

Edna Cleide Muricy da Silva

**Caracterização fenotípica e molecular de isolados do gênero *Nocardia* e
proposição de algoritmo de identificação**

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina
Tropical da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical
Orientadora: Profa. Dra. Erica Chimara Silva

São Paulo

2015

Edna Cleide Muricy da Silva

**Caracterização fenotípica e molecular de isolados do gênero *Nocardia* e
proposição de algoritmo de identificação**

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina
Tropical da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical
Orientadora: Profa. Dra. Erica Chimara Silva

São Paulo

2015

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

Silva, Edna Cleide Muricy da

Caracterização fenotípica e molecular de isolados do gênero
Nocardia e proposição de algoritmo de identificação / Edna Cleide
Muricy da Silva. – São Paulo, 2015.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São
Paulo da Universidade de São Paulo - para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Erica Chimara Silva

Descritores: 1. NOCARDIACEAE. 2. FENÓTIPOS. 3. ANÁLISE
DE SEQUÊNCIA DE DNA. 4. ALGORITMOS

USP/IMTSP/BIB-01/2015.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus pela saúde, coragem e ensinamento para seguir em frente. Dedico também à minha Mãe que sempre com muita sabedoria me incentivou a jamais desistir dos meus objetivos.

Agradecimentos

Sei que seria impossível agradecer cada um que me ajudou nesta etapa da vida, pois se assim fosse teria que fazer uma tese só de agradecimentos, já que cada pessoa que passou em minha vida não passou por acaso, e cada pessoa que passou em minha vida deixou um pouco de si e levou um pouquinho de mim.

Início meus agradecimentos por DEUS, por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, sem as quais certamente não teria dado conta.

Agradeço aos meus pais (Osvaldo em memória), pelo apoio, incentivo, carinho, amor e compreensão. Obrigada por sempre acreditarem que eu seria capaz, por mostrarem o orgulho que tinha do meu trabalho, fazendo com que eu siga sempre em frente. Mesmo de longe sempre mostrando o orgulho que sentem e mostrando o amor que é recíproco.

Ao meu filho Sayid, que Deus me presenteou no decorrer deste trabalho e que dormia como um anjo enquanto eu escrevia este trabalho, é claro que por muitas vezes acordava e queria comer, mamar...

Ao meu esposo Samir, pelo amor, companheirismo e paciência. Obrigada por ser esta pessoa tão especial e por estar ao meu lado incondicionalmente.

À Erica Chimara, minha orientadora, grande parceira, obrigada pelo incentivo, confiança, carinho e compreensão, pelo aprendizado transmitido durante as etapas desse trabalho. Pelas concordâncias e discordâncias que me fizeram crescer. Obrigada por fazer desta etapa de minha vida, não um trabalho, mas um aprendizado, ajudando-me a fazer sempre o melhor mesmo nas horas mais difíceis. Obrigada pelas palavras nas horas difíceis e por nunca julgar.

Aos meus irmãos Janete, Maria, Jermana, Vera, Arivaldo, Edineuza, Lecy e Osvado pelo apoio compreensão e ajuda em todos os momentos da minha vida, e por acreditarem sempre em minha capacidade. Especialmente a Edineuza, que esteve em todos os momentos ao meu lado.

Jamais poderia deixar de agradecer uma pessoa bem especial, a minha querida amiga Gloria pelo apoio companheirismo, incentivo, ajuda e acima de tudo pela amizade, por estar ao meu lado dia a dia nas horas boas e ruins e em momentos difíceis e felizes.

Da mesma forma agradeço ao Prof. Dr. Gil Benard por acreditar e confiar a mim a realização deste projeto, pelo apoio, ajuda e por estar sempre à disposição para ajudar durante o desenvolvimento deste trabalho.

Também não poderia deixar de agradecer a Andreia, que conheci apenas ao iniciar este projeto, mas foi uma pessoa mais que especial, uma amiga um apoio a quem pude contar, uma pessoa que fez parte do meu trabalho apenas para me ajudar, e com tantos afazeres ainda teve tempo de me ajudar, e ao perguntar como posso te agradecer por ter me ajudado tanto, disse apenas arrase no seu trabalho.

A todos os funcionários da micologia, Roseli, Antonio, Mauro, Dona Antonia, Sonia, Aliete, Dulce, Monica, Cleison e Vivi sempre tão atenciosos, que contribuíram muito, direta ou indiretamente, fazendo com que o meu dia a dia ficasse mais leve.

À Dra. Gilda Del Negro pela ajuda e apoio, e por esta sempre disposta a ajudar.

Agradecimento especial a Natalia do IAL pela ajuda, pelo ensinamento e por ajudar a realizar alguns experimentos deste projeto.

Aos funcionários do Nucleo de Tuberculose e Micobacterioses do IAL que direta ou indiretamente me ajudaram nesta etapa.

Agradeço as agências de fomentos CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

Finalmente a todos que direta ou indiretamente fizeram parte do desenvolvimento deste projeto.

Obrigada Deus por estar sempre ao meu lado, por não deixar nunca que eu desistisse, por nunca me deixar sozinha, pela sabedoria, paciência, saúde para seguir em frente, mesmo quando há obstáculos difíceis de serem quebrados.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) linha auxílio regular no projeto número: 2010/19122-0. A aluna recebeu bolsa da Cordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS E QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Histórico	21
1.2 Etiologia.....	22
1.3 Epidemiologia	23
1.4 Manifestações Clínicas	25
1.4.1 Infecções pulmonares	25
1.4.2 Infecções sistêmicas	26
1.4.3 Infecções do sistema nervoso central	27
1.4.4 Infecções cutâneas	28
1.4.5 Micetoma.....	28
1.5 Diagnóstico da infecção e identificação	29
1.5.1 Métodos fenotípicos	29
1.5.2 Métodos moleculares.....	30
1.5.3 MALDI-TOF MS	32
1.5.4 Teste de suscetibilidade.....	32
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Isolados	36
4.2 Micromorfologia dos isolados	36
4.3 Provas bioquímicas	36
4.3.1 Resistência à lisozima	36
4.3.2 Esculina	37
4.3.3 Análise de decomposição dos ácidos aminados	38

4.3.4 Hidrólise da ureia	38
4.4 Identificação Molecular	39
4.4.1 Construção de algoritmo de identificação	39
4.4.2 Extração de DNA	41
4.4.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	41
4.4.4 Digestão enzimática dos produtos amplificados	42
4.5 Sequenciamento	42
4.5.1 Sequenciamento do gene 16S rRNA	42
4.5.2 Sequenciamento do gene <i>hsp65</i>	43
4.5.2.1 Identificação	43
4.5.2.2 Análise de restrição <i>in silico</i>	43
4.6 MALDI-TOF MS.....	44
4.7 Teste de suscetibilidade aos fármacos (MIC)	45
4.7.1 Preparo da suspensão bacteriana e semeadura	46
4.7.2 Leitura e utilização da resazurina	47
4.8 Teste de suscetibilidade aos fármacos (disco difusão)	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Identificação fenotípica dos isolados	49
5.1.1 Macromorfologia dos isolados	49
5.1.2 Micromorfologia dos isolados.....	50
5.2 Provas bioquímicas	51
5.2.1 Prova da resistência à lisozima.....	51
5.2.2 Prova da hidrólise de ureia	51
5.2.3 Prova da decomposição da esculina	52
5.2.4 Análise de decomposição dos ácidos aminados	53
5.3 Identificação molecular.....	55
5.3.1 Identificação por PCR e análise de restrição do gene <i>hsp65 in vitro</i> (PRA- <i>sp65</i>).....	55
5.3.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA	56
5.3.3 Sequenciamento do gene <i>hsp65</i>	56
5.3.3.1 Identificação	56
5.3.3.2 Análise de restrição <i>in silico</i>	57
5.4 MALDI-TOF MS.....	61
5.5 Teste de suscetibilidade aos fármacos: concentração inibitória mínima MIC)	62
5.6 Teste de suscetibilidade aos fármacos: Disco difusão	72
7 DISCUSSÃO	74
8 CONCLUSÕES	85

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
10 ANEXOS	96

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AAR	Álcool-ácido resistente
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ACA	Amoxicilina-ácido clavulânico
AK	Amicacina
BLAST	Basic Local Alignment
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC	Controle de Crescimento da Cepa
CIP	Ciprofloxacina
CM	Controle de Esterilidade do Meio
CIM	Concentração inibitória mínima
CLA	Claritromicina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FOX	Ceftriaxona
Gram	Coloração de Gram
HIV	Human immunodeficiency virus
IMP	Imipenem
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LZ	Linezolid
MALDI-TOF MS	Matrix-associated laser desorption mass spectrometry
MF	Moxifloxacina
MH	Mueller-Hinton cátion ajustado
mL	Mililitro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
ng	Nanograma
PRA	PCR-restriction enzyme analysis
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
rRNA	RNA ribossomal
SNC	Sistema nervoso central
SFT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TC	Tomografia computadorizada
Tris	Tris hidroxiaminometano
μL	Microlitro

U/mL	Unidade por mililitro
μM	Micromolar
<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
\pm	Mais ou menos

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema de preparo de placa para MIC com a concentração final de cada droga em ug/ml. CC: Controle de Crescimento da Cepa; CM: Controle de Esterilidade do Meio; AK: amicacina; CIP: ciprofloxacina; MIN: minociclina; TOB: tobramicina; ACA: amoxicilina-ácido clavulânico; IMP: imipenem; SFT: sulfametoxazol- trimetoprim.....46
- Figura 2** - Aspectos macromorfológicos do crescimento dos isolados em meio ágar Sabouraud. A: Cerebriforme e salmão; B: Cerebriforme e creme; C: Seca e amarela; D: Cerebriforme e laranja; E: Cerebriforme, seca e branca; F: Micobactéria com colônias cerebriformes e creme.....49
- Figura 3** - Análise microscópica de isolados de: A) *Nocardia* sp. e B) *Mycobacterium kansasii* corados pelo método de Ziehl Neelsen (aumento de 100x).....50
- Figura 4** - Análise microscópica do microcultivo de isolados de *Nocardia* sp. corados pelo método de Ziehl Neelsen (aumento de 100x).....50
- Figura 5** - Prova da resistência a lisozima. A: Controle negativo, B: Controle positivo (*Nocardia* sp.), C: isolado 544.....51
- Figura 6** - Prova da hidrólise da uréia. A: amostra positiva (rósea); B: amostra negativa (amarela).....52
- Figura 7** - Prova da decomposição da esculina. A: Controle negativo; B isolados com resultado positivo, apresentando o escurecimento do meio.....52
- Figura 8** - Prova de hidrólise de hipoxantina. A: amostra negativa; B: amostra positiva (possui halo de degradação)53
- Figura 9** - Prova da hidrólise da xantina. A: amostra negativa; B: amostra positiva (possui halo de degradação)53
- Figura 10** - Prova de hidrólise de tirosina. A: amostra negativa; B: amostra positiva (possui halo de degradação)54
- Figura 11** - Prova de hidrólise de caseína. A: amostra negativa; B: amostra positiva (possui halo de degradação)54
- Figura 12** - Perfil de restrição dos isolados digeridos com as enzimas *BstEII* e *HaeIII*, submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%.....55
- Figura 13** - Perfil de restrição dos isolados digeridos com as enzimas *MspI* e *HinfI*, submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%.....55

- Figura 14** - Perfil de restrição dos isolados digeridos com a enzima *Bsa*HI e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%.....56
- Figura 15** - Placas inoculadas e com crescimento de *Nocardia* sp. pelo teste de MIC (Concentração Inibitória Mínima) **A:** leitura visual **B:** leitura com resazurina.63
- Figura 16** - Algoritmo de identificação de *Nocardia* sp. com a utilização dos métodos mais eficientes na diferenciação de espécies desse gênero73

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Algoritmo de perfis de PRA- <i>hsp65</i> elaborado a partir de seqüências depositadas no Genbank e cortadas <i>in silico</i> e de perfis descritos em literatura.....	40
Tabela 2 - Comparação entre os resultados de identificação molecular obtidos nas análises das diferentes técnicas empregadas no presente estudo.....	57
Tabela 3 - Resultados de identificação dos isolados com resultados concordantes, submetidos ao sequenciamento dos genes <i>hsp65</i> , 16S rRNA, identificação por MALDI-TOF MS e PRA- <i>hsp65</i>	58
Tabela 4 - Resultados de identificação dos 72 isolados submetidos ao sequenciamento dos genes <i>hsp65</i> , 16S rRNA, identificação por MALDI-TOF MS e PRA- <i>hsp65</i>	59
Tabela 5 - Número de isolados com resultados de MIC discordantes entre a leitura visual e com resazurina, por fármaco testado.....	63
Tabela 6 - Resultados dos testes de suscetibilidade a fármacos pelo método MIC em isolados identificados como <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. otitidiscaviarum</i> e <i>N. cyriacigeorgica</i>	64
Tabela 7 - Perfil de suscetibilidade dos 50 isolados de <i>Nocardia</i> spp. testados pelo método de Concentração inibitória mínima (MIC).....	65
Tabela 8 - Resultados obtidos em 50 isolados de <i>Nocardia</i> sp. nos testes de suscetibilidade aos fármacos pelos métodos de concentração inibitória mínima.....	65
Tabela 9 - Perfil de suscetibilidade dos 50 isolados de <i>Nocardia</i> spp. testados pelo método de Disco Difusão.....	68
Tabela 10 - Resultados dos testes de suscetibilidade a fármacos pelo método de Disco Difusão em isolados identificados como <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. otitidiscaviarum</i> e <i>N. cyriacigeorgica</i>	69
Tabela 11 - Resultados obtidos em 50 isolados de <i>Nocardia</i> sp. nos testes de suscetibilidade aos fármacos pelos métodos disco difusão.....	70
Quadro 1 - Critérios interpretativos para teste de disco difusão de bactérias gram negativas ^a e gram positivas ^b e consenso utilizado para categorização dos isolados de <i>Nocardia</i> spp.	68

RESUMO

Muricy ECM. Caracterização fenotípica e molecular de isolados do gênero *Nocardia* e proposição de algoritmo de identificação. (Dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2015.

O gênero *Nocardia* é composto por bactérias gram-positivas e filamentosas, que normalmente só causam doença em indivíduos imunocomprometidos. No entanto, certo número de infecções por nocardia têm sido relatados em pacientes imunocompetentes. Nos últimos anos, observou-se um aumento da frequência de infecções por *Nocardia* spp. e, com o aumento do número de espécies descritas, a identificação correta tem sido de difícil obtenção mas de grande importância para a aplicação do tratamento correto e elucidação epidemiológica. O objetivo deste estudo foi caracterizar, por métodos fenotípicos e moleculares, 72 isolados de *Nocardia* spp. de interesse médico, avaliando as metodologias para elaborar um algoritmo de identificação. Os isolados foram provenientes da Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e da rotina do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz. Os isolados foram identificados por testes fenotípicos, identificação molecular por análise de restrição (PRA-*hsp65*), sequenciamento dos genes *hsp65* e 16S rRNA e MALDI-TOF MS (Matrix-associated laser desorption time of flight mass spectrometry). O perfil de suscetibilidade foi analisado pelo método de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e disco difusão (DD), com os fármacos: amicacina, ciprofloxacina, minociclina, tobramicina, amoxicilina+ácido clavulânico, imipenem e sulfametoxazol+trimetoprim. Os resultados revelaram que a identificação fenotípica foi insuficiente para definir as espécies. Apenas 24 (33,4%) isolados tiveram identificação fenotípica concordante com o sequenciamento do gene 16S rRNA. Na análise feita pela técnica de PRA-*hsp65* foram observados 20 (27,8%) *N. brasiliensis*, seis (8,3%) isolados de outras espécies de nocardias e 38 (52,8%) foram considerados novos padrões (NP). Foi detectado um isolado misto e em cinco isolados não foi obtido produto de amplificação. O sequenciamento do gene *hsp65* proporcionou a identificação de 51 isolados como *Nocardia*, 14 foram identificados como pertencentes a outros gêneros, dos quais, um apresentou mistura

de nocardia e micobactéria, sendo identificado como *Mycobacterium abscessus* no gene *hsp65* (análise *in silico*) e *N. otitidiscaviarum* no gene 16S rRNA. Sete isolados não foram sequenciados devido à ausência de amplificação do fragmento. Os isolados analisados através do sequenciamento do gene 16S rRNA, foram identificados como *Nocardia* (57-79,2%), *Gordonia* (7-9,7%), *Rhodococcus* (3-4,2%), *Tsukamurella* (2-2,8%), *Mycobacterium* (2-2,8%) e *Streptomyces* (1-1,3%). Para a análise de MALDI-TOF MS foi observado que, dos 72 isolados estudados, 49 foram identificados como *Nocardia*, 11 como pertencentes a outros gêneros e 12 amostras não puderam ser identificadas devido aos valores de leitura não serem adequados para análise. Pela primeira vez o corante resazurina foi utilizado para leitura de MIC de *Nocardia* sp. Entre os fármacos testados através do MIC, os que apresentaram maior sensibilidade foram amicacina (100%) e tobramicina (84%). As maiores resistências foram encontradas com os fármacos sulfametoxazol+trimetoprim (76%) e imipenem (54%). Devido à ausência de critérios interpretativos de disco difusão para o gênero *Nocardia*, foi elaborado um critério para o presente estudo. Os resultados obtidos no teste de DD mostraram 100% de sensibilidade para os fármacos amicacina, minociclina e sulfametoxazol+trimetoprim. Os isolados apresentaram a maior porcentagem de resistência ao fármaco ciprofloxacina (64%). Comparando os resultados de DD com os obtidos no MIC, observamos que os fármacos ciprofloxacina, imipenem e sulfametoxazol+trimetoprim apresentaram porcentagem de discordância acima de 20%. O fármaco sulfametoxazol+trimetoprim teve a maior discordância (>75%), com elevada porcentagem de isolados resistentes na MIC, mas baixa porcentagem de resistência em DD. O único fármaco com 100% de concordância entre os resultados foi amicacina. Foi elaborado um algoritmo de identificação que utiliza técnicas fenotípicas para triagem para diferenciar nocardias de outros gêneros. A identificação por PRA-*hsp65* será útil na rotina de laboratório de micobactérias como identificação presuntiva. A identificação definitiva das espécies deve ser obtida pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

Descritores: Nocardiaceae. Fenótipos. Análise de sequência de DNA. Algoritmos

ABSTRACT

Muricy ECM. Phenotypic and molecular characterization of *Nocardia* isolates and proposition of identification algorithm Dissertation. São Paulo. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2015.

The genus *Nocardia* comprises filamentous gram-positive bacteria that usually cause disease only in immunocompromised individuals. However, a number of *Nocardia* infections have been reported in immunocompetent patients. Overall, it has been reported in the recent years an increased frequency of infections caused by *Nocardia* spp. due to an also increasing number of species, making the correct identification of the species more difficult. Correct identification assumes a major importance with respect to antimicrobial treatment's choice as well as for epidemiological investigation purposes. The objective of this study was to characterize by phenotypic and molecular methods 72 isolates of *Nocardia* spp. of medical interest, designing the methodologies for an identification algorithm. The isolates were obtained from the fungal collection of the Tropical Medicine Institute of São Paulo and the routine service of the Tuberculosis and Mycobacteriosis Center of the Adolfo Lutz Institute. The isolates were identified by phenotypic testing, molecular identification by restriction analysis (PRA-*hsp65*), *hsp65* and 16S rRNA genes sequencing, and MALDI-TOF MS (matrix-associated laser desorption time-of-flight mass spectrometry). The susceptibility profile was analyzed by the Minimum Inhibitory Concentration method (MIC) and disk diffusion (DD), with the following drugs: amikacin, ciprofloxacin, minocycline, tobramycin, amoxicillin+ clavulanic acid, imipenem and sulfamethoxazole trimethoprim. The results showed that the phenotypic identification was insufficient to define the species. Only 24 (33.4%) of the isolates had phenotype identification that was concordant with the 16S rRNA gene sequencing. In the analysis made with the PRA-*hsp65* technique were observed 20 (27.8%) *N. brasiliensis* and six (8.3%) isolates from other species of *Nocardia* spp., while 38 isolates (52.8%) were considered as new standards (NP). Also by this technique a mixed isolate was detected and an amplification product was not obtained in five isolates. The *hsp65* gene sequencing provided identification of 51

isolates as *Nocardia*, 14 were identified as belonging to other genera, one of them being identified either as *Mycobacterium abscessus* by *in silico* analysis of the *hsp65* gene and as *N. otitidiscaviarum* by the 16S rRNA gene sequencing. Seven isolates were not sequenced due to the absence of the amplified fragment. The isolates analyzed by 16S rRNA gene sequencing were identified as *Nocardia* (57 to 79.2%), *Gordonia* (7 to 9.7%), *Rhodococcus* (3 to 4.2%), *Tsukamurella* (2-2, 8%), *Mycobacterium* (2 to 2.8%) and *Streptomyces* (1-1.3%). By MALDI-TOF MS analysis of the 72 isolates, 49 were identified as *Nocardia*, 11 were identified as belonging to other genera and 12 isolates could not be identified because the samples provided reading values that were inadequate for analysis. For the first time, to our knowledge, the resazurin dye was used to determine the MICs of *Nocardia* sp. Among the drugs tested, the most sensitives were amikacin (100%) and tobramycin (84%). The higher resistances were found with trimethoprim-sulfamethoxazole (76%) and imipenem (54%). Due to the absence of established criteria for the interpretation of the disk diffusion assay with *Nocardia*, we designed a specific criterion for this study. The results obtained in the DD test showed 100% sensitivity for the drugs amikacin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. The isolates showed the highest percentage of resistance to ciprofloxacin drug (64%). Comparing the results with those obtained with DD and MIC, we observed that ciprofloxacin, imipenem and sulfamethoxazole-trimethoprim showed a percentage of disagreement above 20%. The sulfamethoxazole-trimethoprim drug had the highest discrepancy (> 75%), with high percentage of resistant isolates with MIC but low percentage of resistance in DD. The only drug with 100% agreement between the both results was amikacin. We designed a recognition algorithm using phenotyping techniques to screen and differentiate nocardias from other genera. The identification by PRA-*hsp65* will be useful in routine mycobacteria laboratory as a presumptive identification tool. The final identification of the species should be obtained by sequencing the 16S rRNA gene.

Descriptors: Nocardiaceae. Phenotypic. DNA sequence analysis. Algorithm.

1 INTRODUÇÃO

Os membros do gênero *Nocardia* são microrganismos do grupo dos actinomicetos aeróbios que, apesar de não serem muito frequentes na prática clínica, são considerados importantes patógenos e agentes que causam infecções graves em humanos e animais (McNeil e Brown, 1994). Nos últimos anos observou-se um aumento na frequência de infecções por *Nocardia* spp., afetando principalmente pacientes com deficiência de imunidade, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), em uso de fármacos imunossupressores e receptores de transplante (Shen et al., 2011).

As espécies do gênero *Nocardia*, família Nocardeaceae, possuem características microbiológicas semelhantes às bactérias dos gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium*. O gênero inclui bactérias aeróbicas, Gram positivas, parcialmente álcool-ácido resistentes (AAR) e filamentosas. São organismos saprófitas e cosmopolitas, amplamente distribuídos na natureza; vivem no solo, em vegetais, pó, ar e muitas vezes estão associados à água (Brown e McNeil, 2003; Saubolle e Sussland, 2003).

