



Micobactérias não tuberculosas em pacientes com suspeita de tuberculose e a diversidade genética de *Mycobacterium avium* no extremo sul do Brasil

Caroline Busatto¹ , Júlia Silveira Vianna¹ , Ana Barbara Scholante Silva¹ ,
Rossana Basso² , Jussara Silveira² , Andrea Von Groll¹ , Ivy Bastos Ramis¹ ,
Pedro Eduardo Almeida da Silva¹

1. Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica – NUPEMM – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande (RS) Brasil.
2. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande (RS) Brasil.

Recebido: 29 maio 2019.

Aprovado: 4 agosto 2019.

Trabalho realizado no Laboratório de Micobactérias, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande (RS) Brasil.

RESUMO

Objetivo: As micobactérias não tuberculosas (MNT) são um grupo heterogêneo de bactérias amplamente distribuídas na natureza e relacionadas com infecções oportunistas em seres humanos. Os objetivos deste estudo foram identificar MNT em pacientes com suspeita de tuberculose e culturas positivas e avaliar a diversidade genética de cepas identificadas como *Mycobacterium avium*. **Métodos:** Foram estudadas amostras pulmonares e extrapulmonares provenientes de 1.248 pacientes. As amostras que apresentaram resultado positivo em cultura e negativo para o complexo *M. tuberculosis* na identificação molecular foram avaliadas por meio da detecção dos genes *hsp65* e *rpoB* e de sequenciamento de fragmentos conservados desses genes. Todas as cepas identificadas como *M. avium* foram genotipadas pelo método *mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat* com oito loci. **Resultados:** Das 332 micobactérias isoladas, 25 (7,5%) eram MNT. Dessas 25, 18 (72%) eram *M. avium*, 5 (20%) eram *M. abscessus*, 1 (4%) era *M. gastri* e 1 (4%) era *M. kansasii*. As 18 cepas de *M. avium* apresentaram alta diversidade, e apenas duas eram geneticamente relacionadas. **Conclusões:** Esses resultados mostram a necessidade de considerar a investigação de MNT em pacientes com suspeita de tuberculose ativa e culturas positivas e de avaliar a diversidade genética de cepas de *M. avium*.

Descritores: *Mycobacterium avium*; Micobactérias não tuberculosas; HIV; Técnicas de genotipagem.

INTRODUÇÃO

A incidência de infecções por micobactérias não tuberculosas (MNT) tem aumentado em todo o mundo, atraindo atenção em contextos diagnósticos de rotina, principalmente em pacientes com suspeita de tuberculose. Reconhecidas como patógenos primários em seres humanos, as MNT são as principais causas de infecções oportunistas em pessoas com HIV.⁽¹⁾ As infecções por MNT ocorrem frequentemente no trato respiratório e podem progredir para doença pulmonar grave, aumentando assim a morbidade e mortalidade.⁽²⁾

Entre as espécies de MNT mais importantes e frequentemente isoladas estão membros do *Mycobacterium avium complex* (MAC, complexo *Mycobacterium avium*), particularmente *M. avium* e *M. intracellulare*, seguidas por *M. abscessus*.⁽³⁾ Em virtude da onipresença do MAC no ambiente, supõe-se que a exposição a condições ambientais seja a forma mais comum de transmissão dessas MNT para o hospedeiro, embora seja um grande desafio provar a transmissão por fonte ambiental ou a transmissão direta de paciente para paciente. No entanto, aventou-se a possibilidade de transmissão de *M. abscessus* de paciente para paciente⁽⁴⁾ e, em um estudo recente,

nematóides foram usados para determinar se *M. avium* poderia ser transmitida de hospedeiro para hospedeiro.⁽⁵⁾ Os resultados do estudo sugeriram que é possível adquirir *M. avium* tanto de uma fonte viva — um paciente infectado que tenha uma doença pulmonar crônica, por exemplo — como do ambiente externo.

A distribuição das espécies de MNT que causam infecções varia de acordo com a região geográfica. Portanto, é mais desafiador definir a epidemiologia de infecções causadas por MNT em países em desenvolvimento do que a da tuberculose, porque, diferentemente do que acontece com a tuberculose, não é obrigatória a notificação de casos de infecção por MNT.^(3,6) Para obter dados epidemiológicos confiáveis e prescrever a terapia adequada, é importante identificar com precisão a MNT responsável. A identificação de bacilos álcool-ácido resistentes ou uma cultura positiva não permitem que se diferenciem as espécies micobacterianas.^(7,8)

A *American Thoracic Society* divulgou critérios diagnósticos para auxiliar no diagnóstico de doenças causadas por MNT.⁽⁷⁾ São necessários dados clínicos, radiográficos e (principalmente) microbiológicos; devem ser coletados três ou mais espécimes de escarro para

Endereço para correspondência:

Caroline Busatto. Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica – NUPEMM – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rua General Osório, s/n, Centro, CEP 96200-400, Rio Grande, RS, Brasil.

