



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**DESENVOLVIMENTO DE TESTES MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DO
COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* E DE OUTRAS MICOBACTÉRIAS DE
IMPORTÂNCIA CLÍNICA**

Yasmin Castillos de Ibrahim das Neves

Rio Grande, RS

2025



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**DESENVOLVIMENTO DE TESTES MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DO
COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* E DE OUTRAS MICOBACTÉRIAS DE
IMPORTÂNCIA CLÍNICA**

YASMIN CASTILLOS DE IBRAHIM DAS NEVES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea von Groll
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Julia Reis

Rio Grande, RS

2025

Ficha Catalográfica

N518d Neves, Yasmin Castillos de Ibrahim das

Desenvolvimento de testes moleculares para a detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e de outras micobactérias de importância clínica / Yasmin Castillos de Ibrahim das Neves. – 2025. 144 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Rio Grande/RS, 2025.

Orientadora: Dra. Andrea von Groll.

Coorientador: Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva.

Coorientadora: Dra. Ana Julia Reis.

1. Diagnóstico 2. Identificação 3. *Mycobacterium tuberculosis*
4. Micobactérias não-tuberculosas 5. BiDz 6. *Real-Time* PCR I. Groll, Andrea von II. Silva, Pedro Eduardo Almeida da III. Reis, Ana Julia IV. Título.

CDU 616-002.5

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

YASMIN CASTILLOS DE IBRAHIM DAS NEVES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

DESENVOLVIMENTO DE TESTES MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* E DE OUTRAS MICOBACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Ivy Bastos Ramis de Souza – FURG

Prof^a. Dr^a. Vanusa Pousada da Hora – FURG

Prof^a. Dr^a. Lia Gonçalves Possuelo – UNISC

Prof. Dr^a. Vanice Rodrigues Poester – FURG (Suplente)

Prof^a. Dr^a. Andrea von Groll – FURG (Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradecer à Universidade Federal do Rio Grande - FURG, que tem sido minha segunda casa durante essa longa jornada, pela oportunidade de ter uma formação acadêmica de qualidade. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas oportunidades e bolsas nacionais e internacionais.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Andrea von Groll, por todos os ensinamentos compartilhados, que foram essenciais para o desenvolvimento desta tese, e pela confiança depositada em mim durante todos esses anos. Também gostaria de agradecer aos meus coorientadores, Prof. Dr. Pedro Almeida da Silva e Profa. Dra. Ana Julia Reis, por me acompanharem durante todo o doutorado.

Aos meus colegas do Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, pelos anos de apoio acadêmico. Às minhas amigas Dienefer Bierhals e Mariana Quaresma, pelo apoio incondicional, carinho e amizade.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha família por todo o carinho, amor e compreensão ao longo desta jornada.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1. O GÊNERO <i>Mycobacterium</i>	21
2.1.1. Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
2.1.2. Micobactérias não-tuberculosas.....	23
2.2. EPIDEMIOLOGIA	25
2.2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
2.2.2. Micobactérias não-tuberculosas.....	27
2.3. ESQUEMAS TERAPÊUTICOS	33
2.4. DIAGNÓSTICO.....	38
2.4.1. Métodos fenotípicos.....	40
2.4.2. Métodos moleculares	41
3. JUSTIFICATIVA.....	54
4. OBJETIVOS	56
4.1. OBJETIVO GERAL	56
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
5. BIBLIOGRAFIA.....	58
6. ARTIGO 1: TESTE BiDz-TB/NTM.....	79
6.1. MATERIAL SUPLEMENTAR	93
7. ARTIGO 2: TESTE MULTI-DETECT MTB/NTM.....	98
8. CONCLUSÕES	120
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
10. ANEXOS	124
Anexo A. Informações adicionais relacionadas ao teste BiDz-TB/NTM	124
Anexo B. Informações adicionais relacionadas ao teste Multi-Detect MTN/NTM	126
Anexo C. Relatório de atividades do doutorado sanduíche no exterior	128
Anexo D. Atividades de pesquisa, ensino e extensão	140

RESUMO

As micobactérias incluem espécies patogênicas de relevante impacto para a saúde humana, como o *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose (TB) e os patógenos oportunistas do grupo de micobactérias não-tuberculosas (MNT). Apesar dos esforços globais para reduzir a transmissão do *M. tuberculosis* e melhorar o diagnóstico laboratorial da TB, ainda existem cerca de 2,5 milhões de casos de TB anuais não diagnosticados e não tratados. Paralelamente, os relatos de doenças pulmonares causadas por MNT (DP-MNT) têm aumentado mundialmente, agravando o cenário diagnóstico e epidemiológico das doenças causadas por micobactérias. O diagnóstico diferencial entre TB e DP-MNT é desafiador, pois ambas as doenças apresentam manifestações clínicas e achados radiológicos semelhantes, frequentemente resultando no diagnóstico errôneo das DP-MNT como TB. O diagnóstico laboratorial convencional apresenta limitações significativas, que comprometem o manejo terapêutico e levam a necessidade do uso de métodos moleculares como alternativa tecnológica para maior especificidade e rapidez na identificação da espécie infectante. No entanto, a utilização desses métodos ainda é restringido pelo alto custo e/ou dependência de insumos importados. Visando ampliar as opções diagnósticas, esta tese desenvolveu e validou dois testes moleculares: o BiDz-TB/NTM e o Multi-Detect MTB/NTM, para a detecção de micobactérias e a diferenciação entre o complexo *M. tuberculosis* e as principais espécies de MNT clinicamente relevantes (*M. avium*, *M. kansasii*, complexo *M. abscessus* e/ou *M. intracellulare*). O BiDz-TB/NTM apresenta um princípio inovador, baseado no uso de sensores desoxirribosimas binários (BiDz), e o Multi-Detect MTB/NTM se baseia na técnica de *Real-Time* PCR utilizando sondas TaqMan. Para o desenvolvimento e avaliação dos testes, foram realizadas análises *in silico* para selecionar alvos moleculares, ensaios de padronização e otimização das condições de amplificação e hibridização e a avaliação dos parâmetros de acurácia diagnóstica. Um painel de DNAs genômicos totais de 19 espécies bacterianas previamente caracterizadas foi utilizado. Os resultados obtidos demonstraram que os alvos projetados possuem desempenho robusto na identificação do gênero *Mycobacterium* spp. e das espécies-alvo, apresentando alta sensibilidade, especificidade e acurácia. Os resultados alcançados nesta tese indicam que os testes propostos, no seu formato final, poderão contribuir para ampliar as opções diagnósticas atualmente disponíveis, sobretudo em regiões com limitações financeiras, reduzindo o tempo de resposta diagnóstica e melhorando o manejo da TB e das DP-MNT.

Palavras-chave: Diagnóstico; Identificação; *Mycobacterium tuberculosis*; Micobactérias não-tuberculosas; BiDz; *Real-Time* PCR

Objetivos do Desenvolvimento Sustentável contemplados: ODS número 3: Saúde e bem-estar – Objetivo 3.3: Acabar com as epidemias de aids, tuberculose, malária e doenças tropicais negligenciadas até 2030

ABSTRACT

Mycobacteria include pathogenic species with significant impact on human health, such as *Mycobacterium tuberculosis*, the etiological agent of tuberculosis (TB), and the opportunistic pathogens from the non-tuberculous mycobacteria (NTM) group. Despite global efforts to reduce the transmission of *M. tuberculosis* and improve laboratory diagnosis of TB, there are still around 2.5 million undiagnosed and untreated cases of TB every year. At the same time, reports of pulmonary diseases caused by NTM (NTM-PD) have increased worldwide, aggravating the diagnostic and epidemiological scenario of diseases caused by mycobacteria. The differential diagnosis between TB and NTM-PD is challenging, as both diseases present similar clinical manifestations and radiological findings, often resulting in the misdiagnosis of NTM-PD as TB. Conventional laboratory diagnostics have significant limitations, which compromise therapeutic management and lead to the need to use molecular methods as a technological alternative for greater specificity and speed identifying the infecting species. However, the use of these methods is still restricted by high costs and/or dependence on imported reagents. To expand diagnostic options, this thesis developed and validated two molecular tests: BiDz-TB/NTM and Multi-Detect MTB/NTM, for the detection of mycobacteria and the differentiation between the *M. tuberculosis* complex and the main clinically relevant NTM species (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. abscessus* complex, and/or *M. intracellulare*). The BiDz-TB/NTM test introduces an innovative principle based on the use of binary deoxyribozyme (BiDz) sensors, while the Multi-Detect MTB/NTM test is based on the Real-Time PCR technique using TaqMan probes. For the development and evaluation of the tests, *in silico* analyses were performed to select molecular targets, standardization and optimization assays of amplification and hybridization conditions, and evaluation of diagnostic accuracy parameters. A panel of total genomic DNAs from nineteen previously characterized bacterial species was used. The obtained results demonstrated that the designed targets show robust performance in identifying the *Mycobacterium* spp. genus and the target species, exhibiting high sensitivity, specificity, and accuracy. The results achieved in this thesis indicate that the proposed tests, in their final format, could contribute to expanding the currently available diagnostic options, especially in regions with financial constraints, reducing diagnostic response time and improving the management of TB and NTM-PD.

Keywords: Diagnosis; Identification; *Mycobacterium tuberculosis*; Non-tuberculous mycobacteria; BiDz; Real-time PCR

Sustainable Development Goals contemplated: SDG 3: Health and well-being – Goal 3.3:
End the epidemics of AIDS, tuberculosis, malaria and neglected tropical diseases by 2030.

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Características fenotípicas das micobactérias e espécies representativas de cada grupo.....	22
Tabela 2. Frequência das espécies de micobactérias não-tuberculosas mais isoladas em países da Ásia, Europa, África, América do Norte e América do Sul.....	28
Tabela 3. Esquemas terapêuticos para o tratamento de doenças causadas pelo CMAV.	35
Tabela 4. Esquemas terapêuticos para o tratamento de doenças causadas pelo <i>M. kansasii</i> ...	36
Tabela 5. Esquemas terapêuticos para o tratamento de doenças causadas pelo CMAB.	37
Tabela 6. Critérios diagnósticos para o diagnóstico de doença pulmonar causada por MNT.	39
Tabela 7. Comparação de kits comerciais baseados em hibridização reversa (LPA) para a identificação e micobactérias.....	44
Tabela 8. Métodos disponíveis comercialmente para a identificação do complexo <i>M. tuberculosis</i> e/ou micobactérias não-tuberculosas.	50

ARTIGO 1

Table 1. Set of primers used for 16S rRNA fragment amplification.

Table 2. BiDz sensor evaluation: Specificity, sensitivity, accuracy and LoD.

Table 1S: Clinical strains of *Mycobacterium* sp. Identification.

Table 2S: Sequences for the sensor strands and fluorogenic substrate used in the study.

ARTIGO 2

Tabela 1. Condições dos reagentes utilizados para a *Real-Time* PCR.

Tabela 2. Sequências dos alvos desenhados para as espécies-alvo.

Tabela 3. Valores médios dos ciclos threshold obtidos para o painel de DNAs genômicos nos ensaios de especificidade, sensibilidade e acurácia dos alvos projetados.

Tabela 1S. Espécies analisadas in silico para a detecção do gênero *Mycobacterium* spp.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Frequência das espécies de micobactérias não-tuberculosas (MNT) mais isoladas em Unidades Federativas do Brasil. *Espécies isoladas de casos de doença pulmonar causadas por MNT. #Identificação de Complexo *M. abscessus* e *M. chelonae* sem distinção. **Fonte:** Adaptado de: Busatto et al. (2020); Couto de Mello et al. (2013); da Costa et al. (2013); de Lima et al. (2013); Lima et al. (2022); Matos et al. (2004); Pedro et al. (2008, 2017); Puga et al. (2018); Zamarioli et al. (2008). 33

ARTIGO 1

FIG 1. Principle of binary deoxyribozyme (BiDz) sensors. (A) Representation of the amplified DNA analyte indicating the binding sites for forward (blue) and reverse (red) primers in the conserved regions of the *rrs* gene encoding for 16S rRNA, as well as the sites of the hypervariable region 2 (V2) of 16S rRNA interrogated by the BiDz sensors (Dza, green; Dzb, orange). The numbering of hypervariable regions is based on the *Escherichia coli* nomenclature system (42). (B) Binding of BiDz sensors to the target DNA and of the fluorogenic substrate (MzF-FAM) to the BiDz sensors, resulting in catalytic core formation, MzF-FAM cleavage, and fluorescence emission.

FIG 2. Validation and optimization of LATE asymmetric PCR primer designs. Based on LATE PCR principles, extended-length variants of the conventional R2 reverse primer with increased annealing temperatures of 3°C (R + 3) and 5°C (R + 5) were tested. The limiting reverse primer (0.025 µM) was used at a ratio of 1:40 relative to the forward primer concentration (1 µM). Threefold serial dilutions of input template (Mtb chromosomal DNA) starting at 10ng/reaction served as templates for PCR amplification, followed by detection of BiDz sensor fluorescent signal. Signal: background ratios (S:B) were determined by dividing the raw fluorescent signal from the analyte-containing sample by the background signal from the sample from which template DNA was omitted. Red bars indicate the lowest input (analyte) that yielded S:B of >2.

FIG 3. Evaluation of the specificity, sensitivity, and accuracy of BiDz sensors against target and non-target DNAs. The results of the signal: background ratio (S:B) are expressed as an absolute mean for target and non-target species. Samples with S:B of >2 were considered positive. Red bars indicate the target species of the Mtb-BiDz (A), Mab/Mche-BiDz (B), Mav-

BiDz (C), and Mkan-BiDz (D) sensors. Gray bars indicate the non-target species. The results shown represent the average of all clinical isolates for each species. Note: *M. abscessus* complex includes subsp. *massiliense*, *bolletii*, and *abscessus* strains. **M. avium* complex species evaluated: *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. chimaera*. #Species of the *M. avium* complex evaluated: *M. intracellulare* and *M. chimaera*. Non-mycobacterial species: *Vibrio coralliilyticus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Graphs of data for individual isolates can be found in Fig. S2.

FIG 4. Evaluation of the specificity, sensitivity, and accuracy of the Mint/Mchi-BiDz sensor against target and non-target DNAs. The results of the signal: background ratio (S:B) are expressed as an absolute mean, except for samples of *M. intracellulare* and *M. avium*. Samples with S:B of >2 were considered positive. The red bars indicate the target species of the Mint/Mchi-BiDz sensor. The gray bars indicate the non-target species, and the *M. avium* sample with a positive result is indicated in gold. Non-mycobacterial species: *Vibrio coralliilyticus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

FIG 1S: Alignment of 16S ribosomal RNA sequences from different bacterial species against *Mycobacterium tuberculosis*. Marked in black are the locations of the forward and reverse primers on the 16S ribosomal RNA sequences (5'-3').

FIG 2S: Agarose gel stained with ethidium bromide revealing the amplicons obtained by LATE-PCR. **Lanes 1 to 10 and 12 to 15:** *Mycobacterium* sp. samples; **Lane 16:** *Vibrio coralliilyticus*; **Lane 17:** *Escherichia coli*; **Lane 18:** *Staphylococcus aureus*; **Lane 19:** *Acinetobacter baumannii*; **Lane 20:** *Pseudomonas aeruginosa*; **Lane 21:** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

ARTIGO 2

Figura 1. Curva padrão para avaliação da eficiência dos alvos desenhados. (A) Alvo Myco-16S, (B) Alvo Mtb-ESAT, (C) Alvo Mkan-16S e (D) Alvo Mav-16S. O *slope* e o coeficiente de regressão (R^2 ; correlação entre a concentração de DNA e os valores de Ct obtidos) são apresentados para cada curva, demonstrando a eficiência de amplificação e a linearidade das *Real-Time* PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMI – Amicacina

AS – *Additional Species*

ATCC – *American Type Culture Collection* (Cepa de referência)

ATM – Antimicrobianos

ATS/IDSA – *American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America*

BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes

BDQ – Bedaquilina

BiDz – Sensores desoxirribozimas binários (*Binary Deoxyribozyme Sensors*)

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CFZ – Clofazimina

CLA – Claritromicina

CM – *Common Mycobacteria*

CMAB – Complexo *Mycobacterium abscessus*

CMAV – Complexo *Mycobacterium avium*

CMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

COVID-19 – Doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2

Ct – Ciclo *Threshold*

°C – Grau Celsius

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP-MNT – Doenças pulmonares causadas por micobactérias não-tuberculosas

E – Eficiência

EMB – Etambutol

ERT – Ertapenem

ESAT-6 – Alvo antigênico secretado precocemente de 6 kDa

FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul

FQ – Fluoroquinolona

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (*High-Performance Liquid Chromatography*)

IMP – Imipenem

INH – Isoniazida

ITS – Espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer*)

kDa – Quilodalton

LATE – *Linear-After-The-Exponential*

LoD – Limite de detecção (*Limit of Detection*)

LPA – Ensaio de sonda em linha (*Line Probe Assay*)

Mab/Mche-BiDz – Sensor BiDz para a identificação do complexo *M. abscessus* e *M. chelonae*

MALDI-TOF MS – Ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry*)

Mav-BiDz – Sensor BiDz para a identificação do *M. avium*

Mav-16S – Alvo projetado para a identificação do *M. avium*

MDR – Multidroga-resistente

MX – Moxifloxacina

MGIT – *Mycobacteria Growth Indicator Tubes*

Mint/Mchi-BiDz – Sensor BiDz para a identificação do *M. intracellulare* e *M. chimaera*

Mkan-BiDz – Sensor BiDz para a identificação do *M. kansasii*

Mkan-16S – Alvo projetado para a identificação do *M. kansasii*

ml – Mililitro

MNT (ou NTM) – Micobactérias não-tuberculosas (*Non-Tuberculous Mycobacteria*)

Mtb-BiDz – Sensor BiDz para a identificação do complexo *M. tuberculosis*

Mtb-ESAT – Alvo projetado para a identificação do complexo *M. tuberculosis*

Myco-BiDz – Sensor BiDz para detecção do gênero *Mycobacterium* spp.

Myco-16S – Alvo projetado para a detecção do gênero *Mycobacterium* spp.

NAAT – Técnica de amplificação de ácidos nucleicos (*Nucleic Acid Amplification techniques*)

NaCl – Cloreto de sódio

NGS – Sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing*)

NUPEMM – Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

Real-Time PCR – Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real

PCR-PRA – PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis

pg – Picograma

PPSUS – Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde

PVHIV – Pessoas vivendo com HIV

PVHIV/AIDS – Pessoas vivendo com HIV/AIDS

PZA – Pirazinamida

R² – Coeficiente de regressão

RD1 – Região de diferença 1

RMP (ou RIF) – Rifampicina

rRNA 16S – RNA ribossômico 16S

RS – Rio Grande do Sul

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TB – Tuberculose

TGC – Tigeciclina

TxR – Texas Red

UFC – Unidade formadora de colônia

UF – Unidade Federativa

μL – Microlitro

μM – Micromolar

WGS – Sequenciamento de genoma completo (*Whole Genome Sequencing*)

XDR – Extensivamente resistente



INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

As micobactérias, do gênero *Mycobacterium*, constituem um grupo diversificado e complexo, que inclui espécies com alto potencial patogênico para humanos e animais. Dentre as 216 espécies validadas (Parte *et al.*, 2020), apenas um pequeno número é classificado como estritamente patogênico, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose (TB). As demais espécies, denominadas como micobactérias não-tuberculosas (MNT), são predominantemente ubíquas, ambientais e raramente patogênicas, embora algumas possam atuar como patógenos oportunistas (Brasil, 2019, 2022; Griffith *et al.*, 2007).

A TB é uma das principais causas de morte por um único agente infeccioso no mundo, com transmissão do *M. tuberculosis* por via aérea e exigindo um esquema terapêutico prolongado. As MNT, por sua vez, são consideradas menos virulentas que o *M. tuberculosis*, mas também podem causar doenças em indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos. Entre essas doenças, as doenças pulmonares causadas por MNT (DP-MNT) são as mais frequentes, representando 80% a 90% dos casos (Brasil, 2022; Griffith *et al.*, 2007; Sharma; Upadhyay, 2020; Winthrop *et al.*, 2017; WHO, 2024a). As espécies mais frequentemente associadas às DP-MNT incluem o complexo *Mycobacterium avium* (CMAV), *Mycobacterium kansasii* e o complexo *Mycobacterium abscessus* (CMAB) (Brasil, 2021; Prevots *et al.*, 2023; Sharma; Upadhyay, 2020).

Ao contrário da TB, as DP-MNT não são de notificação obrigatória, o que dificulta a estimativa de sua real prevalência e incidência. No entanto, em países desenvolvidos, a prevalência dessas doenças parece ultrapassar a da TB, enquanto em países em desenvolvimento, pode ser subestimadas pela alta prevalência da TB. Isto ocorre especialmente devido à dificuldade de distinguir clinicamente e radiologicamente as DP-MNT da TB, podendo levar a diagnósticos incorretos e à administração de esquemas terapêuticos inadequados (Brasil, 2021; Bryant *et al.*, 2016; Daley *et al.*, 2020; Greif *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007; Haworth *et al.*, 2017; Thornton *et al.*, 2021; Twabi *et al.*, 2021; Winthrop *et al.*, 2017).

O diagnóstico microbiológico convencional de micobactérias baseia-se em baciloscopia (microscopia) e cultura, porém esses métodos apresentam importantes limitações. A baciloscopia não diferencia o *M. tuberculosis* das MNT, uma vez que ambos aparecem como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Já a cultura, considerada padrão-ouro, pode levar até três semanas para fornecer resultados positivos, atrasando o início do tratamento adequado (Brasil, 2019, 2021; Griffith *et al.*, 2007). É importante ressaltar que o esquema terapêutico

para as doenças causadas por MNT varia conforme a espécie envolvida, tornando a identificação precisa da espécie essencial para um melhor prognóstico (Brasil, 2021; Griffith *et al.*, 2007).

Diante dessas limitações e para realizar a identificação da espécie micobacteriana, métodos moleculares baseados em reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-Time Polymerase chain reaction*; *Real-Time PCR*), como o Xpert[®] MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, EUA), e em hibridização reversa de DNA, como o Genotype[®] (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha), tornaram-se a principal alternativa laboratorial por oferecer maior rapidez e especificidade (Brasil, 2019, 2021; Chakravorty *et al.*, 2017; Epperson *et al.*, 2024; Griffith *et al.*, 2007). No entanto, apesar de estarem comercialmente disponíveis, esses métodos possuem um custo elevado devido à dependência de insumos e equipamentos importados, exclusivos dos fabricantes (Brum *et al.*, 2016; Gopalaswamy *et al.*, 2020; Telenti *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 2021), ressaltando a necessidade de ampliar as opções diagnósticas disponíveis (WHO, 2024b).

Neste sentido, esta tese propõe o desenvolvimento de dois testes diagnósticos de diferentes princípios moleculares, o BiDz-TB/NTM e o Multi-Detect MTB/NTM, para diagnosticar e diferenciar o complexo *M. tuberculosis* (CMTB) das principais espécies de MNT causadoras de doenças pulmonares clinicamente similares. O teste BiDz-TB/NTM é baseado em uma PCR assimétrica associada a sensores desoxirribosimas binários (BiDz), que clivam substratos fluorogênicos, resultando em emissão de fluorescência detectável. Por outro lado, o teste Multi-Detect MTB/NTM emprega a *Real-Time PCR* associada a sondas de hidrólise do tipo TaqMan, garantindo alta especificidade para a detecção de alvos. O desenvolvimento de testes moleculares nacionais é fundamental para acelerar e aprimorar a identificação das principais micobactérias de importância clínica, contribuindo para o controle das doenças causadas por esses microrganismos.



REFERENCIAL TEÓRICO



2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O GÊNERO *Mycobacterium*

Pertencentes à ordem *Actinomycetales*, à família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium* (Parte *et al.*, 2020; SKERMAN; McGOWAN; SNEATH, 1980), as micobactérias compreendem um grupo de 216 espécies oficialmente validadas (Parte *et al.*, 2020). Em 2018, justificada pela grande diversidade de espécies de micobactérias, uma nova classificação taxonômica foi proposta, dividindo o gênero *Mycobacterium* em cinco gêneros. Essa divisão foi realizada com base em análises filogenéticas comparativas de 150 espécies e sinapomorfias moleculares (Gupta; Lo; Son, 2018).

Nessa nova classificação taxonômica, o gênero *Mycobacterium* foi mantido, abrangendo os principais patógenos humanos e animais, como CMTB, CMAV e *M. kansasii*. No entanto, quatro novos gêneros foram criados: *Mycolicibacter gen. nov.* e *Mycolicibacillus gen. nov.*, abrangendo principalmente espécies não patogênicas e de crescimento lento, como *M. terrae* e *M. trivialis*, respectivamente; *Mycolicibacterium gen. nov.*, abrangendo espécies não patogênicas e potencialmente patogênicas de crescimento rápido, como *M. fortuitum*; e *Mycobacteroides gen. nov.*, abrangendo um pequeno grupo de espécies potencialmente patogênicas e de crescimento rápido, como CMAB e *M. chelonae* (Gupta; Lo; Son, 2018).

Destaca-se que apesar da nova nomenclatura ter sido oficialmente validada (Oren; Garrity, 2018), essa divisão não tem sido adotada devido à renomeação de patógenos oportunistas, como *M. abscessus*. Dessa forma, o gênero original *Mycobacterium* continua sendo utilizado como sinônimo para os novos gêneros (Meehan *et al.*, 2021).

As micobactérias são bacilos retos ou ligeiramente curvados, caracterizadas pela ausência de motilidade, metabolismo tipicamente aeróbio e alto teor das bases guanina e citosina (58%-70%). Além disso, a estrutura da parede celular, rica em ácidos micólicos de cadeia longa, confere às micobactérias maior resistência aos ATM, metais pesados, desinfetantes e à descoloração por álcool-ácido (Brasil, 2019, 2022; Rocha; Felgueiras; Duarte, 2020; Sharma; Upadhyay, 2020).

Embora compartilhem características morfológicas e genéticas que permitem formar um clado parental único, as micobactérias são um grupo diverso. Elas diferem quanto à sua patogenicidade e características fenotípicas, como produção de pigmentos e tempo de crescimento (Tabela 1). Tais características são comumente utilizadas como triagem inicial para

a identificação dessas espécies (Brasil, 2022; Rastogi; Legrand; Sola, 2001; Runyon, 1959; Sharma; Upadhyay, 2020).

Tabela 1. Características fenotípicas das micobactérias e espécies representativas de cada grupo.

Grupo*	Tempo de crescimento [#]	Pigmentação	Espécies representativas
Complexo <i>M. tuberculosis</i>		Não se aplica	<i>M. tuberculosis</i>
			<i>M. africanum</i>
			<i>M. bovis</i>
Runyon I	Lento (a partir de sete dias)	Fotocromógena ¹	<i>M. kansasii</i>
			<i>M. marinum</i>
Runyon II		Escotocromógena ²	<i>M. szulgai</i> <i>M. goodii</i>
Runyon III		Acromógena ³	Complexo <i>M. avium</i> <i>M. ulcerans</i>
Runyon IV	Rápido (até sete dias)	Não se aplica	Complexo <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>

Fonte: Adaptado de: Brasil (2022); Runyon (1959). *Grupos Runyon I a IV estabelecidos para micobactérias não-tuberculosas. [#]Tempo de crescimento em culturas sólidas. ¹Fotocromógena: Produção de pigmento laranja-amarelo apenas quando há exposição de luz. ²Escotocromógena: Produção de pigmento laranja-amarelo independente da exposição à luz. ³Acromógena: Não há produção de pigmentos.

De acordo com sua patogenicidade em humanos, as micobactérias foram classificadas em três categorias: estritamente patogênicas; potencialmente patogênicas; e raramente patogênicas. Apenas os membros do CMTB, o *M. leprae*, o *M. lepromatosis* e o *M. ulcerans* são considerados estritamente patogênicos. As espécies classificadas como potencialmente patogênicas e raramente patogênicas compreendem um grupo diverso, inicialmente chamado de micobactérias atípicas, e atualmente denominado de MNT (Brasil, 2022; Rastogi; Legrand; Sola, 2001).

2.1.1. Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

As espécies responsáveis por causar TB em humanos e animais pertencem a um grupo de micobactérias estreitamente relacionadas, conhecido como CMTB. Os membros deste complexo são patógenos intracelulares obrigatórios, que apresentam 99.9% de similaridade na sequência genômica total e 100% na sequência do RNA ribossômico 16S (rRNA 16S). Apesar

da alta relação genética, os membros do CMTB diferem em relação ao hospedeiro primário, fenótipo, patogenicidade e virulência. Essas características são conferidas, principalmente, por deleções de regiões de diferença, que são sequências genômicas variáveis dentro do CMTB, com 2 a 12,7 kb, e por polimorfismos de nucleotídeo único (Brosch *et al.*, 2002; Coscolla; Gagneux, 2014; Gagneux, 2018).

Entre os membros do CMTB, os agentes etiológicos da TB em humanos, *M. tuberculosis* e *M. africanum*, são as únicas espécies que não possuem reservatórios ambientais ou animais conhecidos (Brites; Gagneux, 2017; Gagneux, 2018). Algumas espécies adaptadas a animais, como *M. bovis* (TB bovina), *M. orygis* (TB em mamíferos do gênero *Oryx* [e. g. antílopes]) e *M. caprae* (TB em caprinos), possuem potencial zoonótico (Gagneux, 2018; Jagielski *et al.*, 2016; Macedo *et al.*, 2020; Olea-Popelka; Fujiwara; Dean, 2021; Riopel *et al.*, 2024). No entanto, a proporção de identificação de espécies adaptadas a animais em casos de TB humana, embora subestimada, varia de 1% a 10% dependendo da região, e raramente são transmitidas de humano para humano (Gagneux, 2018; Ghielmetti *et al.*, 2021; Ramanujam *et al.*, 2021; Taye *et al.*, 2021; van de Weg *et al.*, 2020; WHO, 2020).

De maneira geral, a espécie micobacteriana com maior impacto na saúde humana mundial é o *M. tuberculosis*. No entanto, em alguns países da África Ocidental, o *M. africanum* também contribui significativamente, representando quase 50% dos casos de TB (Asare *et al.*, 2021; WHO, 2024a). O *M. tuberculosis* acomete preferencialmente os alvéolos pulmonares (TB pulmonar), contudo, pode infectar outros órgãos ou sistemas (TB extrapulmonar) e se disseminar pelo corpo (TB miliar). A TB pulmonar representa cerca de 95% de todos os casos e seus sintomas clássicos incluem tosse crônica seca ou produtiva, febre, sudorese noturna, perda de peso e fadiga (Brasil, 2019; Uddin *et al.*, 2021; WHO, 2024a).

2.1.2. Micobactérias não-tuberculosas

As MNT constituem um amplo grupo de micobactérias ubíquas e ambientais, majoritariamente saprófitas. A primeira descrição das MNT ocorreu em 1889, com a identificação do *Mycobacterium smegmatis*. Desde então, mais de 200 espécies e subespécies foram descritas, algumas das quais são consideradas patógenos oportunistas de humanos (DeFlorio-Barker *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2019; Parte *et al.*, 2020; Rastogi; Legrand; Sola, 2001).

As doenças causadas por MNT estão associadas a ingestão de água contaminada, inalação de aerossóis ou contato dérmico. Os reservatórios ambientais mais comuns incluem

fontes de água como tanques de água potável, encanamentos domésticos e hospitalares, banheiras e chuveiros (Ahmed *et al.*, 2020; Halstrom; Price; Thomson, 2015; Johnson; Odell, 2014). Para doenças pulmonares, a exposição direta à aerossóis é considerada a rota mais provável (Johnson; Odell, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Embora a transmissão de MNT de pessoa para pessoa não esteja comprovada, alguns estudos sugerem a possibilidade de transmissão de membros do CMAB entre pacientes portadores de fibrose cística (Bryant *et al.*, 2016; Ruis *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2020).