As principais espécies de *Nocardia* de interesse em saúde pública têm apresentado alterações nos perfis de resistência a antibióticos, como observado para o Complexo *N. asteroides* e *N. brasiliensis*, gerando uma nova classificação taxonômica. Esses complexos estão intimamente relacionados com doença invasiva, em indivíduos que apresentam algum processo de imunossupressão (Kiska et al., 2002; Benes et al., 2003).

Com o advento de técnicas moleculares, a filogenia do gênero *Nocardia* sofreu uma revolução taxonômica, sendo descritas 104 espécies até o momento (<http://www.bacterio.cict.fr/n/nocardia.html>). A presente classificação foi baseada na análise molecular que permitiu definir sua filogenia, por meio do sequenciamento da região conservada do gene 16S rRNA (Brown-Elliott et al., 2006; Uzcátegui-Negrón et al., 2009).

A identificação correta das espécies de *Nocardia* é cada vez mais importante para auxiliar no estabelecimento da melhor estratégia terapêutica, além da sua

importância em termos de virulência e epidemiologia. O principal método de diagnóstico ainda é a detecção da bactéria em esfregaços e o isolamento do agente em meios de cultura. Entretanto, estes métodos, além de demorados, não são suficientes para a identificação das espécies (Glupczynski et al., 2006; Lerner, 1996).

1.1 Histórico

O gênero *Nocardia* foi isolado pela primeira vez em 1888 por Edmond Nocard, de uma lesão bovina, na Ilha de Guadalupe, França (Nocard, 1888). Eppinger (1890) descreveu o primeiro caso documentado de nocardiose em humanos, como “síndrome de pseudotuberculose”, após observar abscessos cerebrais produzidos pelo organismo, também descrito por Nocard, e o nomeou de *Cladothrix asteroides*. No entanto, em 1896 foi renomeado como *Nocardia asteroides*. Devido a essa divergência quanto a sua taxonomia, entre o relato do isolamento por Nocard, bem como à evidência de que causaria lesões nos bovinos, a identificação de *N. farcinica* foi desacreditada (Trevisan, 1889).

Em 1962, Gordon e Mihm (1962), analisaram características morfológicas e bioquímicas de *N. farcinica* e *N. asteroides*, devido ao status taxonômico incerto do gênero. Na época os autores sugeriram à Comissão Internacional de Taxonomia que agrupasse essas duas espécies e, ao agrupar, *N. asteroides* foi escolhido para substituir *N. farcinica*. Porém, a identificação da espécie *N. asteroides* continuou duvidosa. Tanto a taxonomia como a nomenclatura da espécie foram identificadas erroneamente, se comparadas aos padrões atuais. Somente a partir da aplicação de métodos moleculares e testes de suscetibilidade é que a taxonomia de *N. farcinica* foi claramente estabelecida (Gordon e Mihm, 1962).

Em 1909, o dermatologista Adolpho Carlos Lindenberg isolou pela primeira vez, no Brasil, uma amostra de actinomiceto, a partir de lesão no joelho esquerdo de um paciente da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. O microrganismo foi denominado *Discomyces brasilienses* principalmente devido a diferenças morfológicas e fisiológicas entre este isolado e o isolado original de *N. asteroides*,

mas atualmente é classificado como *N. brasiliensis* (Lacaz, 1981).

McNeil et al. (1994), em revisão literária, relataram trabalhos que discutem a heterogeneidade nas espécies de *N. asteroides*, por suas apresentações fenotípicas e genotípicas diferentes, sugerindo a classificação em subgrupos (McNeil et al., 1994).

Estudos realizados no sul dos Estados Unidos mostraram que o grupo mais comum de *N. asteroides*, que não hidrolisa a caseína, tirosina e xantina, corresponde ao mesmo grupo que Wallace et al. (1988), designaram como padrão de drogas tipo VI. Nesse estudo os autores verificaram que o padrão de drogas tipo VI representava cerca de 35% dos isolados clínicos de *N. asteroides* e poderia ser uma escolha para se tornar o novo padrão de *N. asteroides* (Wallace et al., 1988 ; Wallace, 1990).

1.2 Etiologia

As espécies do gênero *Nocardia*, família Nocardeaceae, formam um homogêneo “cluster” do subgrupo Corynebacteriaceae, ordem Actinomycetes. As características morfológicas apresentam hifas aéreas verdadeiras, o que levou, a princípio, a classificar este grupo como pertencente ao reino *Fungi* (Lechevalier, 1990; Goodfellow, 1992).

A ordem dos Actinomycetales foi dividida em grupos não formais (actinoplanetes, maduromycetes, nocadioforme, actinomycetes e streptomycetes) e com o passar do tempo e acúmulo de conhecimento sobre eles, foram sendo classificados com nomes semelhantes. O gênero possui características microbiológicas semelhantes aos gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* (McNeil e Brown, 1994).

1.2 Epidemiologia

Os actinomicetos aeróbios são cosmopolitas e podem ser isolados como componentes saprófitas, tanto em água doce como salgada, bem como no solo, poeira e matéria orgânica em decomposição (Beaman e Beaman, 1994). Portanto, sua distribuição geográfica pode ser dependente das características ambientais (Tan et al., 2010). A incidência de nocardiose em pacientes com AIDS também apresenta variações geográficas, mostrando que os casos ocorrem em maior número em regiões rurais do que em áreas urbanas (Marquez-Diaz e Soto-Ramirez, 1998).

Beaman et al. (1976), relataram a incidência de nocardiose na América do Norte, sendo estimados de 500 a 1.000 novos casos anualmente, principalmente nos Estados Unidos (Beaman et al. 1976).

Em Queensland, Austrália, foram estudados 102 isolados obtidos de 93 pacientes, no período entre 1983 e 1988, dos quais 44,1% eram *N. asteroides*, 34,3% *N. brasiliensis*, 4,9% *N. caviae* e 4,9% *N. transvalensis*, com uma incidência de 0,4/100.000 habitantes (Georghiou e Blacklock, 1992). Em uma região de Madri, Espanha, foram avaliados 43 isolados, dos quais as espécies inicialmente isoladas foram *N. farcinica*, *N. nova*, e *N. asteroides*, com incidência de 0,39/100.000 no período entre 1995 e 1998 e 0,55/100.000 no período entre 2003-2006. Ao final do estudo os autores identificaram *N. cyriacigeorgica* (32,4%), *N. farcinica* (24,3%), *N. otitidiscaviarum* (10,8%), *N. veterana* (8,1%), *N. nova* (5,4%), *N. abscessus* (5,4%), *N. asiatica* (2,7%), *N. beijingensis* (2,7%), *N. brasiliensis* (2,7%), *N. carnea* (2,7%), e outras espécies de *Nocardia* (2,7%) (Mínero et al., 2009). Em Québec, Canadá, foi estimada a incidência de 0,51/100.000 em 2007-2008, a partir dos 575 isolados estudados. Durante o estudo foram isoladas as espécies *N. transvalensis*, *N. brasiliensis*, *N. asteroides*, *N. abscessus*, *N. pseudobrasiliensis* entre outras, das quais as mais frequentes foram *N. nova*, *N. farcinica* e *N. cyriacigeorgica* (Tremblay et al., 2011).

No Brasil, a distribuição geográfica é desconhecida e, como não é uma doença de notificação compulsória, os dados sobre incidência de nocardiose são subestimados. Lacaz (1981) analisou 154 casos de micetoma, no período de 1944 a 1978, todos isolados no Brasil, e observou que 113 casos foram identificados como

actinomicetos. O local mais comum da infecção foram os membros inferiores, além dos pulmões, bexiga, intestino, rins e cérebro. A espécie com maior incidência foi *N. brasiliensis* (Lacaz, 1981).

Chedid et al. (2007), relataram 22 casos de nocardiose causadas por *N. asteroides* e *N. brasiliensis*, no período de 1977 a 1998, isoladas de pacientes da cidade de Porto Alegre com doença pulmonar, sistêmica e disseminada (Chedid et al., 2007). Castro et al. (2008), descreveram 27 micetomas provenientes de pacientes atendidos no período de 1990 a 2000, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo. A maioria dos pacientes era proveniente de áreas rurais do nordeste do país, com a proporção homens: mulheres em 3:1 e média de idade de 48 anos. *N. brasiliensis* foi isolada em três casos e *N. asteroides* em um caso (Castro et al., 2008).

A partir da década de 80 houve um aumento de pacientes imunocomprometidos e, por consequência, ocorreu um aumento no número de infecções por *Nocardia*. Esse aumento deveu-se ao fato do uso de drogas imunossupressoras, pacientes transplantados e infecção pelo HIV (human immunodeficiency virus).

A infecção por *Nocardia* tem sido considerada importante doença oportunista (Dominguez e Anthony, 1999). Em 1980, Curry (1998), revisou 455 casos de nocardiose verificando que 39% dos casos não receberam terapia imunossupressora (Curry, 1980). Entretanto, Menendez et al. (1997) relataram 10 casos de nocardiose pulmonar, dos quais quatro estavam recebendo corticoides e dois tinham infecção pelo HIV. Os autores ainda demonstraram que o uso de fármacos por via intravenosa também foi um fator de risco (Menendez et al., 1997).

Palacios et al. (2001), encontraram uma incidência de nocardiose de 83,3% em pacientes com prescrição de fármacos por via parenteral, demonstrando que o uso contínuo de corticoides pode ser um importante fator de risco para infecções por *Nocardia* (Palacios et al., 2001). Dominguez e Anthony (1999), demonstraram que 58% dos casos de infecção por *Nocardia* ocorreram em hospedeiros imunocompetentes (Dominguez e Anthony, 1999).

1.3 Manifestações Clínicas

Clinicamente as formas mais comuns da nocardiose são a infecção invasiva dos pulmões e a forma disseminada, que pode acometer tanto indivíduos imunocompetentes como imunodeprimidos. Em indivíduos imunocompetentes, em geral, há o acometimento cutâneo inicial, causado principalmente pelas espécies *N. asteroides*, *N. brasiliensis* e *N. otitidiscaviarum* (Menendez et al., 1997; Dominguez e Anthony, 1999; Cross e Bindford, 1962).

A infecção pode evoluir para formas graves e, em cerca de 30% dos casos, esse processo ocorre principalmente no sistema nervoso central (SNC), ou associado à pneumonia, nódulo ou infiltrado pulmonar (Martinez et al., 2007). A via de infecção pode ser a inoculação traumática; entretanto, observa-se que em indivíduos imunocomprometidos muitas vezes o local inicial da infecção é o trato respiratório (McNeil e Brown, 1994).

Beaman e Beaman (1994), classificaram as infecções em humanos, causadas por *Nocardia* sp., como: nocardiose pulmonar; nocardiose sistêmica; nocardiose do Sistema Nervoso Central, nocardiose cutânea e subcutânea e actinomicetoma (Beaman e Beaman, 1994).

1.4.1 Infecções pulmonares

A nocardiose pulmonar pode apresentar-se como aguda, subaguda ou crônica. Não há sinais clínicos específicos. Geralmente ocorre febre alta, tosse produtiva, suor e perda de peso. A infecção pode ocorrer a partir da inalação de partículas infectantes, encontradas no solo, água e material orgânico, que podem se desprender como partículas de pó (Beaman e Beaman, 1994; Schaal, 1992).

As manifestações pulmonares podem variar, desde uma leve infiltração até uma consolidação multilobar. Nesses infiltrados pode ser observada a presença de massas, infiltrados nodulares, nódulos grandes e irregulares. Geralmente o diagnóstico inicial é dado como pneumonia, abscessos, tuberculose ou carcinoma pulmonar. A imagem radiográfica não é suficiente para o diagnóstico, podendo

mostrar nódulos, massas irregulares ou abscessos múltiplos e até mesmo infiltrados no lobo superior, confundindo muitas vezes com uma tuberculose (Lerner, 1996; Presant et al., 1993, Rubin e Shin, 1984).

Raramente a *Nocardia* invade cavidades pulmonares, produzindo assim aparência de "bolas fúngicas". Em 80% dos pacientes, a tomografia computadorizada (TC) revela a presença de nódulos ou massas que às vezes apresentam uma reação granulomatosa com necrose central, fatores de confusão com tuberculose ou histoplasmose (Lerner, 1996).

A doença ocorre com mais frequência em indivíduos imunocomprometidos (McNeil e Brown, 1994; Long, 1994). Alguns pacientes com nocardiose pulmonar podem ser acometidos por outras doenças de base como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, sarcoidose crônica ou terem sido tratados por longo tempo com altas doses de corticóides (Saubolle e Sussland, 1993).

Pacientes transplantados, portadores de lúpus, doença granulomatosa crônica, alcoolismo, diabetes e com infecção pelo HIV também são mais susceptíveis às infecções pulmonares (McNeil e Brown, 1994; Chapman e Wilson, 1990; Dorman et al., 2002; Kageyama et al., 2004; Moylett et al., 2003).

O diagnóstico diferencial inclui geralmente tuberculose pulmonar, infecção por *Rhodococcus equi*, HIV ou pneumonia fúngica, principalmente causado por *Aspergillus* (Filice, 2001).

1.4.2 Infecções sistêmicas

A infecção, seja respiratória ou cutânea, pode se espalhar e levar a uma forma extrapulmonar da doença. A presença de lesões em dois ou mais órgãos define a doença como sistêmica ou disseminada. Os locais mais comuns de disseminação incluem o SNC, pele, tecidos subcutâneos, rins, articulações, ossos e até o coração (McNeil e Brown, 1994; Lerner, 1996). Os pacientes com maior risco de desenvolver infecções disseminadas são imunocomprometidos com HIV ou transplantados renais (Braun, 1991).

O comprometimento ocular também tem sido descrito como consequência traumática e inclui desde lesões superficiais até retinite e endoftalmite (McNeil e

Brown, 1994). No período de 2006 a 2008, Reddy et al. (2010), isolaram 20 espécies de *Nocardia* de pacientes com nocardiose ocular, sendo *N. levis* a espécie mais isolada (35%) além de *N. farcinica*, *N. abscessus*, *N. brasiliensis*, *N. amamiensis*, *N. puris*, *N. beijingensis*, *N. otitidiscaviarum* e *N. thailandica*. Este trabalho mostrou que, além das principais espécies causadoras de infecção ocular, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica* e *N. otitidiscaviarum* também podem ocasionar graves lesões (Reddy et al., 2010).

Segundo Beaman e Beaman (1994), em uma revisão de 71 casos de nocardiose no período entre 1984 a 1992, os locais mais comuns da infecção eram os pulmões (51,3%) e o cérebro (11,7%), mostrando também que a nocardiose cerebral pode ocorrer em pacientes com AIDS (Beaman e Beaman, 1994).

1.4.3 Infecções do sistema nervoso central (SNC)

A nocardiose do SNC é geralmente diagnosticada após o desenvolvimento de *déficits* neurológicos focais, podendo se manifestar como meningoencefalite aguda. Alguns estudos demonstraram que em mais de 40% dos casos de nocardiose sistêmica, 22,7% tem envolvimento do SNC, sendo o pulmão o local primário de infecção. Entretanto, em 38,2% dos casos, a infecção primária ocorreu no SNC (Beaman e Beaman, 1994).

Beaman e Beaman (1994), observaram que as infecções do SNC tendem a ser mais destrutivas e rapidamente progressivas em indivíduos imunocomprometidos do que em pacientes imunocompetentes, cujas infecções são lentamente progressivas. Paciente que apresenta sintomatologia mínima no quadro neurológico pode ser tratado com antibióticos. No entanto, na maioria dos casos, a excisão cirúrgica é necessária e o agente causal é *N. asteroides*, embora outras espécies tenham sido relatadas (Lerner, 1996).

Mamelak et al. (1994), relataram 11 casos de nocardiose no SNC, com uma taxa de mortalidade de 33% em pacientes com um abscesso e 66% com múltiplos abscessos (Mamelak et al., 1994).

1.4.4 Infecções cutâneas

A nocardiose cutânea e subcutânea representa 25% dos casos, e pode ocorrer por meio de punção ou introdução traumática de *Nocardia* spp.. Isto geralmente ocorre por espinho, farpas de madeira, picada de insetos e arranhões de animais, onde a integridade da pele é violada. Devido à presença da bactéria no solo, esse tipo de contaminação no homem é muito comum (McNeil e Brown, 1994; Sahathevan et al., 1991). Outro tipo de manifestação cutânea pode ocorrer em decorrência da doença disseminada (Dodiuk-Gad et al., 2010).

A nocardiose cutânea, ao contrário da infecção pulmonar, invasiva e disseminada que afetam principalmente pacientes imunocomprometidos, acomete principalmente indivíduos imunocompetentes. Os principais agentes etiológicos são *N. asteroides*, *N. brasiliensis* e *N. otitidiscaviarum*, sendo *N. brasiliensis* predominante nesta infecção (Smego e Gallis, 1984).

1.4.5 Micetoma

Micotoma é uma doença crônica causada por uma variedade de fungos e actinomicetos (Lechevalier, 1989 e Lacaz, 1985). O termo micetoma foi designado por Carter em 1861, para tumores produzidos por fungos. A presença de grânulos é sinal do micetoma, que são colônias do microrganismo. A doença evolui progressivamente e provoca infecção da pele, tecido subcutâneo, músculos e ossos, onde os principais locais de traumatismo são a mão, braço, perna e pé (Lechevalier, 1989 e Lacaz, 1985).

Os micetomas podem ser cutâneos ou subcutâneos, contendo granulomas supurativos e produzindo uma área de inchaço, muitas vezes indolor, que geralmente envolve os membros inferiores e é caracterizada por tumefação. Após a inoculação do agente, seguido de trauma localizado, a infecção torna-se crônica com forma de tumor e com o tempo ocorre deformação da região (Mahgoub et al., 1995).

A maioria dos casos de actinomicetomas é causada por *Nocardia* sp. No entanto, isolados do gênero *Actinomadura* também são relatados. O agente etiológico

mais isolado é *N. brasiliensis*, mas existem relatos de *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* e *N. transvalensis* (Lechevalier, 1989; Lacaz, 1981).

1.4 Diagnóstico da infecção e identificação

O diagnóstico dos actinomicetos é inicialmente realizado pela visualização microscópica de grânulos actinomicóticos ou de filamentos em material biológico, tais como lavados brônquicos, escarros, secreções de abscessos, material drenado de lesão tecidual, biópsia e líquido cefalorraquidiano. O gênero *Nocardia* não produz grãos compactos, sendo estes morfologicamente frouxos, com a presença de filamentos formados por cocos e bacilos, que se fragmentam. Uma característica importante desta espécie estritamente aeróbica é ser gram-positiva e parcialmente álcool-ácido resistente (Lechevalier, 1990; Goodfellow, 1992).

Sinais, sintomas e estudos radiológicos podem sugerir o diagnóstico, porém o diagnóstico só pode ser confirmado após uma avaliação adequada das amostras no esfregaço e cultura (Cross e Bindford, 1962).

As técnicas de coloração de Gram e de Kinyoun modificado são as técnicas mais comuns para a identificação de *Nocardia* (Berd, 1993). No entanto, a coloração de Ziehl Neelsen também pode ser utilizada para visualização do microrganismo, assim como ela é executada para microscopia de micobactérias (Berd, 1993; Muricy et al., 2014).

1.5.1 Métodos fenotípicos

Microscopicamente, os microrganismos do gênero *Nocardia* são Gram-positivos, parcialmente álcool-ácido resistentes, apresentando filamentos ramificados. Em geral, as colônias têm uma aparência branca ou cotonosa devido à presença de abundantes filamentos aéreos. As espécies de nocardia crescem na maioria dos meios seletivos mas também crescem em meios usados rotineiramente para cultura de bactérias, fungos e micobactérias (Ashdown, 1990; Muricy et al., 2014). O crescimento das colônias pode variar de 48 horas a quatro semanas, mas

podem ser rotineiramente observadas após três a sete dias (Shawar et al., 1990).

Após o isolamento do microrganismo, vários testes podem ser usados para diferenciar as espécies e diferenciar o gênero *Nocardia* de outros gêneros, como *Mycobacterium* sp. que pode apresentar características similares (Laurent et al., 1999). A identificação normalmente é baseada na análise morfológica e bioquímica. A análise bioquímica baseia-se nas provas de decomposição da caseína, xantina, hipoxantina, tirosina, hipurato de sódio, esculina e uréia. As provas de produção de ácidos a partir de carboidratos (arabinose, frutose, galactose, inositol, lactose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose e xilose) também podem ser utilizadas assim como o teste de resistência à lisozima, que é importante para diferenciar o gênero dos demais actinomicetos (Berd, 1993). Entretanto, para uma identificação precisa, faz-se necessária a utilização de técnicas moleculares.

1.5.2 Métodos moleculares

Como os métodos tradicionais de identificação fenotípica revelam resultados inconsistentes, sendo incapazes de diferenciar todas as espécies do gênero, as técnicas moleculares têm sido consideradas de extrema importância na determinação das mesmas (Brown-Elliot et al., 2006).

Segundo Brown-Elliot et al. (2006), os métodos moleculares têm tido um enorme impacto sobre a taxonomia de *Nocardia*. Nos últimos anos ocorreu uma revolução taxonômica no gênero *Nocardia* spp., com a descrição de várias novas espécies (Cloud et al., 2004).

A partir da análise de sequências gênicas foi possível identificar e ter uma maior compreensão do gênero *Nocardia* e organismos relacionados. A utilização de tais técnicas resultou no reconhecimento de muitas novas espécies (Brown-Elliot et al., 2006). A análise molecular por meio da técnica de PCR-RFLP ou em combinação com outros métodos moleculares tem sido utilizada como uma das principais técnicas moleculares para caracterização de isolados pertencentes ao gênero *Nocardia* ou para a identificação de novas espécies (Brown-Elliot et al., 2006).

A aplicação bem sucedida de protocolos para diferenciação rápida das espécies de micobactérias foi demonstrada por Telenti et al. (1993). Estes autores utilizaram a amplificação de um fragmento de 441pb do gene *hsp65* seguida de restrição enzimática, denominada técnica de PRA, do inglês polymerase chain reaction and restriction analysis, metodologia esta que tem sido mundialmente aceita por sua aplicabilidade (Cloud et al., 2004). Esta técnica foi ampliada pelo estudo de Chimara et al. (2008), e, atualmente, é possível realizar a identificação de 117 espécies de micobactérias, dentre as 172 descritas até o momento (Chimara et al., 2008). A utilização deste método foi expandida e, atualmente, outros actinomicetos também podem ser identificados pelo PRA (Chang et al., 2007; Rodríguez-Nava et al., 2006; Wilson et al., 1998; Steingrube et al., 1997). De acordo com o estudo de Moraes et al. (2008), a utilização desta técnica na rotina de identificação de micobactérias permitiu a correta identificação de *Nocardia* em um isolado, mostrando a utilidade da técnica na separação de gêneros com características microscópicas semelhantes (Moraes et al., 2008).

A utilização do sequenciamento do gene 16S rRNA proporcionou uma melhor classificação do gênero e por isso é utilizado como padrão ouro na identificação de *Nocardia*. Woo et al. (2008) e Wauters et al. (2005), estudaram um grande número de amostras clínicas para identificação das espécies por sequenciamento do gene 16S rRNA. Neste estudo, foram identificados 86 isolados de *Nocardia*, sendo eles: *N. farcinica* (44%), *N. nova* (22%), *N. cyriacigeorgica* (15%), *N. brasiliensis* (6,9%) e *N. abscessus* (5,8%) (Woo et al., 2008; Wauters et al., 2005).

