PK, Kapila K, Ohri VC. Recent advances in tuberculosis diagnostic techniques. *MJAFI* 56: 143-148, 2000.
55. Niemann S, Richter E, Rüscher-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol* 38: 152-157, 2000.
56. Pandolfi JR, Malaspina AC, Santos ACB, Suffys PN, Oellemann MAC, Valentini SR, Leite CQF. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev Cienc Farm Básica Apl* 28: 251-257, 2007.
57. Pedro HSP, Pereira MIF, Goloni MRA, Ueki SYM, Chimara E. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. *J Bras Pneumol* 34: 950-955, 2008.
58. Pitombo MB, Lupi O, Duarte RS. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? *Rev Bras Ginecol Obstet* 31: 529-533, 2009.
59. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 17: 98-106, 2004.
60. Ramachandran R, Paramasivan CN. What is new in the diagnosis of tuberculosis? *Indian Journal of Tuberculosis* 50: 133-141, 2003.
61. Reniss – Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde. *Casos de infecção por micobactérias não tuberculosas notificadas*. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/notificados.pdf, 2009. Acesso em: ago/2009.

62. Rocha AS, Barreto AMW, Campos ED, Silva MVB, Fonseca L, Saad MH, Degraive WM, Suffys PN. Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. *J Clin Microbiol* 40: 4.191-4.196, 2002.
63. Rosemberg J, Tarantino AB. Tuberculose. In: Tarantino AB. *Doenças pulmonares*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.294-380.
64. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª ed. v.2. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 8.4-8.12.
65. Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo. *Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento*. São Paulo, 2005. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/TB/mat_tec/TB11_3MNTSB.pdf. Acesso em: out/2009.
66. Silva FCS, Ueki YM, Geiger DCP, Leão SC. *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteri in the clinical laboratory. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 43: 25-28, 2001.
67. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger BT. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *J Clin Microbiol* 31: 175-178, 1993.
68. Ueki SYK, Martins MC, Telles MAS, Virgilio MC, Giampaglia CMS, Chimara E, Ferrazoli L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med Lab* 41: 1-8, 2004.
69. van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Sol DR, van Embden A. The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of IS dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29: 2.578-2.586, 1991.
70. Wang YN, Chi CQ, Cai M, Lou ZY, Tang YQ, Zhi XY, Li WJ, Wu XL, Du X. *Amycolicococcus subflavus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 638-643, 2010.
71. Waléria-Aleixo A, Kroon EG, Campos MAS, Marguti-Pinto ME, Bonjardim CA, Ferreira PC. Heteroduplex mobility assay for rapid, sensitive and specific detection of mycobacteria. *Diagn Micr Infec Dis* 36: 225-235, 2000.
72. Who – World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing, Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report, 2009. Acesso em: out/2009.
73. Wu TL, Chia JH, Kuo AJ, Su LH, Wu TS, Lai HC. Rapid identification of mycobacteria from smear-positive sputum samples by nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 46: 3.591-3.594, 2008.
74. Yuen LK, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J Clin Microbiol* 31: 1615-1618, 1993.

PRÓXIMOS EVENTOS NA ÁREA DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

MEETINGS TO BE HELD ON THE AREA OF TROPICAL PATHOLOGY AND PUBLIC HEALTH

XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, São Paulo, SP, 25 a 27 de agosto de 2011. Informações: www.qeeventos.com.br/cbparasito2011

XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia e XXXVIII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em doença de Chagas, Foz do Iguaçu, PR, 19 a 21 de setembro de 2011. Informações em: www.sbpz.org.br

XX Congreso de la FLAP (Federación Latino Americana de Parasitología) y XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, Bogotá, Colombia, 27 de septiembre a 1º de octubre de 2011. Informaciones: xxcongresoflap2011@uniandes.edu.co

XXVI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 02 a 06 de outubro de 2011, Foz do Iguaçu, Paraná. Informações: <http://www.sbmicrobiologia.org.br/26cbm>

27ª Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e 15ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, Uberaba, MG, 26 a 28 de outubro de 2011. Informações em: www.chagasleish2011.com.br/home.html

38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet 2011), 01 a 04 de novembro de 2011, Florianópolis, Santa Catarina. Informações: <http://www.conbravet2011.com.br>

VIII Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 12 a 16 de novembro de 2011, São Paulo. Informações: <http://www.epi2011.com.br/>

60th Annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Philadelphia, USA, 4rd to 8th December, 2011. Information: www.astmh.org/meetings

XVIII International Congress for Tropical Medicine and malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, Rio de Janeiro, 23 to 28th September 2012. Informações: <http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/index.html>