Destaca-se que a sobrevivência das MNT em diversos habitats, especialmente em fontes de água e solos, é favorecida por sua capacidade de formar biofilmes e pela hidrofobicidade da parede celular das micobactérias. Essas características também conferem às MNT altos níveis de resistência aos ATM, metais pesados e desinfetantes (Bryant *et al.*, 2016; Johnson; Odell, 2014; Rocha; Felgueiras; Duarte, 2020).

As MNT podem causar doenças pulmonares crônicas, extrapulmonares, que afetam tecidos linfáticos (linfadenite), cutâneos e moles, e disseminadas. O sítio da infecção depende da fonte de exposição, da espécie infectante e da imunidade do hospedeiro. Dentre os possíveis sítios de infecção por MNT, destaca-se que as doenças pulmonares são as mais frequentes (DeFlorio-Barker *et al.*, 2021; Johnson; Odell, 2014), estando associada a ocorrência de sintomas semelhantes aos causados pela TB, como tosse, perda de peso e febre (Gopalaswamy *et al.*, 2020; Winthrop *et al.*, 2017). Além disso, entre as espécies de MNT patogênicas em humanos, as mais prevalentes são os membros do CMAV, *M. kansasii* e os membros do CMAB (Ahmed *et al.*, 2020; Busatto *et al.*, 2020; Gopalaswamy *et al.*, 2020).

Os membros do CMAV são micobactérias de crescimento lento que constituem um grupo heterogêneo, mas intimamente relacionado que compartilham de 85% a 93% das sequências genômicas totais e mais de 99,5% da sequência do rRNA 16S (van Ingen *et al.*, 2018). O espectro de doenças causadas por todos os membros do CMAV não é conhecido. Contudo, as doenças pulmonares causadas por *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. chimaera* são as mais comuns (Gopalaswamy *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007; van Ingen *et al.*, 2018). Além disso, as manifestações clínicas associadas às doenças causadas por esse grupo ainda não são bem definidas, visto que a diferenciação entre as espécies não é realizada clinicamente. No entanto, alguns estudos sugerem diferenças na patogenicidade, com taxas variáveis de resposta ao tratamento de doenças pulmonares e de mortalidade entre pacientes infectados por *M. intracellulare*, *M. avium* ou *M. chimaera* (Azar *et al.*, 2020; Boyle *et al.*, 2015; Jhun *et al.*, 2020; Koh *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 2022).

O *M. kansasii*, uma MNT de crescimento lento, é considerado entre as MNT a espécie mais virulenta, sendo capaz de causar doenças pulmonares tão graves quanto o *M. tuberculosis*. No entanto, quando causada por isolados sensíveis aos ATM, a doença pulmonar por *M. kansasii* apresenta taxas de cura que podem chegar a 90% (Daley *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2022; Johnston; Chiang; Elwood, 2017). As semelhanças entre *M. kansasii* e *M. tuberculosis* podem ser explicadas pela proximidade filogenética de *M. kansasii* com o ancestral comum do CMTB, sendo uma das últimas espécies a divergir e compartilhando pelo menos 12 genes que codificam fatores de virulência (Guan *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2015).

Por fim, o CMAB, um grupo de micobactérias de crescimento rápido, passou por diversas alterações taxonômicas ao longo dos anos. Até 1992, o *M. abscessus* era considerado uma subespécie de *M. chelonae*, quando foi elevado aos status de espécie (Kusunoki; Ezaki, 1992). Desde 2016, as antigas espécies *Mycobacterium massiliense* e *Mycobacterium bolletii* foram reclassificadas como *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*, respectivamente. Assim, juntamente com *M. abscessus* subsp. *abscessus*, essas subespécies passaram a compor o CMAB (Tortoli *et al.*, 2016). Entre as micobactérias de crescimento rápido, o CMAB é considerado o mais patogênico, sendo frequentemente relacionado a doenças pulmonares. Além disso, está associado a altas taxas de resistência aos ATM devido aos seus mecanismos intrínsecos de resistência, o que torna seu tratamento um desafio clínico (Jhun *et al.*, 2020; Pasipanodya *et al.*, 2017).

2.2. EPIDEMIOLOGIA

2.2.1. *Mycobacterium tuberculosis*

A TB, tendo o *M. tuberculosis* como seu principal agente etiológico em humanos, é um importante problema de saúde pública mundial, sendo impulsionada por fatores socioeconômicos e individuais, como pobreza, moradias precárias e superlotadas, infecção pelo HIV, desnutrição e comorbidades. Em 2023, estima-se que 1,25 milhões de pessoas morreram em decorrência da TB, no mundo, com um declínio progressivo nos óbitos por TB após o primeiro ano da pandemia de COVID-19 (2021:1,42 milhões; 2022: 1,32 milhões). No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê que, em 2024, a TB voltou a ser a principal causa de óbitos por apenas um agente infeccioso, ultrapassando a COVID-19, e permanecerá entre as dez principais causas de óbitos no mundo (Brasil, 2019; WHO, 2020, 2024a).

Segundo as estimativas da OMS, em 2023, ocorreram 10,8 milhões de novos casos de TB, representando um acréscimo de 0,8 milhões em relação a 2019, período pré-pandêmico. Desses casos, 7,1 milhões foram notificados em 2019 e 8,2 milhões foram em 2023. O aumento nas notificações em 2023 pode ser o reflexo dos atrasos no diagnóstico da TB causados pela COVID-19 nos anos anteriores, mas também demonstra uma recuperação dos serviços de diagnóstico da TB. Apesar dos avanços, ainda existem lacunas diagnósticas importantes, com cerca de 25% das pessoas com TB não sendo diagnosticadas e tratadas (WHO, 2020, 2024a)

Essas lacunas diagnósticas são mais pronunciadas nos países em desenvolvimento, onde a maioria dos casos de TB, em 2023, estavam concentrados: Sudeste Asiático (45%), África (24%) e Pacífico Ocidental (17%). Nesse mesmo ano, na região das Américas, que representou 3,2% da carga mundial, foram estimados cerca de 35 mil óbitos e 342 mil casos novos de TB, dos quais cerca de 37,1% (13 mil óbitos) e 30,1% (103 mil casos novos) foram no Brasil (WHO, 2024a). Do total de casos estimados no Brasil, cerca de 77,9% dos casos novos (80.012 casos) foram notificados (Brasil, 2024). Neste cenário, o Brasil se mantém entre os 30 países prioritários para o controle da TB pela OMS, devido à alta carga de TB e à coinfeção TB-HIV (7.451 casos, em 2023) (Brasil, 2024; WHO, 2024a).

O Brasil possui 27 Unidades Federativas (UF), estando o Rio Grande do Sul (RS) entre as cinco primeiras UF com maior proporção de casos novos (4.584 casos) e óbitos por TB (337 óbitos) em 2023, além de apresentar incidências superiores a nacional (40 casos/100 mil habitantes e 2,9 óbitos/100 mil habitantes *versus* 37,3 casos/100 mil habitantes e 2,8 óbitos/100 mil habitantes). Além disso, o RS é a UF com a maior taxa de coinfeção TB-HIV, com 16,2%, superando a taxa nacional (9,3%). Destaca-se que, entre os casos novos de TB registrados no RS, 3.952 eram pulmonares e destes, 72,1% foram confirmados por critérios laboratoriais (baciloscopia, Xpert ou cultura) (Brasil, 2024).

O RS possui 10 municípios prioritários para o controle da TB, que representam 70% da carga da doença no estado. Entre esses municípios, destaca-se Rio Grande, que, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), registrou em 2023 um total de 141 casos novos de TB (70,9 casos/100 mil habitantes), apresentando uma incidência superior à estadual e à nacional. Além disso, em 2022, foram registrados sete óbitos por TB (3,5 casos/100 mil habitantes) (Brasil, 2023, 2024).

2.2.2. Micobactérias não-tuberculosas

A epidemiologia das DP-MNT não é conhecida, principalmente devido à ausência de notificação obrigatória na maioria dos países (De Lima Mota *et al.*, 2017; Greif *et al.*, 2020; Prevots *et al.*, 2017; Puga *et al.*, 2018; Winthrop *et al.*, 2017). No entanto, estudos realizados em países desenvolvidos e/ou com baixas cargas de TB relataram que as DP-MNT parecem estar se tornando mais prevalentes que a TB (Donohue, 2021; Hoefsloot *et al.*, 2013; López-Roa *et al.*, 2020; Prevots *et al.*, 2017; Thomson, 2010). Em países em desenvolvimento, o impacto dessas doenças é frequentemente encoberto pela alta incidência da TB, devido às semelhanças nos seus quadros clínicos (Hoefsloot *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2019; Okoi *et al.*, 2017; Puga *et al.*, 2018).

Relatos de doenças causadas por MNT ganharam destaque com a emergência do HIV, quando espécies de MNT passaram a ser isoladas com maior frequência nesta população (Griffith *et al.*, 2007; Rocha; Felgueiras; Duarte, 2020). Além do HIV, diversos determinantes de saúde, ambientais e individuais vêm sendo descritos como fatores de risco para doenças causadas por MNT. Dentre eles estão, a presença de comorbidades, como bronquiectasias, fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica, história prévia de TB, imunosenescência, contato com o solo e água contaminados e realização de procedimentos médicos invasivos ou estéticos (da Costa *et al.*, 2013; Donohue, 2021; Forbes *et al.*, 2018; Gopalaswamy *et al.*, 2020; Nunes-Costa *et al.*, 2016).

A prevalência do isolamento das espécies de MNT apresenta uma heterogeneidade geográfica (Tabela 2), podendo variar também de acordo com a fonte de infecção, presença de comorbidades e forma de apresentação clínica. No entanto, como já mencionado anteriormente, os membros do CMAV, do CMAB e *M. kansasii* são as espécies de MNT mais frequentemente isoladas. Vale destacar, que essas espécies são responsáveis por mais de 90% dos casos relatados de DP-MNT no mundo (Lipman *et al.*, 2020; Thornton *et al.*, 2021).

263 **Tabela 2.** Frequência das espécies de micobactérias não-tuberculosas mais isoladas em países da Ásia, Europa, África, América do Norte e América
 264 do Sul.

País	CMAV	CMAB	<i>M. kansasii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. simiae</i>
Ásia									
China (2008-2020)	48%	21,6%*	15%	NA	5,1%	3,2%	NI	NI	NI
Índia (1981-2020)	13,6%	19,3%	1,5%	11,9%	16,6%	4,8%	NI	NI	3,5%
Singapura (2011-2016)	15,3%	45,6%*	13,5%	NA	16,8%	3,5%	NI	NI	NI
Taiwan (2007-2010)	32,4%	9,2%	9,8%	17,6%	17%	7%	NI	NI	NI
Coreia do Sul (2007-2019)	63,9%	6,6%	4,1%	1,4%	3,4%	1,2%	NI	NI	NI
Japão (2001-2016)	66,7%	12,5%	1,9%	4,3%	4,7%	6%	NI	NI	NI
Europa									
Escócia (2000-2010)	44,8%	13,7%	3,9%	2,6%	NI	NI	21,7%	4,5%	NI
Irlanda (2007-2012)	70,3%	5,4%	NI	5,4%	NI	10,8%	2,7%	NI	NI
Reino Unido (2007-2014)	52,5%	8,4%	NI	8,4%	NI	15,2%	4,7%	7,9%	NI
Portugal (2005-2014)	48,2%	1,6%	5,8%	7,9%	NI	13,7%	13,7	NI	NI
Espanha (1994-2017)	49,8%	1,8%	9,5%	3,8%	6%	6,7%	NI	4,7%	NI
França (2002-2014) #	59%	3%	11,6%	<1%	1,9%	NI	NI	18%	NI
Grécia (2007-2013) #	50%	8,3%	NI	NI	8,3%	8,3%	NI	8,3%	NI
República Tcheca (2012-2018) #	47,2%	1,3%	23,8%	2,3%	2%	NI	2%	18,2%	NI
Alemanha (2006-2016)	33,3%	9,3%	NI	NI	NI	NI	23,6%	15,2%	NI
Holanda (2008-2013) #	54%	6,3%	9,5%	NI	NI	NI	11,1%	NI	4,8%

265 *Identificação dos membros do complexo *M. abscessus* (CMAB) e do *M. chelonae* sem distinção. #Espécies isoladas de casos de doenças pulmonares causadas por MNT. **NA:**
 266 Não se aplica. **NI:** Não identificado. **CMAV:** Complexo *M. avium*. **Fonte:** Adaptado de: Barnes; Rojo; Moretto (2004); Busatto *et al.* (2020); Chaptal *et al.* (2022); de Lima *et*
 267 *al.* (2013); Greif *et al.* (2020); Imperiale *et al.* (2012); Lima *et al.* (2022); Llerena; Valbuena; Zabaleta (2018); Pedro *et al.* (2008, 2017); Prevots *et al.* (2023); Puga *et al.* (2018);
 268 Zamarioli *et al.* (2008).

269 Continuação. **Tabela 2.** Frequência das espécies de micobactérias não-tuberculosas mais isoladas em países da Ásia, Europa, África, América do
 270 Norte e América do Sul.

País	CMAV	CMAB	<i>M. kansasii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. simiae</i>
África									
Tunísia (2002-2016)	NI	NI	23,3%	10%	16,7%	6,6%	NI	NI	NI
Gana (2012-2014)	47,9%	9,6%*	1,3%	NA	2,7%	NI	NI	NI	5,1%
Botsuana (2012-2014)	50%	NI	NI	NI	2,6%	7%	3,9%	NI	3,5%
Quênia (2020)	31%	14%	NI	NI	20%	NI	NI	NI	NI
Etiópia (2017)	14,3%	14,3%	2,9%	NI	11,4%	8,6%	NI	NI	42,9%
América do Norte									
Estados Unidos (2005-2019)	8,1-82,2%	4,1-37%	<1-4,7%	<2%	NI-24%	NI-20,4%	NI	NI	NI-2,9%
Canadá (1998-2010)	50,5	2,2	1,3	1,5	5%	12,8	NI	21,6	NI
México (2001-2017) #	47	27,3	7,6	NI	27,3	NI	NI	NI	NI
América do Sul									
Argentina (1991-2010) #	57,6-75%	NI	3-10,6%	1,5-6%	3-16%	NI-10,6%	NI	NI-1,5%	NI-3%
Brasil (1993-2016)	12-73,4%	1,9-32%	NI-33,6%	NI-2,5%	NI-20%	NI-30%	NI	NI	NI
Colômbia (2012-2016)	42,1%	27,5%	3,3%	5,5%	13,2%	0,4%	0,4%	NI	1,1%
Guiana Francesa (2008-2018)	29,2%	3,4%	2%	NI	23,1%	4,8%	NI	0,7%	0,7%
Uruguai (2006-2018)	57,6%	1,2%	8,2%	3,1%	3,1%	5,9%	NI	0,8%	1,2%

271 *Identificação dos membros do complexo *M. abscessus* (CMAB) e do *M. chelonae* sem distinção. #Espécies isoladas de casos de doenças pulmonares causadas por MNT. **NA:**
 272 Não se aplica. **NI:** Não identificado. **CMAV:** Complexo *M. avium*. **Fonte:** Adaptado de: Barnes; Rojo; Moretto (2004); Busatto *et al.* (2020); Chaptal *et al.* (2022); de Lima *et*
 273 *al.* (2013); Greif *et al.* (2020); Imperiale *et al.* (2012); Lima *et al.* (2022); Llerena; Valbuena; Zabaleta (2018); Pedro *et al.* (2008, 2017); Prevots *et al.* (2023); Puga *et al.* (2018);
 274 Zamarioli *et al.* (2008).

Embora as MNT sejam consideradas patógenos oportunistas, o relato de DP-MNT está aumentando exponencialmente em todo mundo (Donohue, 2021; Halstrom; Price; Thomson, 2015; Park *et al.*, 2020; Prevots *et al.*, 2017), impulsionado pelo aprimoramento das técnicas diagnósticas para o isolamento e identificação das espécies (Griffith *et al.*, 2007; López-Roa *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2021; Puga *et al.*, 2018; Sviridov *et al.*, 2024).

Na Coreia do Sul, a prevalência de DP-MNT aumentou de 2009 para 2016, passando de 9,4 para 36,1 casos por 100 mil habitantes, sendo o *M. intracellulare*, membro do CMAV, a espécie mais frequente, enquanto a prevalência de TB diminuiu de 106,5 para 74,4 no mesmo período (Prevots *et al.*, 2023; Yoon; Choi; Ki, 2017). No Japão, um estudo nacional observou um aumento da incidência de DP-MNT de 5,7 em 2007 para 14,7 casos por 100 mil habitantes em 2014, com maior frequência de *M. avium* entre esses casos (Namkoong *et al.*, 2016). Poucos dados estão disponíveis para outras regiões asiáticas, porém, as taxas de isolamento de espécies de MNT para Taiwan, China, Índia e Singapura foram compiladas por Prevots *et al.* (2023) e podem ser observadas na Tabela 2.

Para a Europa, Prevots *et al.* (2023) analisaram estudos publicados entre 2014 e 2022 em dez países e observaram uma estabilidade na taxa de incidência de DP-MNT na França (1,025 em 2010 e 1,096 casos por 100 mil habitantes em 2017), um aumento nessa taxa no Reino Unido (22,9 em 2006 e 40,99 casos por 100 mil habitantes em 2016), e um aumento na taxa de prevalência de DP-MNT na Holanda (2,3 em 2012 e 5,9 casos por 100 mil habitantes em 2019) e Alemanha (2,3 em 2009 e 3,3 casos por 100 mil habitantes em 2014). Apenas taxas acumulativas de incidência de DP-MNT estavam disponíveis para a Escócia (2,43 de 2000 a 2010), República Tcheca (1,1 de 2012 a 2018) e Grécia (8,8 de 2007 a 2013). Na Espanha, apenas as taxas acumulativas de prevalência de DP-MNT e de isolamento de MNT foram descritas, sendo 42,8 e 113,2 casos por 100 mil habitantes de 1994 a 2014, respectivamente. Apesar da variabilidade de dados entre os países europeus, em relação a identificação das MNT, os membros do CMAV foram as espécies mais frequentes (Tabela 2).

Na África, dados nacionais sobre as taxas de prevalência e incidência do isolamento de MNT e de DP-MNT não estão disponíveis. Contudo, em uma revisão sistemática, que incluiu dados de Botsuana, Gana, Quênia e Etiópia, foi observada uma frequência maior de isolamento do CMAV, com predomínio de *M. intracellulare*. Já na Etiópia, o isolamento de *M. simiae* supera a frequência de CMAV (42,9% contra 14,3%), enquanto na Tunísia a espécie mais isolada foi *M. kansasii*. Apesar da variação nas taxas de isolamento de MNT dentro do continente africano, os membros do CMAV foram as espécies mais identificadas (Tabela 2).

Para os estudos com dados suficientes para definir DP-MNT, o *M. kansasii* foi a espécie infectante mais frequente (Prevots *et al.*, 2023).

Nos Estados Unidos os casos de DP-MNT são mais prevalentes que os casos de TB. Um estudo nacional observou que as taxas de prevalência e de incidência da DP-MNT aumentaram de 2008 para 2015, com taxas de 6,8 e 3,1 *versus* 11,7 e 4,7 casos por 100 mil habitantes, respectivamente (Winthrop *et al.*, 2020). Estudos realizados na Flórida (aumento de 14,3 para 22,6 casos por 100 mil habitantes) e Havaí (aumento de 9 para 19 casos por 100 mil habitantes) confirmam esse aumento temporal (Adjemian *et al.*, 2017; Kambali *et al.*, 2021). Assim como nos Estados Unidos, o aumento da taxa de prevalência de DP-MNT também foi registrado no Canadá, de 4,65 em 1998 para 9,1 casos por 100 mil habitantes em 2010 (Brode *et al.*, 2017; Raats *et al.*, 2022). No México, apenas taxas gerais de incidência de doenças causadas por MNT de crescimento lento e rápido foram calculadas para o período de 2001 a 2017, variando de 0,2 para 4,8 casos por 100 mil habitantes e de 0,2 para 2,1 casos por 100 mil habitantes, respectivamente (Lopez-Luis *et al.*, 2020).

Em relação as taxas de prevalência de isolamento de MNT (Tabela 2), estudos regionalizados nos Estados Unidos observaram que houve um aumento de 20 para 44 casos por 100 mil habitantes de 2005 a 2013 no Havaí, e de 2 para 48 casos por 100 mil habitantes de 2007 a 2011 em ilhas do pacífico afiliadas aos Estados Unidos, com predominância do CMAV (63,7% e 31,4%, respectivamente) (Adjemian *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018). Da mesma forma, estudos realizados no Canadá registraram o aumento da taxa de isolamento de MNT entre os anos 1998 e 2010 (11,4 para 22,2 casos por 100 mil habitantes), com predomínio dos membros do CMAV, especialmente *M. avium* (Brode *et al.*, 2017; Raats *et al.*, 2022).

Na América Latina, os boletins relatando o isolamento ou DP-MNT são escassos, o que pode ser resultado de uma baixa frequência de casos ou da subestimação dos mesmos devido à falta de capacidade diagnóstica para a identificação de MNT. Uma revisão sistemática realizada por MORA *et al.* (2021), utilizando estudos disponíveis para sete países latino-americanos, observou que o CMAV foi o mais prevalente nos casos de isolamento e de doenças causadas por MNT, seguido do CMAB, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. kansasii*. Além disso, o estudo observou que as doenças extrapulmonares eram mais frequentes que a doença pulmonar, contudo, um viés do estudo pode explicar este dado, uma vez que muitos estudos avaliados relatavam infecções de pele causadas por micobactérias de crescimento rápido adquiridas após procedimentos estéticos (Mora *et al.*, 2021).

De maneira geral, nos estudos publicados em cinco países da América do Sul, os membros do CMAV foram os mais prevalentes nos casos de isolamento de MNT, variando de 29,2% na Guiana Francesa a 75% na Argentina (Barnes; Rojo; Moretto, 2004; Busatto *et al.*, 2020; Chaptal *et al.*, 2022; Couto de Mello *et al.*, 2013; da Costa *et al.*, 2013; de Lima *et al.*, 2013; Greif *et al.*, 2020; Imperiale *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2022; Llerena; Valbuena; Zabaleta, 2018; Matos *et al.*, 2004; Pedro *et al.*, 2008, 2017; Puga *et al.*, 2018; Zamarioli *et al.*, 2008). A incidência de DP-MNT é desconhecida, contudo, em estudos realizados na Colômbia, Argentina e Guiana Francesa, dos casos de isolamento de MNT, 57,4%, 61,1% e 21,1% dos casos, respectivamente, cumpriam os critérios da *American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America* (ATS/IDSA), configurando-se como casos de doença pulmonar. Os membros do CMAV, principalmente *M. avium*, do CMAB e *M. kansasii* foram as principais espécies infectantes identificadas nesses casos (Chaptal *et al.*, 2022; Imperiale *et al.*, 2012; Llerena; Valbuena; Zabaleta, 2018).

Dentre os países latino-americanos, o Brasil é o país com maior número de produções avaliando a frequência de MNT. Segundo dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde, entre os anos de 2013 e 2019, foram notificados 2.731 casos novos de DP-MNT, sendo 22,8%, 22,4% e 12,4% dos casos causados por *M. kansasii*, CMAV e CMAB, respectivamente. No mesmo período, a região sudeste foi responsável por 56,9% dos casos notificados no país, seguida da região sul (16,9%) e nordeste (13,7%) (Brasil, 2021). Apesar da maior prevalência do CMAV, destaca-se que a distribuição das MNT varia geograficamente, como pode ser observado na Figura 1.

Ainda, durante o período de 2013 a 2019, o estado do RS foi responsável por 46,2% dos casos de DP-MNT da região sul do Brasil (213/461), sendo 27,7%, 9,9% e 8,9% dos casos causados pelo CMAV, *M. kansasii* e CMAB, respectivamente (Brasil, 2021). Um estudo realizado por Carneiro *et al.* (2018) entre 2003 e 2013 em um Hospital de Porto Alegre, capital do estado do RS, observaram que 74% dos casos suspeitos de DP-MNT preencheram os critérios da ATS/IDSA, e que foram causados principalmente por *M. avium* (26%), *M. kansasii* (17%) e CMAB (12%). Em um estudo realizado no município do Rio Grande, em 7,5% dos casos suspeitos de TB foram identificadas MNT, principalmente *M. avium* (72%) e CMAB (20%). Além disso, 52% desses casos ocorreram entre pessoas vivendo com HIV (PVHIV), o que vai de encontro a outros estudos que apresentam maior frequência de doenças pulmonares causadas por *M. avium* entre essa população (Busatto *et al.*, 2020).

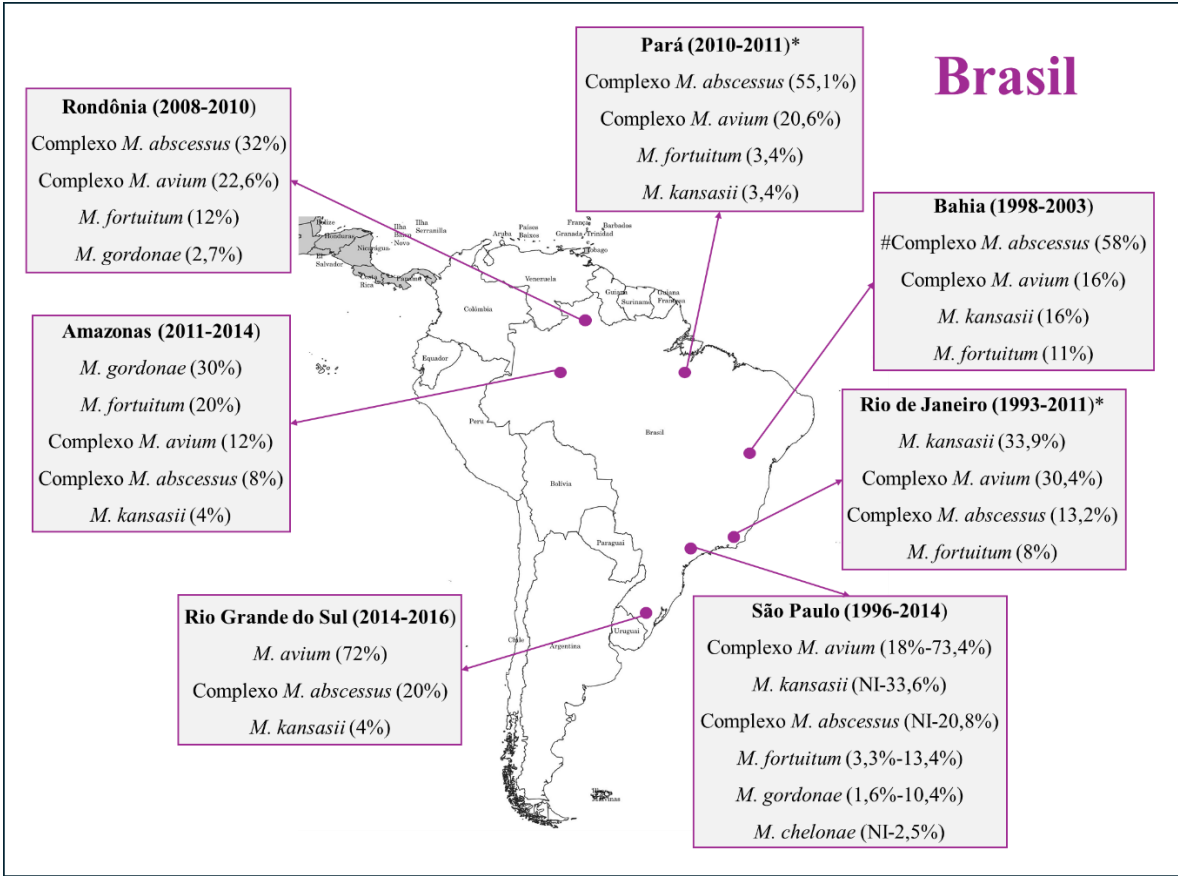


Figura 1. Frequência das espécies de micobactérias não-tuberculosas (MNT) mais isoladas em Unidades Federativas do Brasil. *Espécies isoladas de casos de doença pulmonar causadas por MNT. #Identificação de Complexo *M. abscessus* e *M. chelonae* sem distinção. **Fonte:** Adaptado de: Busatto *et al.* (2020); Couto de Mello *et al.* (2013); da Costa *et al.* (2013); de Lima *et al.* (2013); Lima *et al.* (2022); Matos *et al.* (2004); Pedro *et al.* (2008, 2017); Puga *et al.* (2018); Zamarioli *et al.* (2008).

2.3. ESQUEMAS TERAPÊUTICOS

O esquema básico de tratamento da TB causada por cepas de *M. tuberculosis* sensíveis aos ATM tem duração de seis meses, com administração de isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) por dois meses (fase de ataque), seguido por quatro meses com INH e RMP (fase de manutenção). Quando administrado adequadamente, esse esquema terapêutico apresenta uma taxa de sucesso de aproximadamente 88% em pacientes imunocompetentes e de 79% em PVHIV/AIDS. No entanto, devido ao tempo prolongado de tratamento e aos possíveis efeitos adversos, alguns pacientes interrompem o tratamento, o que favorece o surgimento de cepas resistentes aos ATM e possibilita a manutenção da cadeia de transmissão do *M. tuberculosis* (Brasil, 2019; WHO, 2024a).

Os casos de TB causados por cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos ATM, especialmente por cepas multidroga-resistentes (MDR; resistentes a pelo menos INH e RMP) e por cepas extensivamente resistentes (XDR; resistentes a INH, RMP, a pelo menos uma fluoroquinolona e a linezolida ou bedaquilina), representam um grande desafio para o controle da TB (Brasil, 2022; WHO, 2024a). Isto ocorre, pois, esses casos requerem tratamentos com duração mínima de 18 meses, com maior toxicidade, custo elevado e menor efetividade. Segundo a OMS, a taxa de sucesso dos esquemas terapêuticos é significativamente menor para esses casos, variando de 61% a 68% (Ryckman *et al.*, 2024; WHO, 2024a). A elaboração dos esquemas terapêuticos para a TB resistente deve considerar o tipo de resistência aos ATM (monorresistência, MDR e XDR) e a classificação dos ATM padronizados pela OMS para a composição dos mesmos (Brasil, 2019)

Para o tratamento das doenças causadas por MNT, a escolha dos esquemas terapêuticos deve considerar diversos fatores microbiológicos e clínicos. Portanto, além da identificação do agente etiológico, da apresentação da doença (pulmonar, extrapulmonar ou disseminada) e dos resultados de testes de sensibilidade aos ATM, a possibilidade de cura e a tolerância do paciente à toxicidade dos ATM utilizados são cruciais e influenciam diretamente a decisão terapêutica (Brasil, 2021; Daley *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007). Vale destacar que, em alguns casos o acompanhamento do paciente é recomendado em vez da administração de esquemas terapêuticos devido à alta toxicidade, ao custo elevado e às taxas de sucesso de tratamento dependentes do agente etiológico (Daley *et al.*, 2020).

Diversas combinações de ATM são recomendadas por órgãos nacionais e internacionais como, o Ministério da Saúde e a ATS/IDSA, para o tratamento de infecções causadas por MNT (Brasil, 2021; Daley *et al.*, 2020). No entanto, as diretrizes mantêm a base dos esquemas terapêuticos, estabelecendo que é fundamental a administração de pelo menos três ATM, para reduzir a aquisição de resistência aos ATM, por no mínimo 12 meses após a conversão da cultura ou por 18 meses quando não é possível coletar amostras de escarro (Brasil, 2021; Daley *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007).

Para doenças causadas por membros do CMAV (Tabela 3), a base dos esquemas terapêuticos são os macrolídeos, principalmente claritromicina ou azitromicina, que podem causar uma melhora sintomática e regressão da doença (Brasil, 2021; Daley *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007). Estudos avaliando os esquemas terapêuticos utilizados para o tratamento de doenças pulmonares causadas pelo CMAV mostraram que a utilização de macrolídeos resulta em taxas médias de sucesso do tratamento de 60% (55,1% a 68,1%) (Cheng *et al.*, 2022; Kwak

et al., 2017; Nasiri *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2025). Em casos de aquisição de resistência aos macrolídeos, a taxa de sucesso do tratamento reduz significativamente, variando de 11% a 36%, o que demonstra que a sensibilidade aos macrolídeos está diretamente relacionada ao sucesso de tratamento de doenças causadas por este grupo (Kadota *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2025; Park *et al.*, 2019).

