**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de
crescimento rápido de interesse em Saúde Pública**

Artemir Coelho de Brito

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre em
Saúde Pública**

**Área de Concentração: Serviços de
Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Glavur Rogério
Matté**

**São Paulo
2008**

Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em Saúde Pública

Artemir Coelho de Brito

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública

Área de Concentração: Serviços de Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Glavur Rogério Matté

São Paulo
2008

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente apenas para fins acadêmicos e científicos, desde que na sua reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo em colaboração com o Laboratório de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz com apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq

Dedicatória

Minha mãe Maria dos Remédios Rosa de Brito e meu pai Antônio Coelho de Brito por todo amor e dedicação em minha formação e pelo honra de tê-los como pais.

Agradecimentos

À Deus, que me guia e encoraja na busca dos meus sonhos.

Ao meu orientador Glavur Rogério Matté pela confiança em me orientar, pela orientação deste trabalho e na minha formação.

Maria Helena Matté pelo apoio e contribuições na realização deste trabalho e pelo convívio com sua energia científica que nos impulsiona.

A Milena pelo apoio técnico, Miriam pelas contribuições computacionais e busca dos artigos mais difíceis. Martha, RONALDA, LÍVIA, LÍCIA, CÍNTIA e Bete, Vanessa e Flávio pela amizade.

Maria Alice muito obrigado pela amizade e por me aceitar e confiar em meu trabalho desde o início do meu estágio no setor de micobactérias, fundamental para meu ingresso no mestrado e apoio na realização deste trabalho.

Érica Chimara, Lucilaine Ferrazolli, Vera Simonsen e Rosângela Siqueira pela amizade e pelos ensinamentos em biologia molecular de micobactérias e estarem sempre prontas a ajudar.

Doutora Suely Ueki por sua amizade e pelas contribuições na identificação e fenotípica, e pelo quanto aprendi com você sobre micobactérias.

Doutora Carmem Giampaglia por sua amizade e pelo apoio incondicional na elaboração da dissertação e por ensinar com tanta humildade como escrever e discutir resultados.

Doutora Conceição Martins (não encontro palavras que descreva sua importância em minha vida). Obrigado pelo apoio, amizade, confiança, ensinamentos e está ao meu lado com tantas contribuições para minha vida científica e pessoal.

Aos meus amigos do Instituto Adolfo Lutz; Fernanda Simeão, Jonas Yamauchi, Fábio Latrilha, Letícia, Monique, Andrey, Manu, Selma, Jéssica, Ana Luísa e Tatiane pelo apoio

Samanta e os demais amigos da seção de bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz que sempre estavam prontos pra tirar minhas dúvidas e ensinar as técnicas moleculares pela amizade.

À minha mãe Maria dos Remédios Rosa e ao meu irmão Didi por acreditarem nos meus objetivos mesmo quando pareciam impossíveis.

Ao meu pai Antônio Coelho e aos meus irmãos: Rosineide, Wilson, Francisco, Edilson, Edimar, Lusimar, Marcelino, Verônica, Cândido e José Antônio (in memorian) e meus sobrinhos Vanessa, Mariana, Samuel, Willis, Wilsa, Júnior, Nadja, Nailson, Stephane, Raul, Raiane, Natália, Douglas, Naiane, Naiara, Naísa e Cleiton.

Aos meus tios Pedro Sena e Maria Cardoso e a madrinha Raimunda por todo apoio e amizade que sempre me deram.

À minha avó Ana Rosa. À minha avó Raimunda e meu avô Cândido.

À Iraneide, lembrança sempre presente de alegria e saudades eternas.(In memorian)

A todos os meus professores que contribuíram em minha formação.

Ao meu amigo Marinaldo, pela amizade e por estar sempre ao meu lado e aos meus amigos da graduação em Ciências Biológicas na UFPI

Dra. Ângela Lopes com quem me apaixonei por fazer pesquisa e Dra. Maria José com quem me apaixonei por fazer pesquisa com microrganismos e Dra. Iranise Batista

A biblioteca da Faculdade de Saúde Pública e aos funcionários pelo excelente atendimento durante minhas buscas por artigos

Ao Coseas e a assistente social Rosângela pela concessão da vaga no CRUSP (Conjunto Residencial)

Ao CNPq pela bolsa

Aos meus amigos: Acácio Pagan, Adalberto, Alessandro Lima, Graciela Oliveira, João Celeste, Liliane Pires, Jony Arrais, Marcelo Matsudo, Patrícia Viana, Reginaldo Trindade e Rodrigo pela amizade e pelos dois fantásticos anos de vivência no CRUSP.

O acaso favorece apenas a mente preparada

Louis Pasteur

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	20
TAXONOMIA	22
CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS	23
DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS CAUSADAS POR MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS	26
LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA	27
Biossegurança	27
Bacteriologia	28
SURTOS E CASOS ESPORÁDICOS DE INFECÇÕES POR MICOBACTÉRIAS APÓS INTERVENÇÕES CIRÚRGICAS	31
FREQÜÊNCIA DE ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS	33
1.6.1 Micobactérias não tuberculosas em serviços de saúde pública no Brasil: situação nos últimos anos	35
1.7. JUSTIFICATIVA	37
2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	42
3.2 SELEÇÃO DE CEPAS	42
3.3 MANUTENÇÃO DAS CEPAS	43
3.4 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	44
3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	46
3.5.1 Técnica de PRA (Polimerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis) da região que codifica a proteína de choque térmico de 65KDa	46

3.5.2 Sequenciamento do fragmento do gene <i>rpoB</i>	48
4.0 RESULTADOS	50
4.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	51
4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PELO PRA <i>hsp65</i>	54
4.3 IDENTIFICAÇÃO PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>rpoB</i>	58
5.0 DISCUSSÃO	63
5.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	65
5.2 IDENTIFICAÇÃO PELO PRA <i>hsp65</i> E PELO SEQUENCIAMENTO DO <i>rpoB</i>	66
6.0 CONCLUSÕES	73
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8.0 ANEXO – PRIMEIRA PÁGINA DO CURRICULUM LATTLES	88

Lista de Figuras

- Figura 1** - Representação esquemática da parede bacteriana de; A. organismos Gram-positivos; B. organismos Gram-negativos; C. Micobactérias. 21
- Figura 2** - Perfis de PRA *hsp65* de 09 isolados e cepas controles ATTCs de *Mycobacterium chelonae*, *M. avium* e *M. tuberculosis* com as enzimas de restrição *BstEII* (esquerda) e *HaeIII* (direita) e marcador de 50pb. 54
- Figura 3** - Figura 3 – Perfis de PRA *hsp65* de 13 isolados com as enzimas de restrição *BstEII* (direita) e *HaeIII* (esquerda) e marcador de 50pb. 55
- Figura 4** - Perfis de PRA *hsp65* de 8 isolados com as enzimas de restrição *BstEII* (direita) e *HaeIII* (esquerda) e marcadores de 50pb. 55
- Figura 5** - Amplificação de um fragmento do gene *rpoB* de 752 pb para sequenciamento. M: marcador de 100pb 57
- Figura 6**- Árvore filogenética baseada no método neighbor-joining, utilizando as seqüências do gene *rpoB* (622 pb) da cepa tipo de cada espécie de *Mycobacterium*, bootstrap de 1000 simulações. As seqüências das cepas tipo das diferentes espécies são originárias do banco de dados GenBank as demais são oriundas de banco de dados do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP. 58

Lista de Tabelas

- Tabela 1 -** Caracterização dos 32 isolados selecionados para o estudo, a partir da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz. 52
- Tabela 2 -** Resultados das provas bioquímicas e dos testes de crescimento em meios com NaCl, Citrato de sódio, ácido pícrico e carboidratos, dos isolados dos complexos *M. chelonae*-*M. abscessus* e *M. fortuitum*-*M. peregrinum*. 53
- Tabela 3 -** Identificação dos 38 isolados incluídos no estudo, após digestão do fragmento de amplificação do gene *hsp65* pelas enzimas de restrição *Bst*EI e *Hae*III 56
- Tabela 4 -** Identificação pelo seqüenciamento de um fragmento do gene *rpoB* das cepas identificadas pelo método do PRA-*hsp65* com perfil compartilhado pelo *M. abscessus* 2, *M. bolletii* 1 e *M. massiliense* 1 60
- Tabela 5 -** Identificação final dos isolados em estudo concluída com os resultados das provas fenotípicas, PRA *hsp65* e *rpoB* 61

Lista de Quadros

Quadro 1 - Testes fenotípicos indicados para identificação das principais micobactérias de crescimento rápido de interesse em saúde pública. 45

Quadro 2 - Perfis de restrição e peso molecular dos fragmentos do gene *hsp65*, que codificam a proteína “heat shock” de 65KDa, nas diferentes espécies que foram identificadas entre os isolados submetidos à identificação molecular. 48

Lista de Abreviaturas

ATP - trifosfato de adenosina

CIP - Coleção de Culturas do Instituto Pasteur

CCA - Complexo *Mycobacterium chelonae* – *Mycobacterium abscessus*

CRA - Micobactéria de crescimento rápido acromógena

7H10 - Meio sólido de cultura para micobactérias

ATCC - “American Type Culture Collection”

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - deoxinucleotídeos trifosfato

hsp65 - heat shock protein 65 kDa (gene)

LJ - Löwenstein Jensen

CCA - Complexo *Mycobacterium chelonae* – *Mycobacterium abscessus*

MAC - Complexo *Mycobacterium avium*

Mg - miligrama

mL - mililitro

mM - milimolar

MNTs - Micobactérias não tuberculosas

MS - Ministério da Saúde

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - Pares de bases

PCR - Reação em cadeia pela DNA polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

pmoles - picomoles

PRA - reação em cadeia pela *Taq* DNA polimerase seguida de clivagem com endonucleases e análise dos fragmentos de restrição

PRA - *hsp65* PRA do gene *hsp65*

RNA - ácido ribonucleico

MCR - micobactérias de crescimento rápido

rRNA - RNA ribossomal

rpoB - gene que codifica a β -subunidade da RNA polimerase

μg - micrograma

μL - microlitro

Taq - *Thermus aquaticus*

Resumo

Os complexos *Mycobacterium chelonae* – *M. abscessus* e *Mycobacterium fortuitum* - *M. peregrinum* são compostos por espécies bacterianas de crescimento rápido e potencialmente patogênicas. Sua distribuição é ubíqua no ambiente, são resistentes a cloração da água e a sua replicação ocorre mesmo em condições de escassez de nutrientes. Estão envolvidos em casos de infecção pulmonar e extrapulmonar, e causam infecções em pacientes imunocomprometidos ou submetidos a procedimentos cirúrgicos invasivos. Os objetivos do presente trabalho foram: confirmar através de testes fenotípicos e com as técnicas de PRA *hsp65* e sequenciamento do fragmento do *rpoB*, a identificação de micobactérias de crescimento rápido, incluídas nos complexos *M. chelonae-M. abscessus* e *M. fortuitum-M. peregrinum*. Foram incluídos no estudo os isolados provenientes de pacientes com dois ou mais isolamentos provenientes de sítio não estéril ou um isolamento de sítio estéril. O estudo de 38 isolados demonstrou que as provas fenotípicas disponíveis atualmente não permitem a identificação de todas as espécies de micobactérias de crescimento rápido já descritas na literatura. O PRA *hsp65* possibilitou a identificação rápida e precisa de 63% das espécies de micobactérias e demonstrou um perfil compartilhado pelas espécies *M. abscessus* 2; *M. bolletii* 1 e *M. massiliense* 1. O sequenciamento do gene *rpoB* confirmou a identificação das espécies citadas. Nossos resultados demonstraram que o PRA-*hsp65* e o sequenciamento do gene *rpoB* são ferramentas úteis para fornecer a identificação das espécies de micobactérias com mais acurácia. O uso dessas técnicas poderiam ser consideradas em laboratórios de referência para identificar Micobactérias de crescimento rápido uma vez que elas são patógenos emergentes implicados em surtos e isolados de pacientes em centros de referência para tratamento de tuberculose multirresistente.

