

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ALESSANDRA MARQUES CARDOSO

SURTO DE INFECÇÃO APÓS VIDEOSCOPIAS CAUSADO POR
***Mycobacterium massiliense* EM GOIÂNIA-GO: ANÁLISE MOLECULAR E**
DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis

Tese de Doutorado

Goiânia-GO
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ALESSANDRA MARQUES CARDOSO

SURTO DE INFECÇÃO APÓS VIDEOSCOPIAS CAUSADO POR
***Mycobacterium massiliense* EM GOIÂNIA-GO: ANÁLISE MOLECULAR E**
DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IPTSP/UFG como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Tropical com área de concentração Microbiologia.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro do CNPq e ANVISA-OPAS.

Goiânia-GO
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GT/BC/UFG

C268s Cardoso, Alessandra Marques.
Surto de infecção após videoscopias causado por
Mycobacterium massiliense em Goiânia-GO [manuscrito]:
análise molecular e determinação da suscetibilidade aos
antimicrobianos / Alessandra Marques Cardoso. - 2009.
85 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis; Co-Orientadora:
Profa. Dra. Ana Paula Junqueira-Kipnis.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

Bibliografia.
Inclui lista de figuras e tabelas.
Anexos.

1. *Mycobacterium massiliense* 2. Micobactérias não
tuberculosas 3. Eletroforese em gel em campo pulsado
4. Suscetibilidade antimicrobiana 5. Infecção Hospitalar.
I. Título.

CDU:616-002.5(817.3)

Dedicatória

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

Dedico mais essa conquista aos meus amados, que estão sempre em meus pensamentos e orações:

Cida, Gabriel, Polyanna, Adriano, Renato e Roberto.

Obrigada por tudo!

“As paixões são como ventaniasque enfunam as velasdos navios,fazendo-os navegar;outrasvezes podem fazê-losnaufragar,mas se não fossem elas,não haveriaviagensnem aventurasnem novasdescobertas.”

Voltaire

Agradecimentos

Primeiro a Deus, que nos possibilita inúmeros encontros e experiências das quais extraímos grande aprendizado.

Aos meus orientadores, agradeço com grande respeito e admiração! Ao Prof. Dr. André pela dedicação enquanto membro da banca de qualificação e defesa da minha Dissertação de Mestrado, pela oportunidade em estagiar em seu laboratório em 2005, e por assumir a orientação do meu Doutorado com sabedoria e paciência. À Profa. Dra. Ana Paula por sua vigorosa e indispensável contribuição. Sou grata a ambos pelos valiosos ensinamentos nessa fase tão importante!

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Molecular e do Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas do IPTSP-UFG pelo convívio agradável e pelas experiências compartilhadas. Em especial à Camila, “amiga de todas as horas”.

Aos pacientes que me receberam em seus lares ou local de trabalho e compartilharam informações para o entendimento do surto.

À Dra. Sueli Lemes de Ávila Alves e ao LACEN-GO, que nos forneceram as cepas de micobactérias para estudo.

À Dra. SylviaCardoso Leão e Dra. CristinaViana-Niero, da Universidade Federal de São Paulo, pela acolhida em São Paulo e pelo auxílio imprescindível na realização deste trabalho.

À Dra. Zilah Cândida Pereira das Neves e à COMCIES (Secretaria Municipal de Saúde – Prefeitura de Goiânia) que nos forneceram dados epidemiológicos e contatos telefônicos dos pacientes.

Ao Dr. Edvaldo de Paula e Silva do Instituto Goiano de Angiologia (IAG) pela atenção e disponibilidade.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Marília Dalva Turchi, Dr. Geraldo Sadoyama Leal e Dra. Fabricia Paula de Faria, pela disponibilidade em colaborar com a melhoria deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Dra. SylviaCardoso Leão, Dr. Moises Palaci, Dra. Marília Dalva Turchi e Dr. Cleomenes Reis, pela calorosa contribuição na melhoria da Tese.

Aos professores e alunos da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo convívio sempre estimulante.

Aos colegas do Hemocentro de Goiás, da Secretaria Estadual de Saúde de Goiás, pelo apoio e incentivo.

À FUNAPE pelo auxílio financeiro na participação de Congresso em 2008.

Aos professores do curso, colegas de trabalho, funcionários e amigos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa Tese de Doutorado.

SUMÁRIO

1.	Introdução	01
1.1.	Micobactérias não-tuberculosas (MNT)	01
1.2.	Aspectos imunopatológicos, formação de biofilmes e fatores de virulência das micobactérias	10
1.3.	Relatos de infecção por MNT	13
1.4.	Diagnóstico laboratorial	18
1.4.1.	Identificação por métodos clássicos	18
1.4.2.	Identificação por métodos moleculares	21
1.4.3.	Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos	25
1.5.	Epidemiologia molecular	29
1.6.	Terapêutica antimicrobiana	31
2.	Justificativa	37
3.	Objetivos	38
3.1.	Objetivo geral	38
3.2.	Objetivos específicos	38
4.	Material e métodos	39
4.1.	População em estudo e coleta de amostras clínicas	39
4.2.	Aspectos ético-legais, critérios de inclusão e seleção das cepas	40
4.3.	Obtenção, transporte e armazenamento das cepas	40
4.4.	Extração do DNA cromossômico	41
4.5.	Identificação fenotípica das colônias em ágar Lowenstein Jensen	42
4.6.	Identificação molecular por PCR seguida de análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (PRA-hsp65)	42
4.7.	Sequenciamento parcial do gene <i>rpoB</i>	44
4.8.	Genotipagem por Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE)	45
4.9.	Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos por microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	47
5.	Resultados	50
5.1.	Perfil clínico	50
5.2.	Identificação fenotípica	52
5.3.	Identificação molecular	52