Tabela 3. Esquemas terapêuticos para o tratamento de doenças causadas pelo CMAV.

Apresentação da doença	Tratamento recomendado	Tempo de tratamento
Geral, sem complicações	CLA; RMP ou RMP + INH*; e	18 meses ou 12 meses após conversão da cultura
	EMB	
Formas graves e cavitárias	AMI (3-6 meses [#]);	
	CLA;	
	RMP ou RMP + INH; e	
	EMB	

Fonte: Adaptado de: Brasil (2021). *O uso de RMP + INH deve ser considerado quando houver indisponibilidade de RMP isolada. [#]Tempo dependente da evolução clínica do paciente. **CLA:** Claritromicina; **RMP:** Rifampicina; **INH:** Isoniazida; **EMB:** Etambutol; **AMI:** Amicacina.

É importante destacar que a diferenciação dos membros do CMAV não é realizada rotineiramente, de modo que não estão bem elucidados os fatores de risco, virulência e variabilidades terapêuticas entre as espécies (Griffith *et al.*, 2007). Estudos relatam que o *M. intracellulare* parece responder melhor ao tratamento de doenças pulmonares e tem menores taxas de recidiva quando comparado ao *M. avium*, além de ser mais prevalente entre pacientes imunocompetentes (Boyle *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2020). Em contrapartida, outros estudos relatam menores taxas de resposta ao tratamento (56% *versus* 74%) e maiores taxas de mortalidade (20,3% a 45,5% *versus* 8% a 27,9%) entre pacientes com *M. intracellulare* em comparação com *M. avium* (Azar *et al.*, 2020; Hwang *et al.*, 2017; Jhun *et al.*, 2020; Koh *et al.*, 2012). Por fim, o *M. chimaera* parece ser menos virulento e menos frequente em doenças pulmonares (Boyle *et al.*, 2015; Mason *et al.*, 2022). Portanto, destaca-se que, apesar de não ser realizada de forma rotineira, a diferenciação dos membros do CMAV, especialmente *M. avium* e *M. intracellulare*, pode ter implicações prognósticas e terapêuticas importantes.

Para doenças pulmonares causadas por *M. kansasii*, a base do esquema terapêutico é a RMP, que apresenta altas taxas de sucesso terapêutico (89,9%). A escolha dos ATM complementares à RMP não é clara, contudo, recomenda-se o esquema combinado de RMP,

EMB e INH devido aos bons resultados terapêuticos alcançados (Brasil, 2021; Cheng *et al.*, 2022; Daley *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007; Sharma; Upadhyay, 2020) (Tabela 4). Embora sejam descritas taxas de resistência mais baixas do *M. kansasii* frente a RMP, claritromicina e amicacina, altas taxas de resistência a BEM (47,9% a 76,7%) e INH são relatadas (16,8% a 97,8%) (Akrami; Dokht khosravi; Hashemzadeh, 2023; Guo *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023). Neste cenário, é fortemente recomendada a realização do teste de sensibilidade aos ATM, especialmente frente a RMP (Brasil, 2021; Daley *et al.*, 2020; Haworth *et al.*, 2017).

Tabela 4. Esquemas terapêuticos para o tratamento de doenças causadas pelo *M. kansasii*.

Apresentação da doença	Tratamento recomendado	Tempo de tratamento
Geral, sem complicações:	RMP + INH; e	
Sensível à RMP	EMB	
Geral, sem complicações:	INH;	
Resistente à RMP	EMB; e	
	CLA	
Geral, sem complicações*	RMP + INH;	18 meses ou 12 meses após conversão da cultura
	EMB; e	
	CLA	
	AMI (3-6 meses [#]);	
Formas graves e cavitárias	RMP + INH;	
	EMB; e	
	CLA	

Fonte: Adaptado de: Brasil (2021). *Esquema terapêutico utilizado na ausência de testes de sensibilidade aos ATM. [#]Tempo dependente da evolução clínica do paciente. **CLA:** Claritromicina; **RMP:** Rifampicina; **INH:** Isoniazida; **EMB:** Etambutol; **AMI:** Amicacina.

Vale ressaltar que, apesar das similaridades entre as doenças pulmonares causados por *M. kansasii* e a TB, incluindo os esquemas terapêuticos, o *M. kansasii* é intrinsicamente resistente a PZA, é menos sensível ao EMB e à INH do que o *M. tuberculosis*, e requer esquemas terapêuticos mais longos (Brasil, 2021; Daley *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007; Sharma; Upadhyay, 2020). Além disso, é possível que a utilização do esquema terapêutico anti-TB de forma empírica leve à aquisição de resistência a RMP, EMB e/ou INH e, portanto, a identificação correta da espécie infectante é crucial para um melhor prognóstico do paciente (Zhang *et al.*, 2023).

Quando se trata do tratamento de doenças causadas por CMAB, ainda não há um esquema terapêutico de eficiência comprovada. Entretanto, o uso de macrolídeos combinado a

pelo menos outros três ATM, selecionados com base no perfil de sensibilidade, é recomendado (Tabela 5). Além disso, em doenças pulmonares causadas por CMAB, a ressecção cirúrgica de envoltórios pulmonares associada a utilização de macrolídeos, oferece uma melhor probabilidade de cura (Daley *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007).

As taxas de mortalidade dos pacientes com doenças causadas por CMAB são altas (11,4% a 50,6%), enquanto as taxas de sucesso terapêutico são baixas, podendo estar em torno de 30% em casos associados a resistência aos macrolídeos (Cheng *et al.*, 2022; Jhun *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2024). Isto se deve à resistência intrínseca das espécies do CMAB a diversos ATM, além da resistência induzida a macrolídeos, que são a base dos esquemas terapêuticos (Alexander *et al.*, 2025; Ju *et al.*, 2025; Kang *et al.*, 2024; Pasipanodya *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2019). Devido a essas singularidades, o esquema terapêutico das doenças causadas por CMAB é mais longo, com uma fase de ataque de no mínimo um mês e uma fase de manutenção de pelo menos 12 meses (Brasil, 2021; Daley *et al.*, 2020).

Tabela 5. Esquemas terapêuticos para o tratamento de doenças causadas pelo CMAB.

Apresentação da doença	Tratamento recomendado	Tempo de tratamento
Geral	FASE DE ATAQUE:	
	AMI injetável (3x/semana);	
	TGC;	1 a 3 meses;
	IMP ou ERT;	Dependente da evolução clínica
	CLA; e	
	CFZ	
	FASE DE MANUTENÇÃO:	
	AMI inalatória;	18 meses ou 12 meses após
	CLA;	conversão da cultura
	CFZ; e	
	MFX	

Fonte: Adaptado de: Brasil (2021). **AMI:** Amicacina; **TGC:** Tigeciclina; **IMP:** Imipenem; **ERT:** Ertapenem; **CLA:** Claritromicina; **CFZ:** Clofazimina; **MFX:** Moxifloxacina.

Devido aos rigorosos critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos para o diagnóstico de DP-MNT e à sintomatologia semelhante à da TB, o tratamento anti-TB é frequentemente iniciado empiricamente antes da identificação da espécie infectante (Daley *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007). No entanto, os ATM anti-TB são apenas parcialmente eficazes para o tratamento de DP-MNT, podendo contribuir para o desenvolvimento de resistência aos

ATM. Além das taxas reduzidas de sucesso dos esquemas terapêuticos recomendados, o diagnóstico e o tratamentos tardios de DP-MNT também resultam em desfechos clínicos desfavoráveis. Portanto, para garantir a introdução de esquemas terapêuticos eficazes, a identificação rápida e correta da espécie infectante é crucial (Bryant *et al.*, 2016; Gopalaswamy *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007; Halstrom; Price; Thomson, 2015; Luthra; Rominski; Sander, 2018; Twabi *et al.*, 2021).

2.4. DIAGNÓSTICO

Convencionalmente, o diagnóstico da TB baseia-se em critérios clínicos, achados radiológicos de tórax e métodos microbiológicos bem estabelecidos (Brasil, 2019). Contudo, o diagnóstico de DP-MNT é desafiador devido às dificuldades em distingui-las clínica e radiologicamente da TB. Diagnósticos incorretos levam ao uso de esquemas terapêuticos ineficazes e resultam em piores prognósticos (subseção 2.3). Dessa forma, a DP-MNT sempre deve ser considerada, especialmente em casos de falhas terapêuticas recorrentes do esquema terapêutico anti-TB (Ahmed *et al.*, 2020; Brasil, 2021; Griffith *et al.*, 2007).

O diagnóstico de DP-MNT envolve uma abordagem multifacetada que segue critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos conforme recomendações da ATS/IDSA (Tabela 6) (Griffith *et al.*, 2007). A aplicação desses critérios impede a introdução de esquemas terapêuticos desnecessários ou ineficazes, além de garantir a diferenciação entre as colonizações transitórias ou as contaminações (ambientais e amostrais), e as DP-MNT (Brasil, 2021; Griffith *et al.*, 2007; Winthrop *et al.*, 2017).

514 **Tabela 6.** Critérios diagnósticos para o diagnóstico de doença pulmonar causada por MNT.

Critérios	Achados
Clínicos	Sintomas: Tosse crônica ou recorrente, fadiga, febre, dor torácica e perda de peso, e; Exclusão de outros diagnósticos (ex.: TB)
Radiológicos	Radiografia do tórax com opacidade nodulares ou cavitárias (fibrocavitária, principal característica radiográfica, com envolvimento mais marcado na pleura) ou; Tomografia computadorizada mostrando bronquiectasia multifocal com múltiplos nódulos pequenos.
Microbiológicos	Isolamento em cultura de pelo menos duas amostras separadas de escarro ou; Isolamento em cultura de pelo menos uma amostra de lavado broncoalveolar ou; Isolamento em cultura de uma biópsia pulmonar com histopatologia micobacteriana ou; Biópsia pulmonar com histopatologia micobacteriana associada ao isolamento em cultura de amostras de escarro ou lavado broncoalveolar. Visualização de bacilos álcool-ácido resistentes por baciloscopia (microscopia)

515 **Fonte:** Adaptado de Griffith *et al.* (2007).

516

517 Identificar a mesma espécie em duas amostras não estéreis ou em uma amostra estéril é
518 um fator microbiológico que representa significância clínica para o diagnóstico de DP-MNT.
519 Isto se deve à observação de que menos de 60% dos pacientes com isolamento único de CMAV
520 e CMAB, e menos de 20% com *M. chelonae*, preenchem os critérios diagnósticos de doença.
521 Entretanto, um único isolamento de *M. kansasii*, no contexto adequado – que atende aos
522 critérios clínicos e radiológicos –, pode justificar a introdução imediata do esquema terapêutico
523 (Daley *et al.*, 2020; Sharma; Upadhyay, 2020).

524 O diagnóstico microbiológico da TB e de DP-MNT é realizado principalmente através
525 de métodos fenotípicos, como baciloscopia com coloração de Ziehl-Neelsen (microscopia),
526 cultura e/ou testes bioquímicos, e métodos moleculares, que permitem a detecção e
527 diferenciação acurada e rápida das espécies micobacterianas (Ahmed *et al.*, 2020; Bhalla *et al.*,
528 2018; Brasil, 2019, 2021; Griffith *et al.*, 2007; WHO, 2024a). Ressalta-se a importância da
529 identificação das espécies de micobactérias através de métodos moleculares é preferível, uma
530 vez que a identificação fenotípica pode requerer até três meses para a obtenção de resultados
531 (Brasil, 2021).

532

2.4.1. Métodos fenotípicos

Muitos países com altas cargas de TB são fortemente dependentes da baciloscopia para o diagnóstico da doença, devido à simplicidade, baixo custo e rapidez para a obtenção dos resultados (12 a 24 horas) (Brasil, 2022; Gopalaswamy *et al.*, 2020; Lewinsohn *et al.*, 2017). A baciloscopia apresenta baixa sensibilidade (20% a 80%; ≥ 5.000 bacilos/ml) e não é capaz de distinguir BAAR, portanto, não é capaz de diferenciar as espécies de micobactérias. Entretanto, resultados positivos na baciloscopia, associados a resultados negativos para TB por outros métodos microbiológicos, podem indicar a presença de MNT (Balikçi; Erbakan; Babalik, 2024; Brasil, 2019; Brum *et al.*, 2016; Gopalaswamy *et al.*, 2020; Lewinsohn *et al.*, 2017; Sarro *et al.*, 2021).

A cultura é considerada o método padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial da TB e de doenças causadas por MNT, apresentando alta sensibilidade (≥ 10 bacilos/ml), quando comparada à baciloscopia. A cultura pode ser realizada utilizando meios sólidos, tais como Ogawa-Kudoh e Löwenstein-Jensen, e em meios líquidos, tais como Middlebrook 7H9 e caldo Mueller-Hinton. Culturas líquidas fornecem resultados positivos mais rápidos (em média 14 dias) em comparação com as sólidas (em média 20 dias). No entanto, as culturas sólidas permitem a quantificação bacteriana e fornecem características fenotípicas adicionais, que podem nortear a classificação das espécies micobacterianas (Brasil, 2021, 2022; Gopalaswamy *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007; Lewinsohn *et al.*, 2017; Stephenson *et al.*, 2019).

A realização da cultura, no entanto, exige instalações laboratoriais complexas, que não estão disponíveis na maioria dos locais com recursos limitados. Além disso, quando comparada a outros métodos, como a baciloscopia, a cultura demanda mais tempo para a liberação dos resultados positivos (14 a 20 dias) e negativos (20 a 60 dias) (Brasil, 2019, 2021; Fang *et al.*, 2019; Gopalaswamy *et al.*, 2020). É importante destacar que, embora a cultura, por si só, não permita a identificação das micobactérias, possibilita a realização de outros métodos para a diferenciação das espécies e a determinação do perfil de sensibilidade aos ATM (Brasil, 2021; Griffith *et al.*, 2007; Lewinsohn *et al.*, 2017; Sarro *et al.*, 2021).

Outros métodos fenotípicos, como testes bioquímicos e cromatografia líquida de alta performance (HPLC; *High-performance liquid chromatography*), podem ser utilizados para a identificação das micobactérias. No entanto, esses métodos apresentam desvantagens que levaram à sua substituição por outros métodos, especialmente moleculares (Forbes *et al.*, 2018; Gopalaswamy *et al.*, 2020; Griffith *et al.*, 2007; Sharma; Upadhyay, 2020).

Os testes bioquímicos, que se baseiam em produtos de reações bioquímicas, são laboriosos e demorados. Embora sejam de baixo custo (1 a 2 dólares por amostra), apresentam baixa reprodutibilidade e acurácia, e a obtenção dos resultados pode demorar de um a dois meses. Além disso, muitas espécies de MNT intimamente relacionadas não podem ser diferenciadas e identificadas (Bhalla *et al.*, 2018; Kazumi; Mitarai, 2012; Khieu *et al.*, 2021).

A HPLC, que se baseia na análise de padrões de ácidos micólicos, permite a identificação de micobactérias em cerca de 5 dias. Em locais em que o equipamento de HPLC está disponível, o custo por amostra é de aproximadamente 4 dólares, semelhante ao custo da cultura líquida automatizada utilizando o sistema BACTEC™ MGIT™ (BD, Nova York, EUA). No entanto, esse método requer um banco de perfis de ácidos micólicos de cepas de referência robusto e uma considerável experiência para sua execução e interpretação. Além disso, a HPLC depende da obtenção de culturas puras, o que aumenta o tempo necessário para a liberação dos resultados. Assim como os testes bioquímicos, a HPLC não é capaz de diferenciar espécies de micobactérias intimamente relacionadas, como, por exemplo, os membros dos CMAV (Forbes *et al.*, 2018; Jeong *et al.*, 2011; Mediavilla-Gradolph *et al.*, 2015; Sebastian *et al.*, 2018; Tortoli, 2014).

Adicionalmente, a técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa (MALDI-TOF MS; *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*), baseada na análise de espectros de massa de proteínas bacterianas, tem sido cada vez mais utilizada para a identificação de micobactérias. O MALDI-TOF permite identificar quase 160 espécies micobacterianas com alta especificidade (98,6%) em cerca de 90 minutos. Embora o custo inicial do equipamento seja elevado, o custo por amostra é baixo (≤ 5 dólares), sendo similar a outros métodos comerciais. No entanto, devido a estrutura da parede celular das micobactérias, são necessárias etapas de pré-extração das proteínas, que exigem infraestrutura laboratorial complexa e kits de extração, aumentando o custo do teste por amostra. Vale destacar que, como outros métodos, o MALDI-TOF falha em diferenciar MNT intimamente relacionadas. (Bacanelli; Araujo; Verbisck, 2023; Brasil, 2021; Forbes *et al.*, 2018; Neuschlova *et al.*, 2017; Sharma; Upadhyay, 2020).

2.4.2. Métodos moleculares

Até a década de 1990, o diagnóstico de doenças causadas por micobactérias dependia exclusivamente da utilização de métodos fenotípicos (Bhalla *et al.*, 2018; Khieu *et al.*, 2021).

A partir de então, diversos métodos moleculares, comerciais e *in-house*, foram desenvolvidos para esta identificação. Dentre esses métodos, destacam-se aqueles baseados em hibridização reversa, como o ensaio de sonda em linha (LPA; *Line Probe Assay*), e as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs; *Nucleic Acid Amplification techniques*) (Gopalaswamy *et al.*, 2020; Huang; Yu; Huang, 2020).

Os LPAs se baseiam na hibridização reversa de amplicons, utilizando tiras, principalmente de nitrocelulose, marcadas com sondas de DNA complementares às regiões-alvo das micobactérias. A realização dos LPAs permite a identificação acurada das espécies micobacterianas, com resultados sendo obtidos em até 24 horas, com dedicação exclusiva, através da análise visual dos padrões colorimétricos na tira-teste (Huang; Yu; Huang, 2020; Lee *et al.*, 2009; Mäkinen *et al.*, 2006; Sebastian *et al.*, 2018; Tortoli *et al.*, 2001).

Os LPAs podem ser realizados diretamente em amostras de escarro e apresentam alta especificidade. No entanto, sua sensibilidade está diretamente relacionada à carga bacilar na amostra, sendo reduzida em casos de microscopia negativa. Essa limitação é especialmente relevante em amostras paucibacilares, condição frequentemente observada em PVHIV/AIDS (Lara-Oya *et al.*, 2013; Luetkemeyer *et al.*, 2014; Maschmann *et al.*, 2013; Meaza *et al.*, 2017). Por esse motivo, é comum que os LPAs sejam realizados a partir de amostras positivas na microscopia e/ou de DNA extraído de culturas bacteriana (Ahmad; Mokaddas, 2019; Brandao *et al.*, 2019; Feliciano *et al.*, 2015; Hofmann-Thiel *et al.*, 2011; Moga *et al.*, 2023; WHO, 2024b).

Diversos kits comerciais de LPA foram desenvolvidos para a identificação de micobactérias (Tabela 7), sendo os kits Genotype® (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha) os mais utilizados. O Genotype está disponível em cinco formatos: **MTBDRplus** e **MTBDRsl** para a identificação do CMTB e detecção de resistência à RMP, INH, etionamida, fluoroquinolonas e/ou amicacina; **CM** (*Common Mycobacteria*) e **AS** (*Additional Species*) para a identificação do CMTB e 31 espécies de MNT; e **NTM-DR** para a identificação de sete espécies de MNT e detecção de resistência à macrolídeos e aminoglicosídeos (Barnard *et al.*, 2012; Epperson *et al.*, 2024; Forbes *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2009; Mäkinen *et al.*, 2006). Destaca-se que apenas os kits Genotype MTBDRplus e MTBDRsl (NIPRO Corporation, Osaka, Japão) são endossados pela OMS (WHO, 2024b).

Embora úteis para a identificação de micobactérias, os LPAs são tecnicamente complexos, demorados, exigem alto nível de infraestrutura e possuem alto custo (13-25 dólares por amostra) quando comparados com testes baseados em NAATs, como o Xpert para a

630 detecção do CMTB. Além disso, identificações incorretas ou a identificação de espécies em
631 complexos podem ocorrer devido às reações cruzadas entre espécies intimamente relacionadas
632 (Mäkinen *et al.*, 2006; Meaza *et al.*, 2017; Sebastian *et al.*, 2018; Sharma; Upadhyay, 2020;
633 Tortoli *et al.*, 2001; WHO, 2024b).

634 **Tabela 7.** Comparação de kits comerciais baseados em hibridização reversa (LPA) para a identificação e micobactérias.

Característica	SpeedOligo Mycobacteria ¹	INNO-LiPA Mycobacteria	Genotype CM ² /AS ³	Genotype NTM-DR ⁴
Gene alvo	rRNA 16S e ITS 16S-23S rRNA	ITS 16S-23S rRNA	23S rRNA	<i>erm</i> (41), <i>rrl</i> e rRNA 16S
Tempo para resultados	~2 h [#]	~3 h [#]	2-3 h [#]	2-3 h [#]
Sensibilidade: Microscopia positiva	93% a 100%	87% a 100%*	92,7%	92,1% a 100%*
Sensibilidade: Microscopia negativa	42% a 56%		60%	
Deteção de resistência	Não	Não	Não	Macrolídeos e aminoglicosídeos
Micobactérias identificadas (N)	CMTB + 13 espécies MNT	<i>Mycobacterium</i> sp. + 16 espécies	CMTB + 15 e 16 espécies MNT	7 espécies MNT
Referências	(Hofmann-Thiel <i>et al.</i> , 2011; Lara-Oya <i>et al.</i> , 2013; Ramis <i>et al.</i> , 2015)	(García-Agudo <i>et al.</i> , 2011; Padilla <i>et al.</i> , 2004; Suffys <i>et al.</i> , 2001; Tortoli; Mariottini; Mazzarelli, 2003)	(Lee <i>et al.</i> , 2009; Mäkinen <i>et al.</i> , 2006; Schildhaus <i>et al.</i> , 2022)	(Epperson <i>et al.</i> , 2024; Huh <i>et al.</i> , 2019)

635 [#]Extração de DNA, amplificação, hibridização, leitura - Não inclui o tempo de processamento e da cultura, se realizada. *Os artigos não compararam a sensibilidade do kit com
636 resultados de microscopia. ¹Venda descontinuada no Brasil. ²Identificação de *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M.*
637 *scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*-*M. ulcerans*, *M. szulgai*, CMTB e *M. xenopi*. ³Identificação de *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*,
638 *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M.*
639 *asiaticum* e *M. shimoidei*. **4:** Identificação de *M. chelonae*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. avium*, *M.*
640 *chimaera*, *M. intracellulare*. **rRNA:** RNA ribossômico; **ITS:** Espaçador interno transcrito; **CM:** *Common Mycobacteria*; **AS:** *Additional Species*; **MNT (NTM):** Micobactérias
641 não-tuberculosas; **CMTB:** Complexo *M. tuberculosis*.

A utilização de NAATs reduziu significativamente o tempo necessário para distinguir o CMTB de MNT, quando comparadas aos métodos fenotípicos. Entre as NAAT podem ser citadas a técnica de PCR, o sequenciamento de genes por Sanger e o sequenciamento de genomas completos (WGS; *Whole Genome Sequencing*) (Gopalaswamy *et al.*, 2020; Huang; Yu; Huang, 2020; Lee *et al.*, 2018; Lewinsohn *et al.*, 2017). Na tabela 8 estão sintetizados os principais testes baseados em NAATs descritos na literatura.

A técnica de PCR-Restriction-enzyme Analysis (PRA) é baseada na análise dos padrões de restrição enzimática e foi amplamente utilizada para a diferenciação de espécies de MNT. Essa técnica envolve a amplificação de um fragmento de 439 pares de bases do gene *hsp65*, seguida pela digestão dos produtos de PCR utilizando as enzimas de restrição HaeIII e BstEII (Telenti *et al.*, 1993). Por utilizar a PCR convencional, a PCR-PRA é considerada de baixo custo e relativamente rápida. No entanto, padrões de polimorfismos semelhantes entre espécies relacionadas ou pequenas diferenças nesses padrões, dificultam a interpretação dos resultados e limitam sua utilização (Huang; Yu; Huang, 2020; Macente *et al.*, 2013).

O uso da técnica de *Real-Time* PCR no diagnóstico de doenças infecciosas tem aumentado consideravelmente. Embora exija equipamentos caros e considerável experiência para a sua execução, essa técnica é considerada uma alternativa à hibridização e à PCR convencional. Isto se deve, especialmente, à dispensa de etapas adicionais pós-amplificação do material genético, à alta sensibilidade e especificidade, ao baixo risco de contaminação e à rapidez para a obtenção dos resultados (KIM *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2018; NAGDEV *et al.*, 2011).

Além disso, a *Real-Time* PCR pode utilizar sondas fluorogênicas, como as de hidrólise TaqMan ou do sistema lights-on" e "lights-off, que permitem a detecção de vários alvos simultaneamente (*multiplex*) (KIM *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2018). Assim, testes baseados na utilização de PCR *Real-Time multiplex* são promissores para serem utilizados na rotina diagnóstica para a identificação do *M. tuberculosis* e de MNT, uma vez que economizam tempo e recursos (KIM *et al.*, 2010; SARRO *et al.*, 2021).

Atualmente, uma das NAATs aprovadas pela OMS para o diagnóstico inicial de TB e detecção de resistência a RMP é o método comercial Xpert, um teste automatizado baseado em *Hemi-Nested Real-Time* PCR, e denominado como Teste Rápido Molecular para a TB pelo Ministério da Saúde. O Xpert possui duas versões: o MTB/RIF, que tem como alvo o gene *rpoB*, e o seu sucessor, o MTB/RIF Ultra, desenvolvido para aumentar a sensibilidade do teste para amostras paucibacilares (limite de detecção de 114 para 16 unidades formadoras de

colônia/ml), utilizando como alvos o gene *rpoB* e as sequências de inserção 6110 e 1081. O MTB/RIF Ultra e o MTB/RIF apresentam alta sensibilidade (88,1% versus 72,5%) e especificidade (96,2% versus 98,9%), com os resultados podendo ser obtidos em menos de 2 horas, diretamente de amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares (Chakravorty *et al.*, 2017; Helb *et al.*, 2010; WHO, 2020; Zhang; Xue; He, 2020)

Outras plataformas moleculares foram desenvolvidas e estão em fase de avaliação para superar as limitações do equipamento tradicional (GeneXpert) do método Xpert em termos de acessibilidade (GeneXpert Edge® e GeneXpert Omni®). As plataformas Edge e Omni mantêm a detecção do CMTB e da resistência à RIF através da versão MTB/RIF Ultra, mas utilizam equipamentos portáteis operados por Tablet e smartphone, respectivamente, podendo ser utilizados em locais de difícil acesso e com infraestrutura limitada (Cordeiro-Santos *et al.*, 2020; Ejalu *et al.*, 2022; Georghiou *et al.*, 2021; Zidovec Lepej; Poljak, 2020). Além disso, a versão GeneXpert MTB/XDR, também recomendada pela OMS, está em fase de avaliação para detectar resistência adicional à INH, às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos, utilizando como alvos os genes *katG*, *inhA*, *gyrA*, *gyrB*, *rrs* e *eis*. Esta versão tem se mostrado altamente específica ($\geq 95,8\%$), embora a sensibilidade varie de acordo com o ATM avaliado (61,8% a 96,8%) (Chen *et al.*, 2023; Katamba *et al.*, 2023; Sadari *et al.*, 2022).

Apesar das vantagens mencionadas, o Xpert possui um custo elevado e depende de um único fornecedor, o que dificulta sua ampla utilização em países em desenvolvimento e/ou com alta carga de TB (Boyle *et al.*, 2014; Iram *et al.*, 2014; Nurwidya *et al.*, 2018; Samper; González-Martin, 2018). Além disso, embora o uso do Xpert tenha acelerado o tempo de resposta diagnóstica para TB e diferencie indiretamente o CMTB das MNT, ele não é capaz de detectar e identificar MNT de importância clínica, tornando necessária a realização de testes complementares (Brasil, 2021).

Com capacidade comparável ao Xpert, o sistema Truenat™ (Molbio, Índia), outra NAAT baseada em *Real-Time* PCR, teve suas versões MTB, MTB *plus* e MTB-RIF Dx aprovadas pela OMS para o diagnóstico inicial de TB e detecção de resistência à RMP (WHO, 2020). As versões Truenat MTB e MTB *plus* possuem sensibilidades superiores a 73% e 80%, respectivamente, e especificidade superior a 96%. Já o MTB-RIF Dx apresenta sensibilidade de 84% e uma especificidade de 95% (Meaza *et al.*, 2021; Ngangue *et al.*, 2022; Penn-Nicholson *et al.*, 2021). Apesar das recomendações da OMS, as três versões do Truenat ainda não possuem registros nacionais (Brasil, 2025) e não são recomendados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2022).

Visando a descentralização do diagnóstico de TB, o Truenat possui a vantagem de ser um teste portátil e alimentado por bateria, baseado em chips, que pode ser utilizado em locais com recursos limitados (Jose *et al.*, 2024; Penn-Nicholson *et al.*, 2021). É importante destacar que, a utilização do sistema Truenat para determinar o perfil de resistência à RMP, requer que as amostras positivas para o CMTB pelas versões MTB e MTB *plus* sejam submetidas a uma segunda análise pelo MTB-RIF. Os testes possibilitam a liberação do resultado em aproximadamente duas horas (Meaza *et al.*, 2021; Ngangue *et al.*, 2022; Penn-Nicholson *et al.*, 2021). Além das versões já disponíveis, estão em fase de avaliação as seguintes versões: MTB-INH; MTB-FQ; MDR-TB *plus*; e MTB-BDQ (Vachaspathi, 2024).

Além disso, outros testes baseados em NAATs automatizadas de complexidade moderada para a detecção do CMTB e de resistência à RMP e INH foram recomendados pela OMS para laboratórios centralizados (WHO, 2024b), ou estão sendo avaliados (Vachaspathi, 2024). Entre os testes recomendados estão o **Abbott Real-Time MTB e MTB RIF/INH** (Abbott, EUA) (de Vos *et al.*, 2021; Saavedra *et al.*, 2021), **BD MAX™ MDR-TB** (Becton Dickinson, EUA) (Armstrong *et al.*, 2023; Ko; Yoon, 2025; Ko; Yoon; Lee, 2024), **Cobas® MTB e MTB-RIF/INH** (Roche Diagnostics, Suíça) (de Vos *et al.*, 2024; Nadarajan *et al.*, 2021) e **FluoroType® MTB e MTBDR** (Hain Lifescience, Alemanha) (Dippenaar *et al.*, 2021; Ghebrekristos *et al.*, 2025). Esses testes, baseados em *Real-Time* PCR, possibilitam a realização de um grande volume de testes simultaneamente (≥ 22) com elevada sensibilidade (75% a 95,9%) e especificidades (80% a 100%). No entanto, a liberação dos resultados pode levar até oito horas.

Apesar da diversidade de testes baseados em NAATs desenvolvidos ao longo dos anos para a identificação do CMTB, poucos testes comerciais baseados em *Real-Time* PCR foram desenvolvidos para discriminar o CMTB das MNT e/ou identificar as espécies de MNT. Dessa forma, a maioria dos testes baseados em *Real-Time* PCR são *in-house* e, geralmente, restritos à nível de pesquisa (Brasil, 2021).

Entre os testes comerciais descritos na literatura para a discriminação do CMTB das MNT estão: **Anyplex™ MTB/NTM** (Seegene Inc., República da Coreia) (Kim *et al.*, 2020; Sawatpanich *et al.*, 2022), **EZplex MTBC/NTM** (Genetree Research Inc., Seul, República da Coreia) (Lee *et al.*, 2018) e **Genedia MTB/NTM** (Green Cross Medical Science Corp., Chungbuk, República da Coreia) (Kim *et al.*, 2020; Shin *et al.*, 2020). Apenas os testes **LightCycler® Mycobacterium** (Roche Products, Randburg, África do Sul) (Bainomugisa *et al.*, 2015; Gous *et al.*, 2012; Omar *et al.*, 2011) e **MeltPro Myco Assay** (Zeesan Biotech,

Xiamen, China) (Huang *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2019) são descritos como capazes de identificar o CMTB e espécies de MNT (Tabela 8). Até o momento, poucos estudos avaliando esses testes estão disponíveis na literatura e nenhum dos testes mencionados acima está disponível comercialmente no Brasil.