Tel.: 55 51 99802-0024. E-mail: caroline-busatto@hotmail.com

Apoio financeiro: Nenhum.

microscopia e cultura ou espécimes broncoscópicos. Embora o diagnóstico de doença causada por MNT baseie-se no isolamento dos organismos em cultura de espécimes diagnósticos, o simples isolamento de uma MNT não significa que a doença esteja presente. Existem pelo menos três fatores que podem ajudar os clínicos a diferenciar doença de colonização⁽⁹⁾: a carga bacteriana, as espécies isoladas e a presença ou ausência de progressão clínica ou radiográfica.

Embora a identificação de espécies possa ser realizada por métodos bioquímicos, essa abordagem é trabalhosa e sua reprodutibilidade é ruim. Técnicas moleculares, tais como sequenciamento completo do genoma, análise de fragmentos de restrição por PCR, hibridização com sonda em linha e sequenciamento de fragmentos dos genes *hsp65* e *rpoB*, têm sido amplamente usadas e têm clara vantagem sobre os métodos fenotípicos.^(10,11)

Além da identificação das espécies envolvidas no processo infeccioso, as ferramentas de biologia molecular permitem a genotipagem e diferenciação de isolados da mesma espécie, permitindo assim o estabelecimento de vínculos epidemiológicos. O uso de RFLP com a sequência de inserção (IS, do inglês *insertion sequence*) 1245 como alvo, que é considerado o método padrão ouro para a genotipagem de cepas de *M. avium*, foi modificado pela introdução do método *mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat* (MIRU-VNTR), cujo poder discriminatório é semelhante ao da análise de RFLP com IS1245. As principais vantagens do método MIRU-VNTR são sua simplicidade, resultados rápidos e reprodutibilidade.^(12,13)

Os principais objetivos deste estudo foram determinar a prevalência de MNT em pacientes com suspeita de tuberculose e culturas positivas e avaliar a diversidade clonal de *M. avium*.

MÉTODOS

Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo no qual foram analisadas amostras pulmonares e extrapulmonares provenientes de 1.248 pacientes com suspeita de tuberculose no Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Junior, em Rio Grande (RS). As amostras foram recebidas no Laboratório de Micobactérias da Universidade Federal do Rio Grande entre janeiro de 2014 e dezembro de 2016. As informações referentes às características dos pacientes foram extraídas dos prontuários médicos e do banco de dados do Laboratório de Micobactérias. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande (número de referência: 47/2017).

Procedimentos experimentais

Para PCR, sequenciamento e genotipagem, foi usado DNA extraído de amostras com resultado positivo em cultura líquida em um sistema automatizado (BACTEC

Mycobacteria Growth Indicator Tube; Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA). As amostras que não foram identificadas como *M. tuberculosis* por PCR com IS6110 foram submetidas a PCR para detecção de fragmentos dos genes *hsp65* e *rpoB*. As amostras com resultado positivo para ambos os genes foram sequenciadas para que se identificassem as espécies micobacterianas. Em seguida, todas as cepas identificadas como *M. avium* foram genotipadas pelo método MIRU-VNTR com oito loci (Figura 1).

Extração do DNA

Para a extração do DNA, colônias de micobactérias cultivadas em meio líquido foram ressuspensas em Tris-EDTA 1× e incubadas durante 30 min a 80°C para a inativação das bactérias. Em seguida, o DNA foi extraído pelo método do brometo de cetiltrimetilamônio/NaCl, como o descreveram van Soolingen et al.⁽¹⁴⁾

PCR para *hsp65* e *rpoB*

Um fragmento do gene *hsp65* foi detectado por meio dos iniciadores TB11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCAT-3') e TB12 (5'-CTTGTGCAACCGCATACCCT-3'), que amplificam um fragmento de 441 pb. Para a detecção do fragmento do gene *hsp65*, a PCR foi realizada como a descreveram Telenti et al.⁽¹⁵⁾ Além disso, um fragmento do gene *rpoB* foi detectado por meio dos iniciadores MycoF (5'-GGCAAGGTCACCCGAAGGG-3') e MycoR (5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3'), que amplificam um fragmento de 764 pb. Para a detecção do fragmento do gene *rpoB*, a PCR foi realizada como a descreveram Adekambi et al.⁽¹⁶⁾

Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático (ABI 3500 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos da PCR foram marcados com 5 pmol do iniciador TB11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCAT-3'), para o gene *hsp65* ou com 5 pmol do iniciador MycoF (5'-GGCAAGGTCACCCGAAGGG-3'), para o gene *rpoB*, juntamente com 1 µL de reagente (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems), para 4,5 µL de produto de PCR purificado em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em um termociclador de 96 poços (Veriti; Applied Biosystems) com desnaturação a 96°C por 1 min e, em seguida, 35 ciclos a 96°C por 15 s, 50°C por 15 s e 60°C por 4 min. Após a marcação, as amostras foram purificadas por precipitação com etanol/EDTA e analisadas no sequenciador automático. As sequências obtidas foram analisadas por meio do programa Chromas, versão 2.6 (Technelysium, Southport, Austrália), e as sequências foram alinhadas por meio da *Basic Local Alignment Search Tool* no site do *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Genotipagem de *M. avium*

O método MIRU-VNTR foi realizado com os iniciadores descritos por Thibault et al.⁽¹²⁾ e oito loci. A PCR foi

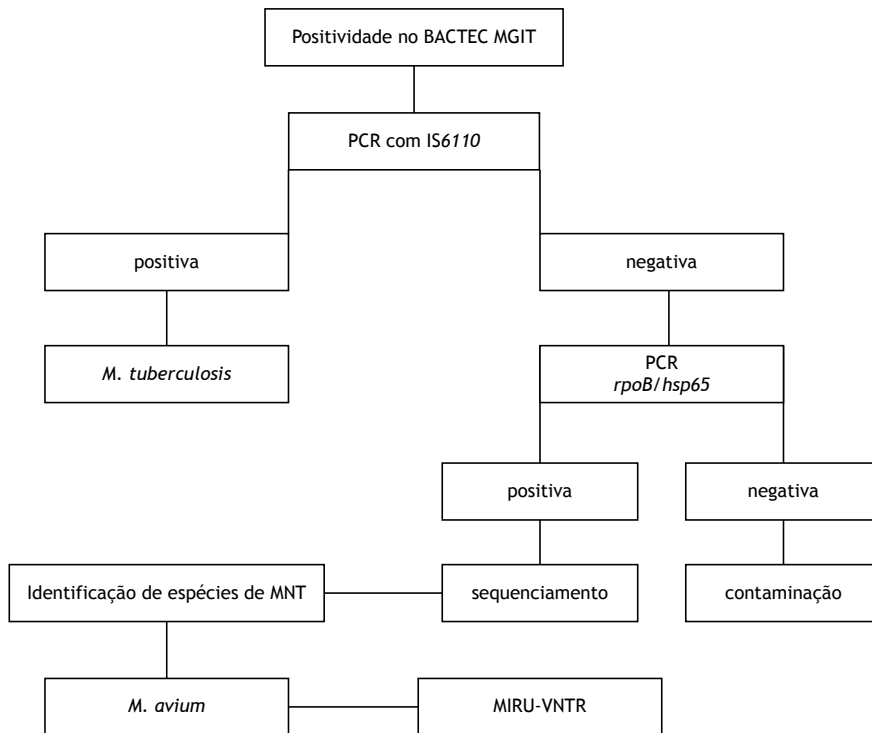


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos experimentais. MGIT: *Mycobacteria Growth Indicator Tube*; *M.*: *Mycobacterium*; MNT: micobactérias não tuberculosas; e MIRU-VNTR: (método) *mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat*.

realizada conforme descrito no banco de dados MAC-INMV (<http://mac-inmv.tours.inra.fr>). Os tamanhos dos fragmentos foram determinados pelo número de repetições em tandem em cada locus. Os produtos da PCR foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 3%, com coloração com 0,001 mg/mL de brometo de etídio e visualização da fluorescência na luz UV. Escadas de DNA de 50 pb e 100 pb (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil) foram usadas para definir o tamanho dos produtos da PCR.

A diversidade alélica de cada locus de MIRU-VNTR foi calculada pela seguinte equação:

$$h = 1 - \sum x_i^2 [n / (n - 1)]$$

em que h é a heterozigosidade no locus, x_i é a frequência alélica no locus e n é o número de cepas. De acordo com h , o poder discriminatório dos loci foi classificado em alto ($h > 0,6$), moderado ($h \leq 0,6$) e baixo ($h < 0,3$).⁽¹⁷⁾

RESULTADOS

Identificação de MNT

Dos 1.248 pacientes com suspeita de tuberculose, 332 apresentaram culturas positivas para micobactérias. Destes, 25 (7,5%) estavam infectados por MNT. Desses 25 pacientes, 20 (80%) haviam sido submetidos ao teste de HIV e 13 (52%) eram HIV positivos. Além disso, 18 (72%) eram homens, ao passo que apenas 7 (28%) eram mulheres. A mediana de idade foi de 46 anos (variação: 26-78 anos).