Em laboratórios com estrutura para o diagnóstico molecular, a técnica fornece a identificação rápida e confiável da maioria dos isolados de *Nocardia* (Wauters et al., 2005). No entanto, alguns autores mostraram que a identificação utilizando o gene 16S rRNA pode resultar em uma identidade errônea para algumas espécies (Brown-Elliott et al., 2006; McTaggart et al., 2010).

1.5.3 MALDI-TOF MS

A técnica de identificação por espectrometria de massa (Matrix-associated laser desorption time of flight mass spectrometry - MALDI-TOF MS) tem sido apresentada como uma ferramenta eficiente para identificação de microrganismos. MALDI-TOF MS pode analisar a composição de proteínas de uma célula bacteriana por meio da comparação do tamanho de peptídeos e pequenas proteínas, que são característicos para cada espécie bacteriana, permitindo a identificação ao nível de espécie em alguns minutos (Saleeb et al., 2011).

Seng et al. (2009), demonstraram a utilização e importância de MALDI-TOF MS como ferramenta de identificação para organismos de crescimento lento, como *Nocardia*, uma vez que a identificação destas espécies por testes convencionais é demorada e difícil. No entanto, existem alguns fatores limitantes no uso desta técnica para a identificação de nocardia. Um dos fatores é o limitado banco de dados de referência, que possui um pequeno número de padrões e poucas espécies com mais de um padrão. Outra limitação está no protocolo de extração (Seng et al., 2009).

1.5.4 Teste de suscetibilidade

O teste de suscetibilidade *in vitro* recomendado para isolados de *Nocardia* é o de Concentração Inibitória Mínima (MIC) pela metodologia de microdiluição em caldo a partir do crescimento dos isolados em caldo Mueller Hinton cátion ajustado (Wayne, 2003; Brown e Wallace, 1992; CLSI, 2011).

Para o teste de suscetibilidade com *Nocardia*, os fármacos recomendados são: amicacina, ciprofloxacina, claritromicina, minociclina, tobramicina, amoxicilina-ácido-clavulânico, ceftriaxona, imipenem, moxifloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol e linezolida (CLSI, 2011).

O método de disco difusão ainda é muito utilizado por diversos laboratórios clínicos, porém é um teste de difícil leitura e sua interpretação é variável, uma vez que não existe padronização nos valores de corte (Wallace et al., 1988; Wallace et

al., 1977). A literatura mostra a utilização de diferentes critérios interpretativos na leitura dos testes, inviabilizando a comparação de resultados para avaliação dos valores de referência (Wallace et al., 1977).

Antes da recomendação do CLSI ao uso do MIC como teste de suscetibilidade para *Nocardia*, outros métodos foram avaliados, incluindo ágar diluição e Etest. Biehle et al. (1994), mostraram a importância da padronização do inóculo e a utilização precisa de critérios de interpretação, incluindo a interpretação da leitura após 72 horas de incubação (Biehle et al., 1994). Os autores ressaltaram a necessidade de padronização do Etest, um método alternativo para *Nocardia*, e a necessidade de experiência na realização e interpretação dos resultados (Biehle et al., 1994).

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Nos últimos anos, observou-se um aumento da frequência de infecções por *Nocardia* spp., passando a ser um problema de Saúde Pública. As principais espécies de *Nocardia* de interesse clínico têm apresentado crescente resistência a antibióticos, como observado para o “Complexo *N. asteroides*” e *N. brasiliensis*, gerando uma nova classificação taxonômica. Estes complexos estão intimamente relacionados com doença invasiva, em indivíduos que apresentam algum processo de imunossupressão (Kiska et al., 2002; Benes et al., 2003).

Até o presente momento, foram descritas e aceitas 103 espécies de *Nocardia* das quais 66,3% foram descritas a partir do ano 2000. Este grande número de espécies, recentemente descritas, não possui todos os estudos de taxonomia numérica necessários para a elaboração de tabelas de identificação fenotípica. Devido à natureza não reativa de algumas espécies e a dificuldade de identificar pelos métodos bioquímicos clássicos, dadas às deficiências que as tabelas de identificação apresentam atualmente, a identificação das mesmas utilizando apenas estes métodos não permite uma identificação confiável. A identificação é de grande importância para a aplicação do tratamento correto e elucidação epidemiológica, bem como para verificação dos perfis mais comuns em nosso meio para propor ações de prevenção.

Existem muitas metodologias para serem utilizadas na identificação das espécies pertencentes ao gênero *Nocardia*. No entanto, cada uma possui sua limitação e a utilização de apenas um método não permite a completa elucidação das espécies presentes em nosso país. Uma vez que, para chegar à identificação conclusiva faz-se necessário o emprego de diferentes métodos, a obtenção de um algoritmo de identificação padronizado é ferramenta imprescindível para o sucesso diagnóstico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar por métodos fenotípicos e moleculares, isolados de *Nocardia* spp., mantidos na micoteca do Laboratório de Micologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e no Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz, para elaboração de um algoritmo de identificação.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificação bioquímica dos isolados de *Nocardia* spp.;
- b) Identificação molecular dos isolados pelo método PRA-*hsp65*;
- c) Sequenciamento do fragmento do gene *hsp65* de todos os isolados;
- d) Comparação do tamanho das bandas de cada perfil obtido pelo método PRA-*hsp65* com a simulação do corte das sequências obtidas;
- e) Sequenciamento do fragmento do gene 16S rRNA de todos os isolados (padeão Ouro);
- f) Identificação dos Isolados pelo método de MALDI-TOF MS;
- g) Caracterização dos isolados quanto ao padrão de susceptibilidade aos fármacos;
- h) Elaboração de um algoritmo de identificação a partir da avaliação de todas as técnicas empregadas para caracterização dos isolados e armazenamento destes como cepas nas referidas micotecas dos Institutos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (N° CPE-IMT 2010/085) e pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (CTC n°. 072D-2010) – ANEXO I

Foram selecionados para o estudo 72 isolados de *Nocardia* de interesse médico, 51 da Micoteca do Laboratório do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e 21 isolados de material clínico da rotina do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do IAL. Dois isolados foram descartados devido à presença de contaminantes após repique nos meios testes.

Os métodos também foram avaliados em cepas da Coleção de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, a saber: *Nocardia asteroides* (IAL 2124 e IAL 2125), *Nocardia brevicatena* (IAL 2123).

4.2 Micromorfologia dos isolados

A análise microscópica dos isolados foi realizada pelo esfregaço em lâmina corada pelo método de Ziehl-Neelsen. Também foi feito o microcultivo dos isolados, pelo método Kawate, no meio seletivo de agar Bennett. Os isolados também foram corados pelo método Ziehl-Neelsen, para observar presença ou ausência de filamento aéreo, características de álcool-ácido resistência (AAR) e fragmentação (Berd, 1993).

4.3 Provas bioquímicas

4.3.1 Resistência à lisozima

A resistência à lisozima diferencia o gênero *Nocardia* de outros actinomicetos aeróbicos (Berd, 1993). Para a realização desta prova, foram feitas duas soluções: Solução A - caldo glicerol (5 g de peptona; 70 ml de glicerol; 1000 ml de água

destilada) e solução B - liozima (100 mg de liozima em 100 ml de 0,01 N de ácido clorídrico esterilizado por filtração). As soluções foram feitas separadamente e, após serem esterilizadas em autoclave, foi adicionado ao caldo de glicerol 5 ml da solução de liozima. Foram produzidos tubos controles da solução A para comparar o crescimento bacteriano na solução com e sem liozima. Os isolados foram inoculados nos tubos e a leitura da técnica foi feita semanalmente por quatro semanas, observando a ocorrência de crescimento nas soluções teste e apenas a presença do inóculo no tubo controle negativo. Foi utilizado como controle negativo um inóculo de isolado de *Streptomyces* spp., uma vez que este actinomiceto não é resistente a liozima. Na ocorrência de crescimento no tubo controle negativo, os meios foram descartados e o teste repetido. Os resultados foram considerados positivos quando observado crescimento nos tubos com e sem liozima e considerados negativos na ausência de crescimento no tubo com o caldo contendo liozima (Berd, 1993).

4.3.2 Esculina

Para a decomposição da esculina foi feito um caldo de esculina (1 g de esculina; 0,5 g de citrato férrico; 10 g de peptona; 5 g NaCl e 1000 ml Água destilada). O caldo foi esterilizado em autoclave e distribuído em tubos. Tubos controles de crescimento foram preparados, adicionando apenas o caldo com a mesma base sem esculina. Foi inoculada uma alçada de crescimento bacteriano nos tubos com a esculina e nos tubos controle. A leitura foi feita semanalmente por quatro semanas, observando se havia ou não o escurecimento do caldo. Foram considerados positivos quando houve escurecimento do meio (Berd, 1993).

4.3.3 Análise de decomposição dos ácidos aminados

Para observar a decomposição dos ácidos aminados (xantina, hipoxantina e tirosina) foi feita uma suspensão (0,4 g de tirosina ou hipoxantina ou 0,4 g de xantina em 10 ml de água destilada para cada aminoácido). Esta suspensão foi misturada com 100 ml de um meio contendo 5 g de peptona; 3 g de extrato de carne; 15 g de ágar, 1000 ml de água destilada. Os meios foram esterilizados em autoclave separadamente, misturados a uma temperatura de 40°C e em seguida distribuídos em placas de Petri. Uma alçada de massa bacteriana foi inoculada na placa e a seguir as placas foram incubadas a 35°C. A leitura foi feita semanalmente por quatro semanas para hipoxantina e tirosina e três semanas para xantina. O desaparecimento dos grânulos da hipoxantina e tirosina, presentes no meio foram interpretados como resultados positivos e os isolados que apresentaram um halo de degradação foram considerados positivos para xantina (Berd, 1993).

Para a decomposição de caseína foi utilizada uma solução (10 g de leite em pó desnatado, em 100 ml de água destilada) e um meio (2 g de ágar em 100 ml de água destilada). Estes foram esterilizados em autoclave separadamente e misturados de forma asséptica sob uma temperatura de 40°C. Os isolados foram inoculados nas placas e a seguir foram incubados a 35°C por sete dias (Mahgoub et al., 1995). Os isolados que apresentaram um clareamento do meio ao redor do crescimento bacteriano, produzindo um halo, foram considerados positivos.

4.3.4 Hidrólise da ureia

O meio de ureia foi preparado dissolvendo-se 1,0 g de peptona, 5,0 g de cloreto de sódio, 2,0 g de fosfato de potássio, 12 mg de vermelho de fenol em 1000 mL de água destilada e 20 g de ágar. 4,5 ml de meio foram distribuídos em tubos e os mesmos foram esterilizados em autoclave. Os tubos foram retirados e no momento em que estavam a uma temperatura entre 60-70°C foram acrescentados 0,5 mL de uma solução de ureia a 20%, em cada tubo, homogeneizando bem, e deixando em

repouso até solidificar. Os isolados foram inoculados em tubos com meio de ureia e deixados a temperatura ambiente de dois a três dias para observar mudança de pH (Berd, 1993). Foram considerados positivos os isolados que obtiveram mudança de cor do meio. A cor original do meio é amarelo, porém ao haver a mudança do pH, o mesmo passa a uma coloração de tonalidade rósea intensa.

4.4 Identificação Molecular

4.4.1 Construção de algoritmo de identificação

Para identificar os isolados pela técnica de PRA-*hsp65* foi construído um algoritmo com base em algoritmos descritos na literatura (Rodríguez-Nava et al., 2006; Steingrube et al., 1997) e em sequências depositadas no banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Todas as sequências de *Nocardia* depositadas no Genbank foram analisadas com auxílio do programa BioEdit versão 7.0.9.0. As sequências foram importadas e alinhadas com os oligonucleotídeos iniciadores Tb11 e Tb12 para determinar as extremidades 3' e 5' do fragmento de 441pb (Telenti et al., 1993). As sequências foram analisadas com a ferramenta de restrição enzimática após a seleção das enzimas BstEII, MspI, HinfI, HaeIII e BsaHI. O tamanho dos fragmentos gerados pelo corte enzimático foi calculado utilizando o tamanho inicial de 441pb e subtraindo a posição do último fragmento. O valor total da subtração corresponde ao tamanho da banda. Esse cálculo foi realizado com todos os pontos de corte obtidos em cada enzima testada para cada espécie obtida no Genbank (Telenti et al., 1993).

Os perfis obtidos da análise de restrição das sequências depositadas no Genbank foram inseridos em banco Microsoft Excel, juntamente com os perfis descritos na literatura (Chang et al., 2007; Rodríguez-Nava et al., 2006; Wilson et al., 1998). Perfis de uma mesma espécie foram comparados e, se fossem iguais, o perfil mais completo (contendo as informações sobre o maior número de enzimas) foi considerado padrão. Espécies com mais de um perfil foram numeradas, de modo que cada número contemplasse um perfil. A **Tabela 1** mostra o algoritmo obtido e utilizado nas análises.

Tabela 1. Algoritmo de perfis de PRA-*hsp65* elaborado a partir de seqüências depositadas no Genbank e cortadas *in silico* e de perfis descritos em literatura.

BstEII	MspI	HinfI	HaeIII	BsaHI	Espécie	Referencia	Autor	N. acesso		
440	130/110/70	440	160/100/70/60	305/70/60	N. africana	DSM44491	Genbank	AY756512		
					N. aobensis	IFM0372	Genbank	DQ789024		
					N. brevicatena 2	ATCC15725	Genbank	DQ789018		
					N. nova 2	ATCC10904	Genbank	DQ789011		
	130/110/70/60	250/190	180/100/90	305/70/60	N. kruczkiae	ATCCBAA948	Genbank	DQ789012		
					N. veterana	DSM44445	Genbank	AY756538		
					N. pneumoniae		RodriguezNava2006			
	130/110/70/60	250/190	180/100/90	305/70/60	N. vermiculata	IFM0391	Genbank	DQ789002		
	145/115-110/70	260/190			N. mexicana		RodriguezNava2006			
	150/145/115-120	310/120-130			N. tenerifensis		RodriguezNava2006			
	180/130	250/190	160/90/60	380/60	N. pseudobrasiliensis	DSM44290	Genbank	AY756530		
	180/130/115	440	140/100/80	340/60	N. higoensis	IFM10084	Genbank	DQ789013		
			160/100/80	185/80/70/60	N. carnea 2	ATCC35163	Genbank	DQ789017		
	180/130/120	440	160/100/80	185/80/70/60	N. vinacea	JCM10988	Genbank	AY756539		
					N. asteroides 7	ATCC43746	Genbank	DQ789021		
					N. asteroides 3	ATCC19247	Genbank	AY756513		
					N. cyriaciageorgica	DSM44484	Genbank	AY756522		
	180/145/120	440	180/80/60	185/80/70/60	N. abscessus	DSM44432	Genbank	AY544983		
					N. thailandica	IFM10145	Genbank	DQ789006		
					N. farcinica 1	ATCC23825	Genbank	DQ789014		
N. brevicatena 1					DSM43024	Genbank	AY756517			
N. nova 1					ATCC33727	Genbank	DQ789010			
N. paucivorans					DSM44386	Genbank	AY756529			
N. araoensis						RodriguezNava2006				
N. asiatica						RodriguezNava2006				
N. neocaledoniensis						RodriguezNava2006				
N. puris						RodriguezNava2006				
440	250/190	180/115/100	270/70/60	N. carnea 1	DSM43397	Genbank	AY756518			
				N. flavorosea	JCM3332	Genbank	AY756524			
				N. uniformis	JCM3224	Genbank	AY756536			
				N. sienata	IFM10088	Genbank	DQ789007			
				N. asteroides 2		RodriguezNava2006				
				315/90	160/100/80/60	185/100/80	N. jejuensis	JCM13281	Genbank	EF375993
				315/130	210/160	185/80/70/60	N. brasiliensis	ATCC19296	Genbank	AY756516
				160/115/60	150/120/70/60	N. otitidiscaviarum 1	ATCC27941	Genbank	DQ789009	
				140/115/100	340/60	N. anaemiae	IFM0323	Genbank	DQ789025	
						N. inohensis		RodriguezNava2006		
						N. niigatensis		RodriguezNava2006		
						N. shimoensis		RodriguezNava2006		
						N. yamanashiensis		RodriguezNava2006		
				250/190	140/100/90	305/70/60	N. transvalensis	ATCC29982	Genbank	DQ789005
260/110/70		180/115/90	340/60	N. alba	DSM44684	Genbank	EF375994			

4.4.2 Extração de DNA

Para a padronização da extração de DNA no estudo, foi proposto o protocolo descrito por Chimara et al. (2008), uma vez que é um protocolo rápido e simples. Porém os autores padronizaram a técnica para *Mycobacterium*, e quando esse protocolo foi utilizado para extração de *Nocardia* houve apenas uma amplificação parcial das amostras. Frente a este problema, foi proposta a utilização do protocolo de Silva et al., (2001). Uma alçada do crescimento bacteriano foi colocada em um microtubo contendo 500 μ l de solução tampão TET estéril (Tris/HCL 10mM, EDTA 1mM, Triton X-100/1% e água destilada). As suspensões foram fervidas por 20 minutos e, em seguida, congeladas a -80°C . Este procedimento foi repetido mais duas vezes e a suspensão foi armazenada a -20°C por, no mínimo, 12 horas. Mesmo assim alguns isolados não amplificaram e por isso foi proposta a mudança do volume de DNA. O volume de 10 μ l possibilitou a amplificação das amostras, sendo padronizado esse protocolo para a extração. Observamos ainda que o ideal é que a cultura esteja jovem (crescimento de uma semana) e a PCR deve ser feita logo após a extração do DNA. A utilização posterior do fervido implica na obtenção de um produto fraco ou a não amplificação.

4.4.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para a PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Tb11: 5'- ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT e Tb12: 5'- CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT, que amplificam um fragmento de 441 pb do gene *hsp65*. A PCR foi realizada com um volume final de 25 μ l. Foram utilizadas as seguintes concentrações de cada reagente: tampão para PCR 1X, 200 μ M de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs), 1,0 mM de MgCl_2 , 25pmol de cada iniciador, 1U de Taq polimerase e 10 μ l de DNA. As condições de amplificação foram $94^{\circ}\text{C}/10$ min, seguida de 45 ciclos de $94^{\circ}\text{C}/1$ min; $60^{\circ}\text{C}/1$ min. e $72^{\circ}\text{C}/1$ min e extensão final de $72^{\circ}\text{C}/7$ min.

4.4.4 Digestão enzimática dos produtos amplificados

A partir do produto amplificado, as amostras foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição BstEII, HaeIII, HinfI, MspI e BsaHI (Fermentas), separadamente. As temperaturas e tempo de digestão foram aplicados seguindo as recomendações dos fabricantes. Os produtos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% (BAD1 LE Genetic Quality Tested - Bioamerica) dissolvida em tampão TBE 0,5x. As imagens obtidas em fotodocumentador foram analisadas visualmente, tendo como referência um marcador de peso molecular de 50 pb. O cálculo das bandas foi estimado visualmente e os perfis obtidos foram comparados com o algoritmo construído previamente.

4.5 Sequenciamento

4.5.1 Sequenciamento do gene 16S rRNA

O sequenciamento do gene 16S rRNA é considerado o padrão ouro para a identificação das espécies do gênero *Nocardia* e por isso todos os isolados foram sequenciados utilizando o protocolo descrito por Rodríguez-Nava et al. (2006), com os iniciadores Noc1 5'GCTTAACACATGCAAGTCG e Noc2 5'GAATTCCAGTCTCCCCTG com fragmento de 606pb. A técnica foi padronizada no IAL, com o objetivo de validar uma técnica para posterior utilização na rotina diagnóstica do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses. As sequências obtidas foram alinhadas com auxílio do programa Unipro Ugene v1.11.5 e comparadas com as depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment). Foram consideradas as mesmas espécies os isolados que apresentaram resultados acima de 98% de similaridade com a sequência do teste.

4.5.2 Sequenciamentos do gene *hsp65*

4.5.2.1 Identificação

O fragmento do gene *hsp65* usado para realização da técnica PRA-*hsp65* também foi usado para identificação por sequenciamento (Chimara et al., 2008). Após a amplificação por PCR, foi realizada uma purificação dos produtos utilizando-se o Kit DNA Wizard® SV Gel and PCR clean-up system (Promega) para purificação, de acordo com a recomendação do fabricante. As amostras foram enviadas ao Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP), nas concentrações de 20 ng de DNA para finalização do sequenciamento. Assim como para o gene 16S rRNA, as sequências obtidas foram alinhadas com auxílio do programa Unipro Ugene v1.11.5 e comparadas com as depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment). Foram consideradas as mesmas espécies os isolados com resultados que apresentaram acima de 98% de similaridade com a sequência do teste.

4.5.2.2 Análise de restrição *in silico*

As sequências obtidas foram alinhadas com os oligonucleotídeos iniciadores Tb11 e Tb12 para determinar as extremidades 3' e 5' do fragmento de 441pb. As sequências foram analisadas, com auxílio do programa BioEdit versão 7.0.9.0, com a ferramenta de restrição enzimática após a seleção das enzimas BstEII, MspI, HinfI, HaeIII e BsaHI. O tamanho dos fragmentos gerados pelo corte enzimático foi calculado utilizando o tamanho inicial de 441pb e subtraindo a posição do último fragmento. O valor total da subtração corresponde ao tamanho da banda. Esse cálculo foi realizado com todos os pontos de corte obtidos em cada enzima testada e o perfil obtido foi comparado ao algoritmo elaborado para identificação da espécie, apresentado na **Tabela 1**.

4.6 MALDI-TOF MS

O IAL, por ser um laboratório de referência nacional para diversos agravos, teve a oportunidade de receber o equipamento de MALDI-TOF MS (Matrix-associated laser desorption time of flight mass spectrometry) da marca Bruker Daltonics (Alemanha) como demonstração do produto por um período de 45 dias. Nessa ocasião tivemos a oportunidade de testar o equipamento para a identificação de diversos microrganismos. Para a identificação de isolados de micobactérias e *Nocardia*, o fabricante do equipamento MALDI recomendou um protocolo de extração cedido pela representante do produto (Becton e Dickinson). Porém esse protocolo mostrou-se trabalhoso por possuir diversas etapas e demorar 4 horas para sua completa execução. Quarenta e quatro isolados de *Nocardia* foram testados, no entanto os valores de leitura não passaram de 1.3 (cutoff mínimo: 1.699), mostrando que as amostras obtidas não estavam adequadas para análise. O protocolo de extração descrito por Saleeb et al. (2011), foi testado com as mesmas amostras, com tempo de execução de duas horas. O valor de leitura variou entre 1.7 e 2.3, possibilitando a identificação dos microrganismos testados.

Os isolados também foram submetidos à identificação por MALDI-TOF MS no equipamento comercializado pela empresa Biomerieux. Foram testados dois protocolos de extração, o protocolo descrito por Saleeb et al. (2011), e usado no equipamento Bruker e o protocolo recomendado pela Biomerieux. Foram obtidos picos proteicos somente com o protocolo descrito por Saleeb et al. (2011). No entanto, nenhum resultado de identificação foi obtido pois os dois bancos de dados que o sistema possui (Myla e Saramis) dispunham de um número mínimo de perfis de *Nocardia* sp.