O sequenciamento de genes é considerado o método padrão-ouro para a identificação de espécies e subespécies de MNT. Os alvos mais utilizados para a identificação de espécies de micobactérias são os genes *rrs*, *hsp65* e *rpoB*, que codificam o rRNA 16S, a proteína de choque térmico de 65 kDa e a subunidade β da RNA polimerase, respectivamente. Apesar da sua alta sensibilidade, a discriminação de espécies geneticamente relacionadas através do sequenciamento parcial ou total de um único gene (ou região) não é suficiente, o que exige o uso de métodos complementares para a identificação. Além disso, muitos laboratórios enfrentam limitações financeiras, o que restringe seu uso na rotina diagnóstica (Brasil, 2021; Daley *et al.*, 2020; Huang; Yu; Huang, 2020; Kazumi; Mitarai, 2012; Samper; González-Martin, 2018).

Entre as NAAT, o WGS é o método com maior poder de resolução para identificar e caracterizar as espécies de micobactérias, bem como detectar mutações associadas a resistência aos ATM (Bryant *et al.*, 2013; Gopalaswamy *et al.*, 2020; Khieu *et al.*, 2021). Seu custo ainda é restritivo e a análise de dados exige profissionais com *expertise*, limitando seu uso na rotina diagnóstica, especialmente em regiões endêmicas de TB. No entanto, o uso de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS; *Next Generation Sequencing*) tem reduzido os custos e o tempo necessário para a obtenção dos resultados genômicos (Feliciano *et al.*, 2018; Nurwidya *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2022; Vogel *et al.*, 2021).

Embora o WGS-NGS faça parte da rotina diagnóstica de laboratórios com baixa demanda e/ou com poucas limitações financeiras, a obtenção de dados genômicos de qualidade exige a utilização de cultura micobacteriana (Comín *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2022; Satta *et al.*, 2018). Para superar as limitações do WGS-NGS, testes baseados em tecnologias de NGS direcionado estão sendo desenvolvidos para detectar mutações diretamente em amostras clínicas de forma rápida. Os testes de NGS direcionados desenvolvidos, até o momento, e recomendados pela OMS em 2023 para a detecção de mutações associadas a resistência à RMP, INH, PZA, EMB, fluoroquinolonas, bedaquilina, linezolida, clofazimina, amicacina, estreptomicina e/ou delamanid são **Deeplex® Myc-TB test** (Genoscreen) **AmPORE TB test** (Oxford Nanopore Diagnostics) e **TBseq® test** (Hangzhou ShengTing Medical Technology

Co) (Cabibbe *et al.*, 2020; Cloutier Charette *et al.*, 2024; Ren *et al.*, 2024; Smith *et al.*, 2020; WHO, 2024b).

Embora os testes Deeplex e AmPORE não sejam recomendados pela OMS para a identificação de espécies de micobactérias é importante destacar que, além da detecção da resistência aos ATM, estes testes visam a genotipagem do CMTB através do *locus* DR do spoligotyping e a identificação de MNT através do gene *hsp65*. Alguns estudos aplicando esses testes para a identificação de MNT apresentaram alta concordância com o sequenciamento Sanger e/ou WGS (Buckwalter *et al.*, 2023; Jouet *et al.*, 2021; Opperman *et al.*, 2024; Ren *et al.*, 2024; Smith *et al.*, 2020).

A implementação de testes baseados em NGS direcionado pode ser uma ferramenta poderosa na detecção de mutações associadas à resistência aos ATM. No entanto, apesar dos custos relativamente mais baixos em comparação com o WGS, seu custo ainda é um obstáculo significativo, especialmente em países em desenvolvimento. A dependência do catálogo de mutações da OMS é outro fator crucial para a eficácia desses testes. Além disso, atualizações constantes das bases moleculares da resistência aos ATM são necessárias para garantir que os testes reflitam com precisão as mutações mais relevantes (Cloutier Charette *et al.*, 2024; Ren *et al.*, 2024; Tram *et al.*, 2024).

A utilização dos métodos citados acima para o diagnóstico de TB e de doenças causadas por MNT é de extrema importância. Entretanto, em regiões com poucos recursos, sua utilização ainda é limitada. Neste cenário, com o intuito de superar as limitações dos métodos atualmente disponíveis (Lee; Kim; Kim, 2021; Nagdev *et al.*, 2011; Vogel *et al.*, 2021), métodos baseados em tecnologias alternativas, como amplificação isotérmica mediada por loop e sensores BiDz, foram desenvolvidos e vêm sendo avaliados (Igarashi *et al.*, 2017; Kim; Cha; An, 2015; Kim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2018; Notomi *et al.*, 2000; Ou *et al.*, 2020; Pérez-García *et al.*, 2017; Wood *et al.*, 2019). Esses métodos possuem características que os tornam opções válidas para a obtenção de métodos diagnósticos verdadeiramente *point-of-care*, como alta especificidade e sensibilidade, rapidez, simplicidade e baixo custo (Bernardini; Pieri; Ciotti, 2021; Deng *et al.*, 2021; Lee; Kim; Kim, 2021; Sarro *et al.*, 2021).

801 **Tabela 8.** Métodos disponíveis comercialmente para a identificação do complexo *M. tuberculosis* e/ou micobactérias não-tuberculosas.

Método	Tempo para resultados	Custo por amostra (\$)	Gene alvo	Características
PCR-PRA	2 dias	NI	Mais usados: rRNA 16S, <i>hsp65</i> , <i>rpoB</i>	Identificação das principais espécies de MNT; Método não automatizado, com interpretação subjetiva
Xpert MTB/RIF Ultra	1 h 30 min	7,97	IS6110, IS108 e <i>rpoB</i>	Detectam o CMTB e resistência à RMP, sendo recomendados pela OMS; Custo elevado; Não identificam MNT
Truenat MTB e MTB plus	1 h	8,00	<i>nrdB</i> ; <i>nrdZ</i> e IS6110	
Truenat MTB-RIF Dx	1 h	8,00	<i>rpoB</i>	
Abbott Real-Time MTB	~8 h	NI	IS6110 e <i>pab</i> ;	NAATs de moderada complexidade; Indicados para laboratórios centrais/referência; Detectam CMTB e resistência a RMP e INH; Tempo de resposta elevado; Não identificam MNT
Abbott Real-Time MTB RIF/INH			IS6110, <i>pab</i> , <i>rpoB</i> , <i>inhA</i> e <i>katG</i>	
BD MAX MDR-TB	~4 h	NI	IS6110, IS108, <i>rpoB</i> , <i>inhA</i> e <i>katG</i>	
Cobas MTB	3 h 30 min	NI	rRNA 16S e 5 genes <i>esx</i>	
Cobas MTB-RIF/INH			<i>rpoB</i> , <i>inhA</i> e <i>katG</i>	
FluoroType MTB	4 h 20 min	NI	<i>rpoB</i> ;	
FluoroType MTBDR			<i>rpoB</i> , <i>inhA</i> e <i>katG</i>	

802 Continuação: **Tabela 8.** Métodos disponíveis comercialmente para a identificação do complexo *M. tuberculosis* e/ou micobactérias não-
 803 tuberculosas.

Método	Tempo para resultados	Custo por amostra (\$)	Gene alvo	Características
Deeplex Myc-TB test	1-2 dias	50,00	<i>inhA, fabG1, katG, ahpC, rpoB, pncA, embB, rrs, gidB, rpsL, eis, tlyA, gyrA, gyrB, ethA, rplC, rrl, Rv0678, hsp65 e Locus DR</i>	Tecnologias de nova geração de sequenciamento; Detecção completa de genes associados à resistência aos ATM; Detecta CMTB e MNT; Custo elevado
AmPORE TB test	<24 h	~63,00	<i>rpoB, fabG1, katG, inhA, pncA, embA, embB, gyrA, gyrB, rrs, eis, tlyA, gidB, rpsL, ethA, Rv0678, atpE, rrl, rplC, ddn, fgd1, fbiA, fbiB, fbiC, hsp65 e Locus DR</i>	
TBseq test	1-2 dias	NI	<i>rpoB, ahpC katG, inhA, pncA, embA, embB, gyrA, gyrB, rrs, eis, tlyA, gidB, rpsL, ethA, Rv0678, atpE, rplC, folC, thyA, alr e hsp65</i>	
Anyplex™ MTB/NTM	~3 h e 50 min	NI	IS6110 e <i>mbp64</i> e rRNA 16S	
EZplex MTBC/NTM	~2 h	NI	IS6110 e rRNA 16S	Apenas discrimina o CMTB das MNT Custo-efetividade não descrita; Não está disponível no Brasil
Genedia MTB/NTM	NI	NI	IS6110, ITS 16S-23S rRNA e <i>rpoB</i>	

804 Continuação: **Tabela 8.** Métodos disponíveis comercialmente para a identificação do complexo *M. tuberculosis* e/ou micobactérias não-
 805 tuberculosas.

Método	Tempo para resultados	Custo por amostra (\$)	Gene alvo	Características
LightCycler Mycobacterium¹	1 h e 45 min	11,70	Região hipervariável 1 do rRNA 16S	Identifica o CMTB e 2 espécies de MNT; Custo elevado; Não está disponível no Brasil
MeltPro Mycobacteria Identification²	~3 horas	26,20	ITS 16S-23S rRNA	Identifica o CMTB e 17 espécies de MNT; Custo elevado; Compatível apenas com equipamentos específicos; Não está disponível no Brasil
Sequenciamento Sanger	7 dias	~6,00	Mais usados: rRNA 16S, <i>hsp65</i> , <i>rpoB</i> , ITS	Padrão-ouro para a identificação; Custo elevado
Sequenciamento de genoma total	Até 10 dias	130,00- 150,00	-	Custo elevado e indisponível na maioria dos laboratórios

806 **Fonte:** Adaptado de: Brasil (2021, 2022); Smith *et al.* (2020); Vachaspathi (2024); WHO (2024b). **1:** Identificação de CMTB, *M. avium* e *M. kansasii*. **2:** Identificação de
 807 CMTB, *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. simiae*, *M. terrae*, *M. marinum*/*M.*
 808 *ulcerans*, *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. malmoense* e *M. szulgai*. rRNA: RNA ribossômico; **ITS:** Espaçador interno transcrito; **MNT (NTM):**
 809 Micobactérias não-tuberculosas; **CMTB:** Complexo *M. tuberculosis*. **NI:** Não informado.



JUSTIFICATIVA



3. JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços globais para o seu controle, a TB continua sendo um grande desafio para a saúde pública, com milhões de casos não diagnosticados anualmente. Paralelamente, a incidência e a prevalência das DP-MNT vêm aumentando em diversos países, tornando o diagnóstico rápido e o manejo clínico dessas doenças cada vez mais relevantes. A TB e as DP-MNT compartilham manifestações clínicas e achados radiológicos que dificultam o diagnóstico diferencial e levam, frequentemente, à introdução empírica do esquema terapêutico para TB em pacientes com DP-MNT. No entanto, as MNT geralmente não respondem ao esquema terapêutico anti-TB, tornando o diagnóstico incorreto um fator crítico para o aumento das taxas de falha terapêutica, recorrência da doença e seleção de bacilos resistentes aos ATM.

Os métodos diagnósticos atualmente disponíveis apresentam importantes limitações, como o longo tempo de espera pelos resultados e a necessidade de equipamentos e/ou insumos de alto custo. Embora os métodos moleculares disponíveis comercialmente ofereçam alta especificidade e rapidez, seus custos elevados restringem sua aplicação em locais com poucos recursos financeiros. Diante desse cenário, torna-se essencial o desenvolvimento de testes moleculares mais acessíveis, acurados e com alta especificidade e sensibilidade, capazes de diferenciar as principais espécies de micobactérias de importância clínica. Esse desenvolvimento não apenas auxilia na redução das lacunas diagnósticas, mas também contribui para a implementação de esquemas terapêuticos adequados, melhorando o prognóstico dos pacientes e auxiliando no controle da TB e de DP-MNT.



OBJETIVOS



4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar os alvos projetados para os testes diagnósticos BiDz-TB/NTM e Multi-Detect MTB/NTM para a detecção e identificação do complexo *M. tuberculosis* e das principais espécies de micobactérias não-tuberculosas de importância clínica.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar e avaliar as condições de PCR assimétrica e dos ensaios BiDz do teste BiDz-TB/NTM frente a cepas clínicas e de referência de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* e CMAB.
- b) Avaliar a especificidade, sensibilidade, acurácia e limite de detecção dos sensores BiDz para a identificação do CMTB, *M. avium*, *M. intracellulare*/*M. chimaera*, *M. kansasii*, CMAB/*M. chelonae*.
- c) Analisar *in silico* genes-alvo para a detecção do gênero *Mycobacterium* spp. e a identificação do CMTB, *M. avium* e *M. kansasii*.
- d) Realizar o desenho de primers e sondas TaqMan para o desenvolvimento do teste Multi-Detect MTB/NTM.
- e) Padronizar e avaliar as condições de *Real-Time* PCR e avaliar a eficiência dos alvos projetados através de curvas padrão utilizando cepas clínicas e de referência de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium* e *M. kansasii*.
- f) Avaliar a especificidade, sensibilidade e acurácia dos alvos do teste Multi-Detect MTB/NTM para a detecção do gênero *Mycobacterium* spp. e a identificação do CMTB, *M. avium* e *M. kansasii*.



BIBLIOGRAFIA



5. BIBLIOGRAFIA

ADJEMIAN, Jennifer *et al.* Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease and Tuberculosis, Hawaii, USA. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 439–447, 2017. DOI: 10.3201/eid2303.161827.

AHMAD, Suhail; MOKADDAS, Eiman. Diversity of Nontuberculous Mycobacteria in Kuwait: Rapid Identification and Differentiation of *Mycobacterium* Species by Multiplex PCR, INNO-LiPA Mycobacteria v2 Assay and PCR Sequencing of rDNA. **Medical Principles and Practice**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 208–215, 2019. DOI: 10.1159/000498910.

AHMED, Imran *et al.* Non-tuberculous mycobacterial infections—A neglected and emerging problem. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 92, p. S46–S50, 2020. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.02.022.

AKRAMI, Sousan; DOKHT KHOSRAVI, Azar; HASHEMZADEH, Mohammad. Drug resistance profiles and related gene mutations in slow-growing non-tuberculous mycobacteria isolated in regional tuberculosis reference laboratories of Iran: a three year cross-sectional study. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 52–62, 2023. DOI: 10.1080/20477724.2022.2049029.

ALEXANDER, David C *et al.* Macrolide resistance due to erm (55). **Microbiology Spectrum**, [s. l.], 2025. DOI: 10.1128/spectrum.02397-24.

ARMSTRONG, Derek *et al.* An analytic feasibility study of the BD MAXTM MDR-TB assay for testing of non-sputum specimens for detection of the Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) and isoniazid (INH) and rifampin (RIF) resistance. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 115925, 2023. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2023.115925.

ASARE, Prince *et al.* The Relevance of Genomic Epidemiology for Control of Tuberculosis in West Africa. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 9, n. 706651, p. 1–17, 2021. DOI: 10.3389/fpubh.2021.706651/full.

AZAR, Michelle *et al.* Distribution and outcomes of infection of Mycobacterium avium complex species in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 232–235, 2020. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.07.007.

BACANELLI, Gisele; ARAUJO, Flabio Ribeiro; VERBISCK, Newton Valerio. Improved MALDI-TOF MS Identification of Mycobacterium tuberculosis by Use of an Enhanced Cell Disruption Protocol. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1692, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11071692.

BAINOMUGISA, Arnold *et al.* Use of real time polymerase chain reaction for detection of M. tuberculosis, M. avium and M. kansasii from clinical specimens. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 181, 2015. DOI: 10.1186/s12879-015-0921-0.

- BALIKÇI, Ahmet; ERBAKAN, Mehmet; BABALIK, Aylin. Evaluation of mycobacterial microscopy and culture results from clinical samples: A five-year analysis. **Tuberk Toraks**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 185–190, 2024. DOI: 10.5578/tt.202403955.
- BARNARD, M *et al.* The Diagnostic Performance of the GenoType MTBDR plus Version 2 Line Probe Assay Is Equivalent to That of the Xpert MTB/RIF Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 3712–3716, 2012. DOI: 10.1128/JCM.01958-12.
- BARNES, AI; ROJO, S; MORETTO, H. [Prevalence of mycobacteriosis and tuberculosis in a reference hospital, Cordoba province]. **Revista Argentina de microbiologia**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 170–3, 2004.
- BERNARDINI, Sergio; PIERI, Massimo; CIOTTI, Marco. How Could POCT be a Useful Tool for Migrant and Refugee Health?. **EJIFCC**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 200–208, 2021.
- BHALLA, Gurpreet S *et al.* Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria. **Practical Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 12, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1016/j.plabm.2018.e00107.
- BOYLE, Daniel P *et al.* Comparison of Clinical Features, Virulence, and Relapse among Mycobacterium avium Complex Species. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 191, n. 11, p. 1310–1317, 2015. DOI: 10.1164/rccm.201501-0067OC.
- BOYLE, David S *et al.* Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis by Recombinase Polymerase Amplification. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0103091.
- BRANDAO, Angela Pires *et al.* Speeding up the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis in a high-burden region with the use of a commercial line probe assay. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 45, n. 2, 2019. DOI: 10.1590/1806-3713/e20180128.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos de Tuberculose - Desde 2001 (SINAN)**. [S. l.], 2023. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/tubercrs.def>. Acesso em: 22 fev. 2025.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. **Brasília: Ministério da Saúde**, [s. l.], p. 1–365, 2019.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de recomendações para o diagnóstico laboratorial de tuberculose e micobactérias não tuberculosas de interesse em saúde pública no Brasil. **Brasília: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde.**, [s. l.], v. 1, p. 1–494, 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações para o diagnóstico e tratamento das doenças causadas por micobactérias não tuberculosas no Brasil. **Brasília: Ministério da Saúde**, [s. l.], v. 1, p. 1–95, 2021.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação de registros na ANVISA**. [S. l.], 2025.

Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/q/?nomeProduto=Truenat>. Acesso em: 26 fev. 2025.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tuberculose 2024. Boletim Epidemiológico. **Brasília: Ministério da Saúde**, [s. l.], v. Março, p. 1–70, 2024.

BRITES, Daniela; GAGNEUX, Sebastien. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the Mycobacterium tuberculosis Complex. *In: ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY*. [S. l.: s. n.], 2017. v. 1019, p. 1–26. DOI: 10.1007/978-3-319-64371-7_1.

BRODE, Sarah K *et al.* Pulmonary versus Nonpulmonary Nontuberculous Mycobacteria, Ontario, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1898–1901, 2017. DOI: 10.3201/eid2311.170959.

BROSCH, R *et al.* A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 3684–3689, 2002. DOI: 10.1073/pnas.052548299.

BRUM, Clarice Brinck *et al.* The BACTEC MGIT(tm) 320 system as a laboratory tool to diagnose tuberculosis in a Brazilian hospital with a high prevalence of HIV infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 112–114, 2016. DOI: 10.1590/0037-8682-0125-2015.

BRYANT, Josephine M *et al.* Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. **Science**, [s. l.], v. 354, n. 6313, p. 751–757, 2016. DOI: 10.1126/science.aaf8156.

BRYANT, Josephine M *et al.* Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with Mycobacterium tuberculosis: A retrospective observational study. **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 10, p. 786–792, 2013. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70231-5.

BUCKWALTER, Seanne P *et al.* Mycobacterium abscessus subspecies identification using the Deeplex Myc-TB targeted NGS assay. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 10, 2023. DOI: 10.1128/jcm.00489-23.

BUSATTO, Caroline *et al.* Nontuberculous mycobacteria in patients with suspected tuberculosis and the genetic diversity of Mycobacterium avium in the extreme south of Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 1–7, 2020. DOI: 10.36416/1806-3756/e20190184.

CABIBBE, Andrea M *et al.* Application of Targeted Next-Generation Sequencing Assay on a Portable Sequencing Platform for Culture-Free Detection of Drug-Resistant Tuberculosis from Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 10, 2020. DOI: 10.1128/JCM.00632-20.

CARNEIRO, Maiara dos Santos *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung disease in a high

tuberculosis incidence setting in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 106–111, 2018. DOI: 10.1590/s1806-375620170000000213.

CHAKRAVORTY, Soumitesh *et al.* The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of Mycobacterium tuberculosis and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. **mBio**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1128/mBio.00812-17.

CHANG, Chia-Ling *et al.* Different clinical features of patients with pulmonary disease caused by various Mycobacterium avium–intracellulare complex subspecies and antimicrobial susceptibility. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 98, p. 33–40, 2020. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.06.019.

CHAPTAL, Milène *et al.* Epidemiology of infection by pulmonary non-tuberculous mycobacteria in French Guiana 2008–2018. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. e0010693, 2022. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010693.

CHEN, Xinchang *et al.* Rapid Detection of Extensive Drug Resistance by Xpert MTB/XDR Optimizes Therapeutic Decision-Making in Rifampin-Resistant Tuberculosis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 6, 2023. DOI: 10.1128/jcm.01832-22.

CHENG, Li-Ping *et al.* Factors Associated with Treatment Outcome in Patients with Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: A Large Population-Based Retrospective Cohort Study in Shanghai. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 27, 2022. DOI: 10.3390/tropicalmed7020027.

CLOUTIER CHARETTE, William *et al.* Concordance of targeted and whole genome sequencing for Mycobacterium tuberculosis genotypic drug susceptibility testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 109, n. 2, p. 116249, 2024. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116249.

COMÍN, Jessica *et al.* The MtZ Strain: Molecular Characteristics and Outbreak Investigation of the Most Successful Mycobacterium tuberculosis Strain in Aragon Using Whole-Genome Sequencing. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. May, p. 1–16, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.887134/full.

CORDEIRO-SANTOS, Marcelo *et al.* Feasibility of GeneXpert® Edge for Tuberculosis Diagnosis in Difficult-to-Reach Populations: Preliminary Results of a Proof-of-Concept Study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 1065–1066, 2020. DOI: 10.4269/ajtmh.20-0326.

COSCOLLA, Mireia; GAGNEUX, Sebastien. Consequences of genomic diversity in mycobacterium tuberculosis. **Seminars in Immunology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 431–444, 2014. DOI: 10.1016/j.smim.2014.09.012.

COUTO DE MELLO, Karla Gripp *et al.* Clinical and Therapeutic Features of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 3, 2013. DOI: 10.3201/eid1903.120735.

DA COSTA, Ana Roberta Fusco *et al.* Occurrence of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection in an Endemic Area of Tuberculosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002340.

DALEY, Charles L *et al.* Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. e1–e36, 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa241.

DE LIMA, Cleoni Alves Mendes *et al.* Nontuberculous mycobacteria in respiratory samples from patients with pulmonary tuberculosis in the state of Rondônia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 457–462, 2013.

DE LIMA MOTA, Matheus Alves *et al.* Clinical-epidemiological profile and factors related to the mortality of patients with nontuberculous mycobacteria isolated at a reference hospital in Ceará, Northeastern Brazil. **International journal of mycobacteriology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 83–90, 2017. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_12_20.

DE VOS, Margaretha *et al.* Accuracy of cobas MTB and MTB-RIF/INH for Detection of Mycobacterium tuberculosis and Drug Resistance. **The Journal of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 708–718, 2024. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2024.05.004.

DE VOS, Margaretha *et al.* Comparative Analytical Evaluation of Four Centralized Platforms for the Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and Resistance to Rifampicin and Isoniazid. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 3, 2021. DOI: 10.1128/JCM.02168-20.

DEFIORIO-BARKER, Stephanie *et al.* Environmental risk factors associated with pulmonary isolation of nontuberculous mycobacteria, a population-based study in the southeastern United States. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 763, p. 144552, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144552.

DENG, Yan *et al.* Comparison of LAMP, GeneXpert, Mycobacterial Culture, Smear Microscopy, TSPOT.TB, TBAg/PHA Ratio for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. **Current Medical Science**, [s. l.], p. 1–6, 2021. DOI: 10.1007/s11596-021-2404-4.

DIPPENAAR, Anzaan *et al.* Diagnostic accuracy of the FluoroType MTB and MTBDR VER 2.0 assays for the centralized high-throughput detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA and isoniazid and rifampicin resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 27, n. 9, p. 1351.e1-1351.e4, 2021. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.04.022.

DONOHUE, Maura J. Epidemiological risk factors and the geographical distribution of eight Mycobacterium species. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 258, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1186/s12879-021-05925-y.

EJALU, David Livingstone *et al.* Cost-effectiveness of GeneXpert Omni compared with GeneXpert MTB/Rif for point-of-care diagnosis of tuberculosis in a low-resource, high-burden setting in Eastern Uganda: a cost-effectiveness analysis based on decision analytical modelling. **BMJ Open**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. e059823, 2022. DOI: 10.1136/bmjopen-2021-

059823.

EPPERSON, L Elaine *et al.* Evaluation of the GenoType NTM-DR line probe assay for nontuberculous mycobacteria using whole genome sequences as reference standard.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 116526, 2024. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116526.

FANG, Hong *et al.* Multicenter evaluation of the biochip assay for rapid detection of mycobacterial isolates in smear-positive specimens. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 81, p. 46–51, 2019. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.01.036.

FELICIANO, Cinara Silva *et al.* Accuracy of whole genome sequencing versus phenotypic (MGIT) and commercial molecular tests for detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Brazil and Mozambique. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 110, p. 59–67, 2018. DOI: 10.1016/j.tube.2018.04.003.

FELICIANO, CS *et al.* Role of a GenoType MTBDRplus line probe assay in early detection of multidrug-resistant tuberculosis at a Brazilian reference center. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 48, n. 8, p. 759–764, 2015. DOI: 10.1590/1414-431X20154458.

FORBES, Betty A *et al.* Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 1–66, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00038-17.

GAGNEUX, Sebastien. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 202–213, 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2018.8.

GARCÍA-AGUDO, Lidia *et al.* Evaluation of INNO-LiPA mycobacteria v2 assay for identification of rapidly growing mycobacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 1220–1226, 2011. DOI: 10.1590/S1517-838220110003000048.

GEORGHIOU, Sophia B *et al.* Equivalence of the GeneXpert System and GeneXpert Omni System for tuberculosis and rifampicin resistance detection. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. e0261442, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0261442.

GHEBREKRISTOS, Yonas *et al.* Xpert MTB/RIF Ultra-resistant and MTBDR plus-susceptible rifampicin results in people with tuberculosis: utility of FluoroType MTBDR and deep sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], 2025. DOI: 10.1128/aac.01671-24.

GHIEMETTI, Giovanni *et al.* *Mycobacterium microti* Infections in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 2025–2032, 2021. DOI: 10.3201/eid2708.210634.

GOPALASWAMY, Radha *et al.* Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections – a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 27, n. 74, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1186/s12929-020-00667-6.

GOUS, N *et al.* Performance of the Roche LightCycler Real-Time PCR Assay for Diagnosing Extrapulmonary Tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 2100–2103, 2012. DOI: 10.1128/JCM.00252-12.

GREIF, Gonzalo *et al.* Species Distribution and Isolation Frequency of Nontuberculous Mycobacteria, Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1014–1018, 2020. DOI: 10.3201/eid2605.191631.

GRIFFITH, David E *et al.* An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 175, n. 4, p. 367–416, 2007. DOI: 10.1164/rccm.200604-571ST.

GUAN, Qingtian *et al.* Comparative Genomic and Transcriptomic Analyses of *Mycobacterium kansasii* Subtypes Provide New Insights Into Their Pathogenicity and Taxonomy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. March, p. 1–13, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00122/full.

GUO, Yinjuan *et al.* Clinical and Microbiological Characteristics of *Mycobacterium kansasii* Pulmonary Infections in China. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2022. DOI: 10.1128/spectrum.01475-21.

GUPTA, Radhey S; LO, Brian; SON, Jeen. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. FEB, p. 1–41, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00067.

HALSTROM, Samuel; PRICE, Patricia; THOMSON, Rachel. Review: Environmental mycobacteria as a cause of human infection. **International Journal of Mycobacteriology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 81–91, 2015. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2015.03.002.

HAWORTH, Charles S *et al.* British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). **Thorax**, [s. l.], v. 72, p. ii1-ii64, 2017. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2017-210927.

HELB, Danica *et al.* Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 229–237, 2010. DOI: 10.1128/JCM.01463-09.

HOEFSLOOT, Wouter *et al.* The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 1604–1613, 2013. DOI: 10.1183/09031936.00149212.

HOFMANN-THIEL, Sabine *et al.* Multi-centre evaluation of the speed-oligo *Mycobacteria* assay for differentiation of *Mycobacterium* spp. in clinical isolates. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 353, 2011. DOI: 10.1186/1471-2334-11-353.

HU, Chunmei *et al.* Characterization of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease in

Nanjing district of China. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 764, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1186/s12879-019-4412-6.

HUANG, Mingxiang *et al.* Effect of Mixed Infections with Mycobacterium tuberculosis and Nontuberculous Mycobacteria on Diagnosis of Multidrug-Resistant Tuberculosis: A Retrospective Multicentre Study in China. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. Volume 15, p. 157–166, 2022. DOI: 10.2147/IDR.S341817.

HUANG, Wei-Chang; YU, Ming-Chih; HUANG, Yi-Wen. Identification and drug susceptibility testing for nontuberculous mycobacteria. **Journal of the Formosan Medical Association**, [s. l.], v. 119, p. S32–S41, 2020. DOI: 10.1016/j.jfma.2020.05.002.

HUH, Hee Jae *et al.* GenoType NTM-DR Performance Evaluation for Identification of Mycobacterium avium Complex and Mycobacterium abscessus and Determination of Clarithromycin and Amikacin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 8, 2019. DOI: 10.1128/JCM.00516-19.

HWANG, Ji An *et al.* Natural history of Mycobacterium avium complex lung disease in untreated patients with stable course. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1183/13993003.00537-2016.

IGARASHI, Yuriko *et al.* Laboratory evaluation of the AnyplexTM II MTB/MDR and MTB/XDR tests based on multiplex real-time PCR and melting-temperature analysis to identify Mycobacterium tuberculosis and drug resistance. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 276–281, 2017. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.016.

IMPERIALE, Belén *et al.* Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. **Revista Argentina de microbiología**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 3–9, 2012. DOI: 10.1590/S0325-75412012000100002.

IRAM, Shagufta *et al.* Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay - Report from a third world country. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 31, n. 1, 2014. DOI: 10.12669/pjms.311.6970.

JAGIELSKI, Tomasz *et al.* Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 239–290, 2016. DOI: 10.1128/CMR.00055-15.

JEONG, Joseph *et al.* The Use of High Performance Liquid Chromatography to Speciate and Characterize the Epidemiology of Mycobacteria. **Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 612–617, 2011. DOI: 10.1309/LMDDEHPSYE6ZDM3C.

JHUN, Byung Woo *et al.* Prognostic factors associated with long-term mortality in 1445 patients with nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: a 15-year follow-up study. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1900798, 2020. DOI: 10.1183/13993003.00798-2019.