As espécies de MNT foram identificadas como *M. avium* em 18 (72%) dos 25 pacientes, como *M. abscessus* em 5 (20%), como *M. gastri* em 1 (4%) e como *M. kansasii* em 1 (4%). Dos 18 pacientes infectados por *M. avium*, 10 (55,5%) eram HIV positivos, 5 (20,0%) eram HIV negativos e 3 (16,7%) apresentavam sorologia desconhecida. Como se pode observar na Tabela 1, 23 (92%) das amostras nas quais foram identificadas espécies de MNT eram de origem pulmonar (escarro, lavado broncoalveolar ou aspirado traqueal).

Genotipagem de *M. avium*

Dezoito cepas de *M. avium* foram analisadas pelo método MIRU-VNTR com oito loci; 16 (88,9%) foram classificadas em cepas órfãs e 2 foram agrupadas, formando assim o único conglomerado (Figura 2). Como mostra detalhadamente a Tabela 2, foram identificados 17 padrões INMV previamente desconhecidos e um padrão conhecido (INMV 78).

Os valores da diversidade alélica nas amostras analisadas foram calculados para cada locus e são apresentados na Tabela 3. Os loci X3, 25, 10 e 32 foram altamente discriminatórios ($h \geq 0,6$); X3 e 10 foram os mais polimórficos, com oito alelos diferentes cada.

DISCUSSÃO

O aumento da incidência de infecções por MNT nos casos de suspeita de tuberculose é um enorme desafio na prática clínica. Dentre as possíveis explicações para o aumento do número de casos desse tipo estão a

Tabela 1. Características dos pacientes infectados por micobactérias não tuberculosas.

Paciente	Idade	Sexo	Sorologia para HIV	Contagem de CD4 (células/mm ³)	Espécime clínico	Resultado do sequenciamento
1676	71	F	Positiva	12	Escarro	<i>M. abscessus</i>
1871	67	M	Negativa		Escarro	<i>M. avium</i>
1895	41	M	Positiva	56	LBA	<i>M. avium</i>
1896	58	M	Desconhecida		Escarro	<i>M. avium</i>
1901	69	M	Desconhecida		Escarro	<i>M. abscessus</i>
2006	46	F	Negativa		Escarro	<i>M. abscessus</i>
2091	26	F	Positiva	54	BH	<i>M. avium</i>
3036	37	F	Positiva	183	LBA	<i>M. avium</i>
3145	28	F	Positiva	544	Escarro	<i>M. avium</i>
3168	46	M	Positiva	152	AT	<i>M. avium</i>
3366	49	M	Negativa		Escarro	<i>M. avium</i>
3390	30	F	Positiva	Desconhecida	Escarro	<i>M. avium</i>
3491	54	M	Positiva	22	Escarro	<i>M. gastri</i>
3471	38	M	Positiva	266	Escarro	<i>M. avium</i>
3594	58	M	Desconhecida		Escarro	<i>M. avium</i>
3717	55	M	Desconhecida		Escarro	<i>M. avium</i>
3811	32	M	Positiva	290	Escarro	<i>M. avium</i>
3870	42	M	Positiva	4	Escarro	<i>M. avium</i>
3913	36	F	Negativa		Escarro	<i>M. avium</i>
4111	78	M	Negativa		Escarro	<i>M. avium</i>
4127	59	M	Desconhecida		Escarro	<i>M. kansasii</i>
4161	40	M	Positiva	55	Escarro	<i>M. abscessus</i>
4307	45	M	Negativa		LBA	<i>M. abscessus</i>
4425	46	M	Positiva	153	GC	<i>M. avium</i>
4695	37	M	Negativa		Escarro	<i>M. avium</i>

F: feminino; M: masculino; M.: *Mycobacterium*; LBA: lavado broncoalveolar; BH: biópsia hepática; AT: aspirado traqueal; e GC: gânglio cervical.