Abstract

Mycobacterium chelonae-*M. abscessus* and *Mycobacterium fortuitum*-*M. peregrinum* complexes are composed by bacterial species characterized by rapid grow and considered as potential pathogens. These microorganisms are ubiquitous in the environment, resistant to water treatment such as standard chlorination and are able to replicate even at poor nutrient conditions. They are related to lung and extra-lung infections in immune-compromised patients or those submitted to invasive surgical procedures. The aim of this study was to confirm the identification of *Mycobacterium chelonae* - *M. abscessus* and *Mycobacterium fortuitum* - *M. peregrinum* complexes, isolated from biological samples considering one or two repetitions if samples are originated from sterile or non-sterile site respectively. Phenotypic tests and molecular methods, PRA-*hsp65* and *rpoB* gene sequencing, were applied to identify 38 strains previously isolated. Results demonstrated that available phenotypic tests did not allow the identification of all described fast growing *Mycobacterium*. The PRA of *hsp65* gene confirmed the identification of 63% of the *Mycobacterium* studied, and demonstrated the band pattern shared by *M. abscessus* 2, *M. bolletii* and *M. massiliensis*. The *rpoB* gene sequencing confirmed the identification of the species cited. Our results demonstrated that PRA-*hsp65* and *rpoB* gene sequencing are useful tools to provide a more accurate species identification of mycobacteria. The use of such techniques would be considered in reference laboratories to identify fast growing *Mycobacterium* species since they are considered emerging pathogens implicated in outbreaks and isolated from a patient in reference centers for treatment of multidrug resistant tuberculosis.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único da família *Micobacteriaceae* e estão dentro do domínio *Archea*, filo *Actinobacteria*, Classe *Actinobacteria*, subclasse, *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae* (BRENNER et al., 2005)

Esses microrganismos apresentam forma bacilar, retos ou ligeiramente curvos, medem de 0,2 a 0,6µm de largura e 1 a 10µm de comprimento, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e não possuem esporos ou cápsulas (HOLT et al. 1994).

As micobactérias possuem uma parede celular de estrutura própria composta de quatro camadas que apresenta uma organização diferente de outros procariotos (Figura 1). O peptidoglicano é a camada mais interna da parede e confere-lhe rigidez, composto por ácido N-glicolilmurâmico em vez de ácido N-acetilmurâmico, encontrado na maioria de outras bactérias. A camada seguinte é o arabinogalactano que se liga ao peptidoglicano através de ligações fosfodiéster. Ligados covalentemente ao arabinogalactano estão os ácidos micólicos que representam cerca de 60% da parede celular micobacteriana, esses constituem-se de lipídios que consistem basicamente de ácidos graxos de cadeia longa incomuns, com 60 a 90 átomos de carbono. A camada mais externa é composta de diferentes lipídeos, incluindo os glicolipídios, sulfolipídios, os fenolglicolipídios, os peptidioglicolipídios e os lipoarabinomanano (Figura 1). A complexidade da parede micobacteriana em particular a riqueza de lipídios complexos explica as propriedades da resistência das micobactérias aos agentes físicos e químicos (RASTOGI, 2001).

Estes ácidos micólicos formam uma cobertura que permite a micobactéria ser resistente à dessecação, podendo sobreviver por períodos prolongados em condições extremas. Essa proteção é importante na resistência a antibióticos, pois a grande maioria é incapaz de penetrar a parede celular (PRIMM et al. 2004).

Figura 1: Representação esquemática da parede bacteriana de; A. organismos Gram-positivos; B. organismos Gram-negativos; C. Micobactérias.

Fonte: (URL: <http://www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html>)

1.1 TAXONOMIA

A definição desse gênero baseia-se em três critérios importantes: porcentagem de citosina e guanina do DNA compreendida entre 31 a 71%, síntese de ácidos micólicos e resistência à descoloração por álcool-ácido (princípio da técnica de Ziehl-Neelsen). As micobactérias são consideradas Gram-positivas, porém não se coram bem por este método (LEVY-FRÉBAUT e PORTAELS, 1992).

O tempo de multiplicação é, geralmente lento, com grande variação dentro do gênero, o que permite dividir as espécies quanto ao tempo de crescimento em: rápido – tempo de geração de 3 a 4 horas (crescimento visível em menos de sete dias) e lento – tempo de geração acima de 16 horas (crescimento visível em mais de sete dias). A temperatura de crescimento das espécies micobacterianas varia de 25°C a 45°C. As colônias possuem aspecto liso ou rugoso e algumas, na presença ou ausência da luz, apresentam pigmentos carotenóides usualmente de cor alaranjada ou amarela (WAYNE e KUBICA, 1986).

Runyon em 1959, classificou com base no tempo de crescimento “in vitro” e na produção de pigmentos carotenóides as micobactérias em a) três grupos de crescimento lento: Grupo I – fotocromógenas (produzem o pigmento somente na presença de luz, Grupo II – escotocromógenas (produzem pigmento também na ausência de luz) e Grupo III – acromógenas (não produzem pigmento); b) um grupo de crescimento rápido: Grupo IV – pigmentadas ou não.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

O gênero *Mycobacterium* atualmente está constituído por 130 espécies e 11 subespécies, descritas na lista de espécies bacterianas com nomes aprovados (EUZÉBY, 2008).

Algumas dessas espécies, isoladas frequentemente de materiais biológicos humanos, foram classificadas de acordo com o seu grau de patogenicidade em: estritamente patogênicas, patogênicas, potencialmente patogênicas, patógenos raros ou saprófitas (TSUKAMURA, 1984). Outras espécies, com descrição recente na literatura, ainda não foram incluídas nessa classificação.

As espécies estritamente patogênicas incluem as do complexo *M. tuberculosis* que causam tuberculose humana e/ou animal e *M. leprae* que causa a hanseníase.

As espécies classificadas como potencialmente patogênicas ou patógenos raros, atualmente designadas micobactérias não tuberculosas (MNTs), incluem diversas espécies que podem causar infecções pulmonares, ganglionares, cutâneas e infecções disseminadas em humanos imunocomprometidos.

De acordo com DAVID et al. 1989, entre as micobactérias estritamente patogênicas estão o *Mycobacterium leprae* e o complexo *M. tuberculosis* com as espécies *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. tuberculosis*. As micobactérias *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. peregrinum* estão classificadas como potencialmente patogênicas.

Um número crescente de casos e surtos de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido têm sido relatados em publicações nacionais e internacionais. Os agentes mais prevalentes pertencem aos complexos *Mycobacterium chelonae-abscessus* e *Mycobacterium fortuitum-peregrinum* (WALLACE, 1983).

Estas espécies são ubíquas no ambiente, podem ser resistentes ao processo de cloração utilizado para tratamento de água de piscinas ou para consumo humano, podem ser resistentes ao glutaraldeído e a sua replicação ocorre mesmo em condições de escassez de nutrientes. Essas características, quando somadas a procedimentos inadequados de desinfecção e esterilização, e procedimentos invasivos, médicos ou não, criam um cenário favorável à ocorrência de infecções (LE DANTEC et al., 2002).

A natureza da doença causada por esses organismos não pode ser bem definido até o momento em parte devido à falta de nomenclatura uniforme. A designação *M. chelonae* foi definida em 1972, contribuindo para facilitar a compreensão dessas infecções por *M.chelonae*. Anteriormente essa espécie micobacteriana era classificada como *M. friedmanni*, *M. salmoniphilum*, *M. abscessus*, *M. runyonii* e *M. brostelense* (KUBICA et al., 1972).

Em 1992, foi proposto que *M. peregrinum* e *M. abscessus* fossem nomeadas novas espécies por possuírem características fenotípicas e genotípicas que as diferenciavam de *M. fortuitum* e *M. chelonae*. (KUSONOKI e EZAKI, 1992).

Na nomenclatura bacteriana atual além de *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* constam outras espécies e subespécies. Pelo método do PRA *hsp-65* é possível identificar o *M. abscessus* subespécie *M. abscessus* tipo 1 e *M.*

abscessus tipo 2 (CHIMARA et al., 2008). O *M. abscessus* tipo 2 apresenta por este método os mesmos perfis de fragmentos de DNA que as espécies *M. bolletii* e *M. massiliense*, sua correta diferenciação é feita com o seqüenciamento de um fragmento do gene *rpoB* (ADEKAMBI, 2003; ADEKAMBI e DRANCOURT, 2004; ADEKAMBI, 2004; ADEKAMBI, 2006).

M. chelonae, *M. abscessus* e *M. fortuitum* são resistentes à maioria das drogas antimicobacterianas (FALKINHAM, 1996). *M. chelonae* é envolvido em diferentes tipos de infecções adquiridas na comunidade e, inicialmente, isolado de tartarugas marinhas 103 anos atrás e obtido ocasionalmente de fonte humana em 1904. Na época, esses microrganismos foram considerados como comensais em humanos (TIMOTHY e BROWN, 1985). Porém a literatura médica contemporânea indica que esses organismos podem ser patógenos humanos com importância particular em infecções hospitalares.

Ao contrário de *M. abscessus* e *M. fortuitum*, *M. chelonae* é raramente uma causa de doença pulmonar crônica. *M. chelonae* causa três tipos básicos de doenças cutâneas, sendo mais comum doença cutânea disseminada, que ocorre quando as pessoas estão imunodeprimidas. Infecções localizadas adquiridas, na comunidade, após trauma representam o segundo tipo de infecção por *M. chelonae*. Essas infecções estendem-se para celulites localizadas ou abscesso de osteomielite. O terceiro tipo de infecção, menos comum, causado por *M. chelonae* está relacionado a contaminações por cateter (GRIFFITH et al., 1993).

A conclusão de uma identificação correta de uma MNT relacionada a uma doença infecciosa, compreensão da etiologia e da dinâmica de transmissão é de fundamental importância em Saúde Pública. Possibilita o conhecimento da real

caracterização e confirmação dos casos e melhoria do diagnóstico para adequação do tratamento e direcionamento mais preciso das medidas de controle da doença.

1.3 DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS CAUSADAS POR MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS –MICOBACTERIOSES

Os critérios para o diagnóstico e tratamento de doença causada por micobactérias não tuberculosas foram definidos internacionalmente pelo American Thoracic Society-ATS (1997). Esses critérios têm sido observados no Brasil, conforme citações em estudos realizados em centros de atendimento de pacientes com infecções causadas por micobactérias. No Brasil, não existe uma norma oficial sobre os critérios para o diagnóstico das doenças causadas por micobactérias não tuberculosas. No estado de São Paulo, a Divisão de Tuberculose da Secretaria de Estado da Saúde disponibiliza em sua página eletrônica www.cve.saude.sp.gov.br, as recomendações para o diagnóstico das micobacterioses, que deve ser fundamentado nos critérios bacteriológicos e radiológicos específicos para cada agravo (Secretaria Estadual de Saúde, 2005; MATOS et al., 2004; UEKI et al., 2005).