- JOHNSON, Margaret M; ODELL, John A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. **Journal of thoracic disease**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 210–220, 2014. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24.
- JOHNSTON, James C; CHIANG, Leslie; ELWOOD, Kevin. *Mycobacterium kansasii*. **Microbiology Spectrum**, Washington, DC, USA, v. 5, n. 1, p. 725–734, 2017. DOI: 10.1128/9781555819866.ch42.
- JOSE, Reena Anie *et al.* Diagnostic accuracy of truena MTB plus for the detection of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 51, p. 100709, 2024. DOI: 10.1016/j.ijmmmb.2024.100709.
- JOUET, Agathe *et al.* Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 2002338, 2021. DOI: 10.1183/13993003.02338-2020.
- JU, Yanan *et al.* The gene MAB_2362 is responsible for intrinsic resistance to various drugs and virulence in *Mycobacterium abscessus* by regulating cell division. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 69, n. 2, 2025. DOI: 10.1128/aac.00433-24.
- KADOTA, Tsukasa *et al.* Analysis of drug treatment outcome in clarithromycin-resistant *Mycobacterium avium* complex lung disease. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 31, 2015. DOI: 10.1186/s12879-016-1384-7.
- KAMBALI, Shweta *et al.* Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in Florida and association with large-scale natural disasters. **BMC Public Health**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 2058, 2021. DOI: 10.1186/s12889-021-12115-7.
- KANG, S *et al.* Treatment outcomes in NTM-PD in a high TB burden context. **IJTLD OPEN**, [s. l.], v. 1, n. 12, p. 547–555, 2024. DOI: 10.5588/ijtldopen.24.0413.
- KATAMBA, Achilles *et al.* Evaluation of Xpert MTB/XDR test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first and second-line drugs in Uganda. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. e0284545, 2023. DOI: 10.1371/journal.pone.0284545.
- KAZUMI, Yuko; MITARAI, Satoshi. The evaluation of an identification algorithm for *Mycobacterium* species using the 16S rRNA coding gene and *rpoB*. **International Journal of Mycobacteriology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 21–28, 2012. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2012.01.004.
- KHIEU, Visal *et al.* Whole-Genome Sequencing Analysis to Identify Infection with Multiple Species of Nontuberculous Mycobacteria. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 879, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10070879.
- KIM, Jihoon *et al.* Comparison of the Genedia MTB/NTM Detection Kit and Anyplex plus MTB/NTM Detection Kit for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in clinical specimens. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 34, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/jcla.23021.
- KIM, Kijeong *et al.* Development and Application of Multiprobe Real-Time PCR Method

Targeting the hsp65 Gene for Differentiation of Mycobacterium Species from Isolates and Sputum Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 9, p. 3073–3080, 2010. DOI: 10.1128/JCM.00939-10.

KIM, JU; CHA, CH; AN, HK. Direct identification of mycobacteria from clinical specimens by multiplex real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 118, n. 6, p. 1498–1506, 2015. DOI: 10.1111/jam.12780.

KO, Sung Jun; YOON, Kui Hyun. Diagnostic Accuracy of BD MAX MDR-TB Assay Performed on Bronchoscopy Specimens in Patients with Suspected Pulmonary Tuberculosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 150–158, 2025. DOI: 10.4046/trd.2024.0091.

KO, Sung Jun; YOON, Kui Hyun; LEE, Sang Hee. Performance of the BD MAX MDR-TB assay in a clinical setting and its impact on the clinical course of patients with pulmonary tuberculosis: a retrospective before-after study. **Journal of Yeungnam Medical Science**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 113–119, 2024. DOI: 10.12701/jyms.2024.00024.

KOH, Won-Jung *et al.* Clinical Significance of the Differentiation Between Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare in M avium Complex Lung Disease. **Chest**, [s. l.], v. 142, n. 6, p. 1482–1488, 2012. DOI: 10.1378/chest.12-0494.

KUSUNOKI, Shinji; EZAKI, Takayuki. Proposal of Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev., and Elevation of Mycobacterium chelonae subsp. abscessus (Kubica et al.) to Species Status: Mycobacterium abscessus comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 240–245, 1992. DOI: 10.1099/00207713-42-2-240.

KWAK, Nakwon *et al.* Treatment Outcomes of Mycobacterium avium Complex Lung Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 65, n. 7, p. 1077–1084, 2017. DOI: 10.1093/cid/cix517.

LARA-OYA, Ana *et al.* Evaluation of the Speed-oligo Direct Mycobacterium tuberculosis Assay for Molecular Detection of Mycobacteria in Clinical Respiratory Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 77–82, 2013. DOI: 10.1128/JCM.00533-12.

LEE, Suengmok *et al.* Evaluation of EZplex MTBC/NTM Real-Time PCR kit: diagnostic accuracy and efficacy in vaccination. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 111–118, 2018. DOI: 10.7774/cevr.2018.7.2.111.

LEE, Andie S *et al.* Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 7, p. 900–904, 2009. DOI: 10.1099/jmm.0.007484-0.

LEE, Yu-Mi; KIM, Min-Jin; KIM, Young-Jin. Increasing Trend of Nontuberculous Mycobacteria Isolation in a Referral Clinical Laboratory in South Korea. **Medicina**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 720, 2021. DOI: 10.3390/medicina57070720.

- LEWINSOHN, David M *et al.* Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. e1–e33, 2017. DOI: 10.1093/cid/ciw778.
- LIMA, Ana Carolina de Oliveira de *et al.* Molecular characterization of nontuberculous Mycobacteria in a tuberculosis and HIV reference unit in the State of Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 55, 2022. DOI: 10.1590/0037-8682-0613-2021.
- LIN, Jian *et al.* Evaluation of the MeltPro Myco Assay for the Identification of Non-Tuberculous Mycobacteria. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. Volume 15, p. 3287–3293, 2022. DOI: 10.2147/IDR.S369160.
- LIN, Chunrong *et al.* Increasing Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Specimens from US-Affiliated Pacific Island Jurisdictions¹. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 485–491, 2018. DOI: 10.3201/eid2403.171301.
- LIPMAN, Marc *et al.* Current and future management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD) in the UK. **BMJ Open Respiratory Research**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1136/bmjresp-2020-000591.
- LLERENA, Claudia; VALBUENA, Angélica; ZABALETA, Angie Paola. Micobacteriosis identificadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Colombia entre 2012 y 2016. **Biomédica**, [s. l.], v. 38, p. 87–94, 2018. DOI:10.7705/biomedica.v38i0.4143.
- LOPEZ-LUIS, Bruno Ali *et al.* Nontuberculous mycobacterial infection in a tertiary care center in Mexico, 2001–2017. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 213–220, 2020. DOI: 10.1016/j.bjid.2020.04.012.
- LÓPEZ-ROA, P *et al.* Epidemiology of Non-Tuberculous Mycobacteria isolated from clinical specimens in Madrid, Spain, from 2013 to 2017. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 1089–1094, 2020. DOI: 10.1007/s10096-020-03826-7
- LUETKEMEYER, Anne F *et al.* Evaluation of Two Line Probe Assays for Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis, Tuberculosis (TB) Drug Resistance, and Non-TB Mycobacteria in HIV-Infected Individuals with Suspected TB. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 1052–1059, 2014. DOI: 10.1128/JCM.02639-13.
- LUO, Tao *et al.* Population genomics provides insights into the evolution and adaptation to humans of the waterborne pathogen Mycobacterium kansasii. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-22760-6.
- LUTHRA, Sakshi; ROMINSKI, Anna; SANDER, Peter. The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in Mycobacterium abscessus Drug Resistance. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 2179, p. 1–13, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02179/full.

- MACEDO, Rita *et al.* Animal-to-human transmission of *Mycobacterium pinnipedii*. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 2000371, 2020. DOI: 10.1183/13993003.00371-2020.
- MACENTE, Sara *et al.* Evaluation of hsp65 Nested PCR-Restriction Analysis (PRA) for Diagnosing Tuberculosis in a High Burden Country. **BioMed Research International**, [s. l.], p. 1–7, 2013. DOI: 10.1155/2013/391549.
- MÄKINEN, Johanna *et al.* Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 481–483, 2006. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01380.x.
- MASCHMANN, Raquel de Abreu *et al.* Performance of the GenoType MTBDR plus Assay Directly on Sputum Specimens from Brazilian Patients with Tuberculosis Treatment Failure or Relapse. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 1606–1608, 2013. DOI: 10.1128/JCM.00364-13.
- MASON, Matt *et al.* Pharmacologic Management of *Mycobacterium chimaera* Infections: A Primer for Clinicians. **Open Forum Infectious Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 1–16, 2022. DOI: 10.1093/ofid/ofac287/6608719.
- MATOS, Eliana Dias *et al.* Nontuberculosis mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference center in Bahia: clinical epidemiological aspects. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 296–304, 2004. DOI: 10.1590/s1413-86702004000400005.
- MEAZA, Abyot *et al.* Diagnostic accuracy of Truenat Tuberculosis and Rifampicin-Resistance assays in Addis Ababa, Ethiopia. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. e0261084, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0261084.
- MEAZA, Abyot *et al.* Evaluation of genotype MTBDRplus VER 2.0 line probe assay for the detection of MDR-TB in smear positive and negative sputum samples. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 280, 2017. DOI: 10.1186/s12879-017-2389-6.
- MEDIAVILLA-GRADOLPH, María Concepción *et al.* Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, p. 1–6, 2015. DOI: 10.1155/2015/854078.
- MEEHAN, Conor J *et al.* Reconstituting the genus *Mycobacterium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 9, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1099/ijsem.0.004922.
- MOGA, Shewki *et al.* Diagnostic performance of the GenoType MTBDRplus VER 2.0 line probe assay for the detection of isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. e0284737, 2023. DOI: 10.1371/journal.pone.0284737.
- MOON, Seong Mi *et al.* Clinical Characteristics, Treatment Outcomes, and Resistance Mutations Associated with Macrolide-Resistant *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 11, p. 6758–6765, 2016.

DOI: 10.1128/AAC.01240-16.

MORA, Arturo D *et al.* Comportamiento clínico de la infección y enfermedad causada por micobacterias no tuberculosas en Latinoamérica: revisión de alcance. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 318–325, 2021.

DOI:10.17843/rpmesp.2021.382.6108.

NADARAJAN, Darshaalini *et al.* Evaluation of the Roche cobas MTB and MTB-RIF/INH Assays in Samples from Germany and Sierra Leone. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 5, 2021. DOI: 10.1128/JCM.02983-20.

NAGDEV, Khushboo J *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid and Reliable Diagnosis of Tuberculous Meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 1861–1865, 2011. DOI: 10.1128/JCM.00824-10.

NAMKOONG, Ho *et al.* Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Japan1. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1116–1117, 2016. DOI: 10.3201/eid2206.151086.

NASIRI, Mohammad Javad *et al.* Antibiotic therapy success rate in pulmonary Mycobacterium avium complex: a systematic review and meta-analysis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 263–273, 2020. DOI: 10.1080/14787210.2020.1720650.

NEUSCHLOVA, M *et al.* Identification of Mycobacterium Species by MALDI-TOF Mass Spectrometry. In: ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY. [S. l.: s. n.], 2017. v. 1021, p. 37–42. DOI: 10.1007/5584_2017_26.

NGANGUE, Yannick Russel *et al.* Diagnostic Accuracy of the Truenat MTB Plus Assay and Comparison with the Xpert MTB/RIF Assay to Detect Tuberculosis among Hospital Outpatients in Cameroon. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 8, 2022. DOI: 10.1128/jcm.00155-22.

NGUYEN, Van-Dong *et al.* Two-drug Versus Three-drug Regimens for Treating Mycobacterium Avium Complex Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Infection and Public Health**, [s. l.], p. 102711, 2025. DOI: 10.1016/j.jiph.2025.102711.

NOTOMI, T *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 1–7, 2000. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.

NUNES-COSTA, Daniela *et al.* The looming tide of nontuberculous mycobacterial infections in Portugal and Brazil. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 96, p. 107–119, 2016. DOI: 10.1016/j.tube.2015.09.006.

NURWIDYA, Fariz *et al.* Molecular Diagnosis of Tuberculosis. **Chonnam Medical Journal**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 1–9, 2018. DOI: 10.4068/cmj.2018.54.1.1.

OKOI, Catherine *et al.* Non-tuberculous Mycobacteria isolated from Pulmonary samples in sub-Saharan Africa - A Systematic Review and Meta Analyses. **Scientific Reports**, [s. l.], v.

7, n. 12002, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-12175-z.

OLEA-POPELKA, Francisco; FUJIWARA, Paula I; DEAN, Anna S. A One Health Approach to Zoonotic Tuberculosis. *In: ESSENTIAL TUBERCULOSIS*. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 359–365. DOI:10.1007/978-3-030-66703-0_39.

OMAR, Shaheed V. *et al.* Analytical Performance of the Roche LightCycler® Mycobacterium Detection Kit for the Diagnosis of Clinically Important Mycobacterial Species. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. e24789, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0024789.

OPPERMAN, Christoffel *et al.* Targeted deep sequencing of mycobacteria species from extrapulmonary sites not identified by routine line probe assays: A retrospective laboratory analysis of stored clinical cultures. **IJID Regions**, [s. l.], v. 13, p. 100464, 2024. DOI: 10.1016/j.ijregi.2024.100464.

OREN, Aharon; GARRITY, George M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 7, p. 2137–2138, 2018. DOI: 10.1099/ijsem.0.002830.

OU, Xichao *et al.* A pilot study: VereMTB detection kit for rapid detection of multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis in clinical sputum samples. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0228312.

PADILLA, Eduardo *et al.* Comparative Evaluation of the New Version of the INNO-LiPA Mycobacteria and GenoType Mycobacterium Assays for Identification of Mycobacterium Species from MB/BacT Liquid Cultures Artificially Inoculated with Mycobacterial Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 3083–3088, 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.7.3083-3088.2004.

PARK, Youngmok *et al.* Age- and sex-related characteristics of the increasing trend of nontuberculous mycobacteria pulmonary disease in a tertiary hospital in South Korea from 2006 to 2016. **The Korean Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1424–1431, 2020. DOI: 10.3904/kjim.2019.395.

PARK, Youngmok *et al.* Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with macrolide-resistant Mycobacterium avium complex pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. **Respiratory Research**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 286, 2019. DOI: 10.1186/s12931-019-1258-9.

PARK, Mirae *et al.* Evaluating the clinical impact of routine whole genome sequencing in tuberculosis treatment decisions and the issue of isoniazid mono-resistance. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 349, 2022. DOI: 10.1186/s12879-022-07329-y.

PARK, Youngmok *et al.* The Association between Behavioral Risk Factors and Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. **Yonsei Medical Journal**, [s. l.], v. 62, n. 8, p. 702–707, 2021. DOI: 10.3349/ymj.2021.62.8.702.

PARTE, Aidan C *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 11, p. 5607–5612, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332.

PASIPANODYA, Jotam G *et al.* Systematic Review and Meta-analyses of the Effect of Chemotherapy on Pulmonary Mycobacterium abscessus Outcomes and Disease Recurrence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 61, n. 11, 2017. DOI: 10.1128/AAC.01206-17.

PEDRO, Heloisa Silveira Paro *et al.* Epidemiological and laboratorial profile of patients with isolation of nontuberculous mycobacteria. **International Journal of Mycobacteriology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 239–245, 2017. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_87_17.

PEDRO, Heloisa da Silveira Paro *et al.* Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 34, n. 11, p. 950–955, 2008. DOI: 10.1590/S1806-37132008001100010.

PENN-NICHOLSON, Adam *et al.* A prospective multicentre diagnostic accuracy study for the Truenat tuberculosis assays. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 2100526, 2021. DOI: 10.1183/13993003.00526-2021.

PÉREZ-GARCÍA, F *et al.* Diagnostic performance of Anyplex II MTB/MDR/XDR for detection of resistance to first and second line drugs in Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 139, p. 74–78, 2017. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.05.006.

PREVOTS, D Rebecca *et al.* Global Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. **Clinics in Chest Medicine**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 675–721, 2023. DOI: 10.1016/j.ccm.2023.08.012.

PREVOTS, D Rebecca *et al.* Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an increasing burden with substantial costs. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 1–5, 2017. DOI: 10.1183/13993003.00374-2017.

PUGA, Fernanda Guioti *et al.* HIV-negative pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria in Southern Brazil: clinical and microbiological characterization. **Journal of Thoracic Disease**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1903–1911, 2018. DOI: 10.21037/jtd.2018.03.66.

RAATS, Daan *et al.* Increasing and More Commonly Refractory Mycobacterium avium Pulmonary Disease, Toronto, Ontario, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1589–1596, 2022. DOI: 10.3201/eid2808.220464.

RAMANUJAM, Harini *et al.* Role of abattoir monitoring in determining the prevalence of bovine tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], n. April, p. 1–16, 2021. DOI: 10.1111/tbed.14118.

RAMIS, Ivy Bastos *et al.* Evaluation of the Speed-Oligo Mycobacteria assay for the identification of nontuberculous mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v.

64, n. 3, p. 283–287, 2015. DOI: 10.1099/jmm.0.000025.

RASTOGI, N; LEGRAND, E; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 21–54, 2001. DOI: 10.20506/rst.20.1.1265.

REN, Fei *et al.* Potential of nanopore sequencing for tuberculosis diagnosis and drug resistance detection. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 1469, 2024. DOI: 10.1186/s12879-024-10378-0.

RIOPEL, Nicholas D *et al.* Characterization of *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium bovis*, and *Mycobacterium caprae* Infections in Humans in Western Canada. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 230, n. 4, p. e789–e797, 2024. DOI: 10.1093/infdis/jiae124.

ROCHA, Diogo; FELGUEIRAS, Óscar; DUARTE, Raquel. Can environmental determinants explain Nontuberculous Mycobacteria geographic incidence?. **Pulmonology**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 145–150, 2020. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2019.12.003.

RUIS, Christopher *et al.* Dissemination of *Mycobacterium abscessus* via global transmission networks. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 1279–1288, 2021. DOI: 10.1038/s41564-021-00963-3.

RUNYON, Ernest H. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. **Medical Clinics of North America**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 273–290, 1959. DOI: 10.1016/S0025-7125(16)34193-1.

RYCKMAN, Theresa S *et al.* Economic implications of novel regimens for tuberculosis treatment in three high-burden countries: a modelling analysis. **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. e995–e1004, 2024. DOI: 10.1016/S2214-109X(24)00088-3.

SAAVEDRA, Belén *et al.* Diagnostic performance of the Abbott RealTime MTB assay for tuberculosis diagnosis in people living with HIV. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 19271, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-96922-3.

SADERI, Laura *et al.* Rapid Diagnosis of XDR and Pre-XDR TB: A Systematic Review of Available Tools. **Archivos de Bronconeumología**, [s. l.], v. 58, n. 12, p. 809–820, 2022. DOI: 10.1016/j.arbres.2022.07.012.

SAMPER, Sofía; GONZÁLEZ-MARTIN, Julià. Microbiological diagnosis of infections caused by the genus *Mycobacterium*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 104–111, 2018. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.11.009.

SARRO, Yeya dit Sadio *et al.* Development and clinical evaluation of a new multiplex PCR assay for a simultaneous diagnosis of tuberculous and nontuberculous mycobacteria. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 70, n. 103527, p. 1–8, 2021. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103527.

SATTA, G *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential?. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 604–609, 2018. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.10.030.

- SAWATPANICH, Ajcharaporn *et al.* Diagnostic performance of the Anyplex MTB/NTM real-time PCR in detection of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria from pulmonary and extrapulmonary specimens. **Heliyon**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. e11935, 2022. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11935.
- SCHILDHAUS, Hans-Ulrich *et al.* GenoType CM Direct® and VisionArray Myco® for the Rapid Identification of Mycobacteria from Clinical Specimens. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 2404, 2022. DOI: 10.3390/jcm11092404.
- SEBASTIAN, George *et al.* “Identification of Non-Tuberculous Mycobacterium by LPA (CM/AS) assay, HPLC and biochemical test: which is feasible for RNTCP?” **Indian Journal of Tuberculosis**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 329–334, 2018. DOI: 10.1016/j.ijtb.2018.08.003.
- SHARMA, Manila *et al.* Determinants of Drug Resistance in Previously-Treated Pulmonary Tuberculosis Patients Registered at a Chest Clinic in South Delhi, India. **Cureus**, [s. l.], v. 11, n. 8, 2019. DOI: 10.7759/cureus.5541.
- SHARMA, SurendraK; UPADHYAY, Vishwanath. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. **Indian Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 152, n. 3, p. 185–226, 2020. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_902_20.
- SHIN, Sunghwan *et al.* Diagnostic Performance of the GENEDIA MTB/NTM Detection Kit for Detecting Mycobacterium tuberculosis and Nontuberculous Mycobacteria With Sputum Specimens. **Annals of Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 169–173, 2020. DOI: 10.3343/alm.2020.40.2.169.
- SKERMAN, VBD; MCGOWAN, VICKI; SNEATH, PHA. Approved Lists of Bacterial Names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 225–420, 1980. DOI: 10.1099/00207713-30-1-225.
- SMITH, Carol *et al.* Assessing Nanopore Sequencing for Clinical Diagnostics: a Comparison of Next-Generation Sequencing (NGS) Methods for Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 1, 2020. DOI: 10.1128/JCM.00583-20.
- STEPHENSON, D *et al.* An evaluation of methods for the isolation of nontuberculous mycobacteria from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and patients assessed for lung transplantation. **BMC Pulmonary Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 19, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1186/s12890-019-0781-2.
- SUFFYS, PN *et al.* Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 12, p. 4477–4482, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.12.4477-4482.2001.
- SVIRIDOV, PS *et al.* Genetic Risk Factors for Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease (Systematic Review). **Sovremennye tehnologii v medicine**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 62, 2024. DOI: 10.17691/stm2024.16.5.07.
- TAYE, Hawult *et al.* Global prevalence of Mycobacterium bovis infections among human

tuberculosis cases: Systematic review and meta-analysis. **Zoonoses and Public Health**, [s. l.], n. April 2020, p. 1–15, 2021. DOI: 10.1111/zph.12868.

TELENTI, A *et al.* Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 175–178, 1993. DOI: 10.1128/jcm.31.2.175-178.1993.

THOMSON, Rachel M. Changing Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacteria Infections. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 1576–1583, 2010. DOI: 10.3201/eid1610.091201.

THORNTON, Christina S *et al.* The respiratory microbiome and nontuberculous mycobacteria: an emerging concern in human health. **European Respiratory Review**, [s. l.], v. 30, n. 160, p. 1–15, 2021. DOI: 10.1183/16000617.0299-2020.

TORTOLI, Enrico *et al.* Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. 4471–4479, 2016. DOI: 10.1099/ijsem.0.001376.

TORTOLI, Enrico. Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 727–752, 2014. DOI: 10.1128/CMR.00035-14.

TORTOLI, Enrico *et al.* Performance Assessment of New Multiplex Probe Assay for Identification of *Mycobacteria*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 1079–1084, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.3.1079-1084.2001.

TORTOLI, Enrico; MARIOTTINI, Alessandro; MAZZARELLI, Gianna. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved Reverse Hybridization Multiple DNA Probe Assay for Mycobacterial Identification. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 4418–4420, 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.9.4418-4420.2003.

TRAM, Trinh Thi Bich *et al.* Targeted sequencing from cerebrospinal fluid for rapid identification of drug-resistant tuberculous meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 4, 2024. DOI: 10.1128/jcm.01287-23.

TWABI, Hussein H *et al.* Non-Tuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease identified during community-based screening for *Mycobacterium Tuberculosis*: a case report. **Malawi medical journal**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 65–67, 2021. DOI: 10.4314/mmj.v33i1.10.

UDDIN, Mohammad Khaja Mafij *et al.* Genetic diversity and characterization of *M. tuberculosis* isolates causing extrapulmonary tuberculosis in Bangladesh. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 95, p. 1–8, 2021. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.105052.

VACHASPATHI, Tejaswini Dharmapuri. Pipeline Report: Tuberculosis Diagnostics. **Treatment Action Group**, [s. l.], p. 1–21, 2024.

VAN DE WEG, Cornelia AM *et al.* The tough process of unmasking the slow-growing mycobacterium: case report of *Mycobacterium microti* infection. **Access Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 74–76, 2020. DOI: 10.1099/acmi.0.000074.

VAN INGEN, Jakko *et al.* A definition of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and clinical purposes, a review. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 11, p. 3666–3677, 2018. DOI: 10.1099/ijsem.0.003026.

VOGEL, Monica *et al.* Implementation of whole genome sequencing for tuberculosis diagnostics in a low-middle income, high MDR-TB burden country. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-94297-z.

WANG, Joyce *et al.* Insights on the Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* from the Analysis of *Mycobacterium kansasii*. **Genome Biology and Evolution**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 856–870, 2015. DOI: 10.1093/gbe/evv035.

WINTHROP, Kevin L *et al.* Incidence and Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in a Large U.S. Managed Care Health Plan, 2008–2015. **Annals of the American Thoracic Society**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 178–185, 2020. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201804-236OC.

WINTHROP, Kevin L *et al.* On the Reportability of Nontuberculous Mycobacterial Disease to Public Health Authorities. **Annals of the American Thoracic Society**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 314–317, 2017. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201610-802PS.

WOOD, Hillary N *et al.* Species Typing of Nontuberculous Mycobacteria by Use of Deoxyribozyme Sensors. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 333–341, 2019. DOI: 10.1373/clinchem.2018.295212.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report. **WHO Library. Geneva, Switzerland. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO**, [s. l.], p. 1–232, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report. **WHO Library. Geneva, Switzerland. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO**, [s. l.], p. 1–69, 2024a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Operational handbook on tuberculosis. Module 3: Diagnosis for tuberculosis detection. **WHO Library. Geneva, Switzerland. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO**, [s. l.], v. 3ed, p. 1–156, 2024b. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340256/9789240022614-eng.pdf>.

XU, Ye *et al.* Rapid Identification of Clinically Relevant *Mycobacterium* Species by Multicolor Melting Curve Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 1, 2019. DOI: 10.1128/JCM.01096-18.

YAN, Jennifer *et al.* Investigating transmission of *Mycobacterium abscessus* amongst children in an Australian cystic fibrosis centre. **Journal of Cystic Fibrosis**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 219–224, 2020. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.02.011.

- YOON, Hee Jung; CHOI, Hwa Young; KI, Moran. Nontuberculosis mycobacterial infections at a specialized tuberculosis treatment centre in the Republic of Korea. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 432, 2017. DOI: 10.1186/s12879-017-2532-4.
- ZAMARIOLI, Liliana Aparecida *et al.* Estudo descritivo da frequência de micobactérias não tuberculosas na Baixada Santista (SP). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 590–594, 2008. DOI: 10.1590/s1806-37132008000800008.
- ZHANG, Zoe Xiaozhu *et al.* Clinical and microbiological characteristics of non-tuberculous mycobacteria diseases in Singapore with a focus on pulmonary disease, 2012-2016. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 436, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1186/s12879-019-3909-3.
- ZHANG, Yangyi *et al.* Drug resistance profile of *Mycobacterium kansasii* clinical isolates before and after 2-month empirical antimycobacterial treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 353–359, 2023. DOI: 10.1016/j.cmi.2022.10.002.
- ZHANG, Meng; XUE, Miao; HE, Jian-qing. Diagnostic accuracy of the new Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis disease: A preliminary systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 90, p. 35–45, 2020. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.09.016.
- ZIDOVEC LEPEJ, S; POLJAK, M. Portable molecular diagnostic instruments in microbiology: current status. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 411–420, 2020. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.09.017.



TESTE BiDz-TB/NTM



6. ARTIGO 1: TESTE BiDz-TB/NTM

Publicado na revista *Microbiology Spectrum* em abril de 2024



Microbiology
Spectrum



Clinical Microbiology | Research Article

Detection of Mtb and NTM: preclinical validation of a new asymmetric PCR-binary deoxyribozyme sensor assay

Yasmin Castillos das Neves,¹ Ana Julia Reis,¹ Marcos Alaniz Rodrigues,¹ Erica Chimara,^{2,3} Maria Cristina da Silva Lourenço,^{2,4} Jacques Fountain,⁵ Ivy Bastos Ramis,^{1,2} Andrea von Groll,^{1,2} Yulia Gerasimova,⁶ Kyle H. Rohde,⁵ Pedro Eduardo Almeida da Silva^{1,2}

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 11.

ABSTRACT Tuberculosis (TB) and infectious diseases caused by non-tuberculous mycobacteria (NTM) are global concerns. The development of a rapid and accurate diagnostic method, capable of detecting and identifying different mycobacteria species, is crucial. We propose a molecular approach, the BiDz-TB/NTM, based on the use of binary deoxyribozyme (BiDz) sensors for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and NTM of clinical interest. A panel of DNA samples was used to evaluate Mtb-BiDz, *Mycobacterium abscessus*/*Mycobacterium chelonae*-BiDz, *Mycobacterium avium*-BiDz, *Mycobacterium intracellulare*/*Mycobacterium chimaera*-BiDz, and *Mycobacterium kansasii*-BiDz sensors in terms of specificity, sensitivity, accuracy, and limit of detection. The BiDz sensors were designed to hybridize specifically with the genetic signatures of the target species. To obtain the BiDz sensor targets, amplification of a fragment containing the hypervariable region 2 of the 16S rRNA was performed, under asymmetric PCR conditions using the reverse primer designed based on linear-after-the-exponential principles. The BiDz-TB/NTM was able to correctly identify 99.6% of the samples, with 100% sensitivity and 0.99 accuracy. The individual values of specificity, sensitivity, and accuracy, obtained for each BiDz sensor, satisfied the recommendations for new diagnostic methods, with sensitivity of 100%, specificity and accuracy ranging from 98% to 100% and from 0.98 to 1.0, respectively. The limit of detection of BiDz sensors ranged from 12 genome copies (Mtb-BiDz) to 2,110 genome copies (Mkan-BiDz). The BiDz-TB/NTM platform would be able to generate results rapidly, allowing the implementation of the appropriate therapeutic regimen and, consequently, the reduction of morbidity and mortality of patients.

IMPORTANCE This article describes the development and evaluation of a new molecular platform for accurate, sensitive, and specific detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria of clinical importance. Based on BiDz sensor technology, this assay prototype is amenable to implementation at the point of care. Our data demonstrate the feasibility of combining the species specificity of BiDz sensors with the sensitivity afforded by asymmetric PCR amplification of target sequences. Preclinical validation of this assay on a large panel of clinical samples supports the further development of this diagnostic tool for the molecular detection of pathogenic mycobacteria.

KEYWORDS diagnostic method, deoxyribozymes, *Mycobacterium*, *M. tuberculosis*, non-tuberculous mycobacteria

Tuberculosis (TB), caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis*, remains a disease of healthcare concern with an estimated 10.6 million new cases and 1.3 million deaths in 2022. According to the World Health Organization (WHO), per year, about four million

Editor Gyanu Lamichhane, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

Address correspondence to Kyle H. Rohde, Kyle.Rohde@uct.edu.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 12.

Received 28 September 2023

Accepted 15 March 2024

Published 23 April 2024

Copyright © 2024 Neves et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

**As informações contidas nesta seção são de domínio da revista
Microbiology Spectrum**

DOI: 10.1128/spectrum.03506-23

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito

Acesso restrito



TESTE MULTI-DETECT MTB/NTM



7. ARTIGO 2: TESTE MULTI-DETECT MTB/NTM

Manuscrito a ser submetido na revista *The Journal of Molecular Diagnostics*

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE *REAL-TIME* PCR PARA A DETECÇÃO DO *Mycobacterium tuberculosis* E DE MICOBACTÉRIAS NÃO- TUBERCULOSAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Yasmin Castillos das Neves^{1*}; Ana Júlia Reis¹; Ivy Bastos Ramis de Souza¹; Pedro Eduardo
Almeida da Silva¹; Andrea von Groll¹

¹ Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM),
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, General Osório, s/n,
Rio Grande, RS, 96200400, Brasil.

Número de páginas de texto: 8 páginas

Número de Tabelas e Figuras: 3 tabelas e 1 figura

Financiamento: YCIN é bolsista da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior (CAPES). Este estudo foi realizado com apoio do Programa de Pesquisa para
o Sistema Único de Saúde - Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (PPSUS –
FAPERGS: processo n°. 21/2551-0000062-7), do Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico/Ministério da Saúde/*National Institutes of Health* (CNPq/MS/NHI:
processo n°. 404170/2019–6) e da CAPES-Brasil (código de financiamento 001).

