

FREQUÊNCIA DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS (MNT) EM PACIENTES ATENDIDOS NO LABORATÓRIO DE ENSINO E PESQUISA EM ANÁLISES CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Igor Tacada (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lívia Gisella Eugenio, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferraciolli, Daniela Ferrari Micheletti, Vera Lucia Dias Siqueira, Rosilene Fressatti Cardoso, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: rblscodro@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

Microbiologia – Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: micobactérias não-tuberculosas, cultura, PCR

Resumo:

As doenças provocadas por micobactérias não tuberculosas (MNT) possuem diversas manifestações. Devido à diferença terapêutica dentro das espécies de micobactérias, a correta diferenciação destas permite a escolha apropriada do tratamento, que é de grande importância no controle da infecção e no conhecimento epidemiológico da doença. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar, retrospectivamente, a frequência de MNT em culturas de amostras de pacientes previamente atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (LEPAC/UEM), utilizando a metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR), no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2016. Este projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP), n. 1.573.890. Das 2.608 culturas para BAAR realizadas, 328 (12,6 %) foram positivas para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e 57 (2,2 %) positivas para MNT. O material clínico mais frequente com presença de MNT foi o escarro (n=49). Das 57 MNT isoladas, somente em 17 pacientes foi possível concluir a identificação completa da bactéria. Pois há necessidade de três amostras com MNT para confirmar a doença, já que esta bactéria pode fazer parte da microbiota humana e nem sempre há colaboração do paciente em retornar ao laboratório. A espécie de MNT mais isolada foi *Mycobacterium intracellulare*. Os dados obtidos sugerem uma maior prevalência de casos de MNT pulmonar e mostra a importância do diagnóstico por biologia molecular. Esta ferramenta fornece diagnóstico rápido e preciso a partir da amplificação de DNA, trazendo confiança nos resultados.

Introdução

Existem atualmente mais de 140 espécies identificadas de micobactérias não tuberculosas (MNT) (URIA, 2010). Há relatos de um aumento no número de casos pulmonares causados por MNT em Ontário, Canadá, de 9.1/100.000 habitantes em 1997 para 14.1/100.000 habitantes em 2003 (MARRAS, 2007). Nos países em desenvolvimento pouco se sabe sobre a infecção causada por MNT (WHO, 2000). A identificação destas espécies micobacterianas não está amplamente disponível em países em desenvolvimento, assim, doenças causadas por MNT não recebem tratamento específico para sua condição, além de muitas não responderem ao tratamento com antibióticos comumente utilizados no caso de *Mycobacterium tuberculosis* (URIA, 2010; KATOCH & MOHAN, 2001). Novas metodologias são empregadas em centros de estudos, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e diminuir o tempo para a detecção de micobactérias em material clínico, bem como para caracterização dos isolados em estudos epidemiológicos (PIERSIMONI, 1998). Sendo assim, o objetivo deste trabalho é analisar a frequência de MNT em pacientes atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2016.

Materiais e métodos

A análise retrospectiva abrangeu os habitantes de 120 municípios com uma população estimada em 716.273 habitantes. Para a realização das culturas para BAAR, as amostras foram incubadas utilizando método automatizado BD BACTEC™MGIT™960 (BD, Franklin Lakes- NJ, EUA). Na PCR foram utilizados os seguintes iniciadores TB11 (5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3') e TB12 (5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3') que amplifica um fragmento com 441 pares de bases (pb) da região intergênica da *hsp65* (complexo *Mycobacterium tuberculosis* e Micobactérias Não-Tuberculosas). Após a eletroforese para confirmação da amplificação, fez-se a digestão dos produtos com enzimas BstEII e HaeIII. A diferenciação das espécies de MNT foi realizada pelo método PRA-*hsp65* (*Polimerase Chain Reaction Analysis of the gene hsp65*). Foram realizadas, no período estudado, 2.608 culturas para BAAR. Os resultados dos exames realizados no LEPAC foram tabelados e as frequências calculadas, utilizando a planilha Excel® 2010. Este projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da UEM, conforme parecer 1.573.890.