4.7 Teste de suscetibilidade aos fármacos (MIC)

O teste de suscetibilidade aos fármacos foi realizado pela técnica de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de acordo com a padronização estabelecida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011). Os fármacos utilizados foram os recomendados pelo CLSI como primários para o tratamento de nocardiose: amicacina, ciprofloxacina, minociclina, tobramicina, amoxicilina-ácido clavulânico, imipenem, trimetoprim-sulfametoxazol. A solução estoque de cada fármaco foi preparada conforme recomendação do CLSI (2011), utilizando a seguinte equação:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{volume (ml)} \times \text{concentração } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mg)}}$$

Os fármacos foram pesados de acordo com cada potência, sendo utilizado o volume de 10 ml e o peso necessário para fazer a solução a 1% (concentração=10 mg/ml). Foi utilizado como diluente água destilada estéril e, apenas para claritromicina, o diluente foi dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções estoque foram aliqüotadas em tubos estéreis assepticamente e em seguida armazenadas em freezer a -20°C. O tubo contendo a solução estoque, após descongelamento e utilização, foi descartado.

A partir da solução estoque de cada droga, foi preparada uma solução de trabalho em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MH), quatro vezes maior do que a concentração final. As placas foram preparadas de maneira asséptica e 100 µl de meio MH foram colocados em cada poço da placa de 96 orifícios. 100 µl das soluções de trabalho de cada fármaco foram colocados na linha A, de acordo com o esquema da **Figura 1**. Em seguida, os fármacos foram homogeneizados e 100 µl foram transferidos para a linha seguinte. Este procedimento foi repetido até a linha H, desprezando-se 100 µl da última linha. A coluna 12 foi utilizada para controle de crescimento do isolado (CC-controle positivo) e controle de esterilidade do meio (CM-controle negativo), respectivamente. As placas prontas foram embaladas em plástico filme, numeradas com lote e mantidas a -70° C, com um prazo de validade de um mês.

Figura 1. Esquema de preparo de placa para MIC com a concentração final de cada fármaco em ug/ml. CC: Controle de Crescimento da Cepa; CM: Controle de Esterilidade do Meio; AK: amicacina; CIP: ciprofloxacina; MIN: minociclina; TOB: tobramicina; ACA: amoxicilina-ácido clavulânico; IMP: imipenem; SFT: sulfametoxazol-trimetoprim.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	256	32	64	32	128	128/64	256	128	32	64/1216
B	128	16	32	16	64	64/32	128	64	16	32/608
C	64	8	16	8	32	32/16	64	32	8	16/304
D	32	4	8	4	16	16/8	32	16	4	8/152
E	16	2	4	2	8	8/4	16	8	2	4/76
F	8	1	2	1	4	4/2	8	4	1	2/38
G	4	0,5	1	0,5	2	2/1	4	2	0,5	1/19
H	2	0,25	0,5	0,25	1	1/0,5	2	1	0,25	0,5/9,5
	AK	CIP	CLA	MIN	TOB	ACA	FOX	IMP	MF	SFT

□ Sensível ◻ Sensibilidade Moderada ◼ Resistente

4.7.1 Preparo da suspensão bacteriana e semeadura

Os isolados foram subcultivados em MH estéril. As suspensões bacterianas foram maceradas com auxílio de ponteiros estéreis e agitadas em vórtex para dissolução de todos os grumos. Em seguida, foram incubadas a 37°C por 3 a 4 dias. Após o período de incubação, esse cultivo foi homogeneizado por inversão e sedimentado por 5 minutos. A suspensão bacteriana foi preparada na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^6$ UFC/mL), com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625nm, medida em espectrofotômetro (CELM, Brasil).

A partir da suspensão da escala 0,5 de McFarland foi feita uma diluição 1:10 em MH e novamente realizada uma segunda diluição 1:10 em MH. 100 µl da segunda diluição foram inoculados em todos os poços da placa, com exceção dos poços CM (controle negativo). Em seguida as placas foram fechadas com tampa, colocadas em saco plástico e incubadas a 37° C por 3 a 5 dias.

A cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle, a qual foi preparada e semeada da mesma maneira que os isolados testados.

4.7.2 Leitura e utilização da resazurina

A leitura visual foi feita comparando o crescimento nos poços com fármaco com o crescimento dos poços sem fármaco (controle CC). A MIC foi determinada no poço com a menor concentração do fármaco em que não houve crescimento bacteriano. Em seguida, foi preparada uma solução de resazurina a 0,01%, um corante vital azul, e adicionados 30 µl da solução em todos os poços com fármaco e em um poço CC e um poço CM. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse período, na mudança de coloração para rosa no poço CC, a placa foi lida. Caso contrário, foram adicionados 30 µl de resazurina em outro poço CC e outro poço CM e a placa foi incubada a 37°C e observada após 24 horas. Nos poços CC deve haver mudança de cor do meio de azul para rosa e os poços CM, onde não há inoculo bacteriano, devem permanecer com a cor azul indicando ausência de crescimento. As placas que tiveram mudança de cor no controle negativo foram descartadas e os testes repetidos.

A leitura da cepa padrão foi utilizada para controle de qualidade dos MIC e para avaliação da interferência da resazurina no crescimento bacteriano. O valor das leituras visual e com resazurina de todos os isolados testados foram comparados.

4.8 Teste de suscetibilidade aos fármacos (DD)

O teste de suscetibilidade aos fármacos por meio da técnica de disco-difusão (DD- método de Kirby Bauer) foi realizado para os fármacos amicacina (AK), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), ciprofloxacina (CIP), imipenem (IMP), sulfametoxazol+trimetoprim (SFT) e tobramicina (TOB). Todos os discos foram obtidos na Oxoid do Brasil.

Somente os isolados identificados por sequenciamento do gene 16S rRNA como *Nocardia* spp. foram testados, sendo cultivados previamente em MH por sete dias a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação. Após este período inicial de crescimento, o inóculo foi padronizado na escala McFarland 0,5, equivalente a $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL. O inóculo padronizado foi aplicado em duas placas de MH ágar de 150 mm x 15 mm com auxílio de swab estéril. Os discos impregnados com os antimicrobianos foram distribuídos quatro a quatro em duas placas e incubados a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. Após o período de incubação os diâmetros dos halos foram mensurados com um halômetro. Como controles de qualidade do teste foram usadas as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* 25923. O teste e os critérios interpretativos do controle de qualidade foram preconizados no documento M100-S23 (CLSI, 2013).

5 RESULTADOS

5.1 Identificação fenotípica dos isolados

5.1.1 Macromorfologia dos isolados

A análise macromorfológica dos isolados foi realizada para observar características tais como textura e produção de pigmento. Os isolados apresentaram colônias secas de aspecto cerebriforme e colônias cremosas com pigmentos que variam de branco, creme, alaranjado, bege ou salmão (**Figura 2 A-F**). A morfologia foi comparada aos isolados de micobactérias, que podem apresentar colônias de aspecto cerebriforme ou cremosas, com presença ou ausência de pigmentos (**Figura 2 G**).

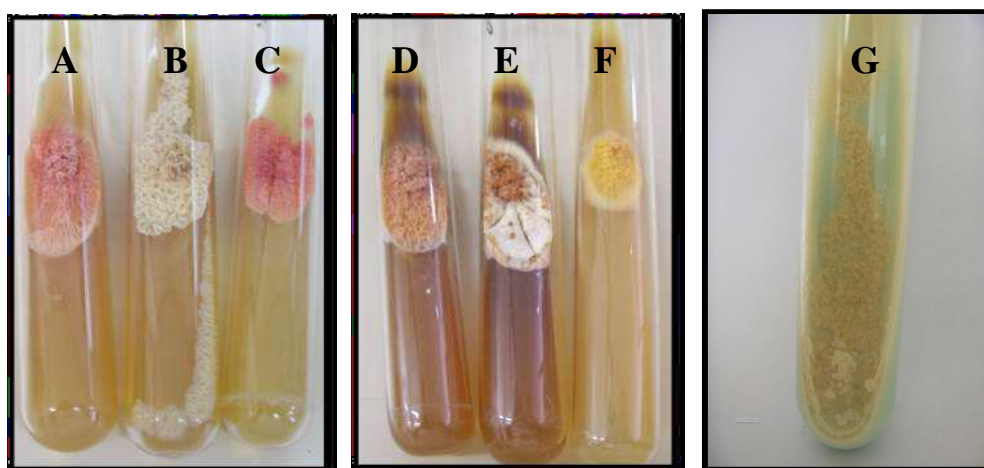


Figura 2. Aspectos macromorfológicos do crescimento dos isolados de *Nocardia* spp. em meio ágar Sabouraud. A: Cerebriforme e salmão; B: Cerebriforme e creme; C: Cerebriforme e salmão; D: Cerebriforme e laranja; E: Cerebriforme, seca e branca; F: Crescimento de *Mycobacterium* sp. em meio Lowenstein Jensen com colônias cerebriformes e creme.

5.1.2 Micromorfologia dos isolados

Os isolados de *Nocardia* apresentaram estruturas filamentosas e formas de cocabacilos parcialmente álcool-ácido resistentes. Entretanto, algumas micobactérias também apresentam essas características e pode haver confusão entre os diferentes gêneros em uma rotina diagnóstica (**Figura 3**).

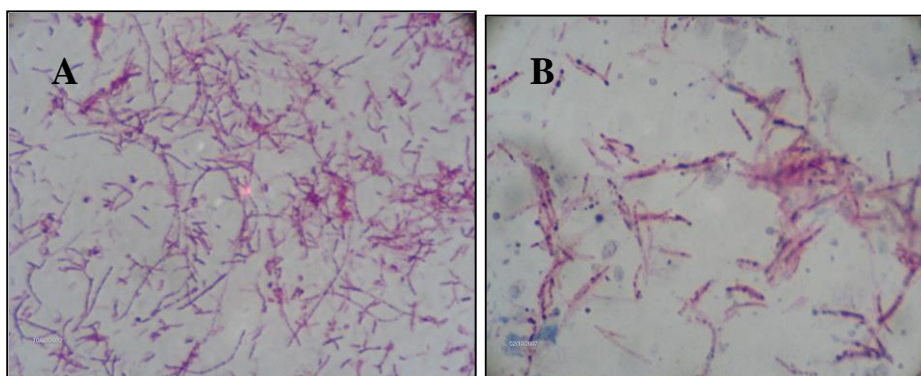


Figura 3. Análise microscópica de isolados de: A) *Nocardia* sp. e B) *Mycobacterium kansasii* corados pelo método de Ziehl Neelsen (aumento de 100x). Nos experimentos de microcultivo, a maioria dos isolados apresentou micélio aéreo, presença ou não de fragmentos e parcialmente álcool ácido resistência (**Figura 4**).

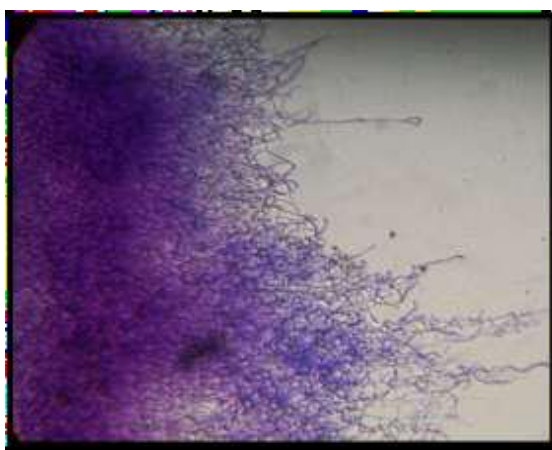


Figura 4. Análise microscópica do microcultivo de isolados de *Nocardia* sp. corados pelo método de Ziehl Neelsen (aumento de 100x).

5.2 Provas bioquímicas

5.2.1 Prova da resistência à lisozima

Nesse estudo observamos que poucos isolados apresentaram crescimento a partir da primeira semana e outros só a partir das semanas seguintes (**Figura 5**). Diferente do esperado, não foi observado crescimento em quatro isolados identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA como *Nocardia*, ou seja, apresentaram sensibilidade à lisozima. Foram resistentes 10 isolados pertencentes a outros gêneros. Avaliando a sensibilidade e especificidade, o teste de resistência a lisozima apresentou 93,0% e 67,0%, respectivamente.

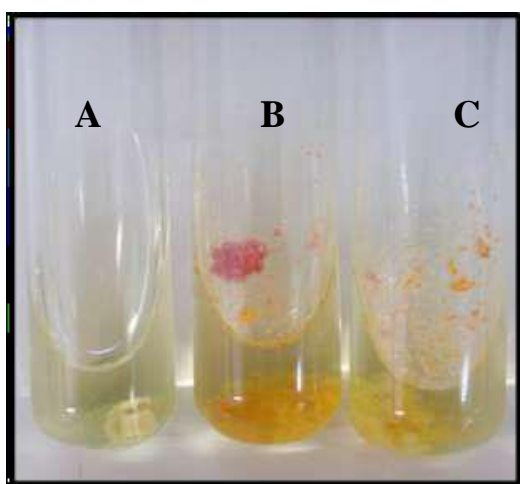


Figura 5. Prova da resistência a lisozima. A: Controle negativo, B: Controle positivo (*Nocardia* sp.), C: isolado 544.

5.2.2 Prova da hidrólise de ureia

Os isolados foram inoculados em tubos com meio de ureia e deixados a temperatura ambiente de dois a três dias para observar mudança de pH. Sessenta e cinco (90,3%) isolados apresentaram produção de urease (**Figura 6**), dentre os quais 53 eram *Nocardia* sp.

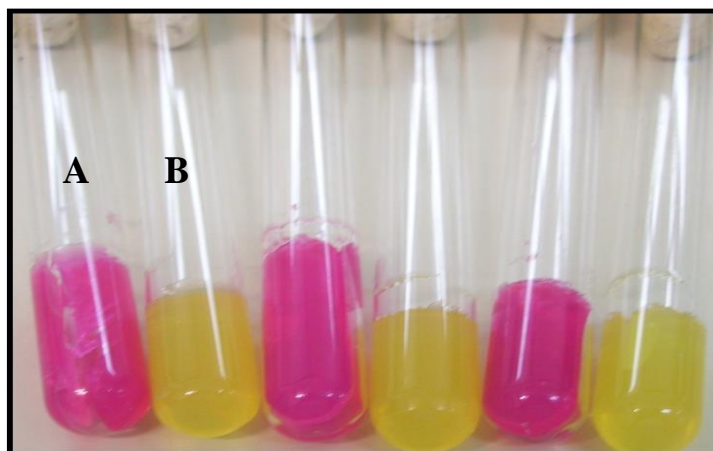


Figura 6. Prova da hidrólise da ureia. A: amostra positiva (rósea); B: amostra negativa (amarela).

5.2.3 Prova da decomposição da esculina

Para a decomposição da esculina, apenas dois isolados de *Nocardia* sp. foram negativos.

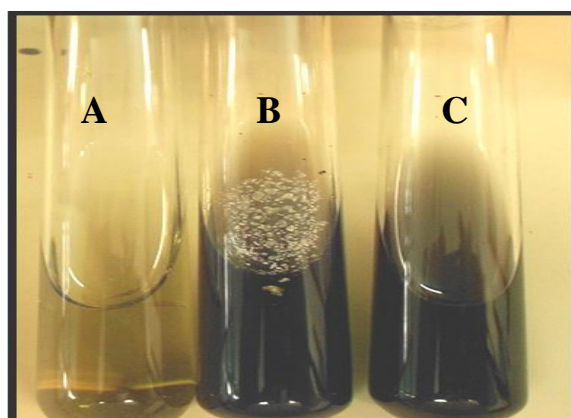


Figura 7. Prova da decomposição da esculina. A: Controle negativo; B isolados com resultado positivo, apresentando o escurecimento do meio.

5.2.4 Análise de decomposição dos ácidos aminados

O desaparecimento dos grânulos da hipoxantina e tirosina, inicialmente presentes no meio, foram interpretados como resultados positivos. Dentre os isolados testados contra hipoxantina, 29 foram positivos e dos isolados testados contra tirosina, 23 hidrolisaram esse aminoácido. Para xantina, apenas um isolado apresentou halo de degradação, sendo considerado positivo (**Figuras 8, 9 e 10**).

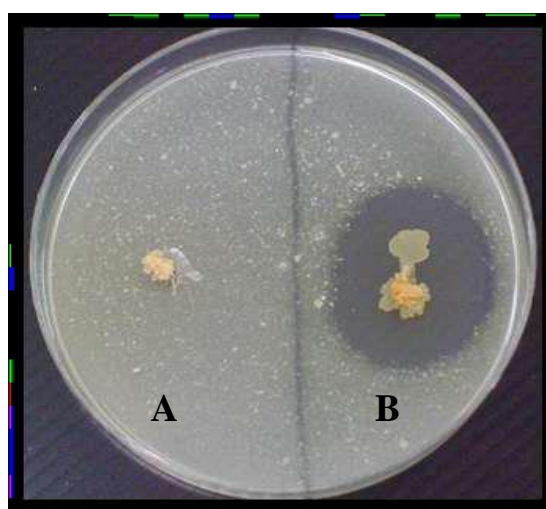


Figura 8. Prova de hidrólise de hipoxantina. A: amostra negativa; B: amostra positiva (possui halo de degradação).

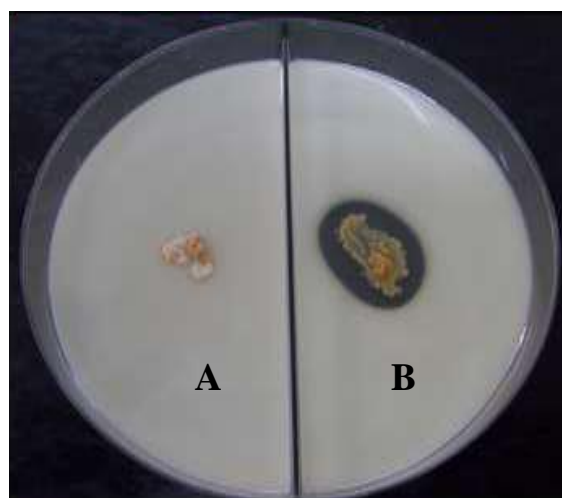


Figura 9. Prova da hidrólise da xantina. A: amostra negativa; B: amostra positiva (possui halo de degradação).

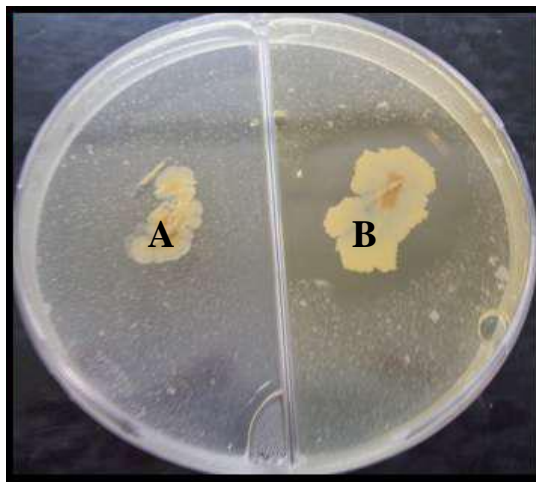


Figura 10. Prova de hidrólise de tirosina. A: amostra negativa; B: amostra positiva (possui halo de degradação).

Na prova de degradação de caseína, foi observado o clareamento do meio ao redor do crescimento bacteriano em 22 isolados, produzindo assim um halo. Este clareamento ocorre pela ação de produtos metabólicos ácidos ou alcalinos contidos no leite. A formação de uma zona clara ao redor do crescimento indicou resultado positivo (**Figura 11**).

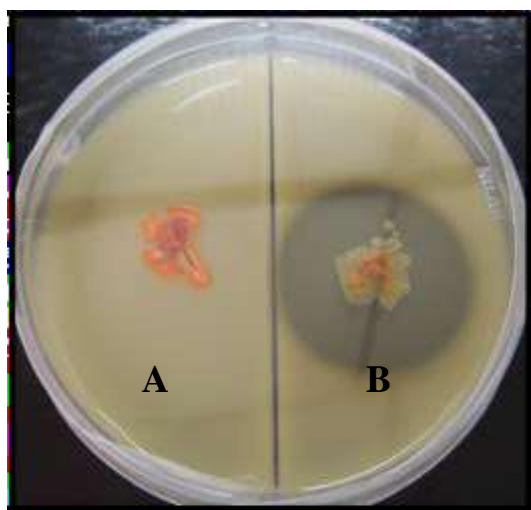


Figura 11. Prova de hidrólise de caseína. A: amostra negativa; B: amostra positiva (possui halo de degradação).

5.3 Identificação molecular

5.3.1 Identificação por PCR e análise de restrição do gene *hsp65* *in vitro*

(PRA-*hsp65*)

Foram analisados 67 isolados pela técnica de PRA-*hsp65*, dos quais 20 (27,8%) foram identificados com *N. brasiliensis*, seis (8,3%) foram identificados como outras espécies de nocardia e 38 (52,8%) foram considerados novos padrões (NP). Um isolado misto foi detectado. O gênero *Mycobacterium* foi identificado em dois isolados. Não foi obtido produto de amplificação em cinco isolados que, por isso, não puderam ser identificados (Tabela 2).

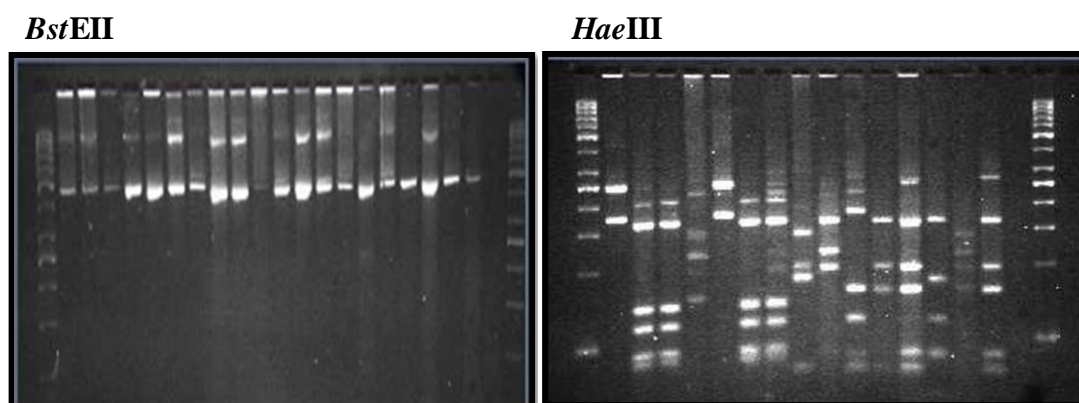


Figura 12. Perfil de restrição dos isolados digeridos com as enzimas *BstEII* e *HaeIII*, submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%.

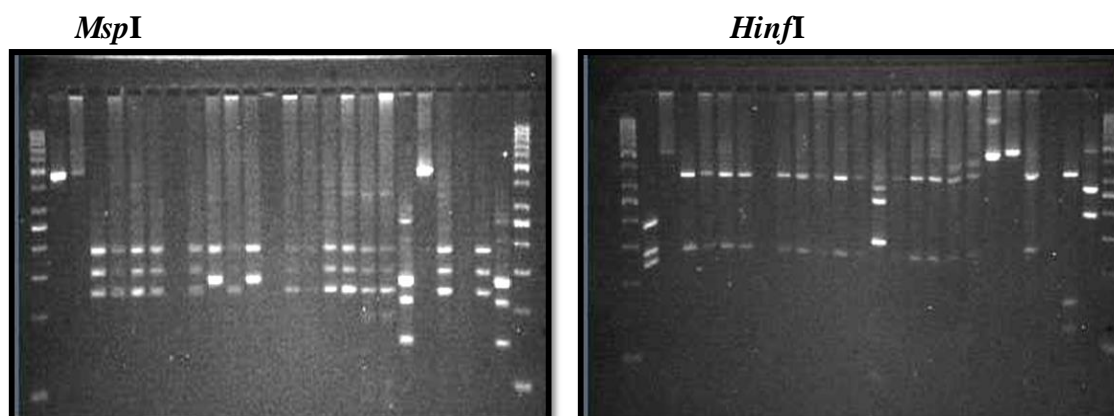


Figura 13. Perfil de restrição dos isolados digeridos com as enzimas *MspI* e *HinfI*, submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%.