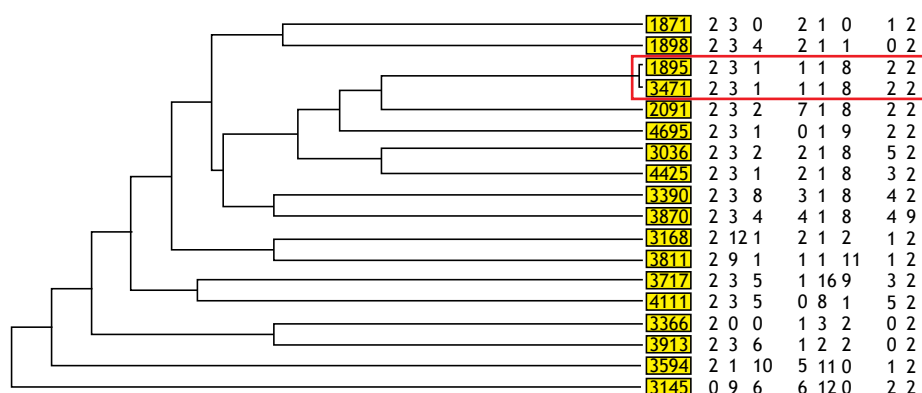


Figura 2. Vínculos epidemiológicos entre pacientes.

melhora da capacidade diagnóstica dos laboratórios e o aumento do conhecimento a respeito de infecções desse tipo em contextos clínicos.⁽¹⁸⁾ No presente estudo, MNT foram identificadas em 7,5% das culturas positivas em pacientes com suspeita de tuberculose. Esse resultado é consistente com os de outros estudos, nos quais MNT foram identificadas em 4-10% das culturas positivas nesses pacientes.⁽¹⁹⁻²¹⁾

Outros estudos mostraram que a prevalência de MNT é maior em homens e em indivíduos com mais de 40

anos de idade (72% e 68%, respectivamente).^(22,23) Além disso, 92% das MNT são isoladas em espécimes respiratórios e, portanto, indivíduos com idade avançada poderiam ser mais suscetíveis a infecções respiratórias causadas por MNT.⁽¹⁹⁾

É importante notar que a incidência de infecção por MNT pode ser 9,7 vezes maior em pacientes infectados pelo HIV, especialmente naqueles com contagem de células CD4 < 100 células/mm³.⁽²⁴⁾ Estudos recentes realizados no Brasil relataram que *M. avium* é a espécie

Tabela 2. Padrões de 18 cepas de *Mycobacterium avium* avaliadas pelo método *mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat*.

Paciente	Loci de interesse no método MIRU-VNTR								Padrão INMV
	292	X3	25	47	3	7	10	32	
	Número de repetições em tandem								
1871	2	2	1	3	1	2	0	0	Ainda não listado
1895	2	1	2	3	1	2	1	8	Ainda não listado
1896	2	2	0	3	1	2	4	1	Ainda não listado
2091	2	7	2	3	1	2	2	8	Ainda não listado
3036	2	2	5	3	1	2	2	8	Ainda não listado
3366	2	1	0	0	3	2	0	2	Ainda não listado
3390	2	3	4	3	1	2	8	8	Ainda não listado
3471	2	1	2	3	1	2	1	8	Ainda não listado
3594	2	5	1	1	11	2	10	0	Ainda não listado
3717	2	1	3	3	16	2	5	9	Ainda não listado
3811	2	1	1	9	1	2	1	11	Ainda não listado
3870	2	4	4	3	1	9	4	8	Ainda não listado
3913	2	1	0	3	2	2	6	2	Ainda não listado
4695	2	0	2	3	1	2	1	9	Ainda não listado
4425	2	2	3	3	1	2	1	8	78*
3145	0	6	2	9	12	2	6	0	Ainda não listado
3168	2	2	1	12	1	2	1	2	Ainda não listado
4111	2	0	5	3	8	2	5	1	Ainda não listado

MIRU-VNTR: *mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat*; INMV: MAC-Institut National de la Recherche Agronomique Nouzilly MIRU-VNTR; e *M.*: *Mycobacterium*. **M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Tabela 3. Diversidade alélica pelo método *mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat* com oito loci.

N. de alelos	MIRU 292	MIRU X3	MIRU 25	MIRU 47	MIRU 3	MIRU 7	MIRU 10	MIRU 32
0	1	2	3	1			2	3
1		6	4	1	12		6	2
2	17	5	5		1	17	2	3
3		1	2	13	1			
4		1	2				2	
5		1	2				2	
6		1					2	
7		1						
8					1		1	7
9				2		1		2
10							1	
11					1			1
>12				1	2			
Medidas de diversidade								
h	0,104	0,783	0,808	0,456	0,540	0,104	0,820	0,765
PD*	Baixo	Alto	Alto	Mod	Mod	Baixo	Alto	Alto

MIRU: *mycobacterial interspersed repetitive unit*; h: heterozigiosidade; PD: poder discriminatório; e Mod: moderado.