Declaração de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Autor correspondente: *Yasmin Castillos das Neves, General Osório, s/n, Rio Grande, RS,
96200400, Brasil, yasmin.neves@furg.br

RESUMO

A tuberculose (TB), causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, permanece como um grave problema de saúde pública. Paralelamente, as doenças causadas por micobactérias não-tuberculosas (MNT) vêm ganhando relevância devido ao aumento global do número de casos. Apesar das semelhanças clínicas e radiológicas das doenças pulmonares causadas por MNT com a TB, que dificultam o diagnóstico preciso, essas doenças requerem esquemas terapêuticos distintos. Assim, a identificação rápida das espécies é essencial para um manejo clínico adequado. Neste estudo, desenvolvemos e avaliamos um teste de *Real-Time* PCR para a detecção e identificação do gênero *Mycobacterium* spp. das espécies *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*. Para isso, primers e sondas TaqMan foram desenhados com base em análises *in silico* dos genes rRNA 16S e *esxA*. Avaliações da eficiência das reações de amplificação dos primers e sondas alvos foram realizadas através de curvas padrão. A especificidade, sensibilidade e acurácia foram avaliadas utilizando um painel de 43 DNAs de micobactérias e de outros gêneros bacterianos. Os alvos projetados apresentaram valores de eficiência $\geq 93,5\%$ e resultaram em 100% de sensibilidade e especificidade e 1,0 de acurácia. Os resultados confirmam a robustez e confiabilidade dos alvos e demonstram seu potencial para a identificação rápida e precisa de micobactérias de importância clínica. Assim, estes alvos tornam-se uma importante alternativa para o desenvolvimento de um novo teste diagnóstico baseado em *Real-Time* PCR.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Micobactérias não-tuberculosas; Diagnóstico; *Real-Time* PCR.

1. INTRODUÇÃO

As micobactérias, pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, compreendem 202 espécies oficialmente validadas ¹. Dentre elas, o *Mycobacterium tuberculosis* é o principal patógeno, sendo o agente etiológico da tuberculose (TB), uma das principais causas de morte no mundo, com 1,25 milhões de óbitos em 2023. Apesar dos esforços globais para conter a transmissão do *M. tuberculosis* e aprimorar o diagnóstico da TB, especialmente com o desenvolvimento de novos métodos rápidos, lacunas ainda existem, com cerca de 25% dos casos não diagnosticados e tratados ^{2,3}.

Embora a TB seja o foco principal das estratégias de controle, as doenças causadas por micobactérias não tuberculosas (MNT), consideradas patógenos oportunistas, também demandam atenção ⁴⁻⁶. A prevalência e a incidência dessas doenças vêm aumentando globalmente ⁷, sendo as formas pulmonares as mais comuns (80%–90% dos casos). Entre as espécies mais prevalentes destacam-se os membros do complexo *Mycobacterium avium* (CMAV), complexo *Mycobacterium abscessus* e o *Mycobacterium kansasii* ^{7,8}.

A determinação dos esquemas terapêuticos a serem utilizados para as doenças causadas por MNT depende da identificação da espécie infectante. Porém, a semelhança clínica e radiológica entre a TB e as doenças pulmonares causadas por MNT dificulta o diagnóstico, levando ao início empírico de tratamento com o esquema anti-TB ⁴⁻⁶. No entanto, esses antimicrobianos têm eficácia limitada contra a maioria das MNT, retardando o sucesso do tratamento e podendo favorecer a seleção de cepas resistentes. Assim, a identificação rápida e precisa da espécie envolvida torna-se essencial ^{5,8,9}.

A cultura, associada à baciloscopia, continua sendo o padrão-ouro para diagnóstico laboratorial de micobacterioses. No entanto, a necessidade de métodos mais rápidos impulsiona o desenvolvimento de abordagens a serem realizadas utilizando diretamente amostras clínicas para a identificação das espécies ^{5,8,10,11}. Nesse contexto, testes baseados em *Real-Time* PCR surgem como alternativas promissoras por sua rapidez, sensibilidade e especificidade ¹¹⁻¹⁵.

Um desses testes é o Xpert[®] MTB/RIF (Xpert, Cepheid, EUA), endossado pela Organização Mundial da Saúde para o diagnóstico inicial da TB e detecção de resistência a rifampicina. Embora seja amplamente utilizado, trata-se de um método que detecta apenas o complexo *M. tuberculosis* (CMTB), evidenciando a necessidade de mais testes diagnósticos, capazes de identificar rapidamente MNT clinicamente relevantes ^{4,12,16}.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar a acurácia de alvos para um novo teste diagnóstico, baseado em *Real-Time* PCR, capazes de detectar e identificar o gênero *Mycobacterium* spp., e o complexo *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*.

2. METODOLOGIA

2.1. Análises *in silico* e desenho dos primers e sondas alvo

Para o desenho das sequências alvo dos primers e sondas, análises *in silico* dos genes *rrs*, que codifica o rRNA 16S, e *esxA* (Rv3875), que codifica o alvo antigênico secretado precocemente de 6 kDa (ESAT-6) foram realizadas utilizando as ferramentas BioEdit v7.7 e BLAST na base de dados padrão de nucleotídeos e de genomas de referência. As sequências rRNA 16S de *M. kansasii* (número de acesso do GenBank NR_121712.2) e de *M. avium* (número de acesso do GenBank NR_117219.1) e a sequência de *esxA* de *M. tuberculosis* (número de acesso do GenBank NC_000962.3: 4352609-4352896) foram utilizadas como template para o desenho dos primers e sondas espécie-específicos. A análise dos alvos para a detecção do gênero *Mycobacterium* spp. foi realizada utilizando como template sequências de rRNA 16S de 27 espécies de micobactérias e de 15 espécies relacionadas à família *Mycobacteriaceae* (*Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp. e *Streptomyces* spp.) (Tabela 1S – suplementar). Posteriormente, foi avaliada a especificidade dos alvos frente a base de dados de genomas de referência representativos depositados no GenBank, verificando a presença de pelo menos dois nucleotídeos de diferença em cada sequência oligonucleotídicas.

A determinação das espécies de MNT-alvo do teste foi baseada em dados nacionais e em estudo local que observaram alta taxa de isolamento e de doenças pulmonares causadas por *M. avium* e *M. kansasii*^{17,4}. A seleção do gene *rrs* para a identificação do gênero *Mycobacterium* spp., *M. kansasii* e *M. avium* se baseou nas regiões hipervariáveis e conservadas do rRNA 16S, que são úteis para a identificação de espécies de micobactérias e discriminação de grupos filogenéticos, respectivamente¹⁸. O gene *esxA* foi selecionado como alvo para a detecção do CMTB devido à sua conservação em *M. tuberculosis*¹⁹.

2.2. Avaliação da eficiência de amplificação

A eficiência das reações de amplificação das sequências de primers e sondas alvos foi avaliada através da construção de curvas-padrão utilizando cinco diferentes concentrações de DNA, sendo 4 diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) do DNA genômico molde das cepas de referência de *M. tuberculosis* H37Rv, para a identificação do gênero *Mycobacterium* spp. e do CMTB, de *M. kansasii* ATCC 12478, para a identificação de *M. kansasii*, e de *M. avium* ATCC 03057HC, para a identificação de *M. avium*. As diluições foram preparadas em uma faixa de concentração de 15 ng/μl (1:1) a 0,0015 ng/μl (10^{-4}). Todas as reações, para cada diluição, foram realizadas em triplicata.

As amplificações dos alvos foram realizadas em um volume total de 25 μl, contendo 12,5 μl de TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 1 μl dos primers forward e reverse, 0,5 μl da sonda TaqMan e 5 μl do DNA molde. As concentrações estoque e final dos reagentes utilizados para a reação de amplificação estão descritas na Tabela 1. A amplificação e a detecção da fluorescência foram realizadas utilizando o equipamento StepOneplus Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific).

O seguinte programa de PCR foi utilizado: pré-tratamento a 50°C por 2 minutos; desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e; 40 ciclos de desnaturação inicial a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 58°C/63°C por 30 segundos. A temperatura de anelamento e extensão de 58°C foi utilizada para os alvos Mkan-16S e Mav-16S, enquanto 63°C foi utilizada para os alvos Myco-16S e Mtb-ESAT.

Tabela 1. Condições dos reagentes utilizados para a *Real-Time* PCR.

Reagente	[Estoque]	[Final]
Água Mili-q	---	---
Primers Forward	10 μM	0,4 μM (400 nM)
Primers Reverse	10 μM	0,4 μM (400 nM)
Sonda TaqMan	10 μM	0,2 μM (200 nM)
TaqMan Mix PCR	2x	1x
DNA	1 ng/μl	2,5 ng

A eficiência dos primers foi calculada pelo software StepOne v2.3 com base na inclinação (*slope*) da curva padrão, utilizando a fórmula $E = 10^{(-1/slope)} - 1$, onde E representa a eficiência. Curvas de amplificação com *slopes* entre -3,59 e -3,1, correspondendo a uma eficiência de 90% e 110%, respectivamente, são consideradas aceitáveis. Eficiências de 100% (*slope* de -3,32) indicam que o DNA molde está duplicando a cada ciclo de PCR, garantindo assim resultados mais precisos^{20,21}.

2.3. Construção do painel de DNAs genômicos para a avaliação dos alvos

Para a validação dos alvos projetados e padronizados para a detecção e identificação do gênero *Mycobacterium* spp. (Myco-16S), CMTB (Mtb-ESAT), *M. kansasii* (Mkan-16S) e *M. avium* (Mav-16S), a partir da coleção de bactérias do Laboratório de Micobactérias do Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM) da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, foi definido um painel composto por 43 DNAs genômicos, provenientes de cepas clínicas e de referência.

O painel incluiu o DNA genômico total das seguintes cepas: *M. tuberculosis* (9/43 + H37Rv), *M. kansasii* (4/43 + ATCC 12478), *M. avium* (4/43 + ATCC 03057HC), *M. intracellulare* (3/43), *M. abscessus* subsp. *abscessus* (2/43), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (2/43), *M. abscessus* subsp. *massiliense* (2/43) e uma cepa de *M. chelonae* (ATCC 946), *M. fortuitum* (ATCC 35931), *M. malmoeense* (ATCC 29571), *M. marinum* (ATCC 927), *M. xenopi* (ATCC 19156), *M. chimaera* (cepa clínica), *M. peregrinum* (ATCC 14467), *M. asiaticum* (ATCC 25276), *M. bovis* BCG (cepa vacinal), *Nocardia* sp. (cepa clínica), *Rhodococcus equi* (cepa clínica), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FURG, com o parecer nº 5.574.421.

2.3.1. Cultura bacteriana e extração de DNA genômico

As cepas de micobactérias foram semeadas em meio de cultura sólido Ogawa-Kudoh e as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em ágar nutriente, e incubadas a 37°C até a obtenção do crescimento bacteriano. As cepas de *Nocardia* sp. e *Rhodococcus* sp. foram obtidas a partir de cultura líquida BACTEC MGIT™ 320. Após a obtenção da massa bacteriana, as colônias foram adicionadas a microtubos contendo 500 µl de tampão Tris-EDTA 1x e inativadas termicamente a 85°C por 30 minutos. O DNA total das cepas bacterianas foi purificado através do método CTAB/NaCl²² e quantificados no fluorímetro portátil Quantus utilizando o reagente QuantiFluor ONE dsDNA System (Promega).

Exceto os DNAs das cepas de referência, todas as amostras foram previamente identificadas por métodos moleculares. As cepas de MNT e de outros gêneros bacterianos foram identificadas por sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*, enquanto as

cepas de *M. tuberculosis* foram identificadas utilizando o método *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat 15 loci*.

2.4. Avaliação da especificidade, sensibilidade e acurácia dos alvos projetados

Para avaliar a especificidade, sensibilidade e acurácia dos alvos projetados para o teste de *Real-Time* PCR, o painel de 43 DNAs genômicos foi padronizado em uma concentração inicial de 1 ng/μl. A amplificação por *Real-Time* PCR foi realizada como descrito acima (item 2.2.), com cada alvo amplificado separadamente. Todas as amostras foram testadas em duplicata e cada reação incluiu dois poços controle, sendo um controle positivo (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii* ATCC 12478 e *M. avium* ATCC 03057HC) e um negativo (água ultrapura Mili-q).

Os resultados foram analisados utilizando o software StepOne v2.3, sendo consideradas positivas aquelas amostras que apresentaram ciclos threshold (Ct: número de ciclos necessários para que a quantidade de DNA amplificado cruze o limiar, sendo detectado). Amostras sem Ct foram consideradas negativas. O tempo total para amplificação e detecção da fluorescência foi de 55 minutos.

A sensibilidade para cada alvo foi calculada utilizando a fórmula $100\% \times a/(a+c)$, onde “a” representa os verdadeiros positivos e “c” os falsos negativos. A especificidade para cada alvo foi determinada utilizando a fórmula $100\% \times d/(b+d)$, onde “b” representa os falsos positivos e “d” os verdadeiros negativos. Para avaliar a acurácia, utilizou-se o cálculo $(a+d)/(a+b+c+d)$.

3. RESULTADOS

Com base nos alinhamentos das sequências do rRNA 16S realizados na ferramenta BioEdit e nas análises feitas na ferramenta BLAST, foram projetados dois conjuntos de primers e três sondas TaqMan específicas para a detecção do gênero *Mycobacterium* spp. e identificação do *M. kansasii* e *M. avium* (Tabela 2). A região hipervariável 2 (nucleotídeos 137 a 242) foi escolhida para o desenho dos primers universais utilizados na identificação de *M. kansasii* e *M. avium*, bem como das sondas TaqMan específicas para essas espécies, localizadas nas posições 182 a 194 devido à alta variabilidade nucleotídica observada. As regiões hipervariáveis 6 (nucleotídeos 986 a 1043) e 7 (nucleotídeos 1117 a 1173) e a região conservada 6 do rRNA 16S foram selecionadas para a discriminação do gênero *Mycobacterium* spp. Destaca-se que, para

garantir a identificação de *M. chelonae* pelo alvo Myco-16S, nucleotídeos degenerados foram adicionados aos primers forward e reverse.

Poucas sequências do gene *esxA* ou ortólogos estavam disponíveis na base de dados do GenBank. No entanto, utilizando a sequência do gene *esxA* de *M. tuberculosis* H37Rv como template, foi possível desenhar um conjunto de primer e sonda específicos para o CMTB (Tabela 2), garantindo no mínimo 3 nucleotídeos de diferença em cada sequência alvo.

Tabela 2. Sequências dos alvos desenhados para as espécies-alvo.

Esta tabela contém informações originais e inéditas, cuja publicação ainda está pendente. O autor reserva o direito de sua futura divulgação conforme sua decisão.

Acesso restrito

A avaliação da eficiência de cada conjunto de primer e sonda, por meio dos ensaios de curva padrão, mostrou que as reações utilizando os alvos Myco-16S, Mtb-ESAT, Mkan-16S e Mav-16S tiveram uma eficiência de 93,5% (Figura 1A), 102,2% (Figura 1B), 122,3% (Figura 1C) e 100,5% (Figura 1D), respectivamente.

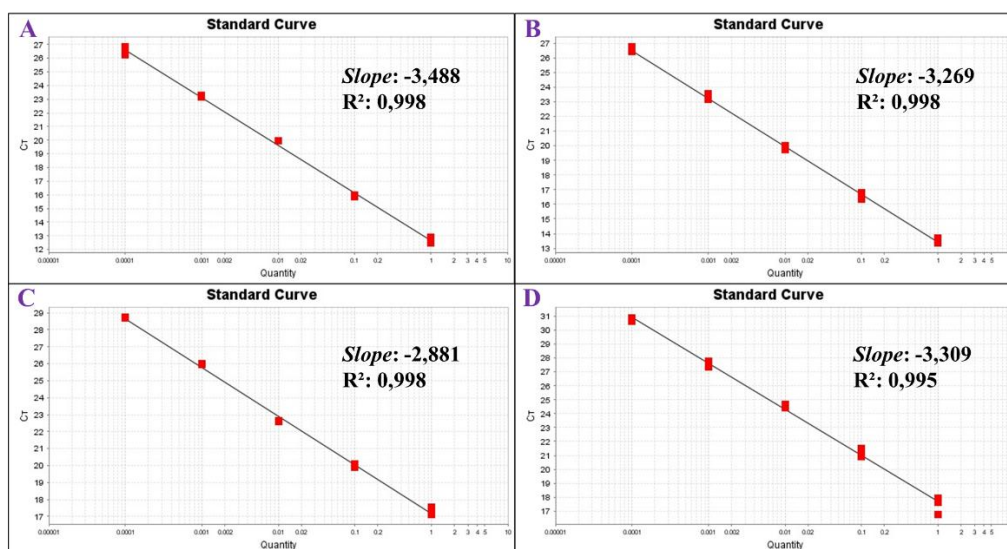


Figura 1. Curva padrão para avaliação da eficiência dos alvos desenhados. **(A)** Alvo Myco-16S, **(B)** Alvo Mtb-ESAT, **(C)** Alvo Mkan-16S e **(D)** Alvo Mav-16S. O *slope* e o coeficiente de regressão (R^2 ; correlação entre a concentração de DNA e os valores de Ct obtidos) são apresentados para cada curva, demonstrando a eficiência de amplificação e a linearidade das *Real-Time* PCR.

Os ensaios conduzidos com os alvos Myco-16S, Mtb-ESAT, Mkan-16S e Mav-16S, utilizando o painel de 43 DNAs de micobactérias e outros gêneros bacterianos, demonstraram uma especificidade, sensibilidade e acurácia de 100% (Tabela 3). Nenhuma amplificação inespecífica foi observada. O alvo Myco-16S mostrou-se eficaz na discriminação de micobactérias de outros gêneros, enquanto o alvo Mtb-ESAT identificou exclusivamente *M. tuberculosis*, sem amplificação em amostras de *M. bovis* BCG ou de outras espécies bacterianas. Da mesma forma, os alvos Mkan-16S e Mav-16S apresentaram amplificação apenas em amostras de *M. kansasii* e *M. avium*, respectivamente, confirmando a alta acurácia dos alvos.

Tabela 3. Valores médios dos ciclos threshold obtidos para o painel de DNAs genômicos nos ensaios de especificidade, sensibilidade e acurácia dos alvos projetados.

Amostra	Ciclo threshold			
	Myco-16S	Mtb-ESAT	Mkan-16S	Mav-16S
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	16,2	13,5	0	0
<i>M. tuberculosis</i> *	18	15	0	0
<i>M. tuberculosis</i> *	18,9	16	0	0
<i>M. tuberculosis</i> *	19,9	17	0	0
<i>M. tuberculosis</i> *	16,5	13,7	0	0
<i>M. tuberculosis</i> *	19,5	16,7	0	0
<i>M. tuberculosis</i> *	21,5	18,6	0	0
<i>M. tuberculosis</i> *	18,9	16,1	0	0
<i>M. tuberculosis</i> *	18,3	15,4	0	0
<i>M. tuberculosis</i> *	19,2	16,2	0	0
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	19,9	0	16,5	0
<i>M. kansasii</i> *	17,1	0	16,6	0
<i>M. kansasii</i> *	17,3	0	14,9	0
<i>M. kansasii</i> *	19,9	0	21,8	0
<i>M. kansasii</i> *	20,3	0	13,7	0
<i>M. avium</i> ATCC 03057HC	19,7	0	0	22,2
<i>M. avium</i> *	16,7	0	0	21,8
<i>M. avium</i> *	22	0	0	20,5
<i>M. avium</i> *	19	0	0	18,9
<i>M. avium</i> *	16	0	0	20,1
<i>M. intracellulare</i> *	21,8	0	0	0
<i>M. intracellulare</i> *	14,3	0	0	0
<i>M. intracellulare</i> *	21,2	0	0	0
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> *	16,8	0	0	0
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> *	19,3	0	0	0
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> *	18,4	0	0	0
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> *	19,2	0	0	0
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> *	17,9	0	0	0
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> *	19,5	0	0	0

*DNAs genômicos provenientes de cepas clínicas. 0: Nenhum ciclo threshold detectado – Sem amplificação da amostra.

Continuação. **Tabela 3.** Valores médios dos ciclos threshold obtidos para o painel de DNAs genômicos nos ensaios de especificidade, sensibilidade e acurácia dos alvos projetados.

Amostra	Ciclo threshold			
	Myco-16S	Mtb-ESAT	Mkan-16S	Mav-16S
<i>M. bovis</i> BCG	21,8	0	0	0
<i>M. chelonae</i> ATCC 946	17,5	0	0	0
<i>M. fortuitum</i> ATCC 35931	17,7	0	0	0
<i>M. malmoense</i> ATCC 29571	17	0	0	0
<i>M. marinum</i> ATCC 927	17,7	0	0	0
<i>M. xenopi</i> ATCC 19156	17	0	0	0
<i>M. chimaera</i> *	19,5	0	0	0
<i>M. peregrinum</i> ATCC 14467	20,9	0	0	0
<i>M. asiaticum</i> ATCC 25276	20,1	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 12598	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0
<i>Nocardia</i> sp.*	0	0	0	0
<i>Rhodococcus equi</i> *	0	0	0	0

*DNAs genômicos provenientes de cepas clínicas. 0: Nenhum ciclo threshold detectado – Sem amplificação da amostra.

4. DISCUSSÃO

A TB é um grande desafio para os programas de saúde pública mundialmente, o que justifica o foco dos laboratórios de diagnóstico de micobacterioses na detecção do *M. tuberculosis*. No entanto, o aumento do número de casos de doenças causadas por MNT não pode ser negligenciado^{4,7,2}. Como já mencionado anteriormente, a identificação rotineira dessas espécies não é realizada devido à dificuldade em diferenciar clínica e radiologicamente as doenças causadas por MNT da TB e à dependência de métodos diagnósticos caros e/ou demorados^{4-6,8}. Para contornar essa limitação, testes baseados em *Real-Time* PCR têm sido descritos nos últimos anos, com foco na detecção do CMTB e na identificação direta ou indireta de MNT^{12-14,11}.

Nesse contexto, o presente estudo desenvolveu e avaliou alvos para um novo teste de *Real-Time* PCR voltado à detecção do gênero *Mycobacterium* spp. e à identificação do CMTB, *M. kansasii* e *M. avium*. Para isso, inicialmente realizou-se avaliações *in silico*

de genes e o desenho de primers e sondas capazes de detectar e discriminar as diferentes espécies de micobactérias. Os genes *rrs* (rRNA 16S) e *esxA* (ESAT-6) foram selecionados para o desenvolvimento dos novos alvos.

A sequência rRNA 16S, com aproximadamente 1500 nucleotídeos, é composta por nove regiões hipervariáveis intercaladas por nove regiões conservadas. Trata-se de uma sequência amplamente utilizada para a identificação de bactérias nos níveis de gênero, espécie e até subespécie, devido à sua alta conservação intraespécie e à variabilidade interespecie^{18,23}. Entre as regiões hipervariáveis do rRNA 16S, destaca-se a região 2 (nucleotídeos 137 a 242), utilizada neste estudo para a identificação de *M. kansasii* e *M. avium*. Essa região é considerada um dos alvos mais adequados para a diferenciação de espécies de micobactérias, especialmente devido à alta variabilidade de nucleotídeos observada entre as posições 182 e 194, local onde foram desenhadas as sondas TaqMan para a identificação das MNT¹⁸.

As regiões hipervariáveis 6 (nucleotídeos 986 a 1043) e 7 (nucleotídeos 1117 a 1173) do rRNA 16S também desempenham um papel relevante na identificação de espécies bacterianas, por combinarem sequências conservadas com variabilidade nucleotídica suficiente para distinguir grupos filogenéticos. Essas regiões, em conjunto com a região conservada 6, uma área de baixa variabilidade¹⁸, se mostraram ideais para o desenho de primers universais e sondas direcionados ao gênero *Mycobacterium* spp.

O gene *esxA* (Rv3875), que codifica ESAT-6, está localizado na Região de Diferença 1 (RD1), uma região de 9.505 nucleotídeos que abriga nove genes (Rv3871 a Rv3879c) responsáveis por importantes fatores de virulência do CMTB^{24,25}. Sabe-se, atualmente, que ortólogos do gene *esxA* e de seu produto ESAT-6 – um dos alvos mais investigados como marcador imunológico de infecções por *M. tuberculosis* – estão presentes em diversas espécies de micobactérias, incluindo aquelas filogeneticamente relacionadas com o CMTB, como *M. kansasii* e *M. marinum*^{26,27}. No entanto, análises comparativas revelaram que, apesar de presentes, as sequências *esxA* não apresentam 100% de homologia. Em *M. kansasii*, por exemplo, há cerca de 30 nucleotídeos de diferença^{27,28}. Essa variabilidade permitiu o desenho de primers e sonda específicos, capazes de discriminar o *M. tuberculosis* das demais espécies de micobactérias analisadas.

A avaliação da eficiência de amplificação dos alvos projetados demonstrou um desempenho adequado para a maioria dos alvos. Os alvos Myco-16S, Mtb-ESAT e Mav-

16S apresentaram eficiências de 93,5%, 102,2% e 100,5%, respectivamente, valores próximos do ideal (100% ^{20,21}), indicando boa performance na detecção do gênero *Mycobacterium* spp., *M. tuberculosis* e *M. avium*.

Por outro lado, o alvo Mkan-16S apresentou uma eficiência de 122,3%, excedendo o intervalo ideal (90% a 110%), sugerindo que a amplificação está ocorrendo em um ritmo superior ao esperado ^{20,21}. Esse desvio pode estar relacionado a erros nas diluições seriadas ou na leitura de fluorescência. No entanto, os ensaios com o painel de 43 DNAs demonstraram que esse desvio de eficiência não comprometeu o desempenho do alvo Mkan-16S.

Os alvos desenhados demonstraram excelente desempenho, resultando em 100% de especificidade, sensibilidade e acurácia. O alvo Myco-16S foi capaz de detectar todas as amostras de micobactérias testadas, sem amplificações inespecíficas em amostras de *Nocardia* sp. e *Rhodococcus* sp, gêneros pertencentes a ordem *Actinomycetales* e filogeneticamente próximos ao *Mycobacterium* spp. A ausência de amplificação, mesmo entre organismos intimamente relacionados, reforça a alta especificidade do alvo Myco-16S para membros do gênero *Mycobacterium* spp. ²⁹, evidenciando a robustez do teste em desenvolvimento. Quanto ao alvo Mav-16S, não foram observadas amplificações em amostras de *M. chimaera* e *M. intracellulare*, espécies pertencentes ao CMAV, o que demonstra a capacidade do alvo em identificar especificamente o *M. avium*, mesmo em um grupo intimamente relacionadas (cerca de 87% de identidade nucleotídica média) ³⁰.

Quando utilizados os alvos Mtb-ESAT e Mkan-16S, não foram observadas reações cruzadas entre os alvos, mesmo o *M. tuberculosis* e o *M. kansasii* sendo filogeneticamente próximos, especialmente em relação a genes de virulência conservados, como os presente na RD1 ^{27,31}. Da mesma forma, utilizando o alvo Mtb-ESAT não foi detectada amplificação na amostra de *M. marinum*, outra espécie intimamente relacionada ao *M. tuberculosis*, e que também carrega o gene *esxA* ³².

Devido à avaliação dos alvos ter sido realizada exclusivamente em amostras de DNA extraído de culturas bacterianas, não foi possível comparar diretamente os resultados analíticos com outros testes de *Real-Time* PCR avaliados frente a amostras clínicas ^{11–15,33–35}. Dessa forma, em comparação com os ensaios de sonda em linha (LPA; *Line Probe Assay*), que também utilizam culturas bacterianas para a identificação de micobactérias, os alvos Myco-16S, Mtb-ESAT, Mkan-16S e Mav-16S apresentaram resultados de especificidade e sensibilidade semelhantes aos descritos para os LPAs

(>97% e >94%, respectivamente). Além disso, o tempo necessário para o processamento e análise das amostras é significativamente menor com o uso da *Real-Time* PCR quando comparado aos LPAs (~4 horas e 20 minutos para 45 amostras *versus* ~24 horas para 10 amostras) ^{36–39} e ao sequenciamento de genes, considerado o padrão-ouro para a identificação de MNT, que pode levar até sete dias ⁴.

Os resultados obtidos neste estudo destacam o potencial dos alvos projetados para um novo teste de *Real-Time* PCR. A seleção criteriosa de primers e sondas TaqMan, garantiu a detecção eficiente do gênero *Mycobacterium* spp., bem como a identificação acurada de *M. tuberculosis*, *M. kansasii* e *M. avium*. A especificidade e sensibilidade dos alvos assegura maior precisão na identificação das espécies-alvo, minimizando o risco de diagnósticos incorretos.

No entanto, este estudo possui algumas limitações como: 1) a avaliação dos alvos foi realizada exclusivamente utilizando DNA extraído de culturas bacterianas, o que impossibilita a comparação direta com outros testes de *Real-Time* PCR aplicados diretamente em amostras clínicas; 2) os alvos foram avaliados em reações de PCR independentes, o que aumenta o tempo total de execução e limita a aplicabilidade na rotina diagnóstica. Apesar dessas limitações, os alvos desenhados e avaliados neste estudo foram projetados para um teste de *Real-Time* PCR, nomeado Multi-Detect MTB/NTM, que ainda está em desenvolvimento e seu formato final será em *multiplex* para a detecção do gênero *Mycobacterium* spp., e identificação das espécies-alvo diretamente de amostras clínicas.