5.4.	Genotipagem	52
5.5.	Suscetibilidade antimicrobiana	54
6.	Discussão	55
7.	Conclusões	64
8.	Referências bibliográficas	65
	ANEXO 1	81
	ANEXO 2	82
	ANEXO 3	83
	ANEXO 4	84
	ANEXO 5	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-PCR	<i>Arbitrarily Primed PCR</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BstEII	Endonuclease de restrição isolada de <i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i>
CCUG	<i>Culture Collection, University of Göteborg, Sweden</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CTAB	<u>Cetyl Trimethylammonium Bromide</u>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DO	Densidade óptica
DraI	Endonuclease de restrição isolada de <i>Deinococcus</i> <i>radiophilus</i>
DSM	<i>Deutsche Sammlung Mikroorganismen</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ECA	Extrato de córtex adrenal
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FC	Fibrose cística
GLPs	Glicopeptídeo-lipídeos
HaeIII	Endonuclease de restrição isolada de <i>Haemophilus</i> <i>aegyptius</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
<i>hsp65</i> gene	<i>65-kDa heat shock protein gene</i>
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IPAJ	Infecção pós-artroplastia de joelho
LACEN-GO	Laboratório Central de Saúde Pública - Dr. Giovanni Cysneiros
LASIK	<i>Laser-Assisted in Situ Keratomileusis</i>
LJ	Meio Lowenstein Jensen
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MCL	Micobactérias de Crescimento Lento
MCR	Micobactérias de Crescimento Rápido
MEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
mL	Mililitro
MNT	Micobactérias não-tuberculosas

1 INTRODUÇÃO

.

1.1. MICOBACTÉRIAS NÃO-TUBERCULOSAS (MNT)

As micobactérias são bacilos aeróbicos não formadores de esporos. Muitas características das micobactérias como a álcool-ácido resistência (resistência à descoloração com álcool acidificado quando coradas com carbolfucsina), a resistência aos antimicrobianos e a patogenicidade estão relacionadas à parede celular, cuja camada externa contém grande quantidade de ácido micólico, formando uma camada cética resistente à água. Os nutrientes entram lentamente na célula bacteriana por essa camada, o que contribui para a taxa de crescimento lento de algumas micobactérias. O gênero *Mycobacterium* inclui patógenos importantes como *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose e *Mycobacterium leprae*, agente causador da lepra ou hanseníase. Outras espécies de micobactérias são encontradas na natureza, principalmente no solo e na água, podendo ser patogênicas ao ser humano em algumas situações (Tortora et al. 2000).

O *Mycobacterium leprae* e o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) - que compreende as espécies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. cannetti*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedi* (Coros et al. 2008) - são indubitavelmente patogênicos ao ser humano. O complexo *Mycobacterium avium* (MAC) inclui diversas espécies de micobactérias entre elas *M. avium* e *M. intracellulare*, microrganismos estes frequentemente relacionados às complicações da AIDS (Ramos et al, 2000), enquanto outros membros do gênero ainda não foram bem caracterizados quanto à sua patogenicidade.

Muitas micobactérias são usualmente saprófitas, embora algumas espécies possam apresentar caráter oportunista e até mesmo letal, com mais de 50 espécies associadas a doenças em humanos. No passado, todas as espécies de micobactérias que não causavam tuberculose eram descritas como micobactérias “atípicas” ou como “outras micobactérias que não o bacilo da tuberculose” (MOTT, do inglês: *mycobacteria other than tubercle bacilli*). A nomenclatura corrente, adotada pela *American Thoracic Society* (ATS), descreve esses microrganismos como Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) (Jordan et al. 2007).

Em relação ao tempo de crescimento - observado *in vitro* - as micobactérias podem ser classificadas em dois grupos: micobactérias de crescimento lento (MCL) e micobactérias de crescimento rápido (MCR). O CMTB e o MAC são agrupados como MCL. O segundo grupo, representado pelas MCR, inclui principalmente as espécies saprófitas encontradas no solo e na água como o complexo *Mycobacterium chelonae-abscessus*. Análises comparativas de sequências do gene 16S do rRNA indicam que as MCR podem ser o grupo filogeneticamente mais antigo. Muitas espécies de MCR, particularmente *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium fortuitum* são patógenos oportunistas, podendo causar desde abscessos localizados até doenças disseminadas e pulmonares (Howard et al. 2002).

As MNT têm emergido como microrganismos importantes associados a infecções respiratórias e outras doenças oportunistas. Entre as diferentes MNT, o complexo *Mycobacterium chelonae-abscessus* representa um grupo que consiste de três espécies proximamente relacionadas, a saber: *M. chelonae*,

M. abscessus e *M. immunogenum*, que com frequência podem estar associadas à contaminação de reservatórios de água hospitalar, de equipamentos hospitalares e das tubulações do sistema hídrico municipal (Wallace et al. 1998; Wilson et al. 2001).