*O poder discriminatório é definido, de acordo com a diversidade alélica (heterozigiosidade), como sendo alto ($h > 0,6$), moderado ($h \leq 0,6$) ou baixo ($h < 0,3$).

de MNT mais frequentemente isolada em espécimes respiratórios provenientes de pacientes infectados pelo HIV.^(25,26)

O presente estudo foi realizado em um hospital de referência para pacientes infectados pelo HIV, no Rio Grande do Sul, onde a prevalência de infecção pelo HIV é de 38,3 casos/100.000 habitantes, a segunda maior

entre todos os estados do país.⁽²⁷⁾ Entre os pacientes infectados por MNT, a maioria estava infectada por *M. avium* (72,0%), e 55,5% desses pacientes estavam coinfectados pelo HIV. Essas infecções geram alta morbidade e custos econômicos, pois os tratamentos atuais têm múltiplos efeitos colaterais e uma taxa de cura por intenção de tratamento < 50%.⁽²⁸⁾

No Brasil, os dados disponíveis sugerem que há diferenças regionais na distribuição das espécies de MNT, especialmente nas proporções relativas de MAC e *M. kansasii*. Carneiro et al.⁽²⁵⁾ também constataram que as espécies do MAC são as mais comuns MNT causadoras de infecção respiratória no estado do Rio Grande do Sul. No entanto, em um centro de referência no estado do Rio de Janeiro, *M. kansasii* foi responsável por um terço de todas as infecções por MNT.⁽²⁹⁾ O fato de que o número de pacientes infectados pelo HIV é maior no Rio Grande do Sul do que no Rio de Janeiro é o motivo mais provável da maior prevalência de infecção respiratória causada por MAC no Rio Grande do Sul.⁽²⁹⁾ Sugeriu-se que, além da presença de cofatores como a infecção pelo HIV, fatores do hospedeiro e fatores ambientais interagem de modo a influenciar o risco de doença e a distribuição geográfica da infecção por MNT.

A infecção por *M. avium* pode ter apresentações clínicas e radiológicas indistinguíveis das da tuberculose, dificultando sua diferenciação e diagnóstico. A identificação precisa de espécies de MNT é fundamental porque o manejo e tratamento de pacientes infectados e as ferramentas de controle epidemiológico empregadas devem refletir as espécies de micobactérias isoladas e suas fontes.⁽³⁰⁾

Estudos sobre a epidemiologia de *M. avium* já se basearam em métodos de tipagem, como a análise de RFLP com IS1245 como sonda, e atualmente baseiam-se em métodos de tipagem como o MIRU-VNTR.⁽¹³⁾ Thibault et al.⁽¹²⁾ padronizaram o método MIRU-VNTR usando oito loci para estudar a variabilidade em cepas de *M. avium* provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas.

Nos últimos cinco anos, vários genótipos de *M. avium* provenientes de diversos hospedeiros (humanos e animais) foram identificados e registrados em um aplicativo denominado banco de dados MAC-INMV (<http://mac-inmv.tours.inra.fr>).⁽¹²⁾ No presente estudo, descrevemos, pela primeira vez, dezessete padrões que serão posteriormente incluídos no banco de dados. O único padrão que já havia sido descrito foi o INMV 78 (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*), previamente isolado em um caprino.⁽³¹⁾ Esse padrão difere dos relatados anteriormente como sendo os mais prevalentes em diferentes partes do mundo (INMV 1 e 2).^(12,32) No entanto, é preciso ter cautela ao usar a subtipagem VNTR porque ela pode superestimar ou subestimar a relação entre as cepas em virtude da instabilidade de alguns elementos repetitivos no genoma.⁽³³⁾

Apesar da ampla aceitação do método MIRU-VNTR, é muitas vezes difícil comparar os resultados de diferentes estudos nos quais o método é usado, em virtude da falta de padronização. Esses estudos envolvem diversos hospedeiros (tais como animais bovinos, caprinos e ovinos), loci (tais como 7, 8, 16 e 20) e metodologias.^(32,34,35) No entanto, oito loci

específicos (292, X3, 25, 47, 3, 7, 10 e 32) são os mais usados no método MIRU-VNTR e apresentam alto poder discriminatório.^(12,36)

No presente estudo, encontramos apenas um conglomerado de cepas, composto por duas cepas de *M. avium*. Parece-nos interessante que os pacientes 1895 e 3471 tenham ocupado o mesmo leito no hospital em um curto período (de 30 dias). Ambos eram HIV positivos e estavam imunodeprimidos, de acordo com a contagem de CD4. O primeiro paciente a ocupar o leito (o paciente 1895) relatou que havia trabalhado no campo e que havia tido contato com aves. Embora haja relatos de que humanos e animais adquirem a infecção por *M. avium* de fontes ambientais,⁽³⁷⁾ a transmissão direta entre animais e humanos não pode ser excluída, porque os perfis genéticos de cepas isoladas em ambos os hospedeiros são semelhantes. Além disso, o solo, a água e biofilmes podem ser importantes fontes de transmissão de *M. avium* em virtude de sua capacidade de sobreviver por um longo período (200-600 dias) nesses ambientes.⁽³⁶⁻³⁸⁾

No tocante à diversidade alélica, alguns loci foram altamente discriminatórios e devem ser priorizados para a rápida diferenciação de cepas de *M. avium*. De acordo com um estudo anterior,⁽³⁹⁾ X3 é um dos loci mais discriminatórios, assim como o são os loci 3 e 10, embora os dois últimos tenham sido descritos como sendo menos adequados para tipagem. Os sete loci apresentaram baixa diversidade alélica (0,104), o que é consistente com os achados de outro estudo.⁽⁴⁰⁾

No presente estudo, *M. avium* foi a MNT mais frequentemente identificada nas culturas positivas de casos com suspeita de tuberculose. Além disso, a infecção pelo HIV foi a principal causa predisponente para doenças infecciosas por MNT.

Pelo que sabemos, este foi o primeiro estudo no qual o método MIRU-VNTR com oito loci foi usado como ferramenta para avaliar a diversidade clonal de cepas de *M. avium* isoladas em seres humanos no extremo sul do Brasil. Observamos alta diversidade clonal, com apenas um conglomerado (composto por duas cepas). Vale notar que as duas cepas do conglomerado provieram de pacientes que possuíam um vínculo epidemiológico. Embora não possamos afirmar que havia uma ligação entre esses dois casos, também não podemos descartar essa possibilidade.

Nosso estudo foi limitado pelo pequeno número de cepas de *M. avium* estudadas. No entanto, nossos achados ressaltam a necessidade de implantar a identificação rápida e precisa de MNT em culturas positivas em pacientes com suspeita de tuberculose e de usar ferramentas moleculares para monitorar a diversidade clonal de cepas de *M. avium* e estabelecer possíveis vínculos epidemiológicos.

REFERÊNCIAS

1. Varghese B, Memish Z, Abuljadayel N, Al-Hakeem R, Alrabiah F, Al-Hajj SA. Emergence of clinically relevant Non-Tuberculous Mycobacterial infections in Saudi Arabia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2234. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002234>
2. Stout JE, Koh WJ, Yew WW. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int J Infect Dis*. 2016;45:123-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.03.006>
3. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection

- with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med*. 2015;36(1):13-34. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.002>
4. Yan J, Kevat A, Martinez A, Teese N, Johnson K, Ranganatha S, et al. Investigating transmission of *Mycobacterium abscessus* amongst children in an Australian cystic fibrosis centre. *J Cyst Fibros*. 2019;S1569-1993(18)30918-4. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.02.011>
 5. Bermudez LE, Rose SJ, Everman JL, Ziaie NR. Establishment of a Host-to-Host Transmission Model for *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Using *Caenorhabditis elegans* and Identification of Colonization-Associated Genes. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:123. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00123>
 6. Nishiuchi Y, Iwamoto T, Maruyama F. Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:27. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00027>
 7. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases [published correction appears in *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(7):744-5. Dosage error in article text]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367-416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
 8. Ryu YJ, Koh WJ, Daley CL. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2016;79(2):74-84. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.2.74>
 9. Daley CL, Griffith DE. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(6):665-671. PMID: 20487602
 10. Brown-Elliott BA, Phillely JV. Rapidly Growing Mycobacteria. *Microbiol Spectr*. 2017;5(1):10.1128/microbiolspec.TNM17-0027-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNM17-0027-2016>
 11. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(2):319-354. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.319-354.2003>
 12. Thibault VC, Grayon M, Boschirolu ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2404-2410. <https://doi.org/10.1128/JCM.00476-07>
 13. Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, Bodmer T, Telenti A. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J Clin Microbiol*. 1995;33(2):304-307. PMID: PMC227937.
 14. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol*. 1994;235:196-205. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35141-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35141-4)
 15. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):175-178.
 16. Adékambi T, Colson P, Drancourt M. *rpoB*-based identification of non-pigmented and late-pigmented rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 2003;41(12):5699-5708. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5699-5708.2003>
 17. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*. 1986;51(5):873-884. <https://doi.org/10.1128/AEM.51.5.873-884.1986>
 18. Busatto C, Vianna JS, da Silva LV Junior, Ramis IB, da Silva PEA. *Mycobacterium avium*: an overview. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019;114:127-134. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.004>
 19. Hoza AS, Mfinanga SG, Rodloff AC, Moser I, König B. Increased isolation of nontuberculous mycobacteria among TB suspects in Northeastern, Tanzania: public health and diagnostic implications for control programmes. *BMC Res Notes*. 2016;9:109. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1928-3>
 20. Nasiri MJ, Dabiri H, Darban-Sarokhalil D, Hashemi Shahraki A. Prevalence of Non-Tuberculosis Mycobacterial Infections among Tuberculosis Suspects in Iran: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129073>
 21. Nour-Neamatollahie A, Ebrahimzadeh N, Siadat SD, Vaziri F, Eslami M, Sepahi AA, et al. Distribution of non-tuberculosis mycobacteria strains from suspected tuberculosis patients by heat shock protein 65 PCR-RFLP. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(6):1380-1386. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.001>
 22. Anttonenka U, Hofmann-Thiel S, Turaev L, Esenalieva A, Abdulloeva M, Sahalchik E, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF with ProbeTec ET DTB and COBAS TaqMan MTB for direct detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimens. *BMC Infect Dis*. 2013;13:280. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-280>
 23. Dabó H, Santos V, Marinho A, Ramos A, Carvalho T, Ribeiro M, et al. Nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens: clinical significance at a tertiary care hospital in the north of Portugal. *J Bras Pneumol*. 2015;41(3):292-294. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132015000000005>
 24. Procop GW. HIV and mycobacteria. *Semin Diagn Pathol*. 2017;34(4):332-339. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2017.04.006>
 25. Carneiro MDS, Nunes LS, David SMM, Dias CF, Barth AL, Unis G. Nontuberculous mycobacterial lung disease in a high tuberculosis incidence setting in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2018;44(2):106-111. <https://doi.org/10.1590/s1806-37562017000000213>
 26. Pedro HSP, Coelho AGV, Mansur IM, Chiou AC, Pereira MIF, Belotti NCU, et al. Epidemiological and laboratorial profile of patients with isolation of nontuberculous mycobacteria. *Int J Mycobacteriol*. 2017;6(3):239-245. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_87_17
 27. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS e DSTs. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.
 28. Thomson RM, Yew WW. When and how to treat pulmonary non-tuberculous mycobacterial diseases. *Respirology*. 2009;14(1):12-26. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2008.01408.x>
 29. de Mello KG, Mello FC, Borge L, Rolla V, Duarte RS, Sampaio EP, et al. Clinical and therapeutic features of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Brazil, 1993-2011. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(3):393-399. <https://doi.org/10.3201/eid1903.120735>
 30. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):727-752. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14>
 31. Biet F, Sevilla IA, Cochard T, Lefrançois LH, Garrido JM, Heron I, Juste RA, et al. Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol*. 2012;12:264. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-264>
 32. Gioffré A, Correa Muñoz M, Alvarado Pinedo MF, Vaca R, Morsella C, Fiorentino MA, et al. Molecular typing of Argentinian *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates by multiple-locus variable number-tandem repeat analysis. *Braz J Microbiol*. 2015;46(2):557-564. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140283>
 33. Ahlstrom C, Barkema HW, Stevenson K, Zadoks RN, Biek R, Kao R, et al. Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on a national and herd level. *BMC Genomics*. 2015;16(1):161. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1387-6>
 34. Inagaki T, Nishimori K, Yagi T, Ichikawa K, Moriyama M, Nakagawa T, et al. Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2156-2164. <https://doi.org/10.1128/JCM.02373-08>
 35. Leão C, Canto A, Machado D, Sanches IS, Couto I, Viveiros M, et al. Relatedness of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* clinical isolates of human and porcine origins assessed by MLVA. *Vet Microbiol*. 2014;173(1-2):92-100. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.027>
 36. Castellanos E, de Juan L, Domínguez L, Aranaz A. Progress in molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Res Vet Sci*. 2012;92(2):169-179. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.017>
 37. Halstrom S, Price P, Thomson R. Review: Environmental mycobacteria as a cause of human infection. *Int J Mycobacteriol*. 2015;4(2):81-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.03.002>
 38. Cook KL, Britt JS. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 2007;69(1):154-160. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.12.017>
 39. Radomski N, Thibault VC, Karoui C, Cruz K, Cochard T, Gutiérrez C, et al. Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing methods. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1026-1034. <https://doi.org/10.1128/JCM.01869-09>
 40. Rindi L, Buzzigoli A, Medici C, Garzelli C. High phylogenetic proximity of isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* over a two decades-period. *Infect Genet Evol*. 2013;16:99-102. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.022>