***Bsa*HI**

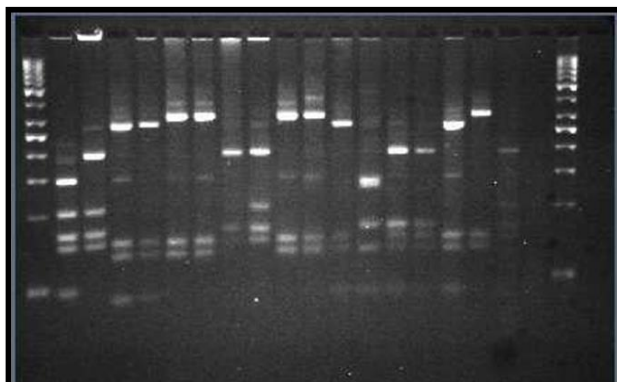


Figura 14. Perfil de restrição dos isolados digeridos com a enzima *Bsa*HI e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%.

5.3.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA

A identificação baseada na análise do gene 16S rRNA dos 72 isolados testados resultou em diferentes gêneros, a saber: 57 (79,2%) *Nocardia*, 7 (9,7%) *Gordonia*, 3 (4,2%) *Rhodococcus*, 2 (2,8%) *Tsukamurella*, 2 (2,8%) *Mycobacterium* e 1 (1,3%) *Streptomyces*. As espécies identificadas em cada gênero estão descritas na **Tabela 4**.

5.3.3 Sequenciamento do gene *hsp65*

5.3.3.1 Identificação

Dos 65 isolados sequenciados, 51 foram identificados como *Nocardia* e 14 foram identificados como pertencentes a outros gêneros (**Tabela 4**). Sete isolados não foram sequenciados devido à ausência de amplificação do fragmento e problemas na obtenção de sequência com qualidade para análise. Um isolado apresentou mistura de nocardia e micobactéria, sendo identificado como *Mycobacterium abscessus* no gene *hsp65* (análise *in silico*) e *N. otitidiscaviarum* no gene 16S rRNA.

5.3.3.2 Análise de restrição *in silico*

As sequências do gene *hsp65* foram submetidas ao corte *in silico*, utilizando a mesma metodologia aplicada na elaboração do algoritmo inicial. Essa análise permitiu detectar a dificuldade que existe na leitura dos perfis de PRA-*hsp65* obtidos *in vitro*, visto que muitos isolados não puderam ser identificados devido à leitura errada dos perfis. Dos 38 isolados considerados como novo perfil (NP) na análise *in vitro*, 15 puderam ser identificados com o perfil *in silico* (**Tabela 2**). O índice de concordância da identificação *in silico* com o sequenciamento do gene 16S rRNA foi de 52,3%.

Tabela 2. Comparação entre os resultados de identificação molecular obtidos nas análises das diferentes técnicas empregadas no presente estudo.

Técnica	<i>Nocardia</i> spp. N(%)	Outros gêneros N(%)	Mista N(%)	NP N(%)	NR N(%)	Total
PRA- <i>hsp65 in vitro</i>	26 (36,1)	2 (2,8)	1 (1,4)	38 (52,8)	5 (6,9)	72
PRA- <i>hsp65 in silico</i>	39 (54,2)	3 (4,2)	0	23 (31,9)	7 (9,7)	72
Sequenciamento <i>hsp65</i>	51 (70,8)	14 (19,4)	0	0	7 (9,7)	72
Sequenciamento 16S rRNA	57 (79,2)	15 (20,8)	0	0	0	72
MALDI-TOFMS	49 (68,1)	11 (15,3)	0	0	12 (16,7)	72

NP: novo perfil pela técnica PRA-*hsp65*; NR: não realizado por problemas técnicos

Dos 72 isolados analisados entre as técnicas moleculares, 21 foram concordantes entre as técnicas, das quais 17 foram considerados como *N. brasiliensis*, um como *M. fortuitum*, dois isolados de *N. otitidiscaviarum* e um *N. cyriacigeorgica* (**Tabela 3**).

Tabela 3. Resultados de identificação dos isolados com resultados concordantes, submetidos ao sequenciamento dos genes *hsp65*, 16S rRNA, identificação por MALDI-TOF MS e PRA-*hsp65*.

Isolados	Coleção	Sequenciamento <i>hsp65</i>	Sequenciamento 16S	MALDI- TOF MS	PRA- <i>hsp65 in silico</i>	PRA- <i>hsp65 in vitro</i>
76	IMTSP	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
83	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
122	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
136	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
236	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
280	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
295	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
404	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
463	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
498	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
514	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
539	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
573	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
581	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
739	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
802	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
860	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
865	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
937	IMTSP	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum 1</i>	<i>N. otitidiscaviarum 1</i>
938	IMTSP	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum 1</i>	<i>N. otitidiscaviarum 1</i>
9854	IMTSP	<i>N. cyriacigeorgica</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>

IAL: Instituto Adolfo Lutz; IMTSP: Instituto de Medicina Tropical

Tabela 4. Resultados de identificação dos 72 isolados submetidos ao sequenciamento dos genes *hsp65*, 16S rRNA, identificação por MALDI-TOF MS e PRA-*hsp65*.

Isolados	Coleção	Identificação inicial	Sequenciamento <i>hsp65</i>	Sequenciamento 16S	MALDI-TOF MS	PRA- <i>hsp65</i> <i>in silico</i>	PRA- <i>hsp65</i> <i>in vitro</i>
76	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
83	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
122	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
136	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
227	IMTSP	<i>N. anaemiae</i>	<i>N. yamanashiensis</i>	<i>N. yamanashiensis</i>	<i>N. yamanashiensis</i>	NP	NP
236	IMTSP	<i>N. anaemiae</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
245	IMTSP	<i>N. elegans</i>	<i>N. asiatica</i>	<i>N. beijingensis</i>	inconclusivo	<i>N. asiatica</i>	NP
280	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
295	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
379	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	inconclusivo	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
404	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
417	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>Streptomyces albus</i>	<i>Streptomyces cacaoi</i>	inconclusivo	NP	NP
463	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
471	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>N. vermiculata</i>	<i>N. vermiculata</i>	<i>N. vermiculata</i>	<i>N. vermiculata</i>	NP
472	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	inconclusivo	<i>M. abscessus</i> 1	<i>M. abscessus</i> 1
489	IMTSP	<i>N. africana</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>Nocardia</i> sp.	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
490	IMTSP	<i>Nocardia</i> sp.	<i>N. araoensis</i>	<i>N. arthritidis</i>	<i>N. exalbida</i>	<i>N. flavorosea</i>	NP
498	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
503	IMTSP	<i>N. abscessus</i>	Gordoniaceae sp	<i>Gordonia sputi</i>	<i>Gordonia sputi</i>	NP	NP
514	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
533	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriaci-georgica</i>	<i>N. cyriaci-georgica</i>	inconclusivo	<i>N. farcinica</i> 1	NP
534	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>	inconclusivo	NP	NP
539	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
544	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. tenerifensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	NP	NP
554	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	NR	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	NR	NP
555	IMTSP	<i>Nocardia</i> sp.	<i>Rhodococcus opacus</i>	<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i>	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	NP	NR
561	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>Nocardia</i> sp.	NP	NP
563	IAL	<i>N. asteroides</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	inconclusivo	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>

573	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
574	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>Gordonia bronchialis</i>	<i>Gordonia sputi</i>	<i>Gordonia sputi</i>	NP	NP
580	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>N. veterana</i>	<i>N. veterana</i>	<i>N. elegans</i>	<i>N. veterana</i>	NP
581	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
608	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	NP
718	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	NP
736	IAL	<i>N. brasiliensis</i>	NR	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	NP	NP
739	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
775	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	NP	NP
779	IMTSP	<i>N. caviae</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>M. abscessus 1</i>	mista
785	IMTSP	<i>N. otitidiscaviarum</i>	NR	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	NR	NP
787	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>N. arthritidis</i>	<i>N. exalbida</i>	<i>Gordonia sputi</i>	<i>N. arthritidis</i> <i>N. asteroides</i>	<i>N. arthritidis</i> <i>N. asteroides</i>
802	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
820	IAL	<i>N. asteroides</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>	NP	NP
860	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
865	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
933	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>Gordonia bronchialis</i>	<i>Gordonia sputi</i>	<i>Gordonia sputi</i>	NP	NP
935	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. farcinica</i>	<i>N. farcinica</i>	inconclusivo	<i>N. asteroides 8</i> <i>N. farcinica 2</i>	<i>N. asteroides 8</i> <i>N. farcinica 2</i>
937	IMTSP	<i>N. caviae</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum 1</i>	<i>N. otitidiscaviarum 1</i>
938	IMTSP	<i>N. anaemiae</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. titidiscaviarum</i>	<i>N. otitidiscaviarum 1</i>	<i>N. otitidiscaviarum 1</i>
1022	IMTSP	<i>Nocardia sp.</i>	Gordoniaceae sp	<i>Gordonia sputi</i>	<i>Gordonia sputi</i>	NP	NP
1168	IAL	<i>N. asteroides</i>	Gordoniaceae sp	<i>Gordonia sputi</i>	<i>Gordonia sputi</i>	NP	NP
1366	IAL	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. cyriaci-georgica</i>	<i>N. cyriaci-georgica</i>	<i>N. cyriaci-georgica</i>	<i>N. cyriaci-georgica</i>	NP
1504	IMTSP	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. araoensis</i>	<i>N. beijingensis</i>	<i>Nocardia sp.</i>	NR	NP
1662	IAL	<i>N. anaemiae</i>	NR	<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i>	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	NR	NP
1913	IAL	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	NP	NP
2123	Coleção IAL	<i>N. brevicatena</i>	<i>N. veterana</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>	NR
2124	Coleção IAL	<i>N. asteroides</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. elegans</i>	<i>N. nova</i>	NP
2125	Coleção IAL	<i>N. asteroides</i>	<i>N. africana</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>	NP
2133	Coleção IAL	<i>Nocardia sp.</i>	NR	<i>N. vaccinii</i>	<i>N. niigatensis</i>	NR	
2262	IAL	<i>Nocardia sp.</i>	Gordoniaceae sp	<i>Gordonia sputi</i>	<i>Gordonia sputi</i>	NP	NP

2265	IAL	<i>Nocardia sp.</i>	Gordoniaceae sp	<i>Gordonia sputi</i>	<i>Gordonia sputi</i>	NP	NP
2513	IAL	<i>N. asteroides</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. africana</i>	NP	NP
3001	IAL	<i>N. brasiliensis</i>	<i>Tsakamurella tyrosinosolvans</i>	<i>Tsakamurella tyrosinosolvans</i>	<i>Tsakamurella paurometabola</i>	NR	NP
3286	IAL	<i>N. asteroides</i>	<i>N. alba</i>	<i>N. veterana</i>	<i>Nocardia sp.</i>	NP	NP
3310	IAL	<i>Nocardia sp.</i>	NR	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	NR	NR
3924	IAL	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. farcinica</i>	<i>N. farcinica</i>	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. asteroides</i> 8 <i>N. farcinica</i> 2	<i>N. asteroides</i> 8 <i>N. farcinica</i> 2
3926	IAL	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. araoensis</i>	<i>N. thailandica</i>	inconclusivo	NP	NP
4209	IAL	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. asteroides</i> 3	NP
9854	IMTSP	<i>N. asteroides</i>	<i>N. cyriaciageorgica</i>	<i>N. cyriaciageorgica</i>	<i>N. cyriaciageorgica</i>	<i>N. cyriaciageorgica</i>	<i>N. cyriaciageorgica</i>
9881	IMTSP	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. pseudobrasiliensis</i>	<i>N. pseudobrasiliensis</i>	inconclusivo	NP	NP
DLC	HC	<i>Nocardia sp.</i>	NR	<i>N. asteroides</i>	<i>N. brasiliensis</i>	NR	NR
HC Der	HC	<i>Nocardia sp.</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. nova</i>	inconclusivo	NP	NP
34098	IAL	<i>N. asteroides</i>	<i>N. concava</i>	<i>N. grenadensis</i>	inconclusivo	NP	NP

IAL: Instituto Adolfo Lutz; IMTSP: Instituto de Medicina Tropical; NP: novo perfil; NR: não realizado

5.4 MALDI-TOF MS

Dos 72 isolados estudados, 49 foram identificados como *Nocardia* e 11 como pertencentes a outros gêneros (**Tabela 4**). Apesar da alteração de protocolo, 12 amostras não puderam ser identificadas, pois não foram obtidos valores de leitura adequados para análise. Comparando os resultados com a identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA, os resultados do MALDI-TOF MS tiveram índice de concordância de 81,7%, observando que 10% desses resultados são referentes a isolados identificados por MALDI-TOF MS somente até o nível de gênero.

5.5 Teste de suscetibilidade aos fármacos: concentração inibitória mínima (MIC)

Pela primeira vez o corante resazurina foi utilizado para leitura de MIC de *Nocardia* sp. (**Figura 15**). Os valores de MIC para a cepa padrão *S. aureus* ATCC 29213 foram os mesmos na leitura visual e com resazurina (0,5 ug/ml) e o poço controle ficou positivo, mostrando que o corante não inibiu o crescimento bacteriano.

No total foram testados 50 isolados, excluindo os isolados que apresentaram algum tipo de contaminação no processo. Os valores obtidos nos testes estão apresentados na **Tabela 8**.



Figura 15. Placas inoculadas e com crescimento de *Nocardia* sp. pelo teste de MIC (Concentração Inibitória Mínima) **A:** leitura visual **B:** leitura com resazurina.

Para o fármaco amicacina, as leituras visuais e com resazurina tiveram 100,0% de concordância. Para os demais fármacos, a concordância também foi elevada, onde observamos que as discordâncias e categorias alteradas ocorreram principalmente entre os fármacos ciprofloxacina, claritromicina e minociclina (**Tabela 5**).

Tabela 5. Número de isolados com resultados de MIC discordantes entre a leitura visual e com resazurina, por fármaco testado.

Fármaco	Discordantes (n)	%	Categoria alterada (n)	%
Amicacina	0	0,0	0	0,0
Ciprofloxacina	9	15,8	2	3,5
Claritromicina	15	26,3	3	5,3
Minociclina	23	40,4	5	8,8
Tobramicina	1	1,8	0	0,0
Amoxicilina+clavulânico	6	10,5	1	1,8
Imipenem	9	15,8	1	1,8
Sulfametoxazol+trimetoprim	5	8,8	1	1,8

Observamos diferenças entre os perfis de suscetibilidade obtidos com relação àqueles que são utilizados para diferenciação de complexos (Brown-Elliot et al., 2006). O perfil de resistência para ciprofloxacina foi pouco observado em isolados de *N. brasiliensis*, que teve a maioria (78,3%) sensível a esse fármaco. Todos os isolados de *N. otitidiscaviarum* foram resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim, ao invés de sensíveis. As diferenças de suscetibilidade nos isolados de *N. cyriacigeorgica* foram encontradas na associação amoxicilina-ácido clavulânico, que se mostrou maioria sensível (66,7%) ao invés de resistente (**Tabela 6**).

Tabela 6. Resultados dos testes de suscetibilidade a fármacos pelo método MIC em isolados identificados como *N. brasiliensis*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum* e *N. cyriaciageorgica*.

Espécies	Fármacos	MIC (%)	
		S	R
<i>N. brasiliensis</i> n=23	Amicacina	23 (100,0)	0
	Tobramicina	22 (95,7)	1 (4,3)
	Minociclina	19 (82,6)	4 (17,4)
	Amoxicilina + ácido clavulânico	19 (82,6)	4 (17,4)
	Ciprofloxacina	18 (78,3)	5 (21,7)
	Imipenem	7 (30,4)	16 (69,6)
	Sulfametoxazol+Trimetoprim	7 (30,4)	16 (69,6)
<i>N. nova</i> n=6	Amicacina	6 (100,0)	0
	Tobramicina	3 (50,0)	3 (50,0)
	Minociclina	5(83,3)	1 (16,7)
	Amoxicilina + ácido clavulânico	4 (66,7)	2 (33,3)
	Ciprofloxacina	2 (33,3)	4 (66,7)
	Imipenem	5 (83,3)	1 (16,7)
	Sulfametoxazol+Trimetoprim	0	6 (100,0)
<i>N. otitidiscaviarum</i> n=4	Amicacina	4 (100,0)	0
	Tobramicina	4 (100,0)	0
	Minociclina	4 (100,0)	0
	Amoxicilina + ácido clavulânico	0	4 (100,0)
	Ciprofloxacina	2 (50,0)	2 (50,0)
	Imipenem	0	4 (100,0)
	Sulfametoxazol+Trimetoprim	0	4 (100,0)
<i>N. cyriaciageorgica</i> n=3	Amicacina	3 (100,0)	0
	Tobramicina	3 (100,0)	0
	Minociclina	3 (100,0)	0
	Amoxicilina + ácido clavulânico	2 (66,7)	1 (33,3)
	Ciprofloxacina	0	3 (100,0)
	Imipenem	2 (66,7)	1 (33,3)
	Sulfametoxazol+Trimetoprim	1 (33,3)	2 (67,3)

S: sensível; R: resistente; MIC: concentração inibitória mínima.

Entre os fármacos testados através do MIC, os que apresentaram maior sensibilidade foram amicacina (100%) e tobramicina (84%). As maiores resistências foram encontradas com os fármacos sulfametoxazol+trimetoprim (76%) e imipenem (54%) (**Tabela 7**).

Tabela 7. Perfil de suscetibilidade dos 50 isolados de *Nocardia* spp. testados pelo método de Concentração inibitória mínima (MIC).

Fármacos	N. de isolados (%)	
	Sensíveis	Resistentes
Amicacina	50 (100%)	0
Tobramicina	42 (84%)	8 (16%)
Minociclina	38 (76%)	12 (24%)
Amoxicilina+ácido clavulânico	34 (68%)	16 (32%)
Ciprofloxacina	33 (66%)	17 (34%)
Imipenem	23 (46%)	27 (54%)
Sulfametoxazol+Trimetoprim	12 (24%)	38 (76%)

Tabela 8. Resultados obtidos em 50 isolados de *Nocardia* sp. nos testes de suscetibilidade aos fármacos pelos métodos de concentração inibitória mínima, na leitura visual e com resazurina (res).

Espécie	Isolados	AK		CIP		MIN		TOB		Aca		IMP		SFt	
		visual	res	visual	res	visual	res	visual	res	visual	res	visual	res	visual	res
<i>N. arthritidis</i>	490	<2 S	<2 S	2 S	2 S	2 S	2 S	<1 S	<1 S	<1/0,5 S	<1/0,5 S	<1 S	<1 S	2/38 S	2/38 S
<i>N. asteroides</i>	534	<2 S	<2 S	8 R	8 R	1 S	1 S	<1 S	<1 S	32/16 R	32/16 R	<1 S	<1 S	2/38 S	2/38 S
<i>N. beijingensis</i>	245	4 S	4 S	2 S	1 S	0,5 S	0,5 S	<1 S	<1 S	8/4 S	8/4 S	32 R	>12 R	<0,5/9,5 S	<0,5/9,5 S
<i>N. beijingensis</i>	1504	<2 S	<2 S	4 S	4 S	4 S	4 S	<1 S	<1 S	32/16 R	32/16 R	2 S	2 S	<0,5/9,5 S	<0,5/9,5 S
<i>N. brasiliensis</i>	83	<2 S	<2 S	4 S	4 S	2 S	4 R	<1 S	<1 S	4/2 S	4/2 S	128 R	>12 R	16/30 R	16/304 R
<i>N. brasiliensis</i>	122	<2 S	<2 S	4 S	4 S	4 R	4 R	<1 S	<1 S	8/4 S	8/4 S	128 R	>12 R	16/30 R	16/304 R
<i>N. brasiliensis</i>	136	<2 S	<2 S	8 R	8 R	1 S	1 S	<1 S	<1 S	4/2 S	4/2 S	64 R	64 R	8/152 R	8/152 R
<i>N. brasiliensis</i>	236	<2 S	<2 S	0,5 S	0,5 S	0,5 S	0,5 S	<1 S	<1 S	4/2 S	4/2 S	64 R	64 R	8/152 R	8/152 R
<i>N. brasiliensis</i>	802	4 S	4 S	2 S	2 S	<0,25 S	0,5 S	16 R	16 R	32/16 R	32/16 R	>128 R	>12 R	>32/608 R	>32/608 R
<i>N. brasiliensis</i>	280	<2 S	<2 S	4 S	4 S	0,5 S	2 S	<1 S	<1 S	4/2 S	4/2 S	>128 R	>12 R	4/76 R	4/76 R
<i>N. brasiliensis</i>	295	<2 S	<2 S	4 S	4 S	2 S	2 S	<1 S	<1 S	<1/0,5 S	<1/0,5 S	<1 S	<1 S	16/30 R	16/304 R
<i>N. brasiliensis</i>	379	<2 S	<2 S	4 S	4 S	<0,25 S	<0,25 S	<1 S	<1 S	2/1 S	2/1 S	2 S	2 S	8/152 R	8/152 R
<i>N. brasiliensis</i>	404	8 S	8 S	8 R	8 R	<0,25 S	<0,25 S	16 R	64 R	4/2 S	4/2 S	64 R	>12 R	16/30 R	16/304 R