M. abscessus foi originalmente classificado como uma subespécie do *M. chelonae*, sendo posteriormente em 1992, reclassificado como uma espécie distinta, com base na hibridização do DNA e análise da sequência do gene 16S do rRNA (Kusunoki & Ezaki 1992; Pitulle et al. 1992; Howard et al. 2002). Portanto, *M. abscessus* não é considerado subespécie de *M. chelonae*.

Fairhurst et al. (2002) enfatizaram a emergência das MNT como patógenos importantes em pacientes transplantados, ao relatar o caso de um paciente de 66 anos com empiema causado por *M. abscessus*, que chegou ao óbito seis meses após o transplante pulmonar. Os autores ressaltaram que cerca de 80% das infecções por MNT nos Estados Unidos são causadas por *M. abscessus* e que esse microrganismo é normalmente resistente às drogas utilizadas no tratamento de infecções causadas por *M. tuberculosis*, como isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, portanto, a acurácia do diagnóstico é especialmente importante para o sucesso da terapia antimicrobiana em casos de infecções por MNT.

Segundo um estudo dos Centros para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), *M. abscessus* e *M. chelonae* são espécies proximamente relacionadas e frequentemente associadas a surtos de infecção hospitalar. Apesar da difícil distinção entre as espécies de MNT por métodos microbiológicos clássicos usualmente aplicados em laboratórios clínicos, diferentes espécies podem causar doenças distintas que requerem esquemas

de tratamento específicos. Yakrus et al. (2001) utilizou as seguintes técnicas para identificar 75 isolados de MNT: Eletroforese de enzimas multilocus (MEE), PCR seguida de análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (PRA-hsp65), testes bioquímicos (crescimento em Lowenstein-Jensen acrescido de NaCl a 5%; utilização de citrato como fonte única de carbono) e cromatografia líquida de alta performance de ácidos micólicos. Os isolados foram caracterizados como *M. abscessus* ou *M. chelonae*, sendo posteriormente submetidos a testes de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo, sendo avaliados: claritromicina, imipenem, cefoxitina, amicacina, sulfametoxazol, doxiciclina, tobramicina e ciprofloxacina. Observou-se concordância entre os diferentes métodos utilizados na identificação dos isolados. Todos os isolados de uma mesma espécie exibiram perfil de suscetibilidade idêntico, ou seja: todas as cepas de *M. abscessus* apresentaram resistência à tobramicina (concentração inibitória mínima/CIM = 8 ou >16 µg/mL), enquanto que todas as cepas de *M. chelonae* foram sensíveis a essa droga (CIM < 4 µg/mL). Os resultados desse estudo enfatizam a importância da identificação das espécies de MNT, sobretudo a diferenciação de *M. abscessus* e *M. chelonae* pelos laboratórios clínicos, como guia para a seleção do(s) antimicrobiano(s) a ser utilizado ressaltando mais uma vez que o esquema de tratamento é diferente para cada uma dessas espécies (Yakrus et al. 2001).

Durante os últimos anos o número de MNT descritas em diferentes situações clínicas tem aumentado consideravelmente devido principalmente às infecções em pacientes imunocomprometidos e ao aprimoramento das técnicas de cultura e identificação das MNT. Os microrganismos frequentemente

isolados são as espécies proximamente relacionadas ao *M. abscessus* (Tiwari et al. 2003; Zhibang et al. 2002). Aplicando métodos fenotípicos e moleculares, Adékambi et al. (2004) descreveram uma nova espécie então denominada *Mycobacterium massiliense* (essa nova espécie, isolada em duas amostras de escarro de uma paciente com pneumonia, apresentou 96% de similaridade a uma cepa padrão de *M. abscessus* pelo sequenciamento parcial do gene *rpoB*). A análise filogenética realizada sugere que, provavelmente, esse microrganismo derivou recentemente do *M. abscessus* (Figura 1).