Embora exista variação entre os critérios bacteriológicos para o diagnóstico das infecções causadas pelas MNT é consenso a importância do isolamento repetido do mesmo agente a partir de espécimes biológicos não estéreis, pois nesses casos podem significar colonização transitória do sítio envolvido ou uma contaminação da amostra clínica. O isolamento único, de uma espécie potencialmente patogênica, a partir de espécimes de sítios supostamente estéreis é fortemente sugestivo de infecção (Secretaria Estadual de Saúde 2005; UEKI et al., 2005).

A identificação específica das espécies de MNTs e a correlação clínico laboratorial é importante para o diagnóstico e a determinação da conduta terapêutica (SENNA et al., 2006).

Na maioria dos países, a distribuição e a incidência da doença causada pelas MNTs não foi completamente pesquisada, como também a ocorrência das espécies, que é variável de região para região (KATOCH, 2004).

1.4 LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA

1.4.1 Biossegurança

Laboratórios de bacteriologia são classificados de acordo com o tipo de serviço realizado em quatro níveis de biossegurança: O nível 1 é adequado ao trabalho que envolva agentes bem caracterizados e conhecidos por não provocarem doença em seres humanos e que possuam mínimo risco ao pessoal do laboratório e ao meio ambiente. O nível 2 é adequado ao trabalho que envolva agentes de risco moderado para as pessoas e o meio ambiente. O nível 3 é aplicável para laboratórios clínicos, de diagnóstico, ensino e pesquisa ou de produção onde o trabalho com agentes patogênicos possa causar doenças graves ou potencialmente fatais, a homens e animais, podendo propagar-se de uma pessoa infectada a outra. Neste nível trabalha-se com microrganismos que apresentam potencial transmissão por via respiratória, por aerossóis, mas são causadores de doenças para as quais existem medidas eficientes de profilaxia e tratamento. O nível 4 é indicado para o trabalho que envolve agentes exóticos e perigosos que exponham o indivíduo a um alto risco de

contaminação a infecções que podem ser fatais. Apresentam um potencial elevado de transmissão por aerossóis e são causadores de doenças para as quais não existem medidas profiláticas e de tratamento eficientes. Aerossóis são produzidos por manipulação de material patológico ou culturas: abertura de tubos, preparo de escarro, transferência de cultura usando alça ou pipeta, durante centrifugação ou lavagem de tubos ou frascos, e quando frascos são quebrados acidentalmente. As micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, estritamente patogênicas, são obrigatoriamente manipuladas em laboratório de nível 3 enquanto as micobactérias de crescimento rápido podem ser manipuladas em laboratórios de nível 2 (Ministério da Saúde, 2005).

1.4.2 Bacteriologia

Na execução do exame bacteriológico são importantes tanto a qualidade quanto o transporte e conservação adequados do espécime, bem como a utilização de técnicas laboratoriais precisas.

Diversos espécimes biológicos podem ser analisados para a detecção de *M. tuberculosis* e das MNTs. Estes são divididos em a) não estéreis (devido a presença da flora bacteriana): escarro, lavado brônquico, lavado gástrico, secreções em geral, fezes, urina, biópsias de pele etc. b) estéreis: sangue, líquidos: pleural, ascítico, cefalorraquidiano e sinovial, gânglio, secreção de gânglio, biópsia de tecido interno etc.

Baciloscopia - fundamenta-se na propriedade conhecida como álcool ácido resistência. Este exame é apenas presuntivo, pois permite a visualização de bacilos

álcool resistentes (BAAR) presentes no espécime em quantidade igual ou superior a 10^4 bacilos/ml, mas não a sua identificação (Ministério da Saúde, 2005a).

Para a realização deste exame são efetuados esfregaços dos espécimes (direto ou após centrifugação) em lâminas, que após secos e fixados são corados pelos métodos de Ziehl-Neelsen e a leitura é realizada em microscópio ótico comum utilizando objetiva de imersão (Ministério da Saúde, 2005a).

A baciloscopia é considerada o exame básico para análise do escarro, por ser um método simples, de fácil implantação e de baixo custo. No caso de outros espécimes deve-se ter cautela ao avaliar resultados de baciloscopia pois micobactérias saprófitas podem estar presentes transitoriamente.

Cultura de micobactérias. A cultura é um método mais sensível que a baciloscopia pois detecta em torno de 10 bacilos/ml possibilitando, além de um aumento da cobertura diagnóstica dos casos paucibacilares, a identificação das espécies e/ou realização dos testes de sensibilidade das micobactérias às drogas (Ministério da Saúde, 2005c).

A cultura de materiais estéreis (exceto biópsia) é efetuada pela semeadura direta no meio de cultura. Para semeadura de sangue são indicados meios líquidos que possibilitam o uso de anticoagulantes e a semeadura direta do material (Secretaria Estadual de Saúde, 2008a).

Os materiais não estéreis, antes da semeadura em meios de cultura, são tratados com agentes químicos para digestão e eliminação da flora bacteriana acompanhante. As biópsias (estéreis ou não), antes da descontaminação e/ou semeadura devem ser colocadas em gral, com solução fisiológica ou água destilada estéril e trituradas com pistilo (Secretaria Estadual de Saúde, 2005b).

Devido a sua importância para o diagnóstico das doenças causadas por micobactérias, no estado de São Paulo, a realização da cultura foi descentralizada o que aumentou a disponibilidade do exame nos serviços de Saúde Pública.

A identificação adequada das espécies, além da observação das características morfológicas, são necessários testes complementares baseados nas características bioquímicas, fisiológicas e genéticas (MARTINS, 2000).

Os esquemas de identificação consistem de determinação das características da cepa testada e comparação destas características com as determinadas por estudos taxonômicos para cada espécie. Os testes fenotípicos são realizados com as células intactas e as condições de realização são críticas para que os resultados sejam confiáveis e reprodutíveis, pois os mesmos variam de acordo com a concentração do substrato, tempo de reação, composição do tampão, comprimento de onda selecionado para detectar os produtos, reagentes colorimétricos e qualidade da cultura analisada. Estes testes estão consolidados e incorporados na identificação de micobactérias e como são amplamente utilizados é fácil a detecção e posterior correção de falhas. Apresentam a desvantagem de depender do crescimento das micobactérias (crescimento rápido ou lento) para sua realização, sendo necessárias de 3 a 8 semanas para obtenção do resultado (MARTINS, 2000).

Outro problema citado por alguns autores, para o esclarecimento bacteriológico das micobacterioses é a presença de culturas mistas após o isolamento a partir de um único material biológico. Os testes para identificação das micobactérias são realizados a partir de toda a massa bacilar presente na cultura, pois o isolamento em placa para a obtenção de cultura pura, no caso das micobactérias, é um processo demorado que retarda a liberação dos resultados. Os resultados de provas

bioquímicas inconclusivas podem ocorrer quando a cultura contém duas ou mais espécies de micobactérias e nesse caso, deve ser feita a investigação de culturas mistas (BLANCO et al., 2002; INUMARU et al., 2005; UEKI et al., 2005).

SURTOS E CASOS ESPORÁDICOS DE INFECÇÕES POR MICOBACTÉRIAS APÓS INTERVENÇÕES CIRÚRGICAS.

Um surto foi descrito na China em 2002 com a ocorrência de 86 isolamentos de *M. chelonae* subsp. *abscessus* relacionados a injeções intramusculares de penicilina. O mesmo microrganismo foi isolado e identificado de amostras das lesões do exterior dos frascos de penicilina e de material colhido no piso do local de estocagem (ZHIBANG et al., 2002).

No Brasil foi relatado um surto de 11 casos de *M. chelonae* depois de cirurgias para correção de miopia. Amostras dos sistemas de refrigeração de ar e água e do utensílio portátil a vapor, usados para desinfecção dos instrumentos cirúrgicos mostraram presença de *M. chelonae* (FREITAS et al., 2003).

No período de março de 2002 a fevereiro de 2003, em New Jersey, foram descritos três casos de infecção de sítios cirúrgicos em pacientes submetidos a cirurgias por um mesmo médico, em duas instituições distintas. O tempo para aparecimento das lesões foi de 18 a 34 dias. Não havia outros casos de infecções por micobactérias nas duas instituições e o cirurgião implicado no surto era o único a utilizar solução de azul de metileno para marcação das incisões e estruturas internas durante a cirurgia. Foi isolado *M. chelonae* de amostras coletadas dos três pacientes e de soluções de azul de metileno encontradas nas instituições onde os pacientes foram

operados. A tipagem molecular das amostras mostrou que todos os isolados tinham a mesma origem clonal (KNACKMUHS et al., 2004).

Em Santo Domingo, República Dominicana foi descrito em 2003 um surto hospitalar em 12 pacientes, *M. abscessus* foi isolado em todos os casos e a análise de sete isolados por RAPD e PFGE confirmou que os mesmos tinham a mesma origem clonal (CDC, 2004).

Um surto foi descrito na cidade de Edmonton no Canadá, onde ocorreram 85 casos de lesões cutâneas em pés e mãos. Os pacientes eram em sua maioria crianças que faziam atividade de recreação em uma piscina pública. As áreas que apresentavam mais lesões eram aquelas sujeitas a maior trauma mecânico. O período de incubação variou de 15 a 119 dias e os casos foram diagnosticados no período de janeiro a julho de 2003. *M. abscessus* foi isolado das lesões de 16 pacientes e da água da piscina utilizada pelos pacientes (DYTOC et al., 2005).

Um surto de abscessos cutâneos por *Mycobacterium chelonae* foi relatado em Lima no Peru entre dezembro de 2004 e janeiro de 2005, 35 pessoas que haviam passado por sessões de mesoterapia apresentaram esses abscessos cutâneos. Treze (37%) pessoas concordaram em realizar exames clínicos. Foram realizadas biópsias de pele de treze pessoas e examinadas as injetadas durante a mesoterapia, *Mycobacterium chelonae* foi isolado de quatro pacientes e de um frasco de procaína (MUNAYCO et al, 2008)

No Brasil, NIERO et al., (2008), realizaram investigação de um surto ocorrido na cidade de Belém do Pará envolvendo 311 pacientes, de fevereiro de 2004 a junho de 2005. Foram incluídos no estudo 58 pacientes que realizaram cirurgia laparoscópica, um paciente com abscesso após injeção e oito pacientes que se

submeteram a mesoterapia. Os microrganismos isolados tiveram crescimento rápido e não eram pigmentadas. Após amplificação do gene *hsp65* e digestão por enzimas de restrição, as cepas apresentaram perfis de banda com a enzima *BstEII* de 235 – 210 e padrões na enzima *HaeIII* de 200 – 70 – 60 – 50 que são comuns ao *Mycobacterium abscessus* 2, *M. massiliense* e *M. bolletii*. Após análise por seqüenciamento de um fragmento de 752 pb do gene *rpoB*, os isolados dos pacientes submetidos a cirurgia e dos isolados de abscessos após injeção foram identificados como *M. massiliense* enquanto os isolados dos pacientes submetidos a mesoterapia foram identificados como *M. bolletii*.

1.6 FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Nos países desenvolvidos, com o tratamento efetivo para TB na década de 1950, os espécimes biológicos começaram a ser cultivados rotineiramente para confirmação do diagnóstico. Muitos casos, com características clínicas de tuberculose, após o isolamento das micobactérias foram confirmados como outras micobacterioses. Nesses países a prevalência de TB tem declinado e a proporção de doenças causadas por MNTs tem aumentado nos países em desenvolvimento são raras as publicações sobre doenças causadas por MNT. Devido ao grande número de casos de tuberculose e a impossibilidade da realização da cultura de todos os espécimes muitos casos de tuberculose não são confirmados bacteriologicamente. Como a doença causada por MNTs não é de notificação compulsória, usualmente sua

prevalência é estimada pela frequência de culturas de MNTs em laboratórios de microbiologia.

O aparente aumento das doenças causadas por MNTs pode ser explicado pelo aumento da consciência da existência das mesmas e do aumento de espécimes encaminhados para a cultura e identificação das espécies (STEPHEN et al., 2006).

A nomenclatura de MNTs foi várias vezes modificada, causando dificuldades à definição de diagnósticos. A espécie *M. abscessus* patógeno frequentemente encontrado em infecções pulmonares teve sua nomenclatura modificada várias vezes nos últimos 20 anos. Inicialmente designada como *M. chelonii* (subspecies *abscessus*) passou a *M. chelonae* (subspecies *abscessus* até que em 1992 recebeu a designação *M. abscessus*. No entanto, muitos laboratórios ainda relatam seus isolamentos como complexo *M. chelonae* ou *M. chelonae/abscessus* (DALEY e GRIFFITH., 2002)

Na década de 1980 a prevalência de doença causada por MNTs foi estimada nos Estados Unidos como sendo de 1,8 casos por 100.000 habitantes. Entre as MNTs usualmente isoladas de secreções respiratórias, 61% eram MAC; 24%, *M. kansasii*; aproximadamente 5% *Mycobacterium fortuitum* e 15%, outras MNTs. Durante a década de 1990, uma análise do CDC apresentou um aumento dramático no isolamento de MNTs. Embora a verdadeira razão não esteja clara, acredita-se que a melhora do reconhecimento clínico e das técnicas de diagnóstico sejam em parte responsáveis pelo aumento (MARTINEZ et al., 2007).

Infecções pulmonares causadas por MNTs têm sido reconhecidas como causa do aumento de morbidade e mortalidade. As manifestações clínicas e radiográficas da infecção são variáveis e podem causar dificuldades ao estabelecimento de um diagnóstico correto. Muitos casos causados por MAC, *M. kansasii*, *M. abscessus* e

M. malmoense podem manifestar-se como infecção clássica cavitária , similar a tuberculose pós-primária.

O diagnóstico pode ser difícil e demorado, mas, a consideração da possibilidade de doença causada por MNTs é o primeiro passo para o diagnóstico correto e instituição do tratamento adequado (MARTINEZ et al., 2007).

Mycobacterium abscessus está entre os principais agentes etiológicos de doença pulmonar causada por MNTs de crescimento rápido, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. (PARK et al., 2007; MARTINEZ et al., 2007; STEPHEN et al., 2006).

1.6.1 Micobactérias não tuberculosas em serviços de saúde pública no Brasil: situação nos últimos anos

O Centro de Referência Nacional de micobactérias Professor Hélio Fraga, no estado do Rio de Janeiro, nos anos 1994-1999 observou o isolamento preponderante do complexo *M. avium intracellulare* (MAC) sobre as demais espécies (44,4%), seguidos de *M. kansasii* e *M. fortuitum*. As regiões sul e sudeste contribuíram com 57,6% dos casos de pacientes com suspeita de micobacteriose. Dentre os 431 pacientes estudados, 106 foram considerados casos de micobacteriose, e a forma mais freqüente foi a pulmonar (BARRETO e CAMPOS., 2000).

MATOS et al., (2004), em estudo realizado na Bahia com pacientes em tratamento para tuberculose multirresistente no período de 1998-2003, isolaram micobactérias não tuberculosas em materiais biológicos de 19 (8,2%) dos 231

pacientes estudados. Foram identificados os complexos *M. chelonae/M. abscessus* (58%), *M. avium/intracelulare* (16%) e *M. fortuitum* (11%).

No Estado de São Paulo, os exames básicos para o diagnóstico da tuberculose foram descentralizados para os laboratórios locais, regionais e de hospitais, ficando os exames mais complexos a cargo do Setor de micobactérias. Em estudo sobre diversidade das espécies de MNTs no estado de São Paulo, nos anos de 1991-1997, UEKI et al. 2005 observaram que as espécies mais isoladas foram MAC 64,2% e *M. kansasii* 12,2%. A porcentagem de isolamento das espécies de crescimento rápido foi de 3,9% para *M. fortuitum* e 1,7% para *M. chelonae*. Considerando as duas espécies mais frequentes, o *M. kansasii* foi mais isolado de sítio pulmonar (83%) e o MAC, de doença disseminada (44,2%). O isolamento das duas espécies de crescimento rápido foi mais frequente em amostras de origem pulmonar.

No período de 1998 a 2006, 33.815 culturas isoladas em diversos laboratórios do estado de São Paulo foram analisadas no Setor de micobactérias do Instituto Adolfo Lutz-Central. Dessas, 5263 (16%) foram identificadas como micobactérias não tuberculosas. As espécies isoladas com mais frequência, no período de 1997 a 2003, foram complexo *M. avium* 33%, *M. kansasii* 18%, *M. gordonae* 12%, *M. fortuitum* 7% e *M. chelonae* (4%) e no período de 2004 a 2006 foram: *M. kansasii* (20%), *M. avium* 17%, *M. gordonae* (12%), *M. abscessus* (10%) e *M. fortuitum* (8%).(comunicação pessoal*).

1.7 JUSTIFICATIVA

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) estão distribuídas no ambiente e tem aumentado, nos últimos anos, o envolvimento desses microrganismos em casos de surtos e infecções hospitalares, geralmente envolvendo pacientes imunodeprimidos ou que façam uso de cateteres, próteses e válvulas cardíacas ou façam uso de drogas imunossupressoras.

Existem poucos estudos sobre MNTs descritos na literatura com destaque para o complexo *Mycobacterium chelonae* – *Mycobacterium abscessus* CCA. Estas espécies apresentam um alto grau de resistência aos antimicrobianos disponíveis, com isso, faz se necessário a realização de estudos de identificação molecular a fim de complementar os resultados bioquímicos para uma correta identificação destes organismos e de estudos de tipagem molecular para se estabelecer as relações de similaridade entre essas espécies, contribuindo para o esclarecimento das infecções e surtos que constituem um grave problema de interesse em saúde pública (CHIMARA et al., 2008).

* TELLES MAS Comunicação pessoal. Setor de Micobactérias. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo. Brasil.

Após o isolamento, a identificação do patógeno baseia-se em técnicas fenotípicas e moleculares. Os testes fenotípicos são amplamente utilizadas nos laboratórios de Saúde Pública para identificação das micobactérias mas nem sempre possibilitam a definição precisa da espécie devido as suas limitações já citadas anteriormente.

Várias investigações com a reação da polimerase em cadeia (PCR) têm avaliado o gene *hsp65*, presente em todas as micobactérias, para melhor definição taxonômica. A sequência do *hsp65* é altamente conservada nessas espécies e pode ser usada para estudos taxonômicos (TELENTI et al., 1993).

Diante do risco potencial para a saúde pública, são de grande relevância estudos com micobactérias de crescimento rápido dos complexos *Mycobacterium chelonae* – *M. abscessus* com o propósito de ampliar os conhecimentos sobre estes patógenos, assim como as outras micobactérias de crescimento rápido que se caracterizam como patógenos emergentes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

1) Avaliar a contribuição dos métodos de caracterização fenotípica e molecular para identificação das espécies do complexo *Mycobacterium chelonae* - *Mycobacterium abscessus*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Confirmar através de testes fenotípicos a identificação de micobactérias de crescimento rápido, incluídas nos complexos *M. chelonae-M.abscessus* e *M. fortuitum-M.peregrinum*, isoladas a partir do material biológico de pacientes que possuam dois ou mais isolamentos provenientes de sítio não estéril ou um isolamento de sítio estéril.
- 2) Avaliar os resultados da identificação fenotípica através de métodos moleculares (PRA *hsp65* e seqüenciamento do fragmento do *rpoB*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E METODOS

O estudo foi realizado com cepas da coleção de culturas do Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório de referência em micobactérias para o Estado de São Paulo.

3.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para inclusão das cepas no estudo foram considerados dois critérios: 1) Cepas identificadas por métodos fenotípicos como sendo do complexo *M. chelonae-M. abscessus* ou *M. fortuitum-M. peregrinum*. 2) Que atendessem aos critérios da American Thoracic Society – ATS, que recomenda o isolamento repetido do mesmo agente em pelo menos dois espécimes biológicos provenientes de sítios não estéreis ou obtenção de um cultivo puro de espécime biológico proveniente de sítios estéreis para a confirmação bacteriológica de um caso de micobacteriose (Griffith et al., 2007).

3.2. SELEÇÃO DE CEPAS

Após análise retrospectiva do banco de dados do Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, o período de 1993 a 2005 foi escolhido por ser anterior à implantação nessa instituição, de técnicas moleculares para identificação de micobactérias. Foram incluídos no estudo 32 isolados de dezesseis pacientes, cultivados a partir de escarro (20), secreção oftalmológica (4), lavado brônquico (3),

biópsia de gânglio (2), líquido cefalorraquidiano (1), líquido pleural (1), sem identificação (1). Alguns isolados de pacientes inclusos no estudo foram recuperados em anos não pertencentes ao período escolhido, a fim de completar o número de isolados necessários à confirmação bacteriológica de um caso.

3.3. MANUTENÇÃO DAS CEPAS

As cepas utilizadas neste estudo foram mantidas pela técnica de congelamento em microtubos de 2 ml com miçangas. Uma porção do crescimento bacteriano foi suspensa, com auxílio de uma alça bacteriológica, em microtubo criogênico contendo 15 miçangas de vidro e 1 ml de meio Sauton com 10% de glicerol. Após o envolvimento das miçangas com a suspensão bacteriana, permitindo a aderência das células ao vidro, o excesso foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e os tubos foram congelados a -70°C (KIRSOP e DOYLE, 1991).

Um microtubo criogênico de cada um dos isolados foi removido de um freezer a -70°C , uma miçanga de vidro de cada cepa foi transferida para um tubo de meio de Löwenstein-Jensen (LJ). Após crescimento foram repicadas em placas com meio Middlebrook 7H11 para observação de colônias com diferentes morfologias. Os diferentes tipos morfológicos foram subcultivados em tubos de LJ.

3.4. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Para caracterização dos isolados, foram avaliados o crescimento em diferentes temperaturas (30 e 37°C), a produção de pigmento e análise do crescimento em diferentes substratos utilizados na rotina do Instituto Adolfo Lutz para identificação de micobactérias de crescimento rápido (KUBICA et al., 1972).

Foram selecionadas as provas bioquímicas: Redução do Nitrato, β -glicosidase, tolerância ao NaCl a 5%, utilização do citrato de sódio como fonte de carbono, ácido pícrico, hidrólise do Tween 80 e fermentação dos açúcares Frutose, Succinato e Manitol (quadro 1). Essas provas possibilitam a distinção entre as espécies de micobactérias de crescimento rápido ou, pelo menos, para a classificação do complexo micobacteriano a que essa espécie pertence (LEÃO et al., 2004; Ministério da Saúde., 2005; KENT e KUBICA, 1985; Dostal et al., 2003).