							S						R	R	
<i>N. brasiliensis</i>	498	<2 S	<2 S	2 S	2 S	<0,25 S	<0,25 S	<1 S	<1 S	0,25/0,125 S	0,5/0,25 S	<1 S	<1 S	8/152 R	8/152 R
<i>N. brasiliensis</i>	514	<2 S	<2 S	4 S	4 S	<0,25 S	1 S	<1 S	<1 S	2/1 S	2/1 S	32 R	32 R	4/76 R	4/76 R
<i>N. brasiliensis</i>	554	8 S	8 S	4 S	4 S	<0,25 S	<0,25 S	<1 S	<1 S	2/1 S	2/1 S	16 R	16 R	4/76 R	4/76 R
<i>N. brasiliensis</i>	561	<0,25 S	<0,25 S	<0,125 S	<0,125 S	<0,25 S	<0,25 S	<1 S	<1 S	0,25/0,125 S	0,25/0,125 S	<1 S	<1 S	2/38 S	2/38 S
<i>N. brasiliensis</i>	563	<2 S	<2 S	<0,25 S	<0,25 S	<0,25 S	<0,25 S	<1 S	<1 S	2/1 S	2/1 S	16 R	16 R	<0,5/9,5 S	<0,5/9,5 S
<i>N. brasiliensis</i>	573	<2 S	<2 S	8 R	8 R	<0,25 S	<0,25 S	<1 S	<1 S	32/16 R	32/16 R	>128 R	>12 R	>32/6 R	>32/60 R
<i>N. brasiliensis</i>	581	8 S	8 S	4 S	4 S	0,5 S	2 S	<1 S	<1 S	4/2 S	4/2 S	2 S	2 S	4/76 R	4/76 R
<i>N. brasiliensis</i>	608	8 S	8 S	2 S	2 S	<0,25 S	<0,25 S	<1 S	<1 S	4/2 S	4/2 S	16 R	16 R	0,5/9,5 S	0,5/9,5 S
<i>N. brasiliensis</i>	718	<2 S	<2 S	4 S	4 S	<0,25 S	8 R	<1 S	<1 S	16/8 S	16/8 S	128 R	>12 R	<0,5/9,5 S	<0,5/9,5 S
<i>N. brasiliensis</i>	736	<2 S	<2 S	4 S	4 S	2 S	4 R	<1 S	<1 S	1/0,5 S	1/0,5 S	2 S	2 S	1/19 S	1/19 S
<i>N. brasiliensis</i>	739	<2 S	<2 S	4 S	4 S	<0,25 S	<0,25 S	<1 S	<1 S	4/2 S	4/2 S	32 R	32 R	4/76 R	8/152 R
<i>N. brasiliensis</i>	775	<2 S	<2 S	4 S	8 R	<0,25 S	1 S	<1 S	<1 S	32/16 R	32/16 R	>128 R	>12 R	>32/6 R	>32/60 R
<i>N. brasiliensis</i>	860	<2 S	<2 S	4 S	4 S	2 S	2 S	<1 S	<1 S	1/0,5 S	1/0,5 S	16 R	32 R	2/38 S	2/38 S
<i>N. brasiliensis</i>	865	<2 S	<2 S	4 S	4 S	1 S	2 S	<1 S	<1 S	4/2 S	4/2 S	>128 R	>12 R	8/152 R	8/152 R
<i>N. cyriaciageorgica</i>	9854	<2 S	<2 S	8 R	16 R	1 S	1 S	<1 S	<1 S	8/4 S	16/8 S	2 S	4 S	8/152 R	8/152 R
<i>N. cyriaciageorgica</i>	1366	<2 S	<2 S	16 R	16 R	<0,25 S	2 S	<1 S	<1 S	128/64 R	128/64 R	4 S	4 S	2/38 S	2/38 S
<i>N. cyriaciageorgica</i>	533	8 S	8 S	8 R	8 R	<0,25 S	5 S	<1 S	<1 S	32/16 R	32/16 R	32 R	>12 R	8/152 R	8/152 R
<i>N. exalbida</i>	787	<2 S	<2 S	4 S	4 S	2 S	4 R	<1 S	<1 S	<0,25/0,125 S	5/0,125 S	2 S	4 S	1/19 S	4/76 R
<i>N. farcinica</i>	3924	<2 S	<2 S	2 S	2 S	4 R	8 R	16 R	16 R	16/8 S	16/8 S	4 S	4 S	8/152 R	8/152 R
<i>N. farcinica</i>	935	<2 S	<2 S	1 S	1 S	1 S	8 R	32 R	32 R	32/16 R	32/16 R	32 R	32 R	8/152 R	8/152 R
<i>N. otitidiscaviarum</i>	779	<2 S	<2 S	4 S	16 R	<0,25 S	0,5 S	<1 S	<1 S	16/8 S	64/32 R	2 R	<1 S	>12 R	16/304 R
<i>N. otitidiscaviarum</i>	785	<2 S	<2 S	4 S	4 S	1 S	1 S	<1 S	<1 S	>128/64 R	>128/64 R	32 R	>12 R	8/152 R	8/152 R
<i>N. otitidiscaviarum</i>	937	<2 S	<2 S	8 R	8 R	<0,25 S	1 S	8 S	8 S	32/16 R	32/16 R	>128 R	>12 R	>32/6 R	>32/60 R
<i>N. otitidiscaviarum</i>	938	<2 S	<2 S	2 S	2 S	<0,25 S	<0,25 S	<1 S	<1 S	64/32 R	64/32 R	2 R	16 R	>32/6 R	>32/60 R
<i>N. nova</i>	2123	<2 S	<2 S	8 R	8 R	0,5 S	0,5 S	128 R	8 R	>12 R	128/64 R	128/64 R	2 S	2 S	16/304 R
<i>N. nova</i>	2124	<2 S	<2 S	8 R	8 R	1 S	1 S	4 S	4 S	0,5/0,25 S	0,5/0,25 S	2 S	2 S	32/60 R	32/608 R
<i>N. nova</i>	2125	<2 S	<2 S	4 S	4 S	4 R	4 R	<1 S	<1 S	32/16 R	32/16 R	>128 R	>12 R	>32/6 R	>32/60 R

											R		R	R	R
<i>N. nova</i>	820	<2 S	<2 S	16 R	16 R	4 R	4 R	16 R	16 R	<0,25/ 0,125 S	0,5/ 0,25 S	<1 S	<1 S	8/152 R	16/304 R
<i>N. nova</i>	2513	<2 S	<2 S	4 S	4 S	0,5 S	0,5 S	32 R	32 R	0,5/0, 25 S	1/0, 5 S	<1 S	<1 S	8/152 R	16/304 R
<i>N. nova</i>	HC Der	<2 S	<2 S	16 R	32 R	<0,25 S	1 S	128 R	>12 8 R	0,25/0, 125 S	0,5/ 0,25 S	<1 S	<1 S	4/76 R	4/76 R
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	9881	<2 S	<2 S	<0,25 S	<0,2 5 S	16 R	16 R	<1 S	<1 S	16/8 S	16/8 S	16 R	16 R	8/152 R	8/152 R
<i>N. thailandica</i>	3926	<2 S	<2 S	8 R	16 R	0,5 S	1 S	<1 S	<1 S	1/0,5 S	1/0, 5 S	<1 S	<1 S	16/30 4 R	16/304 R
<i>N. veterana</i>	3286	<2 S	<2 S	1 S	2 S	0,5 S	2 S	<1 S	<1 S	32/16 R	32/1 6 R	>128 R	>12 8 R	>32/6 08 R	>32/60 8 R
<i>N. veterana</i>	580	<2 S	<2 S	8 R	16 R	4 R	4 R	>128 R	>12 8 R	2/1 S	2/1 S	<1 S	<1 S	16/30 4 R	16/304 R
<i>N. vermiculata</i>	471	<2 S	<2 S	<0,25 S	<0,2 5 S	<0,25 S	<0, 25 S	<1 S	<1 S	<1/0,5 S	<1/0, 5 S	<1 S	<1 S	2/38 S	2/38 S
<i>N. vaccinii</i>	2133	<2 S	<2 S	0,5 S	0,5 S	1 S	1 S	<1 S	<1 S	32/16 R	32/1 6 R	>128 R	>12 8 R	>32/6 08 R	>32/60 8 R
<i>N. yamanashiensis</i>	227	<2 S	<2 S	1 S	1 S	4 R	8 R	8 S	8 S	>128/ 64 R	>12 8/64 R	<1 S	<1 S	8/152 R	8/152 R

Res: resazurina; S: sensível; R: resistente; AK: amicacina; CIP: ciprofloxacina; MIN: minociclina; TOB: tobramicina; Aca: Amoxicilina+ácido clavulânico; IMP: imipenem; SFT: Sulfametoxazol+Trimetoprim

5.6 Teste de suscetibilidade aos fármacos: Disco difusão

No total foram testados 50 isolados, excluindo os isolados que apresentaram algum tipo de contaminação no processo. Os valores obtidos nos testes estão apresentados na **Tabela 11**.

Devido à ausência de critérios interpretativos para o gênero *Nocardia*, verificamos na literatura artigos que utilizam critérios tanto para Gram positivos como para Gram negativos para a interpretação dos valores de disco difusão nesse gênero (Muir e Pritchard, 1997; Perçin et al., 2011).

Comparamos esses critérios (**Quadro 1**) e verificamos que existe grande similaridade entre os critérios estabelecidos para os diferentes grupos. Para a categorização dos isolados em sensível (S), intermediário (I) e resistente (R), elaboramos um critério consenso, sendo que para sulfametoxazol-trimetoprim utilizamos os únicos intervalos propostos especificamente para o gênero *Nocardia* pelo CLSI no documento M24-A2:

Quadro 1. Critérios interpretativos para teste de disco difusão de bactérias gram negativas^a e gram positivas^b e consenso utilizado para categorização dos isolados de *Nocardia* spp.

ANTIMICROBIANO	SENSÍVEL			RESISTENTE			CONSENSO	
	CLSI M100S23 ^a	SFM G ^a	SFM G ^{+b}	CLSI M100S23 ^a	SFM G ^a	SFM G ^{+b}	S	R
Amicacina	≥ 17	≥ 17	≥ 17	≤ 14	≤ 15	≤ 15	≥ 17	≤ 15
Amoxicilina + Ácido clavulânico	≥ 18	≥ 21	≥ 23	≤ 13	≤ 16	≤ 16	≥ 21	≤ 16
Ciprofloxacina	≥ 21	≥ 25	≥ 25	≤ 15	≤ 22	≤ 22	≥ 25	≤ 22
Ceftriaxone	≥ 23	≥ 26	≥ 26	≤ 19	≤ 23	≤ 23	≥ 26	≤ 23
Imipenem	≥ 23	≥ 24	≥ 24	≤ 19	≤ 17	≤ 17	≥ 24	≤ 17
Minociclina	≥ 16	≥ 19	≥ 19	≤ 12	≤ 17	≤ 17	≥ 19	≤ 17
Sulfametoxazol+ Trimetoprim	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≤ 10	≤ 13	≤ 10	≥ 35*	≤ 15*
Tobramicina	≥ 15	≥ 18	≥ 18	≤ 12	≤ 16	≤ 16	≥ 18	≤ 16

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; SFM: Société Française de Microbiologie; G+: Gram positivos; G-: Gram negativos; S: sensível; R: resistente.

Os resultados obtidos no teste de Disco Difusão mostraram 100% de sensibilidade para os fármacos amicacina, minociclina e sulfametoxazol+trimetoprim. Os isolados apresentaram a maior porcentagem de resistência ao fármaco ciprofloxacina (64%) (**Tabela 9**).

Tabela 9. Perfil de suscetibilidade dos 50 isolados de *Nocardia* spp. testados pelo método de Disco Difusão.

Fármacos	N. de isolados (%)	
	Sensíveis	Resistentes
Amicacina	50 (100%)	0
Minociclina	50 (100%)	0
Sulfametoxazol+Trimetoprim	50 (100%)	0
Tobramicina	45 (90%)	5 (10%)
Amoxicilina + ácido clavulânico	35 (70%)	15 (30%)
Imipenem	33 (66%)	17 (34%)
Ciprofloxacina	18 (36%)	32 (64%)

Considerando o perfil de suscetibilidade para diferenciação das espécies, o método de disco difusão identificou corretamente somente os perfis dos isolados de *N. brasiliensis*. Para todas as outras espécies nenhuma metodologia foi 100% eficiente em atender aos perfis descritos por Brown-Elliot e col. (2006) (**Tabela 11**). As espécies que apresentaram resistência a ciprofloxacina foram *N. brasiliensis* (23) e *N. nova* (6) e *N. cyriaciageorgica* (3). *N. brasiliensis* (23) apresentou elevada taxa de resistência a imipenem (60,9%). *N. otitidiscaviarum* (4) apresentou resistência a amoxicilina+ácido clavulânico e a ciprofloxacina (**Tabela 10**).

Tabela 10. Resultados dos testes de suscetibilidade a fármacos pelo método de disco difusão em isolados identificados como *N. brasiliensis*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum* e *N. cyriaciageorgica*.

Espécies	Fármacos	Disco difusão (%)	
		S	R
<i>N. brasiliensis</i> n=23	Amicacina	23 (100,0)	0
	Tobramicina	23 (100,0)	0
	Minociclina	23 (100,0)	0
	Amoxicilina + ácido clavulânico	20 (87,0)	3 (13,0)
	Ciprofloxacina	8 (34,8)	15 (65,2)
	Imipenem	9 (39,1)	14 (60,9)
	Sulfametoxazol+Trimetoprim	23 (100,0)	0
<i>N. nova</i> n=6	Amicacina	6 (100,0)	0
	Tobramicina	5 (83,3)	1 (16,7)
	Minociclina	6 (100,0)	0
	Amoxicilina + ácido clavulânico	4 (66,7)	2 (33,3)
	Ciprofloxacina	0	6 (100,0)
	Imipenem	6 (100,0)	0
	Sulfametoxazol+Trimetoprim	6 (100,0)	0
<i>N. otitidiscaviarum</i> n=4	Amicacina	4 (100,0)	0
	Tobramicina	4 (100,0)	0
	Minociclina	4 (100,0)	0
	Amoxicilina + ácido clavulânico	0	4 (100,0)
	Ciprofloxacina	2 (50,0)	2 (50,0)
	Imipenem	4 (100,0)	0
	Sulfametoxazol+Trimetoprim	4 (100,0)	0
<i>N. cyriaciageorgica</i> n=3	Amicacina	3 (100,0)	0
	Tobramicina	3 (100,0)	0
	Minociclina	3 (100,0)	0
	Amoxicilina + ácido clavulânico	2 (66,7)	1 (33,3)
	Ciprofloxacina	0	3 (100,0)
	Imipenem	3 (100,0)	0
	Sulfametoxazol+Trimetoprim	3 (100,0)	0

S: sensível; R: resistente.

Tabela 11. Resultados obtidos em 50 isolados de *Nocardia* sp. nos testes de suscetibilidade aos fármacos pelo método de disco difusão.

Espécie	Isolados	AK	CIP	MIN	Aca	TOB	IMP	Sft
<i>N. arthritidis</i>	490	50 S	34 S	52 S	59 S	36 S	26 S	50 S
<i>N. asteroides</i>	534	49 S	11 R	27 S	10 R	47 S	47 S	45 S
<i>N. beijingensis</i>	1504	54 S	29 S	39 S	0 R	45 S	46 S	60 S
<i>N. beijingensis</i>	245	42 S	25 S	30 S	40 S	36 S	12 R	37 S
<i>N. brasiliensis</i>	83	52 S	0 R	48 S	40 S	47 S	17 R	35 S
<i>N. brasiliensis</i>	122	47 S	20 R	25 S	25 S	45 S	0 R	40 S
<i>N. brasiliensis</i>	136	43 S	13 R	37 S	30 S	43 S	14 R	32 S
<i>N. brasiliensis</i>	236	63 S	46 S	40 S	28 S	46 S	12 R	38 S
<i>N. brasiliensis</i>	280	45 S	15 R	30 S	28 S	41 S	0 R	39 S
<i>N. brasiliensis</i>	295	47 S	30 S	41 S	43 S	38 S	49 S	59 S
<i>N. brasiliensis</i>	404	44 S	0 R	45 S	36 S	46 S	9 R	37 S
<i>N. brasiliensis</i>	463	64 S	36 S	55 S	50 S	56 S	60 S	32 S
<i>N. brasiliensis</i>	498	62 S	15 R	51 S	24 S	52 S	21 I	32 S
<i>N. brasiliensis</i>	514	66 S	18 R	68 S	59 S	62 S	20 I	54 S
<i>N. brasiliensis</i>	539	52 S	9 R	47 S	46 S	48 S	8 R	45 S
<i>N. brasiliensis</i>	554	44 S	19 R	48 S	50 S	63 S	15 R	60 S
<i>N. brasiliensis</i>	561	32 S	32 S	39 S	54 S	32 S	60 S	34 S
<i>N. brasiliensis</i>	563	58 S	17 R	48 S	41 S	52 S	11 R	41 S
<i>N. brasiliensis</i>	573	49 S	15 R	40 S	38 S	40 S	0 R	31 S
<i>N. brasiliensis</i>	581	56 S	20 R	39 S	30 S	46 S	11 R	42 S
<i>N. brasiliensis</i>	608	54 S	24 I	48 S	49 S	54 S	14 R	53 S
<i>N. brasiliensis</i>	718	62 S	25 S	20 S	62 S	47 S	0 R	44 S
<i>N. brasiliensis</i>	736	50 S	0 R	32 S	0 R	47 S	49 S	47 S
<i>N. brasiliensis</i>	739	60 S	0 R	54 S	40 S	55 S	0 R	41 S
<i>N. brasiliensis</i>	775	51 S	17 R	55 S	35 S	55 S	0 R	49 S
<i>N. brasiliensis</i>	860	45	20	40	62	51	12	46

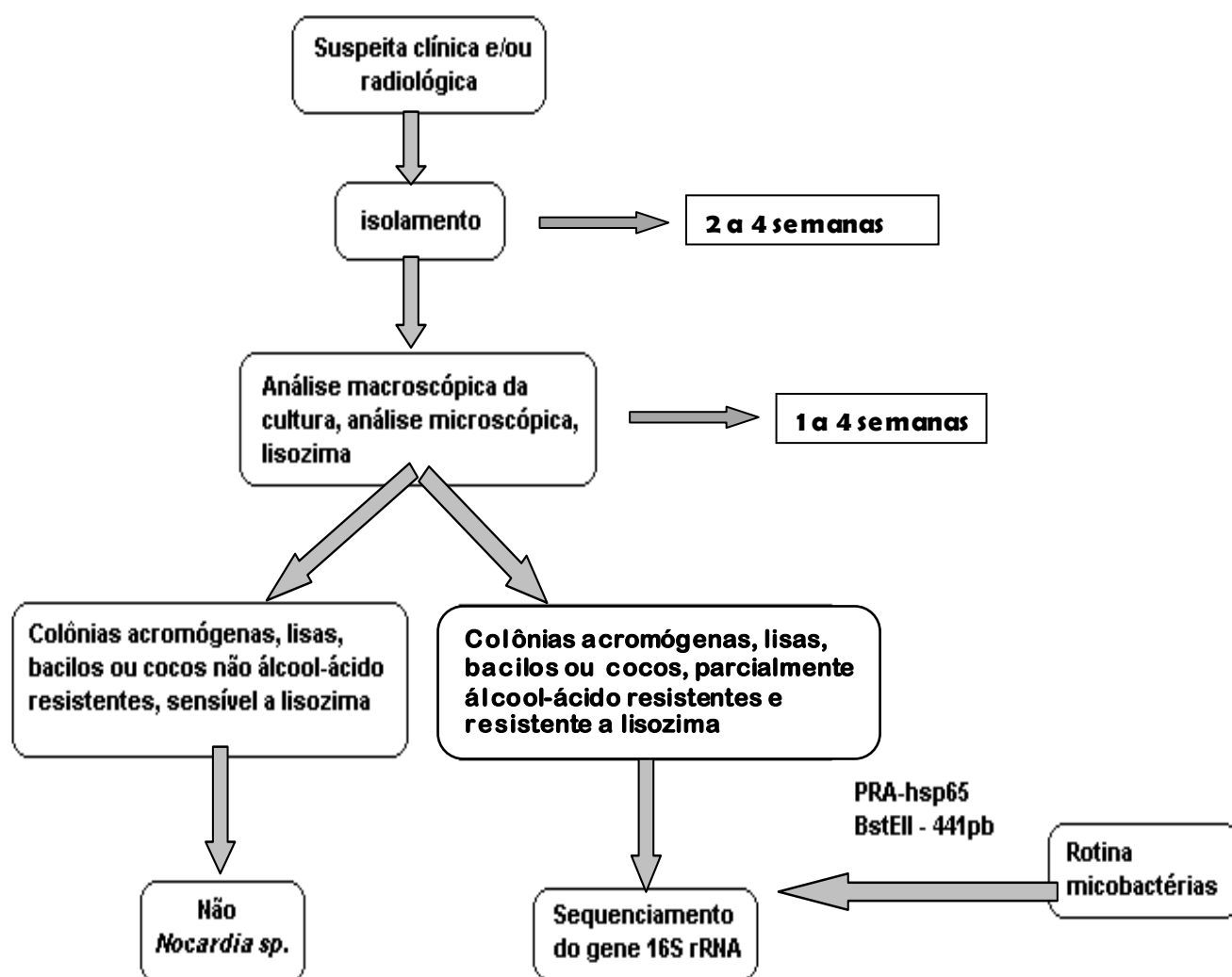
		S	R	S	S	S	R	S
<i>N. brasiliensis</i>	865	61 S	20 R	40 S	47 S	50 S	27 S	55 S
<i>N. cyriacigeorgica</i>	1366	41 S	13 R	24 S	15 R	42 S	28 S	35 S
<i>N. cyriacigeorgica</i>	533	42 S	9 R	44 S	33 S	40 S	35 S	30 S
<i>N. cyriacigeorgica</i>	9854	42 S	0 R	25 S	17 I	44 S	36 S	51 S
<i>N. exalbida</i>	787	65 S	30 S	59 S	50 S	45 S	19 I	55 S
<i>N. farcinica</i>	935	40 S	36 S	50 S	12 R	10 R	35 S	41 S
<i>N. farcinica</i>	3924	36 S	24 I	30 S	30 S	11 R	39 S	34 S
<i>N. nova</i>	HC Derm	45 S	0 R	40 S	35 S	25 S	23 I	31 S
<i>N. nova</i>	2123	51 S	16 R	37 S	15 R	18 S	62 S	41 S
<i>N. nova</i>	2124	44 S	14 R	35 S	18 I	26 S	62 S	35 S
<i>N. nova</i>	2125	43 S	0 R	31 S	0 R	24 S	55 S	40 S
<i>N. nova</i>	820	41 S	0 R	37 S	0 R	12 R	60 S	35 S
<i>N. nova</i>	2513	46 S	0 R	38 S	0 R	13 R	65 S	37 S
<i>N. otitidiscaviarum</i>	937	39 S	25 S	47 S	9 R	28 S	35 S	35 S
<i>N. otitidiscaviarum</i>	938	43 S	28 S	50 S	12 R	33 S	35 S	38 S
<i>N. otitidiscaviarum</i>	779	47 S	13 R	56 S	11 R	43 S	23 I	34 S
<i>N. otitidiscaviarum</i>	785	40 S	15 R	49 S	11 R	35 S	20 I	22 S
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	9881	47 S	35 S	20 S	33 S	40 S	34 S	35 S
<i>N. thailandica</i>	3926	40 S	12 R	25 S	24 S	35 S	42 S	20 S
<i>N. vaccinii</i>	2133	63 S	53 S	47 S	0 R	60 S	30 S	70 S
<i>N. veterana</i>	3286	49 S	35 S	40 S	35 S	47 S	40 S	40 S
<i>N. veterana</i>	580	37 S	9 R	33 S	36 S	11 R	56 S	32 S
<i>N. vermiculata</i>	471	26 S	21 R	37 S	42 S	17 I	49 S	35 S
<i>N. yamanashiensis</i>	227	60 S	27 S	43 S	16 R	22 S	37 S	29 S

S: sensível; R: resistente; AK: amicacina; CIP: ciprofloxacina; MIN: minociclina; TOB: tobramicina; Aca: Amoxicilina+ácido clavulânico; IMP: imipenem; SFT: Sulfametoxazol+Trimetoprim

6 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS E PROPOSIÇÃO DE ALGORITMO DE IDENTIFICAÇÃO

A partir dos dados obtidos no presente estudo, propomos um algoritmo de identificação (**Figura 16**) baseado na sensibilidade, tempo e facilidade na execução de cada método. Dada a suspeita clínica e/ou radiológica de nocardiose, o agente deve ser isolado e, após o isolamento, as características macro e micromorfológicas devem ser analisadas. Se a cultura apresentar colônias pigmentadas ou não, com aspecto rugoso a cerebriforme, filamentos e/ou cocobacilos e parcialmente álcool-ácido resistentes, deve ser feita a prova de resistência a lisozima. Os isolados resistentes devem ser submetidos ao sequenciamento do gene 16S rRNA para obtenção da identificação final. A identificação por PRA-*hsp65* será útil na rotina de um laboratório de micobactérias como identificação presuntiva, quando não houver digestão com a enzima *BstEII* e for obtido padrão desconhecido para micobactérias com a enzima *HaeIII*. Esse isolado deverá ser encaminhado para sequenciamento do gene 16S rRNA. Em um laboratório de média complexidade, o PRA-*hsp65* deverá ser o método de escolha para a identificação final.