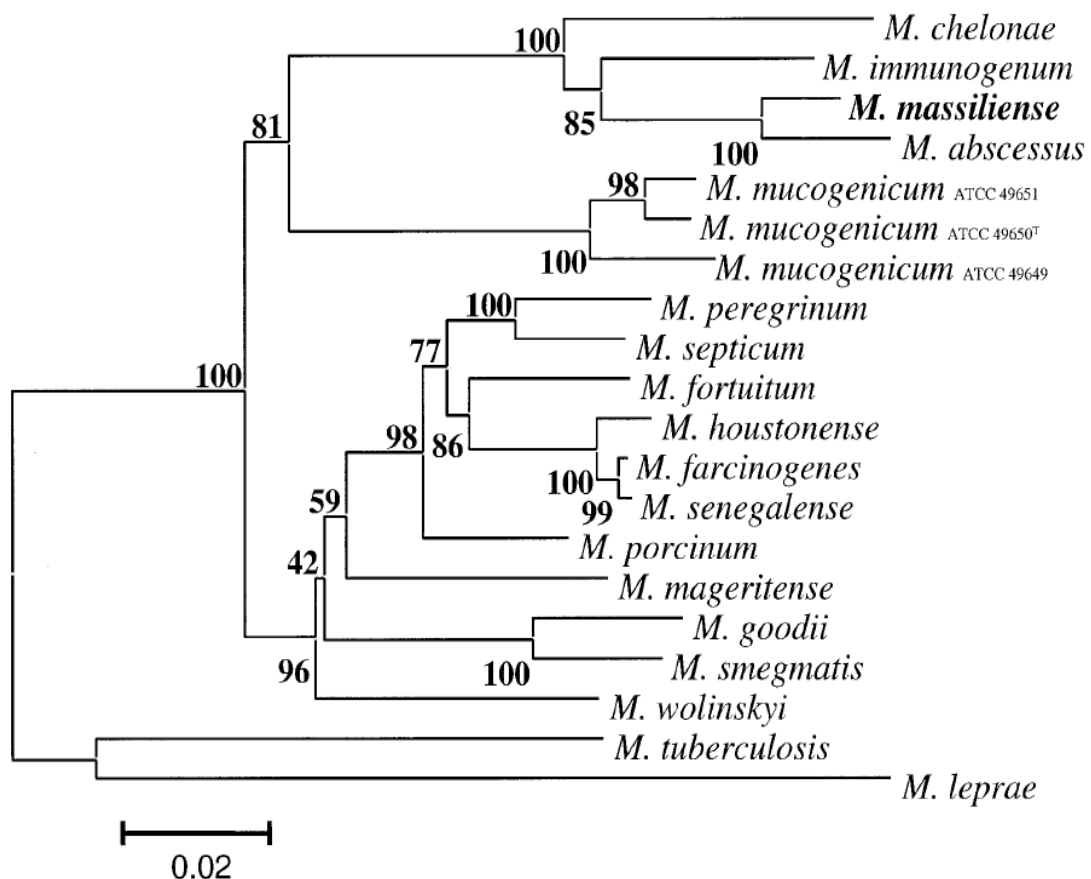


Figura 1 – Árvore filogenética da combinação das sequências dos genes *rpoB*+*recA* de *M. massiliense*, 17 MNT de crescimento rápido, *M. tuberculosis* e *M. leprae*. A barra representa uma diferença de 2% na sequência dos nucleotídeos (Adékambi et al. 2004).

M. massiliense (nome proposto por Adékambi et al. em referência a Massilia, o antigo nome da cidade de Marseille, no sul da França, onde a referida micobactéria foi isolada e identificada pela primeira vez) têm emergido como um patógeno humano frequentemente associado a infecções de feridas, formação de abscessos e pneumonia (Adékambi et al. 2004).

Simmon et al. (2007) utilizando a técnica de sequenciamento dos genes *rpoB*, *sodA* e *hsp65*, identificou como *M. massiliense* quatro de 51 isolados clínicos em estudo, oriundos de uma coleção de cepas de MNT, inicialmente caracterizados como *M. abscessus*. Este foi o primeiro relato de identificação de *M. massiliense* nos Estados Unidos, sugerindo que *M. massiliense* poderia estar frequentemente envolvido em infecções diversas, entretanto, erroneamente classificado como *M. abscessus*.

Adékambi et al. evidenciaram que o sequenciamento parcial do gene *rpoB* é uma ferramenta útil na identificação das MNT. Em estudo publicado em 2006 esse método molecular foi aplicado a uma coleção de isolados de MNT. O resultado obtido foi que nove entre 59 isolados oriundos de 52 pacientes apresentaram três sequências genéticas originais (nunca observadas antes), indicando tratar-se de novas espécies. Uma criteriosa identificação incluindo testes fenotípicos e moleculares confirmou que estes isolados representam três novas espécies emergentes de MNT, a saber: *Mycobacterium bolletii*, *Mycobacterium phocaicum* e *Mycobacterium aubagnense* (Adékambi et al. 2006).

Embora Adékambi et al. (2004) tenham validado *M. massiliense* como uma espécie distinta do grupo *M. chelonae-abscessus*, Leão et al. (2009), após extensiva caracterização de membros do grupo *M. chelonae-abscessus* (*M.*

abscessus, *M. chelonae*, *M. immunogenum*, *M. massiliense* e *M. bolletii*) por testes bioquímicos, cromatografia líquida de alta performance, testes de suscetibilidade antimicrobiana, PRA-hsp65, sequenciamento do gene *rpoB* e *hsp65* com análise de árvores filogenéticas, hibridização de DNA e análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do gene 16S rRNA, propõem que *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. bolletii* representam uma única espécie, ou seja, *M. abscessus*. Duas subespécies foram propostas pelos autores: *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *massiliense*, as quais podem ser distinguidas por dois padrões diferentes de PRA-hsp65, diferindo por uma única banda após digestão com a enzima *HaeIII* e por diferenças nas sequências do gene *rpoB* (3,4%) e *hsp65* (1,3%).

Na literatura existem vários relatos de infecção causada por MNT após traumas, cirurgias cardíacas, cirurgias plásticas na face, mamoplastia, cirurgias dermatológicas, lipoaspiração, implante de silicone na mama, implante de próteses articulares, acupuntura, mesoterapia, pedicure, injeção de silicone, injeções subcutâneas e intramusculares de antibióticos, esteróides e medicamentos alternativos. Surto de úlceras na pele, infecção pulmonar, bacteremia associada a cateter e/ou diálise, pseudosurtos associados à broncoscopia e laparoscopia, e ceratite após cirurgia a laser (LASIK, do inglês: *Laser-Assisted in Situ Keratomileusis*) têm sido descritos (Wallace et al. 1998; Brown-Elliott et al. 2002; Freitas et al. 2003; Tiwari et al. 2003; Uslan et al. 2006; Eid et al. 2007; Kim et al. 2007; Carbonne et al. 2009). *M. chelonae* e *M. abscessus* podem causar infecções cutâneas localizadas ou disseminadas que podem se manifestar com formação de abscessos dolorosos, com ou sem drenagem de secreção, envolvendo principalmente braços e pernas. Celulite

localizada, osteomielite e artrite no joelho também são comuns (Brown-Elliott et al. 2002).