Quadro 1 – Testes fenotípicos indicados para identificação das principais micobactérias de crescimento rápido de interesse em Saúde Pública.

	Nit	Gli	NaCl	Cit	Fru	Man	Ác. Píc.	TW	Referências
<i>M. abscessus</i>	-		+	-			+	-	Stefan et al, 2003
	-		+	-		-	+	+	Leão et al, 2004
	-		+	-		-			Kent et al, 1985
	-	-	+	-	-	-			MS, 2005
<i>M. chelonae</i>			-	+			-		Stefan et al, 2003
	-		-	+		-	+/-	+/-	Leão et al, 2004
	-		-	+		-			Kent et al, 1985
	-		-	+	-	-			MS, 2005
<i>M. fortuitum</i>	+								Stefan et al, 2003
	+		+	-		-	+	+	Leão et al, 2004
	+		+	-		-			Kent et al, 1985
	+	+	+	-	+	-			MS, 2005
<i>M. peregrinum</i>	+		+						Stefan et al, 2003
	+		+/-	-		+	+	+	Leão et al, 2004
	+		+	-		+			Kent et al, 1985
	+	+	+	-	+	+			MS, 2005

Nit:nitrato; gli:glicosidase; cit: citrato de sódio ; Fru: Frutose; Man: Manitol, Ác. Píc: Ácido Pírico; TW: Tween 80; MS: Ministério da Saúde.

3.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.5.1. Técnica de PRA (polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis) da região que codifica a proteína de choque térmico de 65KDa

Para a realização da técnica de PRA-*hsp65*, o DNA foi extraído a partir do crescimento bacteriano em meio de Löwenstein-Jensen suspenso em 500µl de água ultrapura esterilizada. A seguir, a suspensão obtida foi submetida à fervura por 20 minutos e em seguida ao resfriamento a – 20°C, permanecendo congelada até o momento de uso nas reações de PCR (TELENTI et al., 1993; DEVALLOIS et al., 1997).

O DNA extraído das cepas foi submetido à amplificação de um fragmento do gene *hsp65* com os oligonucleotídeos iniciadores Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCAT) E Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT), modificado a partir do descrito por TELENTI et al.(1993). A PCR foi realizada com tampão de reação 1x (KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH 8, MgCl₂ 1,5M) (Invitrogen, Brasil), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 0,2 mM de dNTP, 20 pmoles de cada iniciador e 5µl da suspensão bacteriana submetida à fervura. Após desnaturação inicial por 5 min a 95°C, foram realizados 45 ciclos de amplificação, cada um de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C. Foi realizada uma extensão final de 10min a 72°C. Os produtos das amplificações foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Bst*EII (Biolabs, New England) e *Hae*III (Invitrogen, Brasil), separadamente. As reações de digestão foram feitas em volume final de 20µl, contendo 5U das enzimas de restrição, tampão específico 1x concentrado e 10µl do produto da PCR. As temperaturas e tempo de digestão foram aplicados seguindo as

recomendações dos fabricantes. Os produtos digeridos foram separados em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) 3% em tampão TBE 1x e o padrão de digestão foi visualizado em transiluminador. Para o cálculo do número e do tamanho dos fragmentos, usou-se como referência um marcador de peso molecular de 50pb (Invitrogen, Brasil) aplicado nas laterais e no centro de cada gel e as imagens foram capturadas em fotodocumentador. A identificação (quadro 2) foi finalizada comparando-se os tamanhos dos fragmentos com o algoritmo descrito no site PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) (CHIMARA et al., 2008).

Quadro 2. Perfis de restrição e peso molecular dos fragmentos do gene *hsp65*, que codificam a proteína “heat shock” de 65 kDa, nas diferentes espécies que foram identificadas entre os isolados submetidos à identificação molecular.

Espécie	Tipo Genético	Peso molecular	
		<i>Bst</i> EI	<i>Hae</i> II
<i>M. abscessus</i>	1	235 - 210	145 - 70 - 60 - 55
<i>M. abscessus</i>	2	235 - 210	200 - 70 - 60 - 50
<i>M. bolletii</i>	1	235 - 210	200 - 70 - 60 - 50
<i>M. massiliense</i>	1	235 - 210	200 - 70 - 60 - 50
<i>M. chelonae</i>	1	320 - 130	200 - 60 - 55 - 50
<i>M. fortuitum</i>	1	235 - 120 - 85	145 - 120 - 60 - 55
<i>M. peregrinum</i>	2	235 - 210	140 - 120 - 100 - 55

Chimara et. al 2008

3.5.2. Seqüenciamento do gene *rpoB*

A reação de PCR foi realizada em volume total de 50µl contendo 5µl de tampão 10X (Tris-HCl 50mM, NaCl 50mM, MgCl₂ 5mM) (Promega), 200µl de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 2.5 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (promega), 10 mmol dos oligonucleotídeos iniciadores MycoF (5' – GCAAGGTCACCCCGAAGGG - 3') e MycoR (5' – AGCGGCTGCTGGGTGATCATC - 3'), (ADÉKAMBI T. et al 2003), e 2µl de DNA purificado. A mistura de reagentes da PCR foi submetida denaturação inicial por 1 minuto a 95°C, seguida de 35 ciclos de amplificação, cada um de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C e 90 segundos a 72°C. Foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

As amostras amplificadas foram purificadas com o kit comercial illustratm GFXtm PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Health care).

As amostras foram seqüenciadas (Genomic Engenharia Molecular Ltda), utilizando os iniciadores MycoF com a seqüencia (5' – GGCAAGGTCACCCCGAAGGG - 3') e MycoR que apresenta a seqüencia (5' AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3') que delimitam a região variável de 752 pb do gene *rpoB* (ADEKAMBI et al., 2003).

As seqüências obtidas foram alinhadas manualmente utilizando o programa BioEdit (Biological sequence alignment editor) e foram comparadas com seqüencias homólogas de micobactérias de crescimento rápido acromógenas disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi-nml.nih.gov/genbank/>). Por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool). A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA 4.1 (http://www.megasoftware.net/m_test_reliab.html).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Os dados sobre as cepas utilizadas neste estudo, compilados a partir do banco de dados do Setor de Micobactérias do IAL, estão apresentados na tabela 2

Os resultados dos testes fenotípicos realizados neste estudo dos isolados de cada paciente, constantes da Tabela 2, estão apresentados na Tabela 3.

Sete subcultivos, provenientes dos 32 isolados de material de 16 pacientes, produziram colônias com morfologia diferente (lisas e rugosas) e foram incluídos como novos isolados (Tabela 3), gerando assim, um total de 39 a serem investigados.

O crescimento em diferentes temperaturas: 30°C, 37°C foi confluyente para quase todas as cepas quando avaliadas em cinco dias de incubação. As cepas 7b e 26 mantiveram crescimento pobre até última leitura aos quinze dias a 30°C e a cepa 31 aos quinze dias de incubação a 37°C.

Dos 39 isolados, 38 foram identificados como pertencentes aos complexo *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* e *M. fortuitum*-*M. peregrinum* por meio dos resultados dos testes fenotípicos e o isolado de nº 3 foi descartado por apresentar contaminação (Tabela 3).

Tabela 1. Caracterização dos 32 isolados selecionados para o estudo, a partir da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz.

Ordem	Nº de cepa	Paciente	Origem	Sítio	Ano	Identificação Inicial
1	5784	Pac 1	HC	E	2000	<i>M.chelonae</i>
2	71086	Pac 1	HC	E	1997	<i>M.chelonae</i>
3	61001	Pac 1	HC	E	1996	<i>M.chelonae</i>
4	93462	Pac 2	ICF/CRT	E	1999	<i>M.chelonae</i>
5	980	Pac 2	ICF/CRT	E	2000	<i>M.chelonae</i>
6	92092	Pac 2	ICF/CRT	E	1999	<i>M.chelonae</i>
7	4471	Pac 3	Rib.Preto	E	2001	<i>M.chelonae</i>
8	92827	Pac 3	Rib.Preto	E	1999	<i>M.chelonae</i>
9	5672	Pac 3	Rib.Preto	E	2000	<i>M.chelonae</i>
10	2598	Pac 4	Jundiaí	E	2000	<i>M.chelonae</i>
11	82858	Pac 4	Jundiaí	E	1998	<i>M.chelonae</i>
12	91913	Pac 4	Jundiaí	E	1999	<i>M.chelonae</i>
13	6177	Pac 5	Teresina	LB	2001	<i>C. M.chelonae</i>
14	7302	Pac 5	Teresina	E	2001	<i>M.chelonae</i>
15	7303	Pac 5	Teresina	E	2001	<i>M.chelonae</i>
16	3643	Pac 6	Vitória	E	2001	<i>M.chelonae</i>
17	7850	Pac 6	Vitória	S/I	2002	<i>M.chelonae</i>
18	11532	Pac 6	Vitória	LB	2003	<i>M.chelonae</i>
19	11819	Pac 6	Vitória	LB	2003	<i>C. M.chelonae</i>
20	92701	Pac 7	Jundiaí	BG	1999	<i>C. M. fortuitum</i>
21	91091	Pac 8	CRTA	LCR	1999	<i>C. M. fortuitum</i>
22	51672	Pac 9	MS	L.P	1995	<i>M.chelonae</i>
23	30164	Pac 10	HC	E	1993	<i>M.chelonae</i>
24	40592	Pac 10	HC	E	1994	<i>M.chelonae</i>
25	91424	Pac 11	ICF	E	1999	<i>M.chelonae</i>
26	91	Pac 11	ICF	E	2000	<i>M.chelonae</i>
27	15931	Pac 12	HC	E	2005	<i>M.chelonae</i>
28	91259	Pac 13	HER	B.G	1999	<i>C. M. fortuitum</i>
29	2537	Pac 14	Oftalmo.	S.Of	2000	<i>M.chelonae</i>
30	4291	Pac 15	Oftalmo	S.Of	2000	<i>M.chelonae</i>
31	4087	Pac 15	Oftalmo	S.Of	2000	<i>M.chelonae</i>
32	3524	Pac 16	Oftalmo	S.Of	2000	<i>M.chelonae</i>

HC: Hospital das Clínicas; ICF: Instituto Clemente Ferreira; MS: Mato Grosso do Sul; HER: Hospital Emílio Ribas; Oftalmo.: Laboratório Oftalmológico; E: Escarro; LCR: Líquor Cefalorraquidiano; L.P: Líquido Pleural; L.B: Lavado Brônquico; B.G: Biópsia de Gânglio; S.O: Secreção Oftalmológica; S.I: Sem Identificação

Tabela 2. Resultados das provas bioquímicas e dos testes de crescimento em meios com NaCl, Citrato de sódio, ácido pícrico e carboidratos, dos isolados dos complexos *M. chelonae*-*M. abscessus* e *M. fortuitum*-*M. peregrinum*.

Ordem	Identificação da cepa	Pac.	Nit	β -glic	Nacl	Cit. Sód	Fru	Suc.	Man	Ac. Pic	TW 3d	Identificação fenotípica
1a	5784(L)	1	-	-	-	-	+	+	+	+	-	CCA
1b	5784(R)	1	-	-	d	-	-	+	-	+	+	CCA
2	71086(L)	1	-	d	-	-	-	+	-	-	-	CCA
4	93462(R)	2	-	-	-	d	d	+	-	+	-	CCA
5	980(R)	2	-	-	-	-	-	+	-	+	-	CCA
6	92092(R)	2	-	d	-	-	-	+	-	+	-	CCA
7a	4471(L)	3	+	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>M. peregrinum</i>
7b	4471(R)	3	-	-	+	-	+	+	+	+	-	CCA
8	92827(R)	3	-	-	-	-	-	+	-	+	-	CCA
9	5672(R)	3	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
10	2598(R)	4	-	+	+	-	-	-	-	+	-	CCA
11	82858(R)	4	+	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>M. peregrinum</i>
12a	91913(R)	4	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
12b	91913(L)	4	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
13	6177(R)	5	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
14	7302(R)	5	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
15	7303(R)	5	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
16	3643(R)	6	-	-	+	-	-	d	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
17	7850(R)	6	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
18	11532(R)	6	-	-	+	-	-	-	-	d	-	<i>M. abscessus</i>
19	11819(R)	6	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
20a	92701(L)	7	+	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>M. fortuitum</i>
20b	92701(R)	7	+	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>M. fortuitum</i>
21a	91091(L)	8	d	-	+	-	+	+	+	+	-	<i>M. peregrinum</i>
21b	91091(R)	8	d	-	-	-	+	+	-	+	-	CRA
22a	51672(L)	9	-	+	+	-	-	-	-	-	-	CCA
22b	51672(R)	9	-	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
23	30164(R)	10	-	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
24	40592(R)	10	-	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
25	91424(R)	11	-	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
26	91(R)	11	-	-	+	-	+	+	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
27	15931(L)	12	-	-	d	-	-	-	-	+	-	<i>M. abscessus</i>
28	91259(L)	13	d	+	+	-	+	+	+	+	+	CRA
29	2537(L)	14	-	-	-	-	-	+	-	+	-	CCA
30	4291(R)	15	+	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>M. fortuitum</i>
31	4087(R)	15	-	-	-	+	-	-	-	d	-	<i>M. chelonae</i>
32a	3524(L)	16	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>M. chelonae</i>
32b	3524(R)	16	-	-	d	+	-	+/-	-	-	-	<i>M. chelonae</i>

+:positivo; _ : negativo; d duvidoso; Nit: Nitrato; β -glic: β -glicosidase; Nacl: Cloreto de Sódio; Fru: Frutose; Suc: Succinato; Man: Manitol Ac. Pic: Ácido Pírico; TW: Tween 80; CCA: Complexo *M. chelonae*-*M. abscessus*; CFP: Complexo *M. fortuitum*-*M. peregrinum*; CRA: micobactéria de crescimento rápido acromógena, L=colônia lisa, R=colônia rugosa.

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR PELO PRA-*hsp65*

Após a identificação fenotípica, foi realizada a diferenciação molecular por amplificação do gene *hsp65* seguido de digestão por enzimas de restrição – PRA *hsp65*. Foram encontrados 4 perfis de restrição que correspondem a quatro espécies de micobactérias, um perfil compartilhado por três espécies e um perfil que não está descrito na literatura (Figuras 2, 3 e 4).

Os perfis dos isolados 2, 7a, 7b, 8, 9, 11, 20a, 20b, 27 e 29 não estão demonstrados nas figuras 1,2 e 3 por corresponderem à espécies já identificadas nessas figuras para outros isolados.

Figura 2 – Perfis de PRA *hsp65* de 09 isolados e cepas ATCCs de *Mycobacterium chelonae*, *M. avium* e *M. tuberculosis* com as enzimas de restrição *BstEII* (esquerda) e *HaeIII* (direita) e marcador de 50pb.

Figura 3 – Perfis de PRA *hsp65* de 13 isolados com as enzimas de restrição *BstEII* (direita) e *HaeIII* (esquerda) e marcador de 50pb.

Figura 4 – Perfis de PRA *hsp65* de 8 isolados com as enzimas de restrição *BstEII* (direita) e *HaeIII* (esquerda) e marcadores de 50pb.

Tabela 3 – Identificação dos 38 isolados incluídos no estudo, após digestão do fragmento de amplificação do gene *hsp65* pelas enzimas de restrição *Bst*EI e *Hae*III

Peso molecular		Espécie	Tipo genético	Identificação dos isolados (n=38)
<i>Bst</i> EII	<i>Hae</i> III			
235-210	145-70-60-55	<i>M.abscessus</i>	1	1b, 2a, 4-6, 7b, 8, 9, 23-26, 29 (n=13)
	200-70-60-50	<i>M.abscessus</i>	2	10, 12a, 12b, 13-19, 22a, 22b, 27 (n=13)
		<i>M.bolletii</i>	1	
		<i>M.massiliense</i>	1	
	140-120-100-55	<i>M.peregrinum</i>	2	1a, 7a, 21a, 21b (n=4)
235-120-85	145-120-60-55	<i>M.fortuitum</i>	1	11, 20a, 20b, 30 (n=4)
240-210	140-125-100-55	Novo padrão		28 (n=1)
320-130	200-60-55-50	<i>M.chelonae</i>	1	31, 32a, 32b (n=3)

4.3 IDENTIFICAÇÃO PELO SEQÜENCIAMENTO DO GENE *rpoB*

Dentre os 38 isolados 13 apresentaram um perfil de PRA-*hsp65* compartilhado por três espécies de micobactérias. *M. abscessus* 2, *M. bolletii* e *M. massiliense*. e foram submetidos ao seqüenciamento do gene *rpoB*.

A análise das seqüências apresentaram alta similaridade com as seqüências correspondentes depositadas no GenBank: *M. abscessus* (números de acesso no GenBank AY147164 e AY262741), *M. bolletii* (número de acesso no GeneBank AY859692) e *M. massiliense* (número de acesso no GenBank AY593981). (Figuras 5 e 6).

Figura 5 - Amplificação de um fragmento do gene *rpoB* de 752 pb para seqüenciamento. M: marcador de 100pb

Figura 6 Árvore filogenética baseada no método neighbor-joining, utilizando as seqüências do gene *rpoB* (622 pb) da cepa tipo de cada espécie de *Mycobacterium*, bootstrap de 1000 simulações. As seqüências das cepas tipo das diferentes espécies são originárias do banco de dados GenBank as demais são oriundas de banco de dados do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Análises das seqüências do gene *rpoB* revelaram que as seqüências do isolado 18 apresentou 99,3% de similaridade com a seqüência de *M. abscessus* CIP 104536 e ATCC 23003. Os isolados 16, 17 e 19 apresentaram 99,5% de similaridade com a seqüência de *M. abscessus* CIP 104536 e ATCC 23003.

Os três isolados 10, 12a e 12b apresentaram 99,8% de similaridade com o *M. massiliense* CIP 108297.

Os isolados 13, 14, 15, 22a, 22b apresentaram um grau de similaridade de 99,8% com o *M. bolletii* CIP 108541 enquanto o isolado 27 apresentou 99,5% de similaridade.

O isolado 28 apresentou uma similaridade de 98,2% quando comparado com o *M. porcinum*,

Após o seqüenciamento do gene *rpoB* os isolados 16 a 19 foram identificados como *M. abscessus* 2. Os isolados 10, 12a e 12b foram identificados como *M. massiliense* e os isolados 13,14, 15, 22a, 22b e 27 foram identificados como *M. bolletii*. O isolado 28 não foi conclusivamente identificado pelo *rpoB*, necessitando de análise complementar para confirmação da espécie.

Tabela 4: Identificação pelo seqüenciamento de um fragmento do gene *rpoB* das cepas identificadas pelo método do PRA-*hsp65* com perfil compartilhado pelo *M. abscessus* 2, *M. bolletii* 1 e *M. massiliense* 1.

Isol	Nº de cepa	Pa c	Origem	Sítio	Ano	PRA- <i>hsp65</i>	<i>rpoB</i>
10	2598 (R)	4	Jundiaí	E	2000	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1/ <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. massiliense</i>
12a	91913 (R)	4	Jundiaí	E	1999	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. massiliense</i>
12b	91913 (L)	4	Jundiaí	E	1999	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. massiliense</i>
13	6177 (R)	5	Teresina	LB	2001	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
14	7302 (R)	5	Teresina	E	2001	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
15	7303 (R)	5	Teresina	E	2001	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
16	3643 (R)	6	Vitória	E	2001	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. abscessus</i> 2
17	7850 (R)	6	Vitória	S/I	2002	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. abscessus</i> 2
18	11532 (R)	6	Vitória	LB	2003	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. abscessus</i> 2
19	11819 (R)	6	Vitória	LB	2003	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. abscessus</i> 2
22a	51672 (L)	9	MS	L.P	1995	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
22b	51672 (R)	9	MS	L.P	1995	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
27	15931 (R)	12	HC	E	2005	<i>M. abscessus</i> 2; <i>M. bolletii</i> 1; <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
28	91259 (L)	13	HER	B.G	1999	Novo padrão	*Em análise

E: Escarro; L.B: Lavado Brônquico; S/I: Sem Identificação; L.P: Lavado Pleural; B.G: Biópsia de Gânglio; Isol-

nº dos isolados, *resultados do seqüenciamento do *rpoB* e *hsp65* em análise.

Tabela 5 – Identificação final dos isolados em estudo concluída com os resultados das provas fenotípicas, PRA *hsp65* e *rpoB*

Orde m	Pac.	Identificação Inicial	Identificação fenotípica	Identificação PRA <i>hsp65</i>	Identificação <i>rpoB</i>
1a	1	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. peregrinum</i> 2	Não realizada
1b	1	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
2	1	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
4	2	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
5	2	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
6	2	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
7a	3	<i>M.chelonae</i>	<i>M.peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i> 2	Não realizada
7b	3	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
8	3	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
9	3	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
10	4	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. massiliense</i>
11	4	<i>M.chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> 1	Não realizada
12a	4	<i>C. M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. massiliense</i>
12b	4	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. massiliense</i>
13	5	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
14	5	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
15	5	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
16	6	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. abscessus</i> 2
17	6	<i>C. M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. abscessus</i> 2
18	6	<i>C. M. fortuitum</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. abscessus</i> 2
19	6	<i>C. M. fortuitum</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M.abscessus</i> 2
20a	7	<i>M.chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> 1	Não realizada
20b	7	<i>M.chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> 1	Não realizada
21a	8	<i>M.chelonae</i>	<i>M.peregrinum</i>	<i>M. peregrinum</i> 2	Não realizada
21b	8	<i>M.chelonae</i>	CRA	<i>M. peregrinum</i> 2	Não realizada
22a	9	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
22b	9	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
23	10	<i>C. M. fortuitum</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
24	10	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
25	11	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
26	11	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
27	12	<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> 2, <i>M. bolletii</i> 1, <i>M. massiliense</i> 1	<i>M. bolletii</i>
28	13	<i>M.chelonae</i>	CRA	Novo padrão	*Em análise
29	14	<i>M.chelonae</i>	CCA	<i>M. abscessus</i> 1	Não realizada
30	15	<i>M.chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> 1	Não realizada
31	15	<i>M.chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> 1	Não realizada
32a	16	<i>M.chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> 1	Não realizada
32b	16	<i>M.chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i> 1	Não realizada

CCA- complexo *M. chelonae-M.abscessus*, CRA- micobactéria de crescimento rápido acromógena, Pac-paciente,

*resultados do sequenciamento do *hsp65* em análise.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No Brasil, nos últimos anos, têm sido relatados casos e surtos de infecção por micobactérias não tuberculosas, especialmente as espécies de crescimento rápido incluídas nos complexos *M. chelonae-abscessus* e *M. fortuitum-peregrinum*, relacionados com cirurgias ou outros procedimentos clínicos invasivos (FREITAS et al., 2003; NIERO et al., 2008).

As infecções pulmonares causadas por MNTs têm sido reconhecidas como causa do aumento de morbidade e mortalidade. As manifestações clínicas e radiográficas das infecções são variáveis e podem causar dificuldades ao estabelecimento de um diagnóstico correto. A doença pulmonar causada por MAC, *M. kansasii*, *M. abscessus* e *M. malmoense* pode manifestar-se como infecção clássica cavitária similar tuberculose pós-primária (MARTINEZ et al., 2007).

Nos laboratórios de Saúde Pública do Brasil, as espécies isoladas com maior frequência de materiais de origem pulmonar foram *M. kansasii* e as do complexo *M. chelonae* e *M. fortuitum*. Matos et al., (2004), ressaltam porcentagem significativa de micobactérias potencialmente patogênicas, com predominância das espécies *M. chelonae-abscessus*, foram isoladas de material biológico de pacientes que estavam em tratamento de tuberculose multirresistente.

MARTINEZ et al., (2007), salientam que a consideração da possibilidade de doença causada por MNTs é o primeiro passo para o diagnóstico correto e instituição do tratamento adequado.

O diagnóstico bacteriológico das doenças causadas por micobactérias somente poderá ser definido após a realização de cultura do agente e sua identificação. Essas atividades devem ser realizadas por laboratórios de Saúde

Pública, com proficiência, pois o diagnóstico correto das micobacterioses é de extrema importância não somente aos pacientes afetados por elas mas também ao programa de controle da tuberculose.

5.1 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Tradicionalmente, em laboratórios de Saúde Pública são usados os métodos fenotípicos para a identificação de micobactérias. Conforme citado anteriormente, as condições de realização desses testes são críticas para que os resultados sejam confiáveis e reprodutíveis, pois os mesmos variam de acordo com a concentração do substrato, composição do tampão, reagentes colorimétricos usados para detecção, tempo e temperatura da reação e até mesmo a qualidade da cultura analisada.

Sete subcultivos produziram colônias com morfologias diferentes (lisas e rugosas). As colônias foram separadas, subcultivadas e analisadas como novos isolados.

A observação de dois tipos de colônias sugere a presença de mais de uma espécie o que deve ser investigado, pois representa um fator de erro no processo de identificação.

As provas fenotípicas possibilitaram a identificação de 16 *M. abscessus*, três *M. chelonae*, quatro *M. fortuitum* e dois *M. peregrinum*. Dos demais isolados, 11 somente puderam ser classificados dentro do complexo *M. chelonae-M. abscessus* e dois apenas como micobactéria de crescimento rápido acromógena - CRA.

O teste da redução do nitrato foi importante para diferenciar o complexo *M. chelonae-M. abscessus* do complexo *M. fortuitum-M. peregrinum*. Os testes de

tolerância a NaCl 5% e utilização de citrato de sódio como fonte de carbono foram importantes para diferenciar a espécie *M. chelonae* de *M. abscessus*. As espécies *M. fortuitum* e *M. peregrinum* foram diferenciadas apenas pela prova de utilização do manitol.

Os nossos resultados são concordantes com os de outros estudos que têm demonstrado as desvantagens da identificação das micobactérias pelos métodos fenotípicos. Apesar da diversidade de testes disponíveis na literatura, os resultados muitas vezes são semelhantes para diversas espécies e algumas vezes não são conclusivos impossibilitando a diferenciação de espécies que apresentam perfis fenotípicos muito próximos (TELENTI et al., 1993; SILVA et al., 2001; SILVA ROCHA et al., 2002; CHIMARA et al., 2008; NIERO et al., 2008).

5.2 IDENTIFICAÇÃO PELO PRA-*hsp65* E PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE *rpoB*

Nas últimas décadas, com base em estudos genotípicos, novas metodologias estão sendo desenvolvidas para possibilitar a identificação rápida e acurada das espécies de micobactérias, potencialmente patogênicas, descritas na literatura.

No Brasil, a técnica de PRA *hsp65* proposta por TELENTI et al. (1993) e DEVALLOIS et al.(1997), têm possibilitado a identificação rápida de diversas espécies de micobactérias, boa correlação com os resultados de identificação fenotípica e o reconhecimento de espécies que não eram identificadas anteriormente devido a limitação dos métodos fenotípicos (SILVA et al., 2001; SILVA ROCHA et al., 2002; CHIMARA et al., 2008).

A técnica de PRA-*hsp65* foi importante para identificação dos onze isolados classificados com os testes fenotípicos como complexo *M. chelonae-M.abscessus*. Oito tiveram suas espécies identificadas como *M. abscessus* 1, dois demonstraram um perfil compartilhado por três espécies *M. abscessus* 2, *M. bolletii* 1 e *M. massiliense* 1 e um não pode ser identificado por ter apresentado um padrão ainda não descrito na literatura.

Além disso, o método do PRA-*hsp65* possibilitou a identificação precisa de seis isolados, quatro da espécie *M. fortuitum* tipo 1 e dois da espécie *M. peregrinum* tipo 2.

Onze isolados identificados pelas provas fenotípicas como *M. abscessus* quando submetidos ao PRA *hsp65* demonstraram um perfil compartilhado por três espécies *M. abscessus* 2, *M. bolletii* 1 e *M. massiliense* 1. Outros cinco isolados também identificados como *M. abscessus* quando submetidos ao PRA *hsp65* tiveram sua identificação confirmada como *M. abscessus* 1.

Os três isolados identificados fenotipicamente como *M. chelonae* quando submetidos ao PRA *hsp65* tiveram sua identificação confirmada como *M. chelonae* 1.

Dois isolados foram classificados como micobactéria de crescimento rápido acromógena. Um, pelo PRA *hsp65*, foi identificado como *M. peregrinum* 2 e o outro demonstrou um novo padrão ainda não descrito na literatura.

Entre todos os isolados estudados somente um apresentou resultados conflitantes entre a identificação fenotípica e a identificação pelo PRA *hsp65*. Inicialmente classificado como integrante do complexo *M. chelonae-M.abscessus* quando submetido ao PRA *hsp65* foi identificado como *M. peregrinum* 2.

O gene *hsp65* não possui um polimorfismo significativo que permita diferenciar *M. abscessus* 2 de *M. massiliense* e *M. bolletii* pois as seqüências dessas espécies diferem em apenas três nucleotídeos, possuindo uma similaridade de 99,25%.

É importante realizar o seqüenciamento de genes que possuam regiões polimórficas entre as espécies que permitam a diferenciação das mesmas.

ADEKAMBI et al., (2003), analisando o gene *rpoB* de 20 micobactérias de crescimento rápido definiram cinco regiões polimórficas. A região V foi a melhor para analisar o polimorfismo neste gene por apresentar maior variabilidade.

A diversidade entre as seqüências da região V encontradas nas micobactérias de crescimento rápido geralmente é maior que 3%. Segundo os autores, para que dois isolados sejam considerados da mesma espécie, a diversidade das seqüências do gene *rpoB* deve ser menor que 1,7%.

O seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA é amplamente utilizado para diferenciação de MNTs, porém, sua eficiência é limitada pela falta de diversidade que possibilite a diferenciação entre espécies de micobactérias estreitamente relacionadas pois, esta seqüência é compartilhada por diversas espécies. As espécies *M. chelonae* e *M. abscessus* possuem a mesma seqüência do gene 16S rRNA (SIMMON et al. 2007)

A técnica de ITS que analisa a região espaçadora entre os genes 16S rRNA e 23S rRNA é eficiente para diferenciar a maioria das espécies de micobactérias. Embora a região estudada seja altamente polimórfica e permita precisa definição da maioria das MNTs descritas, inclusive *M.chelonae*, não é capaz de diferenciar *M.*

abscessus, *M. massiliense* e *M. bolletii*, pois compartilham a mesma sequência (ADEKAMBI et al., 2006; ADEKAMBI et al., 2004).

Para elucidar a identidade de quatorze isolados que após os testes fenotípicos e realização de PRA *hsp65* ainda permaneciam sem a definição de espécie foi realizado o sequenciamento do gene *rpoB*. Foram identificados três isolados como *M. massiliense*, seis como *M. bolletii* e quatro como *M. abscessus* 2.

O isolado 28 apresentou 98,2% de similaridade na sequência da região V do gene *rpoB* com a espécie padrão *M. porcinum*. Os resultados obtidos mostrando 1,8% de similaridade, não permitem assegurar a identificação como *M. porcinum* uma vez que Adékambi et al 2003 propuseram que sejam considerados da mesma espécie, microrganismos cuja similaridade das sequências do gene *rpoB* seja menor que 1,7%.

Os testes fenotípicos incluem a observação macroscópica e microscópica das culturas, de suas características de crescimento em diferentes substratos e temperaturas e de seu perfil metabólico. Embora essas provas não sejam capazes de identificar todas as espécies de micobactérias descritas, puderam identificar 36,86% dos isolados até o nível de espécie e 28,9% como pertencentes ao complexo *M. chelonae-M.abscessus*. Apenas os resultados de dois isolados não permitiram relacioná-los com espécies reconhecidas nas tabelas de identificação.

Com a técnica de PRA *hsp65* foi possível identificar as espécies de micobactérias de 63,1% dos isolados analisados e caracterizar os tipos de uma mesma espécie. Entre os demais, 34,0% mostraram um mesmo perfil compartilhado pelas espécies *M. abscessus* 2; *M. bolletii* 1; *M. massiliense* 1 e um isolado mostrou

padrão de PRA não disponível no banco de dados do Instituto Pasteur. (2008) (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

Os resultados fenotípicos possibilitaram a identificação de 16 isolados como *M. abscessus*. Após a realização do PRA *hsp65* cinco isolados foram confirmados como *M. abscessus* 1 e 11 (28,9%) apresentaram um mesmo perfil compartilhado pelas espécies *M. abscessus* 2, *M. bolletii* 1, *M. massiliense* 1.

Embora o PRA *hsp65* tenha demonstrado maior precisão que os métodos fenotípicos para a definição das espécies e dos tipos dos isolados em estudo, o sequenciamento do gene *rpoB* foi necessário para definição das espécies de 13 isolados que apresentaram perfil de PRA *hsp65* compartilhado por *M. abscessus* 2; *M. bolletii* 1; *M. massiliense* 1.

Foram analisados 26 isolados de material biológico de origem pulmonar provenientes de 9 pacientes e 12 isolados de material biológico de origem extrapulmonar provenientes de 7 pacientes.

Analisados os resultados foi possível confirmar bacteriologicamente cinco casos de doença pulmonar causada por *M. abscessus* 1, um caso por *M. abscessus* 2, um caso por *M. massiliense* e dois casos por *M. bolletii*. Essa confirmação, tendo como base os critérios propostos pela American Thoracic Society é possível atualmente graças ao aprimoramento das técnicas de identificação das espécies. Os recursos técnicos disponíveis mostraram que os isolamentos selecionados com identificação inicial de *M. chelonae* ou complexo *M. chelonae-fortuitum* na sua maioria eram da espécie *M. abscessus* concordando com dados da literatura como a espécie de MNT frequentemente envolvida com casos de doença pulmonar.

A identificação fenotípica de uma determinada espécie, a partir dos isolados de sítios estéreis extrapulmonares, por si só possibilitou a caracterização bacteriológica de sete casos de micobacterioses. Porém, com a técnica do PRA *hsp65* foi possível reconhecer que na realidade as espécies isoladas de secreção oftalmológica foram *M. abscessus* 1 em um caso, e *M. chelonae* 1 em dois casos, De duas biópsias de gânglio foram isolados *M. fortuitum* 1 em um caso e no outro a espécie não pode ser identificada com as técnicas utilizadas neste estudo. O isolamento de *M. peregrinum* 2 a partir de LCR ocorreu em um caso. Com o sequenciamento do gene *rpoB* foi definida a espécie *M. bolletii* 1, recentemente descrita na literatura, e isolada do líquido pleural do paciente 22 em 1995.

Entre os isolados que mostraram em seus subcultivos colônias com características morfológicas diferentes apenas os provenientes de dois casos mostram a presença de duas espécies *M. peregrinum* 2 e *M. abscessus* 1. Nos demais casos a diferença na morfologia das colônias não estava relacionada com a existência de mais de uma espécie.

Os resultados deste estudo sugerem que a identificação de micobactérias, devido a sua complexidade, deva ser implementada com testes mais específicos para a precisa diferenciação das espécies. A implantação destes testes, principalmente em laboratórios de referência em Saúde Pública serão úteis para elucidação rápida, de diversos casos envolvidos em surtos de infecção por micobactérias não tuberculosas e casos de doença pulmonar crônica encaminhados aos centros de referência para tratamento de tuberculose multirresistente.

No Brasil, NIERO et al., (2008) recentemente relataram surtos causados por *M. massiliense* e *M. bolletii* em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos

invasivos. Os resultados deste estudo identificaram um caso pulmonar por *M. massiliense* ocorrido no ano de 1998 e um caso extrapulmonar e dois casos pulmonares causados por *M. bolletii* ocorridos respectivamente em 1995, 2001 e 2005. Esses resultados mostram que embora a descrição dessas espécies seja recente elas já circulavam e causavam doença no Brasil há no mínimo dez anos.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A Os testes fenotípicos incluem a observação macroscópica e microscópica das culturas, de suas características de crescimento em diferentes substratos e temperaturas e de seu perfil metabólico. As provas fenotípicas foram capazes de identificar somente 36,86% dos isolados e 28,9% como pertencentes ao complexo *M. chelonae-M.abscessus*. Apenas os resultados de um isolado não permitiu relacioná-lo com espécies já descritas.

B Com a técnica de PRA *hsp65* foi possível identificar as espécies de micobactérias de 63,1% dos isolados analisados e caracterizar os tipos de uma mesma espécie. Entre os demais, 34,0% mostraram um mesmo perfil compartilhado pelas espécies *M. abscessus* 2; *M. bolletii* 1; *M. massiliense* 1 e um isolado mostrou padrão de PRA não disponível no banco de dados do Instituto Pasteur. (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

C. Os resultados fenotípicos possibilitaram a identificação *M. abscessus* em 16 isolados. Após a realização do PRA *hsp65* cinco foram confirmados como *M. abscessus* 1 e 11 (28,9%) apresentaram um mesmo perfil compartilhado por três espécies.

D. Embora o PRA *hsp65* tenha demonstrado maior precisão que os métodos fenotípicos para a definição das espécies e dos tipos dos isolados em estudo, o sequenciamento do gene *rpoB* foi necessário para definição das espécies *M.*

abscessus 2; *M. bolletii* 1; *M. massiliense* 1 que compartilham o mesmo perfil de PRA-*hsp65*

E. O seqüenciamento do gene *rpoB* foi uma técnica adequada para elucidar os casos em que as outras metodologias não possibilitaram uma identificação conclusiva. Foi importante para mostrar a diversidade das espécies de crescimento rápido de interesse em Saúde Pública e deve ser uma técnica considerada para o reconhecimento de micobactérias patogênicas emergentes.

7. REFERÊNCIAS

Adekambi TP, Colson, M. Drancourt M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol. 2003;41:5699–708.

Adekambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54:2095–105.

Adekambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, La Scola B, Raoult D, Drancourt M. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. J Clin Microbiol. 2004;42:5493–501.

Adekambi TP, Berger D, Raoult, Drancourt M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:133–43.

American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med. 1997; 156:S1-S25

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An Official ATS/IDSA Statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:367-416.

Barreto AMW, Campos CED. Micobactérias “não tuberculosas” no Brasil. *Bol Pneumol Sanit*. 2000;8:24-31.

Blanco RM, Inumaru VTG, Martins MC, Giampaglia CMS, Ueki SYM, Chimara E, et al. Estratégias para identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2002;61:91-6.

Brenner JD, Krieg RN, Staley TJ. *Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria: introductory essays*. 2.ed. New York: Springer; 2005. v.2.

Daley CL, Griffith DE. Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. *Clin Chest Med*. 2002;23:623-32.

Chimara E, Ferrazoli L, Ueki SYM, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leão SC. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiol*. 2008;8:48.

David H, Vincent V, Thorel MF. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Paris: Institut Pasteur; 1989.

Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol. 1997;35: 2969-73.

Dostal S, Richter E, Harmsen D. Concise guide to mycobacteria and their molecular differentiation. Würzburg (Germany): Ridom Press; 2003.

Dytoc MT, Honich L, Shandro C, Ting PT, Chui L, Fiorillo L, et al. Clinical microbiological and epidemiological findings of an outbreak of *Mycobacterium abscessus* hand and foot disease. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;53:39-45.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. Nontuberculous mycobacterial infections after cosmetic surgery – Santo Domingo, Dominican Republic, 2003-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2004;53:509.

Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. [acesso em 31maio 2008]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>).

Freitas D, Alvarenga L, Sampaio JL, Mannis M, Sato E, Sousa L, et al. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. Ophthalmology. 2003;110:246-85.

Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ Jr. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. Am Rev Respir Dis. 1993;147:1271-8

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Baltimore; Williams & Wilkins, 1994. p.597-603.

Institut Pasteur. Identification of mycobacteria. PRA pattern. [acesso em 13 maio 2008]. Disponível em: (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

Inumaru VTG, Blanco RM, Martins MC, Giampaglia CMS, Ueki SYM, Chimara E, et al. Culturas mistas de micobactérias: é importante isolar e identificar?. Rev Inst Adolfo Lutz. 2005;64:137-41.

Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol Rev. 1996;9:177-215.

Knackmuhs G, Gerwel M, Patterson C, Cipollone N, Navitski MR, Lawler R, et al. *Mycobacterium chelonae* infections associated with face lifts, New Jersey, 2002-2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2004;53:192-4.

Katoch VM. Infections due to nontuberculous mycobacteria (MNT). Indian J Med Res. 2004;120:290-304.

Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for level III laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control; 1985. (publication n° 86-216546).

Kirsop BE, Doyle A. Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods. 2. ed. San Diego: Academic Press; 1991. p380.

Kubica GP, Baess I, Gordon RE, Jenkins PA, Kwapinski JBG, McDurmont C, et al. A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. J Gen Microbiol. 1972;73:5570

Kusonoki S, Ezaki T. Proposal of *Mycobacterium pergrinum* sp. nov., nom. rev. and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *Abscessus* (Kubica et. al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1992;42:240-5.

Le Dantec, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution system. Appl Environ Microbiol. 2002; 68:5318-25.

Levy-Frébaut VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int J Syst Bacteriol. 1992;42:315-23.

Martinez S, McAdams HP, Batchu CS. The many faces of pulmonary nontuberculous mycobacteria Infection. AJR Am J Roentgenol. 2007;177-86.

Martins MC. Estudo Crítico da utilização das técnicas de biologia molecular na detecção e identificação de micobactérias, em especial, *Mycobacterium tuberculosis* [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2000.

Matos ED, Santana MA, de Santana MC, Mamede P, de Lira Bezerra B, PanÃ£o E, et al. Nontuberculosis mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference center in Bahia: clinical epidemiological aspects. Braz J Infect Dis. 2004;8:296-304.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de bacteriologia da tuberculose. 2. ed. Rio de Janeiro; 1994c.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3. ed. Rio de Janeiro; 2005a.

Munayco CV, Grijalva CG, Culqui DR, Bolarte JL, Ognio LAS, Quispe N, et al. Outbreak of persistent cutaneous abscesses due to *Mycobacterium chelonae* after mesotherapy sessions, Lima, Peru. Rev Saúde Pública. 2008;42:146-9.

Niero CV, Lima, KVB, Lopes ML, Rabello MCS, Marsola LR, Brilhante VCR, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. J Clin Microbiol. 2008;46:850-855.

Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2004;17:98-106.

Park S, Kim S, Park, EM, Kim H, Kwon OJ, Chang CI, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycobacteria abscessus* in Korea. J Korean Med Sci. 2008;23:49-52.

Rastogi N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. Res Microbiol. 2001;142:464-476.

Runyon E H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am. 1959;43:273-291.

Secretaria Estadual de Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica “Alexandre Vranjac. Divisão de Tuberculose / Instituto Adolfo Lutz. Setor de Micobactérias. Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento. [acesso em 31 maio 2008]. Disponível em: (<http://www.cve.sp.gov.br>).

Senna SG, Marsico AG, Suffys PN, Fonseca LS. Identificação e análise de MNTs causadoras de infecções no Hospital Universitário – HUCFF/UFRJ no Rio de Janeiro. J Bras Pneumol. 2006;32:S135-S62.

Silva Rocha A, Werneck Barreto AM, Dias Campos CE, Villas-Boas da Silva M, Fonseca LS, Saad MH, et al. Novel allelic variants of mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp65*. J Clin Microbiol. 2002;40:4191-6.

Silva CF, Ueki SYM, Geiger DC, Leão SC. *hsp65* PCR – Restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. Rev Inst Med Trop. 2001;43:25-8.

Simmon KE, Pounder JI, Greene JN, Walsh F, Anderson, Cohen S. et al. Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* sequencing of clinical isolates collected in the United. J Clin Microbiol. 2007;45:1978-80.

Stephen K, Field, Cowie RL. Lung disease due to the more common nontuberculous Mycobacteria. Chest. 2006;129:1653-72.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analyses. J Clin Microbiol. 1993; 31: 175-8.

Tsukamura M. Identification of mycobacteria. Obu, Aichi: The National Chubu Hospital; 1984.

Timothy H, Brown, MD. The rapidly growing mycobacteria – *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. Infect Control. 1985.6:283-8.

Ueki SYM, Martins MC, Telles MAS, Virgilio MC, Giampaglia CMS, Chimara E, Ferrazoli L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no Estado de São Paulo. J Bras Patol Med Lab. 2005;41:1-8.

Wayne LG, Kubica GP. Genus *Mycobacterium* Lehmann and Neumann 1986. In Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins; 1986. v.2, p.1436-57.

Zhibang Y, Bixia Z, Qisham L, Lihao C, Xiangquan L, Huaping L. Large-scale outbreak of injection with *Mycobacterium chelonae* subsp. *Abscessus* after penicillin injection. J Clin Microbiol. 2002;40:2626-8.

8.0 ANEXO – PRIMEIRA PÁGINA DO CURRICULUM LATTLES

Artemir Coelho de Brito

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Biologia Molecular de Microrganismos, atuando principalmente nos seguintes temas: Biologia, Saúde Pública, Bacteriologia, Biologia Molecular de Micobactérias, Epidemiologia e Resistência Micobacteriana. Atualmente é mestrando em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo e bolsista do CNPq.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 05/02/2008

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/6723849639927649>