Figura 16. Algoritmo de identificação de *Nocardia* sp. com a utilização dos métodos mais eficientes na diferenciação de espécies desse gênero.



7 DISCUSSÃO

O gênero *Nocardia* é de grande importância na saúde pública devido à gravidade das infecções causadas em humanos e animais (Ribeiro et al., 2008; Conville e Witebsky, 2011).

Até a presente data, o gênero compreende 102 espécies das quais pelo menos 30 espécies são consideradas como patógenos oportunistas em humanos (Conville e Witebsky, 2011; Euzéby, 2011).

No presente estudo foram selecionados 72 isolados de *Nocardia* provenientes da micoteca do IMTSP e IAL e foram avaliados aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares, bem como a suscetibilidade aos fármacos.

Ao avaliarmos os métodos fenotípicos observamos que não há como identificar as espécies apenas por tais métodos. Para que seja feita a identificação conclusiva são necessários outros métodos. Essa dificuldade deve-se ao fato de que nem todas as espécies possuem perfis fenotípicos definidos, principalmente as espécies recentemente descritas. Ao revisar aspectos laboratoriais do gênero *Nocardia*, com base na atual taxonomia molecular, Brown-Elliott et al. (2006), observaram que ainda existe controvérsia com os métodos fenotípicos para algumas espécies que não tem perfil definidos. Os autores relatam que espécies podem ser descritas erroneamente quando identificadas apenas por métodos fenotípicos (Brown-Elliott et al., 2006). Analisando os resultados fenotípicos obtidos no presente estudo, observamos que apenas 23 (31,95%) isolados tiveram identificação concordante com o sequenciamento do gene 16S rDNA.

Segundo alguns autores a identificação fenotípica de *Nocardia* é muitas vezes considerada trabalhosa, difícil e requer, para alguns testes, longos tempos de incubação, como para os testes de decomposição de tirosina, xantina, hipoxantina e resistência à lisozima (Muir e Pritchard, 1997; Clark, 2009; Roth et al., 2003).

Durante a realização dos testes de resistência à lisozima observamos que, diferente do esperado, em quatro isolados identificados como *Nocardia* não foi observado crescimento. Segundo Berd (1973), a resistência à lisozima é utilizada para diferenciar o gênero *Nocardia* de outros actinomicetos aeróbicos. Porém, como relatado por vários autores, existem falhas com os testes bioquímicos. Da mesma

forma, a decomposição de tirosina, xantina, hipoxantina e caseína é indicada para definir o perfil de algumas espécies. No entanto, diferentes espécies possuem o mesmo perfil, impossibilitando a identificação somente por tais testes.

Durante a realização das técnicas, alguns isolados foram de difícil manipulação. Muitas espécies de nocardia tem aspecto macromorfológico rugoso e cerebriforme, tornando a transferência da massa bacteriana para o caldo um processo trabalhoso e elevando o tempo de agitação. Em presença de grumos não é possível fazer uma solução comparável à escala de McFarland. Essa dificuldade pode ser agravada pelo maior risco de contaminação da amostra, ocasionada pelo longo tempo de manipulação.

Observamos que, da mesma forma como as micobactérias são classificadas em crescimento lento e rápido, as nocardias também possuem diferentes tempos de crescimento. No entanto, não existem estudos que mostrem essa diferenciação e esse tempo de crescimento pode afetar diretamente a leitura e análise dos testes fenotípicos e de suscetibilidade. Culturas mais jovens são mais facilmente manipuláveis, uma vez que algumas espécies, com o passar o tempo, produzem substâncias que tornam a cultura muito rígida.

Diante dos resultados apresentados por meio das técnicas fenotípicas é importante ressaltar as limitações dessas técnicas, que não permitiram definir espécies, mesmo quando os resultados foram analisados conjuntamente entre morfologia e perfil bioquímico. Brown e Mcneil (2003), relatam que os testes necessários para diferenciar as espécies de *Nocardia* somam mais de 32 diferentes testes. Brown-Elliott et al. (2006), reforçam que, devido à natureza geralmente não reativa da maioria das espécies e ao número crescente de espécies descritas, os métodos bioquímicos por si só não fornecem a identificação confiável de todas as espécies descritas.

Segundo Brown-Elliott et al. (2006), a identificação de nocardia por meio de métodos moleculares têm tido impacto sobre sua taxonomia. De acordo com os autores, a análise genômica aumentou a compreensão da relação entre as espécies, o que resultou no reconhecimento de muitas novas espécies. O uso de técnicas moleculares proporcionou uma identificação mais rápida e precisa, o que não era possível somente com os métodos fenotípicos (Brown-Elliott et al., 2006).

Em nossa pesquisa, do total de 72 isolados, 26 foram identificados como *N. brasiliensis* (identificação pelo padrão ouro 16S rRNA), representando cerca de 36,1% dos isolados, seguido de *N. nova* (8,3%), *N. otitidiscaviarum* (5,6%) e *N. cyriacigeorgica* (4,2%). Apesar dessa amostragem não representar uma frequência de isolamento devido ao seu caráter de conveniência, ela mostra a existência dessas espécies no Estado de São Paulo. A espécie *N. brasiliensis* é mais isolada em áreas com climas tropicais ou subtropicais, sendo frequentemente relatada no sudoeste ou sudeste dos Estados Unidos (Brown-Elliott et al., 2006; Fergie e Purcell, 2001; Wallace et al., 1995).

De acordo com Welsh e Meji (2007), essa espécie é endêmica no México. No Brasil, há poucos estudos sobre a incidência de *N. brasiliensis*. Chedid e col.²⁴ relataram 22 casos de nocardiose no período de 1977 a 1998, isoladas de pacientes da cidade de Porto Alegre, das quais apenas um foi identificado como *N. brasiliensis* (Chedid et al., 2007).

Castro e Piquero (2008), descreveram 27 casos de micetomas provenientes de pacientes no período de 1990 a 2000, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo. *N. brasiliensis* foi isolada em três casos (Castro e Piquero, 2008).

No Brasil, não existe relato de caso de nocardiose por *N. beijingensis*, mas na amostragem analisada foram identificados 2 isolados (2,8%). A *N. beijingensis* foi descrita pela primeira vez por Wang et al. (2001). Kageyama et al. (2004), isolaram *N. beijingensis* de pacientes com nocardiose na Ásia, e em 2011 foi isolado um caso de *N. beijingensis* na França de um paciente com HIV. De acordo com o autor este foi o primeiro caso de *N. beijingensis* relatado fora da Ásia (Martinaud et al., 2011). Algumas cepas foram isoladas na Europa, mas sem evidências de envolvimento com patologia (Cloud e Conville, 2004).

No presente estudo foi proposto um protocolo rápido e simples para padronização da extração de DNA, com objetivo de otimizar o tempo e diminuir o custo do teste. No primeiro protocolo utilizado, descrito por Chimara et al. (2008), verificamos que a técnica padronizada para *Mycobacterium* não foi reprodutiva para *Nocardia*. Diante disto, o protocolo proposto por Silva et al. (2001), foi utilizado, uma vez que estes autores mostraram uma maior reprodutibilidade com essa

metodologia. Mesmo assim, alguns isolados não amplificaram, e com isso foi proposta a mudança do volume de DNA para 10 μ l, resultando numa amplificação bem sucedida. Protocolo semelhante foi utilizado por Bafghi et al. (2014), que, segundo os autores, é um método simples, rápido, eficaz e altamente reprodutível para a extração de DNA de nocardia. Estes mesmos autores relataram a dificuldade de extração do DNA de nocardia devido à sua complexa parede celular, semelhante ao que foi observado no presente estudo.

Em nosso estudo, inicialmente foram observados 25 isolados com perfis diferentes dos publicados para nocardia com a técnica de PRA-*hsp65*. De acordo com Rodríguez-Nava et al. (2006), existem poucos perfis descritos sobre os padrões de PRA-*hsp65*, o que corresponde a somente 36 espécies de *Nocardia*. No entanto, após a análise das sequências para verificar o tamanho real dos fragmentos (*in silico*), muitos isolados puderam ser identificados e somente 10 diferentes perfis de nocardia, os quais ainda não foram publicados na literatura, foram detectados e considerados novos padrões (NP). Frente a esse erro de leitura dos perfis, sugere-se o uso de um programa informatizado para estimar o tamanho dos fragmentos, diminuindo a porcentagem de erro, aumentando o número de isolados identificados.

Todos os isolados analisados por PRA-*hsp65* não apresentaram sítio de restrição para a enzima *BstEII*, achado concordante com os estudos de Rodríguez-Nava et al. (2006); Steingrube et al. (1997) e Muricy et al. (2014). Estes autores sugerem a utilização dessa análise como identificação presuntiva para separação rápida e simples entre *Mycobacterium* e *Nocardia*. A análise dos perfis de PRA-*hsp65* mostrou que, apesar de trabalhosa, essa técnica poderá ser usada para identificação de *Nocardia*, caso o algoritmo seja ampliado para constar não somente os padrões de cepas de referência, mas os padrões mais comumente isolados na rotina diagnóstica.

Vários estudos mostraram que a análise de sequência do gene 16S rRNA é o método mais usado para identificação e tornou-se padrão ouro para identificação definitiva de espécies de *Nocardia* (Brown-Elliott et al., 2006; Cloud e Conville, 2004; Roth et al., 2003). sendo assim considerado no presente estudo. Comparando os resultados do sequenciamento do gene *hsp65* com o padrão ouro, o índice de concordância foi de 66,0%. Esse comparativo deve ser visto com cautela uma vez

que ainda não é de conhecimento público as limitações que cada alvo possui. No entanto, o presente trabalho apresentou o grande potencial do sequenciamento do gene *hsp65* na identificação de nocardia. De acordo com Rodríguez-Nava et al. (2006), o sequenciamento do gene *hsp65* pode ser utilizado para estabelecer uma nova base de dados, de forma análoga ao banco de dados de 16S rRNA. Os autores relatam ainda que, combinando as sequências de *hsp65* e 16S rRNA seria possível formar a base para uma nova identificação de espécies de *Nocardia*, especialmente para espécies com sequências 16S rRNA semelhantes. No presente estudo foi encontrado um isolado misto de nocardia e micobactéria, que foi identificado como *Mycobacterium abscessus* pelo gene *hsp65* e *N. otitidiscaviarum* pelo gene 16S rRNA. Portanto, a identificação dos diferentes gêneros só foi possível com a utilização de alvos diversos. Esse achado confirma a hipótese de utilização de alvos combinados feita por Rodríguez-Nava et al. (2006).

De acordo com Shimokubo et al. (2002), a ocorrência de infecção mista por nocardia e micobactéria é rara, poucos casos foram relatados. Em um estudo realizado por Gupta e Grover (1991), na Índia com 209 casos de tuberculose pulmonar, foram identificados 2,9% com isolamento de *N. asteroides*. Em 2009, outro caso foi relatado na Índia por Yagi et al. (2014), com o isolamento de nocardia e *M. tuberculosis* de um paciente imunocompetente. Muricy et al. (2014), no período de 2008 a 2012, observaram um caso misto entre nocardia e micobactéria isolado de paciente do Estado de São Paulo. Gupta e Grover (1991), falam da importância do diagnóstico correto de infecção mista, devido à complexidade no estabelecimento de uma estratégia de tratamento.

A técnica de identificação pela análise de espectros proteicos tem sido utilizada como ferramenta diagnóstica para diferentes microrganismos (Wauters et al. (2005). De acordo com Van et al. (2010), a identificação de nocardia sempre foi considerada uma tarefa demorada na rotina laboratorial. Diante disto, algumas publicações propuseram ferramentas para melhorar e facilitar a identificação das espécies. O autor relata que o MALDI-TOF MS pode ser um método capaz de identificar vários microrganismos conhecidos, difíceis de serem identificados por meio de testes convencionais (Mellmann et al., 2008; Pignone et al., 2006).

Dentre os 72 isolados testados, 49 (68,1%) foram identificados como *Nocardia* e 11 (15,2%) como pertencentes a outros gêneros. Ao compararmos os resultados de identificação de MALDI-TOF com os de sequenciamento do gene 16S rRNA, observamos uma concordância de 81,7%, salientando que 10% desses resultados são referentes a isolados identificados por MALDI-TOF MS somente até o nível de gênero.

Verroken et al. (2010), em um estudo feito com o equipamento Bruker Biotyper, relatam que 19 isolados (44%) foram corretamente identificados, dos quais 10 (23%) foram identificados em nível de espécie e 9 (21%) foram identificados ao nível de gênero. Dos 10 isolados que foram identificados ao nível de espécie, nove eram *N. nova* e um *N. brasiliensis* (Verroken et al., 2010). De acordo com os autores, a Bruker Biotyper não conseguiu identificar com precisão todos isolados de *N. brasiliensis*, *N. cyriacigeorgica*, e *N. farcinica*. Porém ressalta que a grande vantagem do MALDI-TOF MS é a identificação rápida a partir de colônias cultivadas, com um tempo de resposta muito curto, além disso demonstra alta sensibilidade para uma rápida e fácil identificação de espécies de nocardia (Verroken et al., 2010).

Em um estudo feito por Farfour et al. (2012), 46 isolados de *Nocardia* foram avaliados por MALDI-TOF MS das quais 42 (91,3%) foram identificados em nível de espécie pelo sistema Bruker Biotyper, incluindo seis de sete isolados de *N. brasiliensis*, 10 de 11 isolados de *N. farcinica*, e todos os isolados de *N. nova*, *N. abscessus*, *N. beijingensis*, *N. asteroides* e *N. otitidiscaviarum*. Os autores sugerem que seja necessário atualizar continuamente os bancos de dados para a identificação de *Nocardia* (Farfour et al., 2012).

Apesar de promissora, a técnica ainda precisa ser aprimorada para o uso na identificação de micobactérias e nocardias. Segundo Seng et al. (2009), a base de dados de referência pode ser um dos fatores mais importantes pelos quais a técnica de MALDI-TOF MS não leva a uma identificação conclusiva. O aprimoramento da técnica revelou, ao longo dos últimos anos, que pode ser um método rápido, preciso e fácil de usar para a identificação de microrganismos (Saleeb et al., 2011). Até o momento, o MALDI-TOF MS tem sido testado para a identificação de vários grupos de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas,

micobactérias e leveduras (Seng et al., 2009; Mellmann et al., 2008; Pignone et al., 2006).

A análise dos resultados obtidos na técnica MALDI-TOF MS levou à observação de pontos importantes no desenvolvimento dessa metodologia. A alteração do método de extração de proteínas aumentou a qualidade dos espectros, mas a prática mostrou que algumas etapas, se alteradas, ainda podem render melhores espectros. Uma vez que alguns isolados só foram identificados ao nível de espécie devido a obtenção de espectros com índices abaixo de 1.8, a melhoria da técnica de extração poderia possibilitar a correta identificação destes isolados. Outro ponto que prejudica a análise é que a quantidade de perfis de nocardias armazenados no banco de dados ainda é pequeno, por isso a chance de se encontrar um perfil semelhante ao estudado é baixa. A inclusão de perfis inter e intra-específicos pode aumentar a acurácia da técnica.

Hsueh et al. (2014), relatam que, embora *N. brasiliensis*, *N. cyriacigeorgica*, e *N. farcinica* sejam as espécies mais encontradas em ambientes clínicos, o sistema não foi capaz de identificá-los com precisão em nível de espécie. Dos 47 isolados das três espécies, apenas 35 (74,5%) foram identificados como mesma espécie. Os autores sugerem que o MALDI-TOF é ineficaz para a identificação de *Nocardia* pelas limitações de banco de dados, e que é necessário atualizar continuamente esses bancos (Hsueh et al., 2014).

A utilização de MALDI-TOF MS como uma ferramenta para a identificação de organismos de crescimento lento, como as espécies de *Nocardia*, difíceis de identificar por testes convencionais em laboratórios de rotina, pode ser de grande interesse. Um fator que limita a utilização de técnica ainda é a disponibilidade de dados de referência (Verroken et al., 2010).

Estudos revelam a importância da escolha terapêutica para pacientes com Nocardiose e os testes de suscetibilidade são ferramentas importantes nesse processo (Lai et al., 2011). De acordo com os autores os testes de suscetibilidade também são importantes para avaliar a distribuição epidemiológica entre as diferentes espécies (Lai et al., 2011).

O corante resazurina tem sido utilizado por alguns autores para leitura de MIC em micobactérias e fungos. Segundo Manavathu et al. (2004), a resazurina é um

reagente não radioativo e não tóxico, solúvel em água, sendo sua cor natural azul modificada para rosa em presença de células viáveis. De acordo com esses autores, a resazurina pode ser utilizada para determinação de MIC aos antifúngicos, fungicidas e fungistáticos, tais como a anfotericina B e itraconazol (Manavathu et al., 2004). Yamaguchi et al. (2002), também descreveram o uso deste reagente de modo eficaz, para determinação de MIC para vários antifúngicos. O ensaio de microtitulação com resazurina foi descrito para a determinação de MIC com isolados clínicos de *M. tuberculosis* e foi testado com sucesso por Gabrielson et al. (2002) e Palomino et al. (2002). Até a presente data não há relatos que a resazurina tenha sido utilizada para leitura de MIC em *Nocardia* sp. Desta forma foi utilizada pela primeira vez neste estudo, demonstrando eficiência na leitura, com uma melhor detecção do crescimento.

Dentre os isolados de *N. brasiliensis* identificados, encontramos uma elevada taxa de sensibilidade para ciprofloxacina (80,8%) e de resistência (73,1%) para sulfametoxazol-trimetoprim (**Tabela 5**). De acordo com alguns autores (Brown-Elliott et al., 2006; Conville et al., 2012; Tripodi et al., 2011), o padrão de suscetibilidade para esses fármacos é o contrário do observado, resistente para ciprofloxacina e sensível para sulfametoxazol-trimetoprim.

Segundo Raymonet et al. (1983), Smego e Gallis, (1984), desde 1983 a escolha terapêutica recomendada no tratamento de infecções por *Nocardia* é sulfametoxazol-trimetoprim (Raymonet et al., 1983; Smego e Gallis, 1984). O presente estudo, ao contrário do esperado, revelou um alto índice de resistência para esses fármacos associados.

Segundo Brown-Elliott et al. (2006), as espécies *N. brasiliensis*, *N. otitidiscavarium* e *N. pseudobrasiliensis* são sensíveis a esses fármacos, diferentemente do observado em nosso estudo. Um estudo feito por Lowman e Aithma (2010), mostrou 100% de sensibilidade a este fármaco para isolados de *Nocardia* (Lowman e Aithma, 2010). Porém, Barion et al., (1992) e Mootsikapum et al., (2005), relatam resistência a sulfonamida na Europa, Japão, Tailândia e Kuwait. Um estudo retrospectivo realizado com testes de susceptibilidade por Uhde et al. (2010), no período de 1995–2004, com isolados de *Nocardia* demonstrou que, dos 765 isolados submetidos a tais testes, 42% eram resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim. As espécies mais relatadas como resistentes a esse fármaco foram *N.*

brevicatena (13%), *N. brasiliensis* (21%), *N. cyriacigeorgica* (22%), *N. otitidiscavarium* (32%), *N. nova* (53%,) e *N. farcinica* (80%) (Uhde et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo.

Essa primeira análise sugere cautela no uso de sulfametoxazol-trimethoprim no tratamento da nocardiose. Aydoslu e Tugrul (2007) ressaltam que diante da diversidade de resultados, uma vez que recentemente existe um aumento no número de pacientes imunocomprometidos com Nocardiose, o sulfametoxazol-trimethoprim deve ser usado com cuidado para a terapia empírica (Aydoslu e Tugrul, 2007). Huovinen et al. (2014), sugerem que a resistência aos fármacos para o gênero *Nocardia* pode variar geograficamente (Huovinen et al., 2014)

O fármaco imipenem apresentou elevado índice de resistência (54%) no MIC, principalmente para a espécie *N. brasiliensis* (69,6%). O mesmo foi observado através do disco disco difusão, onde foi observado índice de resistência para *N. brasiliensis* de 69,5%. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos no estudo de Uhde et al. (2010), que, dentre as espécies estudadas, *N. brasiliensis* teve taxa elevada de resistência (83%). De acordo com o estudo realizado por Conville et al. (2012), *N. brasiliensis* é resistente a esse fármaco. Porém um estudo feito por Lowman e Aithma (2010), mostrou sensibilidade de (48,8%) a este fármaco (Lowman e Aithma, 2010).

Ao estudarmos a atividade da amicacina utilizando as duas metodologias (MIC e disco difusão), observamos que todos os isolados foram sensíveis em ambas as técnicas, resultados já demonstrados por outros autores (Brown-Elliot et al. (2006; Lai et al. 2011; Conville et al., 2012). Estudo feito por Bibi et al. (2011), com isolados de *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* e *N. caviae* utilizando o método disco de difusão, também mostraram elevada taxa de sensibilidade a amicacina (99%), assim como demonstrado por Lowman e Aithma, (2010). Aydoslu e Tugrul (2007), também demonstraram 100% de sensibilidade a este fármaco por meio do teste de disco difusão.

Ao avaliarmos a atividade da tobramicina, observamos elevada porcentagem de isolados sensíveis a esse fármaco por meio das técnicas MIC e disco difusão, apresentando 84% e 86% respectivamente. *N. farcinica* e *N. nova* foram as únicas espécies que mostraram perfil de resistência para as duas técnicas (MIC e disco

difusão). Estudo realizado por Tripodi et al. (2011), mostrou alta sensibilidade frente a este fármaco e perfil de resistência apenas para as espécies de *N. farcinica* e *N. nova*, o mesmo visto no presente estudo.

Os resultados do perfil frente a minociclina mostraram elevado índice de sensibilidade, observando que 76% dos isolados foram sensíveis a este fármaco pelo teste de MIC e 100% pelo disco difusão (**Tabela 6**). Resultados semelhantes foram observados em um estudo de Conville et al. (2012), que mostraram elevada sensibilidade a esse fármaco. As espécies observada neste estudo, que apresentaram perfil de resistências foram: *N. nova*, *N. brasiliensis* e *N. farcinica*. Resultados semelhantes visto por Conville et al. (2012), dentre as espécies, observaram perfil de resistências entre *N. nova*, *N. cyriacigeorgica* e *N. farcinica*.

Dos 50 isolados de nocardias avaliados por amoxicilina+ácido clavulânico, 68% foram considerados sensíveis. O mesmo perfil foi observado através do DD, demonstrando concordância entre as duas técnicas (**Tabela 9**). Resultados semelhantes foram demonstrados por outros autores (Brown-Elliott et al., 2006; Lai et al., 2011; Schlager et al., 2014), que encontraram altos índices de sensibilidade a amoxicilina+ácido clavulânico e observaram resistência a este fármaco apenas entre as espécies de *N. nova*, *N. otitidiscavarium* e *N. cyriacigeorgica*. Um estudo feito por Bibi et al. (2011), utilizando a técnica de disco difusão, mostrou sensibilidade a amoxicilina+ácido clavulânico entre as espécies *N. asteroides*, *N. otitidiscavarium* e *N. caviae* (Bibi et al., 2011).