REFERÊNCIAS

1. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020, 70:5607–12
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. WHO Libr Geneva, Switzerland Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2024:1–69
3. World Health Organization. Operational handbook on tuberculosis. Module 3: Diagnosis for tuberculosis detection. WHO Libr Geneva, Switzerland Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2024, 3ed:1–156
4. Brasil. Ministério da Saúde. Recomendações para o diagnóstico e tratamento das doenças causadas por micobactérias não tuberculosas no Brasil. Brasília Ministério

- Da Saúde, 2021, 1:1–95
5. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Winthrop K. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175:367–416
6. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ, Andrejak C, Böttger EC, Brozek J, Griffith DE, Guglielmetti L, Huitt GA, Knight SL, Leitman P, Marras TK, Olivier KN, Santin M, Stout JE, Tortoli E, van Ingen J, Wagner D, Winthrop KL. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. *Clin Infect Dis*, 2020, 71:e1–36
7. Prevots DR, Marshall JE, Wagner D, Morimoto K. Global Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. *Clin Chest Med*, 2023, 44:675–721
8. Sharma S, Upadhyay V. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. *Indian J Med Res*, 2020, 152:185–226
9. Zhang Y, Yu C, Jiang Y, Zheng X, Wang L, Li J, Shen X, Xu B. Drug resistance profile of *Mycobacterium kansasii* clinical isolates before and after 2-month empirical antimycobacterial treatment. *Clin Microbiol Infect*, 2023, 29:353–9
10. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o diagnóstico laboratorial de tuberculose e micobactérias não tuberculosas de interesse em saúde pública no Brasil. Brasília Ministério Da Saúde - Secr Vigilância Em Saúde, 2022, 1:1–494
11. Sarro Y dit S, Butzler MA, Sanogo F, Kodio O, Tolofoudie M, Goumane MS, Baya B, Diabate S, Diallo IB, Daniogo D, Dembele BPP, Camara I, Kumar A, Dembele E, Kone B, Achenbach CJ, Theron G, Ouattara K, Toloba Y, Diarra B, Doumbia S, Taiwo B, Holl JL, Murphy RL, Diallo S, McFall SM, Maiga M. Development and clinical evaluation of a new multiplex PCR assay for a simultaneous diagnosis of tuberculous and nontuberculous mycobacteria. *EBioMedicine*, 2021, 70:1–8
12. Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, Banada PP, Deshpande S, Shenai S, Gall A, Glass J, Krieswirth B, Schumacher SG, Nabeta P, Tukvadze N, Rodrigues C, Skrahina A, Tagliani E, Cirillo DM, Davidow A,

- Denkinger CM, Persing D, Kwiatkowski R, Jones M, Alland D. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of Mycobacterium tuberculosis and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. MBio, 2017, 8:1–12
13. Sawatpanich A, Petsong S, Tumwasorn S, Rotcheewaphan S. Diagnostic performance of the Anyplex MTB/NTM real-time PCR in detection of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria from pulmonary and extrapulmonary specimens. Heliyon, 2022, 8:e11935
14. Lin J, Zhao Y, Wei S, Dai Z, Lin S. Evaluation of the MeltPro Myco Assay for the Identification of Non-Tuberculous Mycobacteria. Infect Drug Resist, 2022, Volume 15:3287–93
15. Fang T, Peng L, Yang T, Cai Q, Li H, Li H, Cai L. Development and evaluation of multiplex real-time PCR for rapid identifying major pathogenic mycobacteria from pulmonary and extrapulmonary clinical samples in eastern China. Heliyon, 2025, 11:e41384
16. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. WHO Libr Geneva, Switzerland Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2020:1–232
17. Busatto C, Silveira Vianna J, Barbara Scholante Silva A, Basso R, Silveira J, Von Groll A, Bastos Ramis I, Eduardo Almeida da Silva P. Nontuberculous mycobacteria in patients with suspected tuberculosis and the genetic diversity of Mycobacterium avium in the extreme south of Brazil. J Bras Pneumol, 2020, 46:1–7
18. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods, 2007, 69:330–9
19. Teklu T, Wondale B, Taye B, Hailemariam M, Bekele S, Tamirat M, Zewude A, Mohamed T, Medhin G, Legesse M, Yu Y, Ameni G, Pieper R. Differences in plasma proteomes for active tuberculosis, latent tuberculosis and non-tuberculosis mycobacterial lung disease patients with and without ESAT-6/CFP10 stimulation. Proteome Sci, 2020, 18:10
20. Molina-Mora JA, Sibaja-Amador M, Rivera-Montero L, Chacón-Arguedas D, Guzmán C, García F. Assessment of Mathematical Approaches for the Estimation and Comparison of Efficiency in qPCR Assays for a Prokaryotic Model. DNA,

- 1293 2024, 4:189–200
- 1294 21. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data.
1295 BMC Bioinformatics, 2006, 7:85
- 1296 22. Soolingen D van, de Haas PEW, Hermans PWM, van Embden JDA. DNA
1297 Fingerprinting of mycobacterium tuberculosis. Methods Enzymol., vol. 235, 1994,
1298 pp. 196–205
- 1299 23. Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S,
1300 Nadarajan R, Brodie EL, Lynch S V. Use of 16S rRNA Gene for Identification of
1301 a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. PLoS One, 2015,
1302 10:e0117617
- 1303 24. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S V.,
1304 Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D,
1305 Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N,
1306 Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver
1307 K, Osborne J, Quail MA, Rajandream M-A, Rogers J, Rutter S, Seeger K, et al.
1308 Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete
1309 genome sequence. Nature, 1998, 393:537–44
- 1310 25. Passos BBS, Araújo-Pereira M, Vinhaes CL, Amaral EP, Andrade BB. The role of
1311 ESAT-6 in tuberculosis immunopathology. Front Immunol, 2024, 15
- 1312 26. Gcebe N, Hlokwe TM, Bouw A, Michel A, Rutten VPMG. The Presence of esat-
1313 6 and cfp10 and Other Gene Orthologs of the RD 1 Region in Non-Tuberculous
1314 Mycobacteria, Mycolicibacteria, Mycobacteroides and Mycolicibacter as Possible
1315 Impediments for the Diagnosis of (Animal) Tuberculosis. Microorganisms, 2024,
1316 12
- 1317 27. Arend SM, de Haas P, Leyten E, Rosenkrands I, Rigouts L, Andersen P, Mijs W,
1318 van Dissel JT, van Soolingen D. ESAT-6 and CFP-10 in Clinical versus
1319 Environmental Isolates of Mycobacterium kansasii. J Infect Dis, 2005, 191:1301–
1320 10
- 1321 28. Sous C, Frigui W, Pawlik A, Sayes F, Ma L, Cokelaer T, Brosch R. Genomic and
1322 phenotypic characterization of Mycobacterium tuberculosis' closest-related non-
1323 tuberculous mycobacteria. Microbiol Spectr, 2024, 12
- 1324 29. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van
1325 Sinderen D. Genomics of Actinobacteria : Tracing the Evolutionary History of an

- 1326 Ancient Phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71:495–548
- 1327 30. van Ingen J, Turenne CY, Tortoli E, Wallace Jr RJ, Brown-Elliott BA. A definition
1328 of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and clinical purposes, a
1329 review. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2018, 68:3666–77
- 1330 31. Wang J, McIntosh F, Radomski N, Dewar K, Simeone R, Enninga J, Brosch R,
1331 Rocha EP, Veyrier FJ, Behr MA. Insights on the Emergence of *Mycobacterium*
1332 tuberculosis from the Analysis of *Mycobacterium kansasii*. *Genome Biol Evol*,
1333 2015, 7:856–70
- 1334 32. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PDR,
1335 Abdellah Z, Arrowsmith C, Chillingworth T, Churcher C, Clarke K, Cronin A,
1336 Davis P, Goodhead I, Holroyd N, Jagels K, Lord A, Moule S, Mungall K,
1337 Norbertczak H, Quail MA, Rabinowitsch E, Walker D, White B, Whitehead S,
1338 Small PLC, Brosch R, Ramakrishnan L, Fischbach MA, Parkhill J, Cole ST.
1339 Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the
1340 evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*, 2008, 18:729–41
- 1341 33. Gous N, Scott LE, Wong E, Omar T, Venter WDF, Stevens W. Performance of the
1342 Roche LightCycler Real-Time PCR Assay for Diagnosing Extrapulmonary
1343 Tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2012, 50:2100–3
- 1344 34. Lee S, Hwang K-A, Ahn J-H, Nam J-H. Evaluation of EZplex MTBC/NTM Real-
1345 Time PCR kit: diagnostic accuracy and efficacy in vaccination. *Clin Exp Vaccine*
1346 *Res*, 2018, 7:111
- 1347 35. Shin S, Yoo IY, Shim HJ, Kang OK, Jhun BW, Koh W-J, Huh HJ, Lee NY.
1348 Diagnostic Performance of the GENEDIA MTB/NTM Detection Kit for Detecting
1349 *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous *Mycobacteria* With Sputum
1350 Specimens. *Ann Lab Med*, 2020, 40:169–73
- 1351 36. Epperson LE, Davidson RM, Kammlade SM, Hasan NA, Nick SE, Machado IMP,
1352 Rodriguez VH, Appleman A, Helstrom NK, Strong M. Evaluation of the
1353 GenoType NTM-DR line probe assay for nontuberculous mycobacteria using
1354 whole genome sequences as reference standard. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2024,
1355 110:116526
- 1356 37. Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, Gilbert GL. Identification of non-tuberculous
1357 mycobacteria: utility of the GenoType *Mycobacterium* CM/AS assay compared
1358 with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *J Med Microbiol*, 2009, 58:900–4

- 1359 38. García-Agudo L, Jesús I, Rodríguez-Iglesias M, García-Martos P. Evaluation of
1360 INNO-LiPA mycobacteria v2 assay for identification of rapidly growing
1361 mycobacteria. *Brazilian J Microbiol*, 2011, 42:1220–6
- 1362 39. Ramis IB, Cnockaert M, Von Groll A, Mathys V, Simon A, Tortoli E, Palomino
1363 JC, Almeida da Silva PE, Vandamme P, Andre E, Martin A. Evaluation of the
1364 Speed-Oligo Mycobacteria assay for the identification of nontuberculous
1365 mycobacteria. *J Med Microbiol*, 2015, 64:283–7

MATERIAL SUPLEMENTAR

1367 **Tabela 1S.** Espécies analisadas *in silico* para a detecção do gênero *Mycobacterium* spp.

Espécie	Número de acesso do GenBank
<i>Mycobacterium</i> spp.	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	NR_102810.2
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977	NR_114658.1
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	ON194475.1
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	CP065265.1: 1407962-1409477
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ATCC 25291	NR_117219.1
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	CP060407.1
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	CP139433.1
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> ATCC 49884	NR_044261.1
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	NR_121712.2
<i>M. fortuitum</i>	X52933.1
<i>M. asiaticum</i> ATCC 25276	NR_118917.1
<i>M. basiliense</i>	LR216719.1
<i>M. branderi</i> ATCC 51789	NR_041897.1
<i>M. celatum</i> ATCC 51131	NR_029143.1
<i>M. genavense</i>	X60070.1
<i>M. haemophilum</i> ATCC 29548	CP011883.2
<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950	CP003322.1: 1637974-1639504
<i>M. lacus</i>	AP022581.1: 1026533-1028064
<i>M. malmoense</i> ATCC 29571	CP080999.1: 3811830-3813360
<i>M. marinum</i> ATCC 927	CP129323.1: 4848890-4850420
<i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981	NR_117218.1
<i>M. shottsii</i> ATCC 700981	EU619854.1
<i>M. simiae</i> ATCC 25275	NR_117227.1
<i>M. spongiae</i>	CP046600.1: 4042405-4043937
<i>M. szulgai</i> ATCC 35799	NR_118584.1
<i>M. ulcerans</i> ATCC 19423	CP092429.2: 1256705-1258235
<i>M. xenopi</i> ATCC 19250	MH169221.1
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	CP010946.1: 1365197-1366712
<i>M. peregrinum</i> ATCC 14467	NR_114447.1

1368 Continuação. **Tabela 1S.** Espécies analisadas *in silico* para a detecção do gênero
1369 *Mycobacterium* spp.

Espécie	Número de acesso do GenBank
Outros gêneros bacterianos	
<i>Nocardia alni</i>	MZ014381.1
<i>Nocardia asteroides</i>	CP089212.1: 5217910-5219421
<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 19296	X80591.1
<i>Nocardia nova</i>	CP006850.1: 1409148-1410659
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	CP041695.1: 2261440-2262953
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939T	X80603.1
<i>Rhodococcus opacus</i>	AP011115.1: 1245496-1247010
<i>Rhodococcus ruber</i>	CP044211.1: 745888-747404
<i>Rhodococcus triatomae</i>	CP048814.1: 526231-527745
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	MN310339.1
<i>Streptomyces gardneri</i>	NR041204.1
<i>Streptomyces laeteviolaceus</i>	AB184630.1
<i>Streptomyces lydicus</i> ATCC 25470	Y15507.1
<i>Streptomyces platensis</i>	EU593594.1
<i>Streptomyces scabrisporus</i>	EU877064.1

1370



CONCLUSÕES



8. CONCLUSÕES

Com base no exposto no presente estudo, pode-se concluir que:

- Os testes propostos e avaliados, BiDz-TB/NTM e Multi-Detect MTB/NTM, foram capazes de detectar e identificar o *M. tuberculosis* e as principais espécies de MNT de interesse clínico. Os resultados mostraram que ambos os testes possuem alta sensibilidade, especificidade e acurácia, atendendo aos critérios recomendados pela OMS para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos moleculares.
- Para o teste BiDz-TB/NTM observou-se que os sensores BiDz foram capazes de identificar corretamente 99,6% das amostras avaliadas, com 100% de sensibilidade e acurácia de 0,99. A combinação da PCR assimétrica com os sensores BiDz, embora tenha sido avaliada frente DNAs genômicos extraídos de culturas micobacterianas, permitiu a obtenção de resultados rápidos e acurados.
- Os alvos projetados para o teste Multi-Detect MTB/NTM, baseado na *Real-Time* PCR, também demonstraram elevada confiabilidade, com 100% de sensibilidade, especificidade e 1,0 de acurácia na detecção do gênero *Mycobacterium* spp. e na identificação de *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*. Os primers e sondas desenhados foram validados com eficiência próxima ao ideal, o que garante a robustez necessária para o teste proposto.

Embora ainda estejam em desenvolvimento, os testes BiDz-TB/NTM e Multi-Detect MTB/NTM representam alternativas promissoras para o diagnóstico molecular de micobactérias. Estudos futuros serão necessários para padronizar os formatos *multiplex* dos testes e validar suas aplicações diretamente em amostras clínicas. Além disso, a avaliação da viabilidade do teste BiDz-TB/NTM como uma plataforma diagnóstica *point-of-care* deverá ser realizada, uma vez que a integração do teste a um dispositivo portátil, poderá ampliar seu impacto, tornando o diagnóstico mais acessível e eficiente, especialmente em regiões de recursos limitados.



CONSIDERAÇÕES FINAIS



9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora nenhum teste diagnóstico disponível consiga identificar todas as espécies de micobactérias, é possível direcionar a detecção para os principais patógenos oportunistas. Com isso, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar testes moleculares capazes de detectar e diferenciar micobactérias de interesse clínico de forma rápida e acurada, considerando o contexto epidemiológico global e local.

Os testes BiDz-TB/NTM e Multi-Detect MTB/NTM demonstraram alto desempenho na detecção e diferenciação de *M. tuberculosis* e das principais espécies de MNT. A alta sensibilidade e especificidade dos alvos projetados indicam que esses testes, em formatos *multiplex*, poderão ser incorporados à rotina diagnóstica, oferecendo uma alternativa eficaz e de baixo custo para a identificação de micobactérias. Apesar dos avanços deste estudo, algumas questões devem ser consideradas:

1. As avaliações dos alvos dos testes foram realizadas em ensaios individuais e a partir de DNAs genômicos extraídos de culturas micobacterianas, o que diminui a aplicabilidade dos testes em rotinas diagnósticas. Dessa forma, a padronização e avaliação dos testes BiDz-TB/NTM e Multi-Detect MTB/NTM em seus formatos *multiplex* e a validação de seus desempenhos diagnósticos diretamente em amostras clínicas é essencial.
2. Após o desenvolvimento final dos testes, a continuidade da pesquisa deve incluir estudos multicêntricos para validar os métodos em diferentes rotinas diagnósticas.
3. Diferente do teste Multi-Detect MTB/NTM, que depende de um equipamento de *Real-Time* PCR, o formato final do teste BiDz-TB/NTM prevê o desenvolvimento de um equipamento integrado de amplificação e leitura da fluorescência visando uma plataforma *point-of-care*.
4. Por fim, análises de custo-efetividade precisam ser realizadas para garantir a acessibilidade dos testes propostos.

Vale destacar, que este estudo reforça a importância do desenvolvimento de novos testes diagnósticos de micobactérias para auxiliar no controle da TB e das DP-MNT, visto que a utilização de testes rápidos e acessíveis às rotinas laboratoriais pode beneficiar diretamente pacientes e sistemas de saúde.



ANEXOS



10. ANEXOS

Anexo A. Informações adicionais relacionadas ao teste BiDz-TB/NTM

O teste BiDz-TB/NTM está sendo desenvolvido em colaboração entre a University of Central Florida (UCF) e o Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM) da Universidade Federal do Rio Grande – FURG. O formato final deste teste prevê o uso da aPCR-LATE com posterior hibridização dos sensores BiDz em ensaios *multiplex*, utilizando um equipamento com sistema automatizado capaz de amplificar a região alvo dos sensores BiDz e detectar o sinal fluorescente emitido, em até duas horas. O teste será realizado em duas etapas:

- (1) detecção do gênero *Mycobacterium* spp. e/ou do CMTB e;
- (2) detecção do *M. avium*, do CMAB/*M. chelonae* e do *M. kansasii* em amostras com resultados negativos para o CMTB.

A interpretação dos resultados será realizada através de padrões de sinais fluorescentes gerados em canais azul (MzF-FAM) e/ou vermelho (Texas Red [TxR]) (Tabela 1). Em ambas as etapas, serão utilizados controles internos (DNA sintéticos do rRNA 16S de *M. tuberculosis* [etapa 1] e *M. avium* [etapa 2]). Os ensaios só serão considerados válidos quando forem obtidos altos sinais fluorescentes para os controles internos, em ambos os canais (azul e vermelho).

Tabela 1. Interpretação dos resultados a partir dos padrões de sinais fluorescentes.

	Alto sinal apenas no canal azul	Alto sinal apenas no canal vermelho	Altos sinais em ambos os canais
Etapas 1	<i>Mycobacterium</i> sp.	Não micobactéria	CMTB
Etapas 2	<i>M. kansasii</i>	CMAB/ <i>M. chelonae</i>	<i>M. avium</i>
Controle interno: Etapas 1	Teste inválido	Teste inválido	Teste válido*
Controle interno: Etapas 2	Teste inválido	Teste inválido	Teste válido#

*Sinais altos - Canal azul: ~2.000 RFU (unidade relativa de fluorescência); Canal vermelho: ~350 RFU. # Sinais altos - Canal azul: ~600 RFU; Canal vermelho: ~300 RFU. **Nota:** Controles negativos com sinais de ~150 a 200 RFU e ~40 a 60 RFU nos canais azul e vermelho, respectivamente.

Os sensores Myco-BiDz e Mkan-BiDz estão projetados para hibridizar somente com o substrato MzF-FAM e o sensor Mab/Mche-BiDz está projetado para hibridizar somente com o substrato TxR. Os sensores Mtb-BiDz e Mav-BiDz estão projetados para hibridizar com ambos

os substratos (Figura 1). As subunidades Dza e Dzb das extremidades da sequência alvo serão universais a ambas as etapas, complementando os sensores Myco-BiDz e Mtb-BiDz, e os sensores Mkan-BiDz, Mab/Mche-BiDz e Mav-Mkan, com subunidades centrais específicas dos alvos.

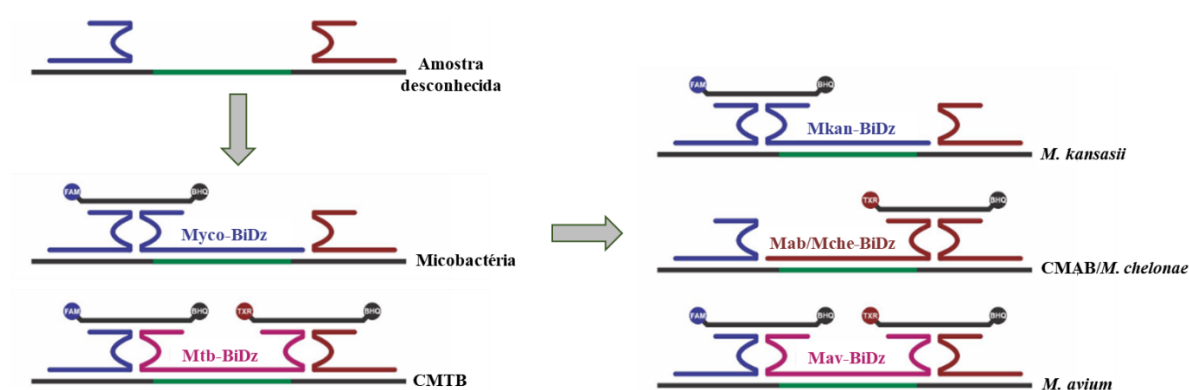


Figura 1. Esquema ilustrativo da hibridização dos sensores BiDz aos substratos fluorogênicos e às espécies-alvo.

ESTUDOS ADICIONAIS

1. O formato multiplex do teste BiDz-TB/NTM, que está sendo padronizado na UCF, tem se mostrado capaz de identificar as espécies-alvo utilizando DNAs sintéticos. No NUPEMM, ensaios avaliando este formato, utilizando cepas clínicas e de referência, ainda estão em andamento, de modo que os resultados ainda não estão disponíveis.
2. O dispositivo portátil, de baixo custo e capaz de realizar a amplificação e detectar a fluorescência emitida segue em processo de desenvolvimento na UCF.
 - a. Durante a avaliação de desempenho do protótipo de amplificação, barreiras técnicas exigiram a remodelação do design inicial, o que resultou em um atraso no desenvolvimento do protótipo, e consequentemente, na transferência da tecnologia da UCF para o NUPEMM.
 - b. Contudo, resultados preliminares sugerem que, após a remodelação do design, o dispositivo será capaz de realizar 30 ciclos de amplificação em menos de 10 minutos.

Anexo B. Informações adicionais relacionadas ao teste Multi-Detect MTN/NTM

Como mencionado anteriormente, o teste Multi-Detect MTN/NTM é baseado na técnica de *Real-Time* PCR associada a sondas de hidrólise do sistema TaqMan e está em desenvolvimento para a detecção simultânea do gênero *Mycobacterium* spp. e identificação do CMTB (etapa 1); e a identificação do *M. avium*, *M. kansasii* e CMAB – alvo ainda em análise *in silico* – (etapa 2), diretamente de amostras clínicas. O teste será realizado em duas etapas, conforme apresentado na figura 2, e incluirá a amplificação de um fragmento de 65 pares de bases do gene RNase P humano como controle interno da reação.

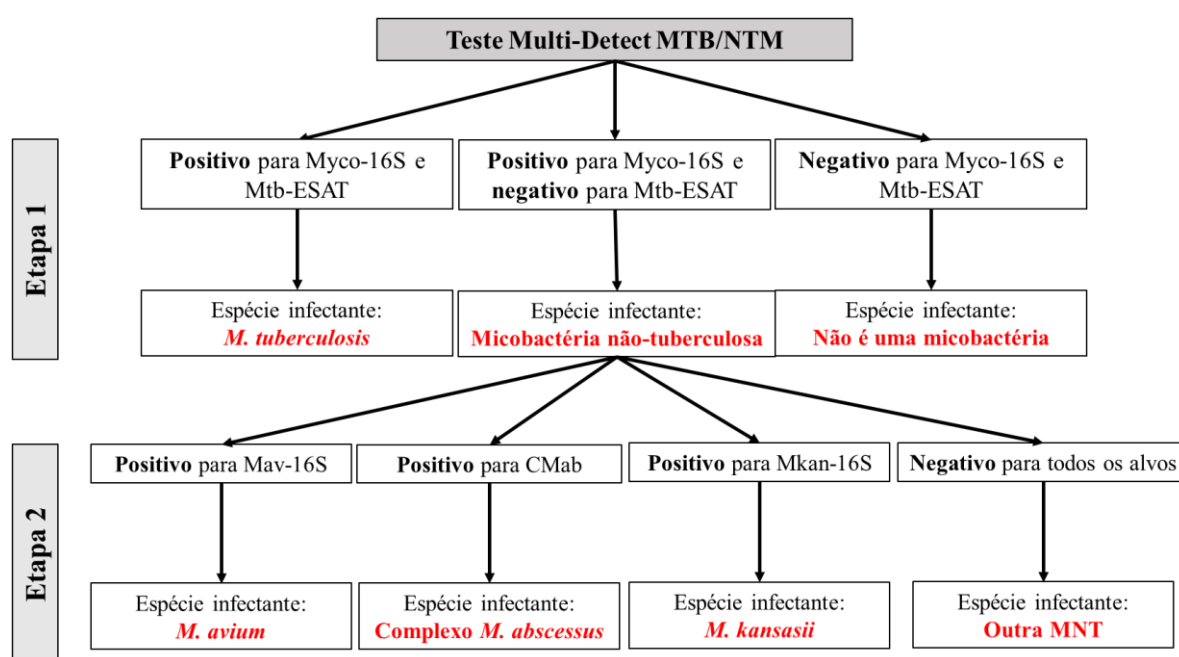


Figura 2. Descrição das etapas do teste Multi-Detect MTB/MNT, com os possíveis resultados.

Myco-16S: Alvo desenhado para a detecção do gênero *Mycobacterium* spp., tendo sua sonda marcada com o fluoróforo VIC (Excitação: 520 ± 10 e Emissão: 558 ± 12); **Mtb-ESAT:** Alvo desenhado para a identificação do CMTB, tendo sua sonda marcada com o fluoróforo FAM (Excitação: 470 ± 15 e Emissão: 520 ± 15); **Mav-16S:** Alvo desenhado para a identificação do *M. avium*, tendo sua sonda marcada com o fluoróforo VIC (Excitação: 520 ± 10 e Emissão: 558 ± 12); **CMab:** Alvo em análise *in silico* para a identificação do CMAB, e terá sua sonda marcada com o fluoróforo ABY (Excitação: 550 ± 10 e Emissão: 587 ± 10); **Mkan-16S:** Alvo desenhado para a identificação do *M. abscessus*, tendo sua sonda marcada com o fluoróforo FAM (Excitação: 470 ± 15 e Emissão: 520 ± 15).

ESTUDOS ADICIONAIS

1. Após o desenho e validação de todos os alvos do teste Multi-Detect MTN/NTM, serão realizados ensaios comparativos dos formatos individual e *multiplex* para verificar possíveis alterações na eficiência dos alvos projetados devido a interações entre as sondas. Em seguida, o formato *multiplex* do teste será padronizado e avaliado quanto à especificidade, sensibilidade, acurácia e limite de detecção, utilizando cepas clínicas e de referência.
2. Avaliar o desempenho diagnóstico do teste Multi-Detect MTN/NTM diretamente em amostras clínicas, com o objetivo futuro de integrá-lo na rotina diagnóstica.
3. Avaliar o teste Multi-Detect MTN/NTM rotina diagnóstica do Laboratório de Micobactérias do NUPEMM-FURG, utilizando amostras clínicas provenientes de pacientes com suspeita de TB. Serão utilizados como métodos padrão-ouro o Xpert MTB-RIF Ultra para a identificação do CMTB e o Sequenciamento Sanger para a identificação das espécies de MNT.

Anexo C. Relatório de atividades do doutorado sanduíche no exterior

Em agosto de 2023 fui contemplada com uma bolsa CAPES-PrInt/FURG de Doutorado Sanduíche no exterior, com início em novembro de 2023 e encerramento em abril de 2024. O plano de trabalho submetido e intitulado **“Genotipagem de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* procedentes da província de Aragón, na Espanha, pelos métodos de Sequenciamento de Genoma total e IS6110-RFLP e padronização de uma plataforma de PCR multiplex em tempo real para a detecção de *M. tuberculosis* e de micobactérias não-tuberculosas de importância clínica”** estava diretamente relacionado ao Projeto de Cooperação Internacional “Prevenção e controle de enfermidades e agravos que acometem a saúde humana e sua qualidade de vida em ecossistemas costeiros”.

Durante os seis meses de estágio em Zaragoza, na Espanha, estive envolvida em diferentes atividades junto a Profa. Dra. Sofia Samper, investigadora sênior do *Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud* (IACS) e coordenadora da linha de epidemiologia molecular do *Grupo de investigación Genética de Micobacterias* (GGM) da Universidad de Zaragoza (UNIZAR). A seguir encontra-se o relatório de atividades enviado a coordenação do PrInt/FURG e à CAPES.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
 PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INTERNACIONALIZAÇÃO DA CAPES
 PROJETO INSTITUCIONAL DE INTERNACIONALIZAÇÃO DA FURG (PRINT/FURG)



RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES DO DOUTORADO SANDUÍCHE

Discente: Yasmin Castillos de Ibrahim das Neves – Doutoranda do PPG em Ciências da Saúde

Período do doutorado sanduíche: 13 de novembro de 2023 a 30 de abril de 2024

Projeto de cooperação internacional - PrInt/FURG: Prevenção e controle de enfermidades e agravos que acometem a saúde humana e sua qualidade de vida em ecossistemas costeiros.

Identificação da proposta de doutorado sanduíche: Genotipagem de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* procedentes da província de Aragón, na Espanha, pelos métodos de Sequenciamento de Genoma total e IS6110-RFLP e padronização de uma plataforma de PCR *multiplex* em tempo real para a detecção de *M. tuberculosis* e de micobactérias não-tuberculosas de importância clínica.

Instituições envolvidas:

1. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil

Faculdade de Medicina, PPG em Ciências da Saúde, Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica

2. Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Zaragoza, Espanha

Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud; Grupo de investigación de Genética de Micobacterias, Universidad de Zaragoza; CIBER de Enfermedades Respiratorias

Supervisores:

Prof.^a Dr.^a Sofia Samper Blasco – Supervisora no exterior

Prof.^a Dr.^a Andrea von Groll – Orientadora

Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva – Coorientador

Rio Grande, Junho de 2024



As atividades apresentadas neste relatório foram realizadas no Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, localizado no Hospital Universitario Miguel Servet, e na Universidad de Zaragoza, Espanha, sob supervisão da Dra. Sofia Samper.

1. Genotipagem do *M. tuberculosis*: Resultados

1.1. Genotipagem clássica: IS6110-RFLP e Spoligotyping

Durante o ano de 2023, 78 pessoas foram diagnosticadas com tuberculose (TB) em três hospitais localizados na comunidade autônoma de Aragón, localizada no noroeste da Península Ibérica. Destes 78 casos de TB, 96,2% (75/78) e 3,8% (3/78) foram identificados através da genotipagem clássica, IS6110-RFLP e/ou Spoligotyping, como causados pelo *M. tuberculosis* e pelo *M. bovis*, respectivamente. Além desta identificação inicial, utilizando os métodos IS6110-RFLP e Spoligotyping foi possível analisar as relações epidemiológicas e/ou identificar filogeneticamente os isolados clínicos provenientes dos pacientes diagnosticados com TB em 2023.

Como pode ser visto na figura 1, os isolados clínicos de *M. tuberculosis*, com resultados de IS6110-RFLP (53/75), tinham em média 10 bandas de IS6110, o que é corroborado pelos perfis de bandas descritos na literatura para esta espécie. Destes isolados, 79,2% apresentavam perfis de bandas de IS6110 únicos e, portanto, não tinham relações epidemiológicas entre si, e 20,8% foram agrupados em cinco *clusters* (CLS A a CLS E). Apenas o CLS B apresentava *link* epidemiológico confirmado por se tratar de transmissões intrafamiliares. Os três isolados de *M. bovis* foram agrupados no CLS F devido a única banda de IS6110 presente, correspondente ao perfil de bandas característico desta espécie, porém, não apresentavam relações epidemiológicas.

As análises filogenéticas realizadas através dos resultados de Spoligotyping disponíveis (45/78), demonstraram que os isolados clínicos pertenciam a linhagem *Euro-American* (L4; 66,7%), linhagem *Central-Asian-Strain* (L3; 6,7%), linhagem *East-Asian*, especificamente a família Beijing (L2; 2,2%) e linhagem *East-African-Indian* (L1; 2,2%) do *M. tuberculosis*, e 4,4% foram identificados como BOV_1 (*M. bovis*). Os demais isolados apresentavam *Spoligotypes* desconhecidos (15,6%), ou seja, nenhum dos perfis já havia sido depositado na base de dados SITVIT2.

Dentro da linhagem 4, a família Haarlem foi a mais prevalente (53,3%), especificamente as subfamílias H3 e H1, seguida das famílias LAM (26,7%) e T (20%). A identificação filogenética dos isolados clínicos estudados está de acordo com a estrutura filogenética do *M. tuberculosis* observada na Europa, com predominância da linhagem 4 e frequências mais baixas das demais linhagens e famílias.

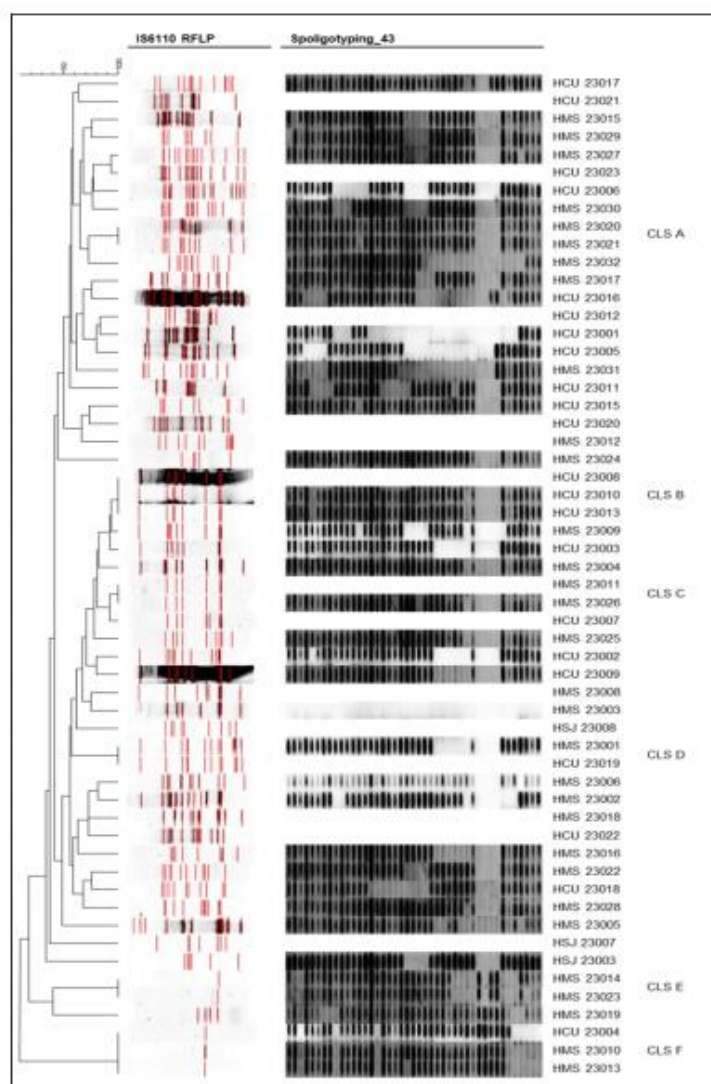


Figura 1. Resultados dos métodos IS6110-RFLP e Spoligotyping dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. O dendrograma a esquerda foi construído utilizando os dados obtidos pelo método IS6110-RFLP.