Resultados e Discussão

Foram realizadas, no período estudado, 2.608 culturas para BAAR, destas, 328 (12,6 %) foram positivas para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e 57 (2,2 %) positivas para micobactérias não-tuberculosas

(MNT) (tabela 1). Das culturas positivas para MNT, o material clínico mais isolado foi o escarro (n=49), porém não foi possível concluir a identificação das espécies de MNT da maioria das culturas deste material, pois para se fazer a identificação das MNT de materiais que podem possuir estas bactérias como microbiota, deve haver o isolamento da mesma bactéria em pelo menos três amostras. Muitas vezes, o paciente não retorna para a coleta de outras amostras, deixando o resultado com identificação parcial (tabela 2). Das 57 MNT isoladas em todos os materiais, somente em 17 amostras foi realizada a identificação completa da MNT.

Além do escarro foram isoladas MNT em: biópsia de mama, lavado broncoalveolar, líquido sinovial e urina. E as espécies de MNT encontradas foram: *Mycobacterium intracellulare*, *M. intracellulare* / *Mycobacterium chimaera*, *M. abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium lentiflavum* e *Mycobacterium massiliense* / *Mycobacterium bolletii* / *M. abscessus*.

Tabela 1. Frequência absoluta de resultados de exames de culturas para BAAR, no período de 2012 a 2016

Ano	Culturas negativas	Culturas positivas para complexo <i>M. tuberculosis</i>	Culturas positivas para MNT	Total
2012	285	22	0	307
2013	376	72	7	455
2014	516	108	21	645
2015	575	54	19	648
2016	471	72	10	553
Total	2.223	328	57	2.608

BAAR: bacilos álcool-ácido resistentes; *M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*; MNT = Micobactérias não-tuberculosas

Tabela 2. Frequência absoluta de resultados de exames de positivos para micobactérias não tuberculosas (MNT), no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2016

Material biológico	n	Espécies de MNT
Escarro	38	MNT
	49	7 <i>M. intracellulare</i> / <i>M. chimaera</i>
	4	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>
Biópsia de mama	3	2 <i>M. fortuitum</i>
	1	<i>M. abscessus</i>
Lavado broncoalveolar	3	1 MNT

	1	<i>M. intracellulare</i>
	1	<i>M. lentiflavum</i>
Líquido sinovial	1	<i>M. massiliense/ M. bolletii/ M. abscessus</i>
Urina	1	MNT
Total	57	

M.: Mycobacterium

Conclusões

Pode-se inferir que a maior prevalência dos casos de MNT é de acometimento pulmonar, já que a grande maioria foi isolada de amostras de escarro e de lavado broncoalveolar e a espécie de MNT mais isolada foi *Mycobacterium intracellulare*. Como o diagnóstico de MNT é difícil e requer várias amostras para sua confirmação, a biologia molecular se destaca pela sua sensibilidade e especificidade. Esta ferramenta fornece um diagnóstico rápido e preciso a partir da amplificação do DNA micobacteriano, trazendo confiança nos resultados.

Agradecimentos

CNPq, Fundação Araucária, LEPAC/UEM, Laboratório de Bacteriologia Médica – UEM.

Referências

URIA G.A. Lung disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16(3):251-256.

MARRAS T.K et al. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. **Thorax** 2007; 62:661-666.

WHO - **Who Healt Organization**. AIDS Epidemic (2000). Disponível em <http://www.who.int/HIV_AIDS/first.html>. Acesso em 10/07/2010.

KATOCH V.M., MOHAN K.T. Atypical mycobacterial infections. **Tuberculosis**. 1ª ed. New Delhi; 2001. p. 439-51.

PIERSIMONI C. et al. Comparative evaluation of the new Gen-Probe *M. tuberculosis* Amplified Direct Test and Assay for Direct Detection of *M. tuberculosis* Complex in respiratory and extrapulmonary specimens. **J Clin Microbiol** 1998; 36(12):3601-3604.