Os perfil de suscetibilidade frente a ciprofloxacina através do MIC mostraram resistência em 34% dos isolados. Já os resultados obtidos através do disco difusão demonstraram 64% de resistência para este fármaco, demonstrando índice de resistência bem mais elevado que o MIC (**Tabela 9**). Quando observado o perfil das diferentes espécies, os resultados demonstraram resistência para *N. nova*, *N. otitidiscavarium*, *N. cyriacigeorgica* e *N. brasiliensis*. Brown-Elliott et al. (2006), Conville et al. (2012) e Tripodi et al. (2011), relataram resistência a ciprofloxacina para as mesmas espécies, vista no presente estudo.

Esses resultados mostram a variabilidade de perfis, sugerindo que a utilização de perfis de suscetibilidade para fins de identificação seja feita com cautela. Segundo Brown-Elliott et al. (2006), para o bom desempenho e interpretação do teste de

suscetibilidade aos fármacos para nocardia é necessária habilidade adquirida através da experiência com o método de ensaio e o conhecimento dos padrões de suscetibilidade de várias espécies.

Analisando os resultados dos testes de suscetibilidade, verificamos que ainda há necessidade de padronização dos testes frente as diferentes espécies. Em nosso estudo encontramos perfil de suscetibilidade diferente em uma mesma espécie, como visto entre as espécies de *N. brasiliensis* e *N. nova*, observado entre as drogas amoxicilina-ácido clavulânico, ciprofloxacina e imipenem. Isso pode implicar em identificação errônea da espécie e tratamento inadequado, uma vez que uma mesma espécie mostrou resistência ou sensibilidade ao mesmo fármaco. Ou seja, é necessária a realização de teste de suscetibilidade para todo isolado que estiver causando doença.

A utilização de diferentes métodos para a identificação de isolados de *Nocardia* sp. revelou que nenhuma técnica é capaz de identificar 100% das amostras. Frente a essa dificuldade, foi elaborado um algoritmo que detecta as características mais discriminativas do gênero utilizando os métodos mais acurados para cada característica. A limitação do algoritmo encontra-se na necessidade de utilização de isolados, uma vez que ainda não existem técnicas que permitam o diagnóstico de nocardiose diretamente da amostra clínica. O algoritmo de identificação proposto utiliza técnicas fenotípicas para triagem, diferenciando as nocardias de outros gêneros. Essas técnicas incluem a análise microscópica do isolado com coloração pelo método de Gram e com coloração de Ziehl Neelsen, prova de resistência à liozima e hidrólise de esculina. Essa triagem é essencial em uma rotina, como descrito por Muricy et al. (2014), utilizando técnicas mais fáceis e baratas para detecção de outros microrganismos que não nocardia. A identificação por PRA-*hsp65* pode ser muito discriminatória em laboratório de micobactérias, sendo indicado resultado positivo para nocardia quando não houver digestão com a enzima *BstEII* e for obtido padrão desconhecido para micobactérias com a enzima *HaeIII*. A identificação definitiva deve ser obtida pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

8 CONCLUSÕES

- a) Os métodos fenotípicos de identificação não são completamente capazes de diferenciar as espécies de nocardia;
- b) A prova de resistência à lisozima pode ser um teste presuntivo para análise de isolados com suspeita de nocardia;
- c) Os isolados de *Nocardia* sp. podem ser visualizados com coloração de Ziehl Neelsen, padronizada para microscopia de micobactérias;
- d) A técnica PRA-*hsp65* pode ser utilizada para identificação de isolados de *Nocardia* sp. e a análise dos resultados deve ser feita, preferencialmente, com auxílio de programas para análise molecular;
- e) Novos perfis de nocardia devem ser estudados e descritos para aumentar a eficiência da utilização da técnica PRA-*hsp65* na identificação;
- f) A técnica MALDI-TOF MS é um método promissor na identificação de nocardias, mas necessita de padronização de protocolo de extração e ampliação do banco de dados;
- g) A utilização da resazurina na leitura do teste de suscetibilidade de nocardia pelo método de concentração inibitória mínima é um método simples e eficiente;
- h) As discrepâncias encontradas nos testes de suscetibilidade pelos métodos de concentração inibitória mínima e disco difusão são evidências da necessidade de padronização dos critérios interpretativos de disco difusão para nocardias.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aydoslu B, Tugrul HM. *Nocardia* spp. isolated from immunocompromised patients in Trakya University Medical Faculty Hospital and their antibiotic susceptibilities. *Mikrobiyol Bul.* 2007; 41:529-35.
2. Ashdown LR. Improved screening technique for isolation of *Nocardia* species from sputum specimens. *Pathology.* 1990; 22:157-161.
3. Boiron P, Provost F, Chevrier G, Dupont B. Review of nocardial infections in France 1987 to 1990. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992; 11:709–714.
4. Beaman BL, Beaman L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7:213-264.
5. Beaman BL, Burnside J, Edwards B, Causey W. Causey W. Nocardial infections in the United States, 1972-1974. *J Infect Dis.* 1976; 134(3): 286-289.
6. Berd D. Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol.* 1973; 25:665-681.
7. Brown JM, McNeil MM. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical Microbiology*, 8th ed. Washington DC: Press. 2003; 502–531.
8. Brown BA, Wallace Jr RJ. Broth microdilution MIC test for *Nocardia* spp. In *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology. 1992; 5.12.1–5.12.9
9. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace Jr. Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:259-82.
10. Braun TI, Kerson LA, Eisenberg FP. Nocardial brain abscesses in a pregnant woman. *Rev Infect Dis.* 1991;13:630-632.
11. Bibi S, Irfan S, Zafar A, Khan E. Isolation frequency and susceptibility patterns of *Nocardia* species at a tertiary hospital laboratory in Karachi. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5:499-501
12. Bafghi MF, Eshraghi SS, Heidarieh P, Habibnia S, Nasab MR. Disseminated *Nocardia asteroides* infection in an immunocompetent woman following an arm injury. *Infection* 2003; 31: 112-4.
13. Bafghi MF, Eshraghi SS, Heidarieh P, Habibnia S, Nasab MR. DNA

extraction from nocardia species for special genes analysis using PCR. North Am J Med Sci. 2014; 6:231-3.

14. Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ Comparative evaluation of the E test for susceptibility testing of *Nocardia* species. Diagn. Microbiol. Infect. 1994; 19:101–110.
15. Bani-Sadr F, Hamidou M, Raffi F, Chamoux C, Caillon J, Freland C. Aspects cliniques et bactériologiques des nocardioses. Presse Med. 1995; 24: 1062-1066.
16. Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes. Approved standard – second edition. 2011; M24-A2.
17. Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. CLSI document. 2013; M100-S23.
18. Chedid MBF, Chedid MF, Porto NS, Severo CB, Severo LC. Nocardial infections: report of 22 cases. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2007; 49:239-246.
19. Castro LGM, Piquero-Casals J. Clinical and mycologic findings and therapeutic outcome of 27 mycetoma patients from São Paulo, Brazil. Int J Dermat. 2008; 47:160-163.
20. Conville PS, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Frank Jr, Witebsky G, et al. Multisite reproducibility of the broth microdilution method for susceptibility testing of *Nocardia* species. J. Clin. Microbiol. 2012; 50:1270–1280.
21. Conville PS, Witebsky F. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*. Manual of Clinical Microbiology. 2011; 10.
22. Curry WA. Human nocardiosis. A clinical review with selected case reports. Arch Intern Med. 1980; 140:818-826.
23. Cross RM, Bindford ChH. Is *Nocardia asteroides* an opportunistic pathogen? Lab Invest. 1962; 11-1103.
24. Clark NM, AST Infectious Diseases Community of Practice *Nocardia* in Solid Organ Transplant Recipients. Am J Transplant. 2009 S70–S77.
25. Chapman SW, Wilson JP. Nocardiosis in transplant recipients. Semin Respir Infect 1990; 5:74–79.
26. Cloud JL, Conville A, Croft A, Harmsen D, Witebsky FG, Carroll KC. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded

database. J Clin Microbiol. 2004; 42:578-584.

27. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Maria CM, Alan M, Durham R, et al. 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.
28. Chang PL, Hsieh WS, Chiang CL. The *hsp65* gene patterns of less common *Mycobacterium* and *Nocardia* spp. By polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis with capillary electrophoresis. Diag Microbiol Inf Dis. 2007; 58:315-323.
29. Dorman SE, Guide SV, Conville PS, Carlo ES, Malech HL, Gallin JI, et al. *Nocardia* infection in chronic granulomatous disease. Clin Infect Dis. 2002; 35:390-394.
30. Dominguez DC, Anthony SJ. Actinomyces and *Nocardia* infections in immunocompromised and nonimmunocompromised patients. J Natl Med Assoc. 1999; 9:35-39.
31. Dodiuk-Gad R, Cohen E, Ziv M, Goldstein LH. Cutaneous nocardiosis: report of two cases and review of the literature. Int J Dermatol. 2010; 49:1380-1385.
32. Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature. [citado 2015 Abr 08]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>
33. Eppinger H. Uber. eine neue pathogene Cladothrix und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis (Cladothrichica). Beitr Pathol Anat Allg Pathol. 1891; 9:287-328.
34. Farfour E, Leto J, Barritault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. J. Clin. Microbiol. 2012; 50:2702-2707.
35. Filice GA. Nocardiosis. In Niederman MS, Sarosi GA, Glassroth J (ed.), Respiratory infections, 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001; p. 457-466.
36. Fergie JE, Purcell K. Nocardiosis in south Texas children. Pediatr. Infect. Dis. J. 2001; 20:711-714.
37. Gupta ML, Grover PS, Bhardwaj BK. *Nocardia* associated with pulmonary tuberculosis. 1991; 23(2):157-9.
38. Glupczynski Y, Berhin C, Janssens M, Wauters J. Determination of

- antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* spp. from clinical specimens by Etest. Clin Microbiol Infect. 2006; 12:905–912.
39. Gordon RE, Mihm JM. The type species of the genus *Nocardia*. J Gen Microbiol 1962; 27: 1-10.
 40. Goodfellow M. The family *Nocardiaceae*. In Ballows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (ed.) The prokaryotes, vol. II, 2nd ed. Springer-Verlag, New York. 1992; 1118-213.
 41. Georghiou PR, Blacklock ZM. Infection with *Nocardia* species in Queensland. A review of 102 clinical isolates. Med J Aust 1992; 156:692-697.
 42. Gabrielson J, Hart M, Jarelöv A, Kühn I, McKenzie D, Möllby R . Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. J Microbiol Methods. 2002; 50, 63–73.
 43. Hsueh Po-Ren, Lee Tai-Fen, Shin-Hei Du, Shih-Hua Teng, Chun-Hsing Liao, Wang-Hui Sheng, et al. Bruker Biotyper Matrix-Assisted Spectrometry System for Identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* Species. Journal of Clinical Microbiology. 2014; 2371–2379.
 44. Huovinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin Infect Dis. 2001; 32:1608–1614.
 45. Kageyama A, Hoshino Y, Watanabe M, Yazawa K, Mikami Y. Clinical isolates of *Nocardia brasiliensis* from Japan exhibit variable susceptibility to the antibiotic imipenem. Mycopathologia. 2004; 158:275–278.
 46. Kiska DL, Hicks K, Pettit DJ. Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. J Clin Microbiol. 2002; 40:1346-51.
 47. Lerner PI. Nocardiosis. Clin Infect Dis. 1996; 22:891-905.
 48. Lacaz CS. Distribuição dos micetomas no Brasil. Bras Derm. 1981; 56: 167-172.
 49. Lechevalier HA. Nocardiform actinomycetes. In Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1989; 2348-404.
 50. Long PF. A retrospective study of *Nocardia* infections associated with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Infection. 1994; 22:362–364.
 51. Lowman W, Aithma N. Antimicrobial Susceptibility Testing and Profiling of *Nocardia* Species and Other Aerobic Actinomycetes from South Africa:

- Comparative Evaluation of Broth Microdilution versus the Etest. *J. of Clinical Microbiology*. 2010; 4534 - 4540.
52. Lai CC, Liu WL, Ko WC, Chen YH, Tang HJ, Huang YT. Antimicrobial-resistant *Nocardia* isolates, Taiwan, 1998-2009. *Clin Infect Dis*. 2011;52:833-5.
53. Lacaz CS. Contribuição para o estudo dos actinomicetos produtores de micetomas. São Paulo, 1945.
54. Laurent F, Poirel L, Naas T, Boiron P. Biochemical-genetic analysis and distribution of FAR-1, a class A beta-lactamase from *Nocardia farcinica*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43:1644-1650.
55. Marquez-Diaz F, Soto-Ramirez LE. Nocardiosis in patients with HIV infection. *AIDS Patient Care STDs*. 1998; 12:825-832.
56. McNeil MM, Brown JM. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 1994; 7:357-417.
57. Minero MV, Marín M, Cercenado E, Rabadán PM, Bouza E, Muñoz P. Nocardiosis at the turn of the century. *Medicine*. 2009; 88:250-261.
58. Menendez R, Cordero PJ, Santos M, Gobernardo M, Marco M. Pulmonary infection with *Nocardia* species: a report of 10 cases and review. *Eur Respir J*. 1997; 10: 1542-1546.
59. Martinez Tomas R, Menendez Villanueva R, Reyes Calzada S. Pulmonary nocardiosis: risk factors and outcomes. *Respirology*. 2007; 12:394-400.
60. Moylett EH, Pacheco SE, Brown-Elliott BA, Perry TR, Buescher ES, Birmingham MC et al. Clinical experience with linezolid for the treatment of *Nocardia* infection. *Clin Infect Dis*. 2003; 36:313-318.
61. Mamelak AN, Obana WG, Flaherty JF, Rosenblum ML. Nocardial brain abscess: treatment strategies and factors influencing outcome. *Neurosurgery*. 1994; 35:622-631.
62. Mahgoub ES. Agents of mycetoma. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*, 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. 2327-30.
63. Muricy E C M, Lemes R A, Bombarda S, Ferrazoli L, Chimara E. Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: critical aspects for bacteriological diagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2014; 397-401.
64. Mootsikapun P, Intarapoka B, Liawnoraset W. Nocardiosis in Srinagarind

Hospital, Thailand: review of 70 cases from 1996–2001. *Int J Infect Dis.* 2005; 9:154–158.

65. Moraes PR, Chimara E, Telles MA, Ueki SY, Cunha EA, Honer MR et al. Identification of non-tuberculous mycobacteria from the Central Public Health Laboratory from Mato Grosso do Sul and analysis of clinical relevance. *Braz J Microbiol.* 2008; 39:268-272.
66. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis, of multilocus sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48, 4525–4533.
67. McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:3000-11.
68. Muir DB, Pritchard RC. Use of the BioMerieux ID 32C yeast identification system for identification of aerobic actinomycetes of medical importance. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:3240–3243.
69. Martinaud C, Verdonk C, Bousquet A, Macnab C, Vaylet F, Soler C. Isolation of *Nocardia beijingensis* from a pulmonary abscess reveals human immunodeficiency virus infection. 2011; 2748-50.
70. Manavathu EK, Ramesh MS, Baskaran I, Ganesan LT, Chandrasekar PHA. Comparative Study of the Post- antifungal Effect (PAFE) of Amphotericin B, Triazoles and Echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. 2004; 53, 386–389.
71. Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckvoet U, Ramminger I, Iwen P et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:1946–1954.
72. Nocard E. Note sur la maladie des boeufs de la Gouadeloupe connue sous le nom de farcin. *Ann Inst Pasteur.* 1888; 2:293–302.
73. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46, 2720–2722.
74. Palacios R, Santos J, Garcia-Ordkez JM. Nocardiosis in patients with HIV infection [Abstract P309]. In: 8th European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection, Athens, Greece. Athens: Provoli Publicity. 2001; 192.

75. Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:1963–1970.
76. Perçin D, Sümerkan B, Inci R. Comparative evaluation of e-test and disk diffusion methods for susceptibility testing of *Nocardia* species. *Mikrobiyol Bul.* 2011; 45:274-9.
77. Presant CA, Wiernik PH, Serpick AA. Factors affecting survival in nocardiosis. *Am Rev Respir Dis.* 1973; 108:1444 -1448.
78. Rubin E, Shin MS. Pleural and extrapleural disease in *Nocardia* infections. *J Can Assoc Radiol.* 1984; 35:189-191.
79. Raymond AS, Moeller MB, Gallis HA. Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for *Nocardia* infections. *Arch Intern Med.* 1983; 143:711–718.
80. Ribeiro MG, Salerno T, Mattos-Guaraldi AL, Camello TC, Langoni H. Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008; 50: 177–185
81. Roth AS, Andrees RM, Kroppenstedt D, Harmsen, Mauch H. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia* asteroids. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:851–856.
82. Reddy AK, Garg P, Kaur I. Speciation and susceptibility of *Nocardia* isolated from ocular infections. *Clin Microbiol and Infect.* 2010; 16: 1168-1171.
83. Rodríguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois JP, Boiron P, Laurent F. Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* gene-based identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:536-546.
84. Sahathevan M, Harvey FA, Forbes G, O'Grady J, Gimson A, Bragman S. Epidemiology, bacteriology and control of an outbreak of *Nocardia asteroides* infection on a liver unit. *J Hosp Infect.* 199; 47:3480.
85. Smego RA Jr, Gallis HA. The clinical spectrum of *Nocardia brasiliensis* infection in the United States. *Rev Infect Dis.* 1984; 6:164-180.
86. Schlaberg R, Mark A, Fisher Kimberley, Hanson E. Susceptibility Profiles of *Nocardia* Isolates Based on Current Taxonomy. *American Society for Microbiology.* 2014; 795– 800-13.
87. Shawar RM, Moore DG, LaRocco MT. Cultivations of *Nocardia* spp. on chemically defined media for selective recovery of isolates from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:508-512.

88. Shen T, Wu L, Geng L, Wei Z, Zheng S. Successful treatment of pulmonary *Nocardia farcinica* infection with linezolid: case report and literature review. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15:486-9.
89. Schaal KP, Lee HJ. Actinomycete infections in humans — a review. *Gene.* 1992; 115:201–211.
90. Silva CF, Ueki SY, Geiger DC, Leão SC. *hsp* 65 PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2001; 43:25-28.
91. Saubolle MA, Sussland D. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4497-4501.
92. Shimokubo T, Ashitani J, Ihi T, Higa T, Kumamoto K. A case of mixed infection by *Nocardia asteroides* and *Mycobacterium tuberculosis*. 2002; 40:703-7.
93. Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:817-822.
94. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 1790–1794.
95. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, Scola PE, Fournier J, Rolain M et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009; 49:543–551.
96. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:175-178.
97. Tremblay J, Thibert L, Alarie I, Valiquette L, Pepin J. Nocardiosis in Québec, Canada, 1988-2008. *Clin Microbiol Infec.* 2011; 17: 690–696
98. Tsukamura M. Numerical taxonomy of the genus *Nocardia*. *J Gen Microbiol.* 1969; 56:265–287.
99. Tan CK, Lai CC, Lin SH, Liao CH, Chou CH, et al. Clinical and microbiological characteristics of Nocardiosis including those caused by emerging *Nocardia* species in Taiwan, 1998–2008. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16: 966–972.

100. Trevisan V. *Generi e le specie delle Batteriacee*. Zanaboni and Gabuzzi, Milan, Italy. 1889.
101. Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R, Cuccurullo S, Mikami Y, Farina C et al. In vitro activity of multiple antibiotic combinations against *Nocardia*: relationship with a short-term treatment strategy in heart transplant recipients with pulmonary nocardiosis. 2011; 13:335-43.
102. Uzcátegui-Negrón M, Serrano JA, Boiron P. Clasificación e identificación de especies de actinomicetos. *Sociedad Venezolana Clin Microbiol*. 2009; 29:91-7.
103. Uhde KB, Pathak S, McCullum Jr, Jannat-Khah DP, Shadomy SV et al. Antimicrobial-resistant nocardia isolates, United States, 1995–2004. *Clin Infect Dis*. 2010; 51: 1445–1448.
104. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol*. 2010; 48:900–907.
105. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang TD, Wauters G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 4015-402.
106. Wallace Jr RJ, Steele LC, Sumter G, Smith JM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32: 1776-1779.
107. Wallace RJ, Tsukamura MJr, Brown BA, Brown J, Steingrube VA, Zhang Y, Nash DR. Cefotaxime-resistant *Nocardia asteroides* strains are isolates of the controversial species *Nocardia farcinica*. *J Clin Microbiol*. 1990; 28:2726–2732.
108. Wallace RJJr, Brown BA, Blacklock Z, Ulrich R, Jost k, Brown JM et al. New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia brasiliensis* associated with invasive disease. *J. Clin. Microbiol*. 1995; 33:1528–1533.
109. Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC. Mycetoma. *Clin Dermatol*. 2007; 25: 195–202.
110. Wang L, Zhang Y, Lu Z, Shi Y, Liu Z, Maldonado L, Goodfellow M. *Nocardia beijingensis* sp., a novel isolate from soil. 200; 51:1783-8.
111. Wilson RW, Steingrube VA, Brown BA, Wallace RJ Jr. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic

Actinomycete isolates. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 148-152.

112. Woo P CY, Lau S K P, Teng J L L, Tse H, Yuen K Y. Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification. *Microbiology and Infectious Diseases, CMI.* 2008; 14, 908–934
113. Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vaneechoutte M, Delme´e et al. Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2624–2628.
114. Wayne PA. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved standard. NCCLS document. 2003; M24-A.
115. Wallace RJ Jr, Septimus EJ, Musher DM, Martin RR. Disk diffusion susceptibility testing of *Nocardia* species. *J Infect Dis.* 1977; 135: 568–576.
116. Yagi K, Ishii M, Kamo T, Tasaka. Pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia cyriacigeorgica* in patients with Mycobacterium avium complex lung disease: two case reports. 2014 -10;14:684.
117. Yamaguchi H, Uchida K, Nagino K, Matsunaga T. Usefulness of a Colorimetric Method for Testing Antifungal Drug Susceptibilities of *Aspergillus* Species to Voriconazole. 2002; 8, 374–377.

10 ANEXOS

Anexo A.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



Projeto nº 0072D-2010 (Protocolo nº 148437/2010)

Caracterização fenotípica e molecular de isolados do gênero *Nocardia* e proposição de algoritmo de identificação

Coordenação: Erica Chimara Silva

Senhora Coordenadora,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico.

Por tratar-se de projeto que *não envolve, direta ou indiretamente, a pesquisa com seres humanos, não exige* a avaliação quanto aos aspectos éticos pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 01 de dezembro de 2010

1a via: CTC/IAL
2a via: Coordenador

Anexo B.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05-103-000 - São Paulo - Brasil
e-mail: epq-imt@usp.br
Telefone: (55-11) 3061-7025 e 3061-8650 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174



São Paulo, 27 de abril de 2011.

Ilmo. (a) Sr. (a)
Dra. Erica Chimara Silva
(aos cuidados de Edna Cleide Mendes Muricy)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, tomou ciência e aprovou o projeto classificado sob número CPE-IMT 2010/085 e intitulado "Caracterização fenotípica e molecular de isolados do gênero *Nocardia* e proposição de um algoritmo de identificação", sob sua responsabilidade. O projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP, para aprovação.

Atenciosamente

Dr. Paulo Cotrim

Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT