

Introdução: *Mycobacterium bovis* é um agente do complexo *M. tuberculosis* que causa TB animal, mas que pode afetar também o ser humano, sendo a sua contribuição relativa no contexto global da tuberculose humana (TB) provavelmente subestimada devido às suas características de crescimento disgônico e lento e, à ausência de piruvato na maioria dos meios utilizados que dificulta o seu isolamento primário. No Brasil, cultivos de microrganismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), sua identificação e testes de sensibilidade são realizados apenas em centros de referência em tuberculose (TB), em geral, em casos específicos. Além disso, meios sólidos, à base de ovo, como Löwenstein-Jensen (LJ) ou Ogawa contendo glicerol (sem suplementação de piruvato) são usados rotineiramente, prejudicando o isolamento de *M. bovis*. Os principais objetivos desta tese foram: 1 - descrever a identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* baseada na amplificação e sequenciamento do pseudogene *oxyR* de esfregaços de escarro corados por Ziehl-Neelsen obtidos de pacientes com TB pulmonar diagnosticada em dois laboratórios de referência da rede pública de Juiz de Fora, Minas Gerais, em 2007 (artigo original 1); 2 - determinar a importância relativa de *M. bovis* como causa de TB em suspeitos referenciados a dois centros de saúde de Juiz de Fora, Minas Gerais, de março de 2008 a fevereiro de 2010 (artigo original 2); 3 - Investigar fatores associados a infecções humanas por *M. bovis* e micobactérias não-tuberculosas, respectivamente (artigo original 3). Os métodos para atingir esses objetivos e os resultados foram apresentados em três artigos originais resumidos a seguir. **Artigo original 1:** Foi realizada uma análise transversal de esfregaços de escarro de lâminas de baciloscopia corados por Ziehl-Neelsen (ZN), provenientes de pacientes com TB atendidos em dois laboratórios públicos de referência de tuberculose localizados em Juiz de Fora, Minas Gerais, objetivando distinguir *Mycobacterium bovis* de outros membros do CMT. Uma abordagem em duas fases foi utilizada (a) amplificação do pseudogene *oxyR* para detectar CMT e, posteriormente, (b) sequenciamento alelo-específico baseado no polimorfismo na posição 285 do pseudogene em questão para distinguir *Mycobacterium bovis* de outros membros do CMT. O pseudogene *oxyR* foi amplificado com sucesso em 100 (56,5%) de 177 esfregaços disponíveis de 99 indivíduos. Nenhum perfil molecular de *M. bovis* foi encontrado. A análise multivariada indicou que os resultados de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR) e o laboratório fonte foram associados ($p \leq 0,05$) com a amplificação do pseudogene *oxyR*. Esfregaços BAAR ++ mostraram maior chance de amplificação do pseudogene *oxyR* que aqueles com BAAR 0, possivelmente devido à quantidade de DNA. Um dos dois laboratórios de origem apresentaram maior chance de amplificação do pseudogene *oxyR*, sugerindo que as diferenças na conservação de escarro entre os laboratórios poderiam ter influenciado o estado de preservação do DNA. Este estudo fornece evidências de que lâminas de baciloscopia de escarro coradas por ZN armazenadas podem ser utilizadas para detecção molecular do CMT, mas não forneceu evidências de *M. bovis* estar associado com tuberculose pulmonar humana em uma área urbana de Minas Gerais. **Artigo original 2:** Um estudo de corte transversal foi conduzido para determinar a importância relativa de *M. bovis* na tuberculose humana em Juiz de Fora, Minas Gerais. Foram investigados 1000 espécimes (603 suspeitos de tuberculose), os quais foram 9 inoculados em meios LJ e Stonebrink (SB). Um total de 356 espécimes tiveram cultura positiva para *Mycobacterium* spp. seja no meio LJ ou no SB e 178 casos de TB tiveram as micobactérias implicadas caracterizadas por métodos convencionais e / ou moleculares (genotipagem do gene *pncA*). Entre os 178, detectou-se um único caso de *M. bovis* por métodos convencionais, mas não pôde ser confirmado por métodos moleculares. Uma amostra da cultura da micobactéria não apresentou qualquer amplificação do gene *pncA* ou do pseudogene *oxyR*. Adicionalmente, tentou-se a extração do DNA presente em 38 biopsias de 38 suspeitos de TB extrapulmonar e a genotipagem do *oxyR* e 14 (36,8%) foram confirmados como TB. Dois deles foram reconhecidos como co-infecções de *M. bovis*. Os dados indicam que a importância relativa de *M. bovis* no conjunto da TB humana em Juiz

de Fora, Minas Gerais, Brasil foi baixa. Três co-infecções de *M. bovis*-*M. tuberculosis* (1,5%) foram evidenciadas dentre 191 pacientes que tiveram confirmadas infecções por *Mycobacterium* spp. (IC95% = 0 - 3,3%). *M. tuberculosis* foi detectado isoladamente em 184 (96,4%) dos 191 pacientes (IC95% = 93,6% - 98,9%), e evidência de *M. avium-intracellulare* isoladamente ou em co-infecção com *M. tuberculosis* foi encontrada em quatro (2,0%) dos 191 pacientes (IC95% = 0 - 4,1%). **Artigo original 3:** Foram avaliados possíveis fatores associados respectivamente a co-infecções de *M. bovis* (estudo 1) e evidências de *M. avium-intracellulare* de forma isolada ou como co-infecções (estudo 2) por meio de dois estudos de caso-controle aninhados em um corte transversal, no qual foram caracterizadas as micobactérias envolvidas em 191 pacientes. Foram selecionados em ambos os estudos 15 controles (TB por *M. tuberculosis*) por cada co-infecção de *M. bovis* ou evidência de *M. avium intracellulare*, respectivamente. Em ambos os estudos os controles foram pareados por faixa de idade (ponto de corte 38 anos) e sexo (estudo 1) e por faixa de idade (ponto de corte 38 anos), sexo e tipo de entrada no serviço (estudo 2). No estudo 1, co-infecções por *M. bovis* tiveram associação ($p \leq 0,05$) com uma “exposição zoonótica” (OR=16,85; IC 95% = 0,64-275,18) e com a forma clínica de TB (OR=16,00; IC 95%=1,21-209,94). No estudo 2, evidências de *M. avium-intracellulare*, agentes que afetam animais, ocasionalmente seres humanos imunocompetentes e frequentemente imunossuprimidos, apresentou uma associação ($p \leq 0,05$) com a infecção por HIV/AIDS (OR=13,36; IC 95%=1,26-140,93).