1.1.1. Genótipos circulantes em Aragón

Desde 2004, com o objetivo de reduzir as taxas de incidência da TB em colaboração com as autoridades de saúde, o grupo de Genética de Micobacterias vem genotipando todos os isolados clínicos de *M. tuberculosis* em Aragón. Assim, um banco de dados com quase 3 mil perfis de IS6110-RFLP e Spoligotyping estava disponível para análises. Para avaliar os genótipos que circularam em Aragón durante o ano de 2023, os perfis de bandas IS6110 obtidos para esses isolados foram comparados a outros perfis carregados no banco de dados.

Quando avaliados em relação aos quase 3.000 perfis de IS6110, os isolados clínicos de 2023 foram agrupados em *clusters* de *M. tuberculosis* já formados no banco de dados (44,6%), pertenciam

ao *cluster* de *M. bovis* (5,4%) ou formaram um novo *cluster* com um perfil único do banco de dados (1,8%). Os demais isolados (46,4%) apresentavam perfis de bandas IS6110 únicos, o que indica que os isolados de 2023 não tinham relações epidemiológicas com os genótipos circulantes em Aragón durante os quase 20 anos de monitoramento e que o *M. tuberculosis* foi adquirido através de fontes desconhecidas.

Não é possível afirmar que uma alteração da estrutura populacional do *M. tuberculosis* em Aragón esteja ocorrendo, já que mais de 45% dos perfis de 2023 estavam presentes no banco de dados. No entanto, a alta proporção de perfis únicos identificados indica uma manutenção dessa estrutura, que pode ser consequência do fluxo de imigração massivo que vem ocorrendo para a Europa e para Aragón.

1.2. Análises bioinformáticas do sequenciamento de genoma total

Utilizando a plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq, foram sequenciados, até o momento, 64 dos 78 isolados clínicos de 2023. Após o sequenciamento, os arquivos fastQ obtidos para 39 isolados clínicos foram submetidos às análises bioinformáticas utilizando duas diferentes pipelines, PhyReSE e MTBSeq, para detecção de variantes alélicas associadas à resistência aos antimicrobianos e à identificação filogenética, e análise de relações epidemiológicas. Os demais isolados sequenciados ainda não foram analisados, portanto, os resultados não estão disponíveis.

A pipeline PhyReSE (Phylo-Resistance Search Engine) é uma ferramenta online que realiza um controle de qualidade rigoroso dos arquivos fastQ obtidos através do WGS, mapeia as reads contra o genoma de referência H37Rv e classifica a amostra quanto a linhagem filogenética e resistência aos antimicrobianos. Para isso, esta pipeline utiliza uma combinação de softwares de bioinformática amplamente validada: FastQC e Qualimap para a verificação da qualidade e pré-processamento dos arquivos fastQ e BAM resultantes; Burrows-Wheeler Aligner (BWA) para o alinhamento das reads contra a H37Rv e; SAMtools e Genome Analysis Toolkit (GATK) para a remoção das reads duplicadas e realizar a chamada de variantes (SNP e inserções e deleções [InDels]). Por ser uma ferramenta online e automatizada, o PhyReSE não requer a instalação de softwares no computador e pode ser operado por qualquer pessoa devido à linguagem simples utilizada. Entretanto, suas limitações são o tamanho dos arquivos fastQ suportados (até 2,1 GB) e o fato de não permitir a análise comparativa dos resultados genômicos obtidos.

Assim como PhyReSE, a pipeline MTBSeq é uma ferramenta automatizada que permite a análise de dados de WGS para a classificação filogenética das amostras e detecção de resistência aos antimicrobianos utilizando os softwares descritos acima, exceto FastQC e Qualimap. Além disso, o MTBSeq gera arquivos FASTA utilizados em análises comparativas de múltiplas amostras, incluindo

inferência de grupos de transmissão e a reconstrução de árvores filogenéticas. O código-fonte completo desta pipeline é fornecido abertamente, contudo, requer a instalação de softwares no computador e etapas em linhas de comando são necessárias, o que limita o seu uso.

1.2.1. Resultados pelas diferentes pipelines: PhyReSE vs MTBSeq

Dos 39 isolados clínicos sequenciados, seis isolados não puderam ser analisados devido à baixa cobertura do genoma sequenciado (2/39), presença de micobactérias atípicas (1/39) e contaminação de amostra (3/39). Os demais isolados clínicos apresentaram uma cobertura média de 89% em relação a H37Rv, com concordância de resultados obtidos por ambas as pipelines de 88% (29/33) para a classificação filogenética e de 79% (26/33) para a resistência aos antimicrobianos. Abaixo estão descritos em detalhes os resultados obtidos pelas pipelines PhyReSE e MTBSeq.

As análises de identificação filogenética realizadas a partir das diferentes pipelines, mostraram que 79,3% (23/29) dos isolados pertenciam a linhagem 4; 6,9% (2/29) a sub-linhagem L1.1.2, 6,9% (2/29) ao *M. bovis*, 3,4% (1/29) a sub-linhagem L2.2.1 e 3,4% (1/29) a linhagem 3. Apenas quatro isolados mostraram resultados discordantes entre as pipelines, sendo identificados como L4.8 (3/33) e L4.9 (H37Rv-like; 1/33) pelo MTBSeq, enquanto PhyReSE não foi capaz de realizar uma identificação filogenética mais profunda, não apresentando resultados (1/33) ou classificando os isolados como L4 (3/33). Os resultados obtidos demonstram que a pipeline MTBSeq apresenta maior sensibilidade e confiabilidade para a classificação filogenética. A tabela 1 apresenta os resultados de classificação filogenética para os 33 isolados clínicos sequenciados e analisados.

Tabela 1. Classificações filogenéticas dos isolados de 2023 obtidas através dos diferentes pipelines.

Classificação filogenética	Pipeline PhyReSE N (%) [*]	Pipeline MTBSeq N (%) [*]
Linhagem <i>Euro-American</i> (L4)	26 (78,8%)	27 (81,8)
L4.1.2.1	12 (36,4%)	12 (36,4%)
L4.3.2	4 (12,1%)	4 (12,1%)
L4.3.3	3 (9,1%)	3 (9,1%)
L4.3.4.2	3 (9,1%)	3 (9,1%)
L4.6.2.2	1 (3%)	1 (3%)
L.4.8	0 (0%)	3 (9,1%)
L.4.9	0 (0%)	1 (3%)
Linhagem <i>East-African-Indian</i> (L1)		
L1.1.2	2 (6,1%)	2 (6,1%)
Linhagem <i>East-Asian</i> (L2)		
L2.2.1	1 (3%)	1 (3%)
Linhagem <i>Central-Asian-Strain</i> (L3)	1 (3%)	1 (3%)
<i>M. bovis</i> (BOV)	2 (6,1%)	2 (6,1%)

*Porcentagem calculada sobre o número total de isolados que foram classificados por pelo menos uma das pipelines (33/39).

Por meio da pipeline PhyReSE, 84,8% (28/33) dos isolados clínicos foram caracterizados como sensíveis aos antimicrobianos, 12,1% (4/33) como resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 3% (1/33) não apresentava resultados. Dentre os 4 isolados resistentes aos antimicrobianos, dois eram resistentes a pirazinamida (PZA) adquirida através da mutação não sinônima no códon 57 do gene *pncA* (His57Asp), um era resistente às fluoroquinolonas (FQ) com mutação não sinônima no códon 94 do gene *gyrA* (Asp94Gly) e um foi considerado multidroga resistente (MDR), sendo resistente a rifampicina (RMP; gene *rpoB* [Asp435Tyr]), isoniazida (INH; gene *katG* [Ser315Thr]), estreptomicina (STP; gene *rpsL* [Lys43Arg]) e PZA (gene *pncA* [Ala134Val]). O isolado MDR correspondia a sublinhagem L2.2.1 (Beijing por Spoligotyping), frequentemente associada a resistência aos antimicrobianos, enquanto os isolados resistentes a PZA correspondiam ao *M. bovis*, espécie intrinsecamente resistente a este antimicrobiano.

Por outro lado, através da pipeline MTBSeq, 81,8% (27/33) dos isolados clínicos foram caracterizados como sensíveis aos antimicrobianos e 18,2% (6/33) como resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Dentre os isolados resistentes, quatro eram resistentes a STP (gene *Rvn01* [substituição C-T]), um era resistente às FQ (gene *gyrA* [Asp94Gly]) e um era MDR, sendo resistente a RMP (gene *rpoB* [Asp435Tyr]), INH (gene *katG* [Ser315Thr]), STP (gene *rpsL* [Lys43Arg]) e PZA (gene *pncA* [Ala134Val]). Ao realizar análises comparativas, observou-se que cerca de 20% dos resultados de resistência obtidos através do MTBSeq estavam incorretos. Isto se deve a identificação de resistência a STP através de uma mutação identificada como marcador filogenético e a não identificação da mutação intrínseca associada a resistência a PZA de *M. bovis*.

Os resultados apresentados demonstram a necessidade de refinar os catálogos de marcadores filogenéticos e mutações associadas à resistência aos antimicrobianos para evitar erros de identificação ou classificações imprecisas. Além disso, demonstraram a importância de usar mais de um pipeline para realizar análises bioinformáticas mais robustas. Isso se deve ao fato de que o uso conjunto dos pipelines PhyReSE e MTBSeq permitiu a classificação genética precisa dos isolados estudados.

Conforme mencionado anteriormente, o pipeline MTBSeq permite a análise comparativa de várias amostras. Assim, ao analisar os isolados de 2023 em conjunto, nenhuma relação epidemiológica foi observada (figura 2), uma vez que a matriz de comparação não resultou em isolados com menos de 12 SNPs de diferença (figura 3). Estes resultados indicam que os isolados clínicos de 2023 não estavam envolvidos em transmissão recente (<5 SNPs) ou formavam *clusters* entre si (<12 SNPs).

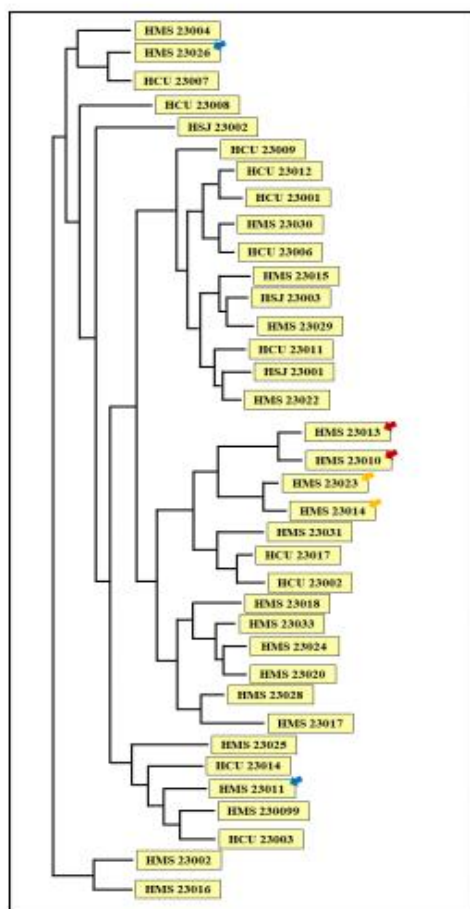


Figura 2. Dendrograma construído com as relações epidemiológicas dos isolados 2023. Indicados por flechas azuis, amarelas e vermelhas estão os isolados agrupados nos CLS C, E e F, respectivamente.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
S1		6	2980	2156	1349	2588	2699	1912	980	2230	2739	2710	2258	4724	2179	4809
S2	2980		6	3353	2429	2874	2841	2764	2844	3098	3006	2959	3207	4568	3139	4582
S3	2156	3353		6	2567	1527	1661	2640	2237	990	1623	1644	989	4779	906	4984
S4	1349	2429	2567		6	1993	1993	1420	1023	2263	2107	2057	2369	4235	2296	4251
S5	2588	2874	1527	1993		6	733	2092	2310	1014	760	486	1419	4321	980	4266
S6	2699	2841	1661	1993	733		6	2268	2410	1293	743	762	1427	4291	1296	4281
S7	1912	2764	2640	1420	2092	2268		6	1514	2271	2390	2206	2592	4465	2259	4401
S8	980	2844	2237	1023	2310	2410	1514		6	2112	2458	2417	2262	4473	2123	4582
S9	2230	3098	990	2263	1014	1293	2271	2112		6	1215	1004	979	4457	745	4683
S10	2739	3006	1623	2107	760	743	2390	2458	1215		6	707	1303	4459	1338	4358
S11	2710	2959	1644	2057	486	762	2206	2417	1004	707		6	1310	4365	1074	4333
S12	2258	3207	989	2369	1419	1427	2592	2262	979	1303	1310		6	4699	957	4913
S13	4724	4568	4779	4235	4321	4291	4465	4473	4457	4459	4365	4699		6	4509	1489
S14	2179	3139	906	2296	980	1296	2259	2123	745	1338	1074	957	4509		6	4718
S15	4809	4582	4984	4251	4266	4281	4401	4582	4683	4358	4333	4913	1489	4718		6

Figura 3. Matriz de comparação reconstruída para exemplificar as análises realizadas entre os isolados clínicos de 2023.

Os três isolados classificados como contaminações apresentavam uma mescla de genótipos identificados por ambas as pipelines como: (1) “L2.2.1 ou L4”; (2) “L4.1.2.1 ou L4.6.2.2”; e (3)

“L4.1.2.1 ou L4.3.3”. Estes isolados foram submetidos a um novo sequenciamento genômico massivo e os resultados ainda não estão disponíveis. Contudo, utilizando as árvores filogenéticas construídas, baseadas na proximidade genética dos isolados, podemos inferir que os isolados 1, 2 e 3 pertencem a L2.2.1 (1209 SNPs de diferença), L4.6.2.2 (1236 SNPs de diferença) e L4.3.3 (1122 SNPs de diferença), respectivamente.

1.3. Análise comparativa da genotipagem clássica e sequenciamento de genoma total

Ao realizar análises comparativas, observamos que os isolados agrupados pelo método IS6110-RFLP (figura 1) foram discriminados pelo sequenciamento genômico, de modo que nenhum dos isolados sequenciados e analisados, que possuíam resultados de RFLP (31/33), apresentavam relações epidemiológicas. O agrupamento incorreto por RFLP se deve ao baixo número de cópias de IS6110, o que, conhecidamente, resulta na redução significativa do poder discriminatório deste método. No entanto, como pode ser visto na figura 2, embora os isolados agrupados por RFLP nos CLS C, E e F não formassem clusters, eles estavam intimamente relacionados, diferindo em 1051 SNPs, 1223 SNPs e 1489 SNPs, respectivamente. Além disso, estes isolados compartilhavam a mesma linhagem/sub-linhagem, sendo elas: L4.1.2.1 (CLS C; Haarlem), L1.1.2 (CLS E; EAI) e *M. bovis* (CLS F).

Ao avaliar os resultados disponíveis para os 39 isolados sequenciados, apenas 30 haviam sido submetidos ao método Spoligotyping, até o momento. No entanto, ao comparar os resultados de Spoligotyping e sequenciamento genômico, com exceção dos isolados com spoligotypes desconhecidos, observamos 100% de concordância na classificação filogenética. Além disso, os resultados de Spoligotyping estavam disponíveis para os três isolados classificados como contaminações, sendo identificados como Manu2 (isolado 1), Haarlem 3 (isolado 2) e Haarlem 1 (isolado 3). Estes resultados discrepantes corroboram a necessidade de realizar um novo sequenciamento genômico massivo para afirmar com precisão os resultados observados.

A genotipagem clássica, que inclui, mas não se limita aos métodos IS6110-RFLP e Spoligotyping, é extremamente importante para acelerar as análises epidemiológicas e filogenéticas do complexo *M. tuberculosis* em locais com recursos financeiros limitados. Entretanto, é necessário considerar suas limitações, como o baixo poder discriminatório de cepas com baixo número de cópias IS6110, a evolução convergente dos espaçadores do Spoligotyping e a ausência de resultados de sensibilidade aos antimicrobianos, o que exige o uso de métodos adicionais para aumentar a confiabilidade dos resultados. Diante disso, o sequenciamento genômico massivo, considerado um método inacessível para a maioria dos pesquisadores devido à dificuldade de realização de análises bioinformáticas, ganhou destaque através do aprimoramento das técnicas, com facilitação da linguagem computacional, associado à redução dos custos.

2. Atividades extras realizadas em paralelo ao projeto do doutorado sanduíche

Durante o período de estágio no exterior, foram realizadas outras atividades pertinentes ao projeto apresentado para o doutorado sanduíche. Essas atividades tiveram como objetivo o aprendizado e domínio de habilidades para a análise de variantes alélicas associadas à resistência aos antimicrobianos e à identificação filogenética em relação ao genoma de referência H37Rv. Para isso, foram utilizados os softwares Chromas e Integrative Genomics Viewer (IGV) e, bem como as ferramentas online Tuberculist e Mycobrowser, que permitem a visualização e/ou a análise de sequências genômicas parciais e completas. As atividades realizadas estão resumidas as seguir.

I. Identificação de nucleotídeos mutados:

Utilizando o software Chromas e as ferramentas online Tuberculist e Mycobrowser, investigamos sequências parciais de genes que codificam alvos de antimicrobianos para identificar nucleotídeos mutados e seus respectivos códons e assim avaliar se a mutação observada confere ou não resistência. Em uma das análises realizadas, carregamos sequências parciais do gene *rpoB* no Chromas, copiamos as sequências para o Tuberculist e Mycobrowser e utilizando a posição inicial do gene *rpoB* calculamos a posição dos nucleotídeos mutados. Em seguida, verificamos a qual códon o nucleotídeo pertencia, para então analisar se a mutação encontrada conferia ou não resistência a RMP.

A realização de inúmeras análises utilizando estas ferramentas, permitiu o aprendizado e o aperfeiçoamento da capacidade de identificar mutações e avaliar se estas estavam ou não associadas a resistência aos antimicrobianos. Além disso, o uso destas ferramentas possibilitou a construção do catálogo de mutações descrito abaixo.

II. Identificação filogenética a partir da investigação de regiões de deleção (RDs):

Para corroborar os resultados filogenéticos obtidos com os pipelines PhyReSE e MTBSeq, realizamos análises com as sequências genômicas utilizando o software IGV 2.8.4. Estas análises consistiram na investigação de RDs, amplamente validadas na literatura, como marcadores filogenéticos. Entre as análises realizadas, verificamos a presença ou ausência de deleções associadas ao genótipo RD-Rio, descoberto no Brasil, nos isolados identificados como LAM (L4.3.2; L4.3.3; e L4.3.4.2). Como resultado, dos 10 isolados LAM, apenas três, correspondentes a L4.3.4.2, tinham a deleção RD-Rio. A utilização deste software permite a visualização completa do genoma de interesse em relação ao H37Rv, o que, conseqüentemente, possibilita o estudo robusto de variantes alélicas.

III. Elaboração de um catálogo de mutações de resistência:

Com base nos catálogos de variantes disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), foi elaborado um catálogo de mutações de resistência aos antimicrobianos anti-TB. Este catálogo foi organizado devido à dificuldade de identificar os polimorfismos derivados dos eventos

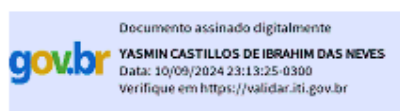
mutacionais que resultaram nas variantes descritas. Das 1.125 variantes presentes nos catálogos da OMS, 241 estavam associadas a resistência a 12 antimicrobianos anti-TB. Assim, usando os softwares e ferramentas online descritas acima, conseguimos identificar as mutações não sinônimas nos genes *rpoB*, *inhA*, *katG*, *embB*, *pncA*, *gyrA*, *gyrB*, Rv0678, *rplC*, *rrs*, *gid*, *rpsL* e *ethA* que originaram as variantes descritas como associadas a resistência.

É importante observar, que o catálogo descreve os códons WT de H37Rv, a posição deste códon em relação ao gene avaliado e os códons modificados com os prováveis polimorfismos. Para escolher estes polimorfismos, foi considerada apenas uma alteração de nucleotídeo, ou seja, foi avaliado apenas um evento mutacional por vez. Este catálogo não está publicado, mas será disponibilizado aos pesquisadores envolvidos na sua preparação e mediante solicitação.

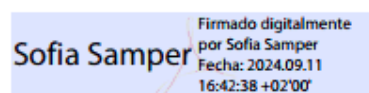
3. Considerações finais

Durante meu estágio de seis meses no exterior, realizamos atividades que foram essenciais para o progresso do meu doutorado. No entanto, não tivemos tempo hábil para concluir um dos objetivos específicos do projeto de doutorado sanduíche submetido, que era padronizar os alvos da plataforma PCR-rt *multiplex* MTB/MNT para detectar o gênero *Mycobacterium* e *M. tuberculosis*. Porém, com o auxílio de investigadores do Grupo Genética de Micobacterias, novos alvos foram desenhados *in silico* para aumentar a eficiência das reações *multiplex*, e as avaliações estão programadas para começar em julho de 2024.

O doutorado sanduíche em Zaragoza, na Espanha, me proporcionou a oportunidade de conviver com docentes, especialmente a Dra. Sofia Samper, e discentes excelentes que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Todos os conhecimentos adquiridos permitirão o desenvolvimento de projetos voltados para o sequenciamento e análise de genomas em colaboração entre o Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica e outros grupos de pesquisa da FURG e de outras instituições. O conhecimento de ferramentas de sequenciamento genômico e de análises bioinformáticas serão de grande importância considerando a recente aquisição de um sequenciador pela FURG.



Yasmin Castillos das Neves
(Discente)



Sofia Samper Blasco
(Supervisora no exterior)



D. Óscar López Lorente, Director Ejecutivo de la Fundación Instituto de Investigación Sanitaria (IIS Aragón);

CERTIFICA que,

D./Dña. Yasmin Castillos de Ibrahim das Neves ha realizado una estancia con el Grupo de Investigación GIIS049 "Grupo Genética de Micobacterias" gestionado por la Fundación Instituto de Investigación Sanitaria Aragón. Las fechas de dicha estancia han sido desde el 11 de noviembre de 2023 hasta el 30 de abril de 2024.

En Zaragoza, a 29 de octubre de 2024

25448429X
OSCAR LOPEZ
(R: G99426132)

Firmado digitalmente
por 25448429X OSCAR
LOPEZ (R: G99426132)
Fecha: 2024.11.08
13:55:15 +01'00'

Óscar López Lorente
Director Ejecutivo

Anexo D. Atividades de pesquisa, ensino e extensão

PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICO

Relacionada a tese

1. Resumo enviado ao VIII Workshop Rede-TB 2021. Evento online; 2021. ***DNAzyme is an accurate tool for the development of new platforms for tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria.*** Apresentação oral realizada por um dos autores.
2. Apresentação oral na 20ª Mostra de Produção Universitária – MPU/FURG e 23º Encontro de Pós-Graduação. Rio Grande, RS; 2021. **Avaliação de uma plataforma para a detecção e identificação do *Mycobacterium tuberculosis* e de micobactérias não-tuberculosas.**
3. Apresentação oral no 57º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP. Belém, PA; 2022. **Sensores desoxirribozimas binários na detecção e identificação de micobactérias de importância clínica.**
4. Menção honrosa na 57º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP, Belém, PA; 2022. **Título do trabalho:** Sensores desoxirribozimas binários na detecção e identificação de micobactérias de importância clínica.
5. Apresentação oral na 22ª Mostra de Produção Universitária – MPU/FURG e 24º Encontro de Pós-Graduação. Rio Grande, RS; 2023. **Teste de PCR Real-Time para a identificação do *Mycobacterium tuberculosis* a partir da cultura de amostras pulmonares provenientes de pacientes com suspeita de tuberculose.**
6. Apresentação de pôster no 58º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP. Salvador, BA; 2023. **Desenvolvimento de um teste de PCR em tempo real para a detecção de *Mycobacterium avium* a partir do cultivo em sistema BD *Mycobacteria Growth Indicator Tube* de amostras pulmonares procedentes de pacientes com suspeita de tuberculose.**
7. Bolsa CAPES-PrInt/FURG de doutorado sanduíche no exterior. Projeto intitulado “**Genotipagem de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* procedentes da província de Aragón, na Espanha, pelos métodos de Sequenciamento de Genoma total e IS6110-RFLP e padronização de uma plataforma de PCR multiplex em tempo real para a detecção de *M. tuberculosis* e de micobactérias não-tuberculosas de importância**

- clínica”** (Anexo C). Local: Zaragoza, Espanha. Período: novembro/2023 a abril/2024. Supervisora no exterior: Profa. Dra. Sofia Samper.
8. Artigo publicado como primeira autora: **Detection of Mtb and NTM: preclinical validation of a new asymmetric PCR-binary deoxyribozyme sensor assay** (Artigo 1; Seção 6). 2024. Microbiology Spectrum. DOI: 10.1128/spectrum.03506-23.
 9. Apresentação oral na 23ª Mostra de Produção Universitária – MPU/FURG e 25º Encontro de Pós-Graduação. Rio Grande, RS; 2024. **Sequenciamento de genoma total em comparação com métodos clássicos de genotipagem para a caracterização epidemiológica e filogenética de isolados de *Mycobacterium tuberculosis***. Resumo relacionado ao Doutorado Sanduíche em Zaragoza, Espanha (Anexo C).
 10. Apresentação oral de um relato de experiência na 23ª Mostra de Produção Universitária – MPU/FURG e 2º Mostra de Internacionalização para o Desenvolvimento Institucional. Rio Grande, RS; 2024. **Joint doctorate abroad experience: molecular research of *Mycobacterium tuberculosis* with next-generation sequencing technology**. Resumo relacionado ao Doutorado Sanduíche em Zaragoza, Espanha (Anexo C).
 11. Manuscrito em desenvolvimento como primeira autora: **Desenvolvimento e avaliação pré-clínica de *Real-Time* PCR para a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* e de micobactérias não-tuberculosas de importância clínica** (Artigo 2; Seção 7). The Journal of Molecular Diagnostics.

Não-relacionada a tese

1. Artigo publicado como coautora: **Whole-genome sequencing as a tool for studying the microevolution of drug-resistant serial *Mycobacterium tuberculosis* isolates**. 2021. Tuberculosis. DOI: 10.1016/j.tube.2021.102137.
2. Apresentação oral na 21ª Mostra de Produção Universitária – MPU/FURG e 24º Encontro de Pós-Graduação. Rio Grande, RS; 2022. **Análise bacteriológica de infecção de corrente sanguínea de dois filhotes de toninhas (*Pontoporia blainvillei*) em reabilitação após encalhe**.

3. Palestrante no WORKSHOP Investigações Epidemiológicas para o Enfrentamento da Tuberculose. Rio Grande, RS; 2023. **Impacto do fluxo migratório no perfil genotípico do *Mycobacterium tuberculosis* disperso na América Latina.**
4. Resumo publicado na 22ª Mostra de Produção Universitária – MPU/FURG e 32º Congresso de Iniciação Científica. Rio Grande, RS; 2023. **Identificação de micobactérias não-tuberculosas em pacientes com suspeita de tuberculose.**
5. Resumo publicado na 22ª Mostra de Produção Universitária – MPU/FURG e 24º Encontro de Pós-Graduação. Rio Grande, RS; 2023. **Uso de sensores desoxirribozimas binários para a detecção do *Mycobacterium tuberculosis* com diferentes perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos: Um estudo piloto.**
6. Artigo publicado como primeira autora: **Genotyping methods and their contributions to the study of tuberculosis dynamic in Latin America.** 2023. The Journal of Infection in Developing Countries. DOI: 10.3855/jidc.17840.
7. Resumo publicado na 23ª Mostra de Produção Universitária – MPU/FURG e 25º Encontro de Pós-Graduação. Rio Grande, RS; 2024. **Identificação molecular de resistência a isoniazida em *Mycobacterium tuberculosis* utilizando sensores desoxirribozimas binários.**
8. Resumo publicado na 23ª Mostra de Produção Universitária – MPU/FURG e 7º Salão de Indissociabilidade, RS; 2024. **Desenvolvimento de materiais didáticos sobre tuberculose para aplicação em um município com alta carga da doença: um relato de experiência.**
9. Resumo publicado no 59º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP. São Paulo, SP; 2024. **Tuberculose e pós-graduação: como estão os registros de propriedade intelectual vinculados a teses e dissertações produzidas no Brasil?**
10. Artigo em desenvolvimento como primeira autora: **Microbiological characterization of samples from two neonate franciscanas dolphins (*Pontoporia blainvillei*) rescued alive in the south-east of Brazil: case report.**
11. Artigo em desenvolvimento como coautora: **Avanços no diagnóstico de tuberculose e outras micobacterioses e identificação de resistência aos antimicrobianos, com ênfase na busca de plataformas *point-of-care*.**

12. Artigo em desenvolvimento como coautora: **Produção resultantes de teses e dissertações sobre tuberculose no Brasil.**

PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA E EXTENSÃO:

1. **Projeto de pesquisa:** Detecção *point-of-care* de TB e MNT utilizando sensores Desoxirribosíma fluorescentes e dispositivo alimentado por bateria, impresso em 3D. *Projeto desenvolvido em colaboração com a University of Central Florida (UCF) e o Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM) da FURG.* **Coordenador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva. Concluído; 2019-2024.**
2. **Projeto de pesquisa:** Inovação, desenvolvimento e validação de plataformas para o diagnóstico laboratorial da tuberculose e outras micobacterioses de importância clínica. **Coordenadora: Profa. Andrea von Groll. Concluído; 2021-2023.**
3. **Projeto de pesquisa:** Desoxirribosíma como estratégia molecular para o desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica *point-of-care* para a detecção da tuberculose e da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* aos antimicrobianos. **Coordenadora: Profa. Dra. Ivy Bastos Ramis de Souza. Em andamento; 2022-atual.**
4. **Projeto de pesquisa:** Ensaio clínico prospectivo multicêntrico para avaliar a acurácia de novos testes diagnósticos de TB e TB droga resistente em diferentes regiões do país: Standard M10 e MDR MTB LAMP. **Coordenador: Prof. Dr. Afrânio Lineu Kritski. Em andamento; 2024-atual.**
5. **Projeto de pesquisa:** Vigilância genômica e metagenômica da resistência a antimicrobianos no contexto de saúde única. **Coordenador: Profa. Dra. Livia Kmetzsch. Em andamento; 2023-atual.**
6. **Projeto de extensão:** Tuberculose e outras micobacterioses: Educar para controlar. **Coordenadora: Profa. Dra. Ivy Bastos Ramis de Souza. Em andamento; 2024-atual.**

OUTRAS ATIVIDADES:

1. Ministrante de minicurso: **Prática de ferramentas convencionalmente utilizadas em laboratório de microbiologia.** XXIV Jornada Biológica, Instituto de Ciências Biológicas, FURG; Rio Grande, RS. Período: 28/08/2023 a 01/09/2023 (4 horas).

2. Realização de curso teórico-prático: **Nova geração de sequenciamento, montagem e análise de genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis***. Centro de Ciências computacionais, FURG; Rio Grande, RS. Ministrante: Prof. Dr. João Perdigão (Universidade de Lisboa). Período: 09/10/2023 a 10/10/2023 (20 horas).
3. Participação em comissão organizadora: **WORKSHOP Investigações Epidemiológicas para o Enfrentamento da Tuberculose**. Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, FURG; Rio Grande, RS. Período: outubro/2023.
4. Participação em comissão de ensino: **Representante discente da Pós-Graduação em Ciências da Saúde no Conselho da Faculdade de Medicina, FURG**. Rio Grande, RS. Período: janeiro/2022 a novembro/2023.
5. Participação em comissão interna de avaliação do PPG Ciências da Saúde para indicação de tese ao Prêmio CAPES de Tese: **Representante discente na edição 2022**.