Surtos ou pseudo-surtos de infecção hospitalar causados por *M. abscessus* e *M. chelonae* têm sido reconhecidos desde a década de 1970. A frequente presença desses microrganismos na água de torneira do hospital; sua relativa resistência ao glutaraldeído, a agentes derivados do mercúrio e ao cloro; sua habilidade em sobreviver e crescer em água destilada e dentro de amebas, bem como seu frequente envolvimento na formação de biofilmes faz com que espécies como essas, ou proximamente relacionadas a essas, continuem causando problemas em pacientes hospitalizados (Zhang et al. 1997; Wallace et al. 1998; Adékambi et al. 2006; Duarte et al. 2009).

Kim et al. (2008) publicaram um estudo no qual 144 cepas de MNT isoladas de amostras clínicas obtidas em diferentes hospitais da Coreia do Sul foram avaliadas. Destas, 127 (88,2%) pertenciam ao complexo *M. chelonae-abscessus*. Nesse grupo, foram identificados: *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. bolletii* em 0,8% (n = 1), 51,2% (n = 65), 46,5% (n = 59), 1,6% (n = 2) respectivamente. Inicialmente todos os isolados foram identificados por PRA-hsp65 e posteriormente a análise comparativa da sequência dos genes 16S rRNA, *rpoB* e *hsp65* foi utilizada para avaliar a proporção dessas quatro espécies proximamente relacionadas. Isolados de *M. abscessus* do grupo I previamente identificados por PRA-hsp65 foram todos confirmados como sendo *M. abscessus*. Por outro lado, *M. abscessus* do grupo II segundo PRA-hsp65 foram reclassificados como *M. massiliense* ou *M. bolletii* pelo sequenciamento parcial do gene *rpoB* e do *hsp65*. Os achados deste estudo sugerem a existência de um número considerável de pacientes com infecção

pulmonar causada por *M. massiliense*, os quais foram provavelmente diagnosticados como *M. abscessus* (ou complexo *M. chelonae-abscessus*) anteriormente.

O envolvimento das MNT com indivíduos que apresentam algum tipo de doença pulmonar é notório. As MNT têm sido relacionadas a condições como alcoolismo crônico, escoliose torácica, enfisema e fibrose cística (FC). Enquanto a tuberculose em pacientes com FC é relativamente incomum há um interesse crescente em considerar as infecções causadas por MNT, em particular por *M. abscessus*, nesse grupo de pacientes. No caso da FC, existem vários fatores que predispõem os pacientes a uma infecção por MNT, dentre eles desnutrição, severidade da doença, diabetes e tratamento frequente com antimicrobianos intravenosos e corticosteróides (Jordan et al. 2007).

Uma vez que várias espécies de MNT podem fazer parte da microbiota normal transitória do trato respiratório, a *American Thoracic Society* estabelece critérios para determinar o significado clínico desses isolados: I. Três amostras de escarro ou lavado brônquico com cultura positiva para MNT e pesquisa de BAAR negativa; II. Duas amostras de escarro ou lavado brônquico com cultura positiva e uma pesquisa de BAAR positiva. Seria considerado um caso provavelmente sem significado clínico aquele com uma única cultura positiva e com pesquisa de BAAR negativa ou com baixo número de bacilos (Woods 2000).

1.2. ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, FORMAÇÃO DE BIOFILMES E FATORES DE VIRULÊNCIA DAS MICOBACTÉRIAS

O conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade das MNT é limitado. É sabido que a presença de lipídios na parede celular das micobactérias pode favorecer a infecção, pela necessidade de uma fonte de triglicérides para o seu crescimento ou talvez como um elemento de proteção frente aos mecanismos de fagocitose do hospedeiro (Brown-Elliot & Wallace 2002; Brown-Elliot et al. 2002). Entretanto, um aspecto característico que contribui para a virulência do *M. tuberculosis*, por exemplo, é a sua habilidade em crescer dentro de macrófagos (Kawamura, 2008). Acredita-se que esse mecanismo possa ser observado em MNT devido a várias semelhanças observadas entre as espécies do gênero *Mycobacterium*.

Em linhas gerais, a interação entre micobactéria e macrófago representa uma etapa crítica capaz de determinar se a infecção será estabelecida no hospedeiro. As micobactérias são patógenos intracelulares facultativos, com habilidade em crescer dentro dos macrófagos. No interior dos fagossomas, as micobactérias impedem a acidificação destas vesículas, de forma a evadir-se dos mecanismos microbicidas dos macrófagos (Sturgill-koszycki et al. 1994). Se o microrganismo persiste, multiplicando-se dentro do macrófago, pode induzir uma resposta imune específica mediada por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (Thomssen et al. 1995).

Os macrófagos infectados e os linfócitos estimulados produzem fatores solúveis, que incluem quimiocinas e citocinas, que modulam uma complexa resposta imune. Alguns componentes da resposta imune para o controle das

infecções causadas por micobactérias são: Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interferon gama (IFN- γ) e Interleucina 12 (IL-12) (Cooper et al. 1993; Cooper et al. 2002). O IFN- γ é produzido pelos macrófagos infectados e pelas células NK, sendo provavelmente o componente imunomodulador mais importante para o controle da infecção micobacteriana. Em contraste, a IL-4 e IL-10 modulam negativamente a resposta inflamatória, sendo desta forma, fatores permissivos para a proliferação intracelular das micobactérias (Sturgill-Koszycki et al. 1994; Flynn & Chan 2001).

Segundo Etienne et al. (2002), aproximadamente 85% da parede celular das micobactérias é composta por glicopeptídeo-lipídeos (GLPs), sendo estes relacionados com a morfologia da colônia (Barrow & Brennan 1982; Belisle et al. 1993). Catherinot et al. (2007) em estudo realizado com camundongos C57BL/6, analisaram a virulência de duas cepas de *M. abscessus* cujas colônias apresentavam características morfológicas diferentes: colônias lisas e colônias rugosas. Os autores evidenciaram que a morfologia das colônias relaciona-se diretamente com a virulência. As colônias rugosas expressaram maior letalidade com maior estímulo à produção de TNF- α quando comparadas com as colônias lisas. Por outro lado, as micobactérias oriundas das colônias lisas apresentaram maior quantidade de GLPs na parede celular. Existe uma associação direta entre a quantidade de GLP e a formação de biofilmes, ou seja, quanto maior a expressão de GLP maior a capacidade de formar biofilmes. Segundo Howard et al. (2006), *M. abscessus* apresenta a habilidade de alternar a morfologia de sua colônia entre lisa e rugosa, permitindo a transição para um fenótipo mais virulento e invasivo.

Os biofilmes são comunidades biológicas com elevado grau de organização, onde bactérias e outros microrganismos formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. Estas comunidades biológicas encontram-se envolvidas em matrizes poliméricas produzidas por elas próprias. Os biofilmes podem desenvolver-se em qualquer superfície úmida, biótica ou abiótica. A associação dos microrganismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis. Como as bactérias são ubiquitárias, virtualmente os biofilmes podem formar-se em qualquer superfície e em qualquer ambiente (Davey & O'toole 2000).

De acordo com Esteban et al. (2008), a relação das micobactérias com biofilmes têm sido observada há décadas em amostras clínicas e ambientais. A detecção de micobactérias em biofilmes oriundos de diferentes sistemas hídricos tem sido relatada, embora a identificação das espécies não tenha sido alcançada em todos os casos. Espécies de crescimento rápido, como *M. fortuitum* e *M. chelonae*, têm sido descritos como parte desses biofilmes polimicrobianos, onde micobactérias de crescimento lento também foram isoladas. Segundo o estudo de Esteban et al. (2008), todas as espécies de MCR testadas (*M. fortuitum* ATCC 6841T e ATCC 13756, *M. chelonae* ATCC 19235 e ATCC 35752T, *M. abscessus* DSM 44196T, *M. peregrinum* ATCC 14467T, *M. mucogenicum* DSM 44124, *M. septicum* ATCC 700731T, *M. immunogenum* ATCC 700505T, *M. mageritense* ATCC 700351T, *M. porcinum* ATCC 33776T, *M. senegalense* NCTC 10956T, *M. elephantis* DSM 44368T, *M. smegmatis* ATCC 607, ATCC 19420T e ATCC 14468, *M. goodii* ATCC 700504T, *M. alvei* ATCC 51304T e *M. brumae* ATCC 51384T) revelaram

habilidade em formar biofilmes *in vitro*, sendo a composição química do meio capaz de influenciar o tempo necessário para o desenvolvimento do biofilme.

Outros mecanismos de virulência do *Mycobacterium tuberculosis* são: resistência aos constituintes inibitórios do soro, diminuição da produção de TNF- α pelas células infectadas do hospedeiro, diminuição da expressão de receptores celulares para IFN- γ e diminuição na produção de receptores para adesão nos macrófagos (Cooper et al. 1993; Falkinham 1996; Flynn & Chan 2001; Cooper et al. 2002).

1.3. RELATOS DE INFECÇÃO POR MNT

A distribuição ubiquitária de *M. abscessus* e demais espécies proximamente relacionadas pode resultar em colonização transitória da pele humana, situação que possibilita a introdução do microrganismo durante procedimentos capazes de romper a integridade da pele. O primeiro caso de infecção em sítio de implante de anticoncepcional causada por MNT foi relatado por Alfa et al. (1995). Segundo os autores, quando micobactérias estão envolvidas em casos como esse, não é surpreendente que a terapia antimicrobiana seja ineficaz, uma vez que drogas ativas contra *M. abscessus* (claritromicina, amicacina, imipenem ou sulfametoxazol) devem ser administradas por um período de quatro a seis meses, ressaltando que claritromicina é a droga de escolha para tratamento de pacientes com infecções de pele por *M. abscessus*.

A infecção pós-artroplastia de joelho (IPAJ) é considerada a principal causa de falha em implantes de próteses, com uma incidência de infecções

variando entre um a 12%. Casos de IPAJ causada por *M. chelonae* têm sido relatados e essa micobactéria requer atenção quanto ao potencial patogênico em situações como essa. Quando uma IPAJ é clinicamente evidente, mas as culturas convencionais (onde são pesquisadas bactérias facultativas comumente observadas na clínica médica, como por exemplo, *Staphylococcus* sp, enterobactérias e *Pseudomonas* sp) apresentam-se negativas, a infecção por MNT deve ser considerada. Nesse caso, após a semeadura da amostra clínica em ágar sangue, a incubação deverá ser prolongada por um período de cinco a sete dias para possibilitar a observação do crescimento de MCR. Posteriormente à realização das culturas em meios específicos para o isolamento de micobactérias, a identificação pelos métodos apropriados contribui para a seleção do antimicrobiano ideal para o tratamento do paciente. Infecções causadas especificamente por *M. chelonae* são de tratamento difícil em função do seu característico perfil de resistência aos fármacos disponíveis. Geralmente as opções de tratamento são cefoxitina e amicacina (Pring et al. 1996).

Um surto de infecção de ferida cirúrgica causado por *M. abscessus* foi descrito por Chadha et al. (1998) em Nova Deli, Índia. Segundo os autores, durante um período de cinco meses, 45 pacientes desenvolveram um quadro de infecção caracterizado pela presença de ferida exposta, celulite e descarga com supuração progressiva. Nos dois primeiros meses do surto, não houve suspeita do envolvimento de MNT, sendo que as amostras clínicas foram submetidas à coloração de Gram e cultura em ágar MacConkey e ágar sangue, sem desenvolvimento de colônias bacterianas após 48 horas de incubação. Quando as amostras foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen

(coloração álcool-ácido resistente) e cultura em ágar Lowenstein-Jensen, o envolvimento de micobactérias tornou-se evidente. Posteriormente, amostras ambientais foram coletadas em diferentes locais da sala de cirurgia pediátrica, incluindo equipamento cirúrgico, gases esterilizadas, material de sutura, luvas cirúrgicas, soluções desinfetantes em uso, bem como amostras de água de diferentes fontes, sendo identificada uma torneira de água contaminada como a fonte da infecção. O estudo evidenciou deficiências graves nos procedimentos de desinfecção e esterilização, trazendo à luz a necessidade de monitoramento constante das técnicas de desinfecção e esterilização em unidades cirúrgicas.

Galil et al. 1999, relataram um grande surto de infecção causado por *M. abscessus* nos Estados Unidos envolvendo um produto injetável não licenciado vendido como “Extrato de Córtex Adrenal” (ECA) e distribuído como medicamento alternativo. O produto foi distribuído por 148 vendedores em 30 estados. Foram identificados 87 indivíduos com abscessos pós-injeção, atribuídos ao produto utilizado. As culturas evidenciaram crescimento de MNT, sendo identificado *M. abscessus* por tipagem enzimática (MEE) e molecular (PFGE).

Ozluer & De'Ambrosis (2001) publicaram na Austrália o relato de um caso de infecção de ferida cirúrgica causado por *M. abscessus* em um paciente de 59 anos, submetido a uma cirurgia devido a um carcinoma de células escamosas. Apesar de três dias de tratamento com dicloxacilina, aproximadamente cinco semanas após a cirurgia houve o desenvolvimento de uma ferida no sítio cirúrgico com produção de descarga purulenta-sero-sanguinolenta. A cultura da amostra revelou o desenvolvimento de MNT. *M. abscessus* foi isolado e identificado por testes bioquímicos e moleculares. O

antibiograma foi realizado pelo método de disco-difusão (Kirby-Bauer), revelando sensibilidade do microrganismo frente à amicacina, cefoxitina e claritromicina. Os autores acreditam que a fonte da infecção por *M. abscessus* possa ter sido água salgada contaminada e/ou arbustos, uma vez que o paciente relatou exposição das feridas, em um acidente de barco, no oitavo dia após a cirurgia, o que sugere risco elevado de infecção de feridas expostas em ambientes potencialmente contaminados.

Trupiano et al. (2001) relataram o primeiro caso de mastite granulomatosa supurativa causada por *M. abscessus* em uma paciente de 17 anos com lesão associada à inserção de um “*piercing*” no mamilo. Nesse relato, os autores discutem a emergência das MNT, que têm sido implicadas a uma variedade de infecções envolvendo tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes.

Um grande surto de infecção causado por *M. abscessus* (até então denominado *M. chelonae* subespécie *abscessus*) foi relatado na China após injeção de penicilina G, envolvendo 86 indivíduos. Segundo Zhibang et al. *M. abscessus* foi recuperado da tampa do frasco de penicilina G e do solo onde o antibiótico estava armazenado, sob condições inadequadas. A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) de proteínas celulares e plasmídeos, revelou um padrão idêntico das cepas isoladas das feridas dos pacientes, da tampa dos frascos do antibiótico e do solo, sugerindo que as cepas envolvidas no surto tiveram uma fonte comum, isto é, provavelmente o solo. Além disso, o estudo sugere que a desinfecção da tampa dos frascos foi inadequada, ou seja, a tintura de iodo e o etanol utilizado para essa finalidade não foram capazes de eliminar o microrganismo

contaminante, que uma vez sendo resistente à penicilina G conseguiu crescer lentamente no sítio anatômico onde a droga foi aplicada causando o surto de infecção (Zhibang et al. 2002).

Fox et al. (2004) relataram o caso de um paciente transsexual de 29 anos que desenvolveu uma infecção por *M. abscessus* após receber, de forma ilícita, injeção intramamária de silicone líquido. De acordo com os autores, doenças causadas por MNT envolvem com frequência a pele e os tecidos moles, principalmente após procedimentos cirúrgicos ou traumatismos, ressaltando-se aqui o caráter ubiqüitário e oportunista do microrganismo. Em síntese, fatores de risco para o desenvolvimento de infecção por *M. abscessus* incluem trauma, contaminação de feridas, esterilização inadequada de instrumentos cirúrgicos e contaminação de soluções de limpeza.

Tortoli et al. (2008) documentaram na Itália o primeiro caso de óbito causado por *M. massiliense*. Trata-se do caso de uma cepa de *M. massiliense* recuperada do sangue de uma paciente submetida a transplante renal concomitantemente a um diagnóstico de tuberculose pulmonar. A respeito da co-infecção com *M. tuberculosis*, os autores acreditam que a bacteremia causada por *M. massiliense* desencadeou a morte súbita da paciente. Nesse caso a paciente chegou ao óbito antes da identificação do microrganismo e infelizmente nenhuma das drogas utilizadas empiricamente era ativa contra o microrganismo. Apenas especulações podem ser feitas a respeito de como a paciente adquiriu a infecção pelo *M. massiliense*, todavia, cinco meses antes de sua admissão no hospital, a paciente recebeu uma prótese articular coxofemoral em função de uma queda e desde então apresentou queixa de dor óssea generalizada que a manteve debilitada. Apesar da ausência de provas

quanto à forma de aquisição da infecção por *M. massiliense* pela paciente, é notório que infecções causadas por MCR após intervenções cirúrgicas são conhecidas e deveriam ser consideradas em muitos casos.

1.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.4.1. IDENTIFICAÇÃO POR MÉTODOS CLÁSSICOS

Algumas vezes o diagnóstico das infecções causadas por MNT é tardio porque a solicitação de testes microbiológicos é incompleta ou inadequada; a coloração de Ziehl-Neelsen, por exemplo, é considerada uma ferramenta diagnóstica simples e rápida para infecções causadas por micobactérias, porém não é realizada rotineiramente a menos que exista uma solicitação explícita por parte do clínico. Deve-se suspeitar de uma infecção causada por MCR quando resultados negativos de culturas bacterianas convencionais são obtidos. Embora as MNT apresentem a habilidade de crescer em meios de cultura líquidos e sólidos utilizados na rotina dos laboratórios de bacteriologia, o isolamento requer incubação por no mínimo três dias, sob temperatura em torno de 30°C para algumas espécies como *M. chelonae* (Koneman et al. 2001; ANVISA 2004).

A identificação das micobactérias por métodos clássicos é baseada na utilização de diferentes testes fenotípicos. Inicialmente as amostras clínicas são submetidas à coloração de Ziehl Neelsen para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e cultura em meios específicos (sólidos ou líquidos) para o isolamento de micobactérias, dentre eles, Lowenstein-Jensen, Middlebrook

7H10, 7H11 e 7H9, Bactec 12B, Bactec 13A, MGIT, ESP Myco, MB/BacT, Bactec Myco Lytic. Rotineiramente, o meio de cultura Lowenstein-Jensen (LJ) figura-se como o mais utilizado nos laboratórios, sendo composto por: ovos inteiros coagulados, sais, glicerol, fécula de batata e verde de malaquita (agente inibidor). Em relação à cultura, após a semeadura no meio específico, procede-se à incubação observando-se temperatura e tempo de incubação de acordo com o tipo de amostra clínica. As diferentes espécies de micobactérias expressam extraordinária dependência da temperatura de incubação para seu crescimento ótimo. Todas as amostras suspeitas de infecções cutâneas e subcutâneas por micobactérias como amostras de tecidos, feridas e úlceras de pele devem ser incubadas à temperatura entre 25° e 30°C após semeadura (temperatura ótima de crescimento de algumas MNT, sobretudo *M. abscessus*). Para as demais amostras (sangue, medula óssea, amostras respiratórias, líquido pleural, líquido cefalorraquidiano, lavado gástrico, urina, fezes e linfonodos) recomenda-se incubação à temperatura de 37°C (temperatura ótima de crescimento da maioria das micobactérias). Incubação à temperatura de 42°C pode ser útil para o isolamento de *M. xenopi* (Koneman et al. 2001; ANVISA 2004).

As micobactérias podem ser identificadas de forma presuntiva e separadas em grupos de acordo com o tempo de crescimento, a temperatura ótima de crescimento e a produção de pigmento quando exposta à luz. Essas características podem ser observadas na cultura jovem em LJ (contraste de cor mais facilmente observado). O tempo de crescimento é definido como sendo o tempo necessário para as colônias serem visualizadas a olho nu, em meio sólido. As micobactérias de crescimento rápido (MCR) desenvolvem-se antes

ou até o sétimo dia de incubação enquanto que as colônias de micobactérias de crescimento lento desenvolvem-se após sete dias de incubação, podendo o crescimento prolongar-se por seis a oito semanas, como no caso do *M. tuberculosis*. São consideradas de crescimento rápido: *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. bolletii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum*. São micobactérias de crescimento lento: *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. ulcerans*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. interjectum*, *M. paratuberculosis*, *M. intracellulare* e *M. kansasii* (Koneman et al. 2001; ANVISA 2004).

No final da década de 1950, quando espécies diferentes de *M. tuberculosis* começaram a ser encontradas com maior frequência na prática médica, Runyon propôs agrupar esses microrganismos “atípicos” segundo sua velocidade de crescimento e produção de pigmentos. O esquema de Runyon não inclui o CMTB e permite classificar as outras micobactérias (MNT) em quatro grupos: a) Fotocromogênicas – grupo I de Runyon: produzem pigmentos (amarelo ou laranja) somente após exposição à luz (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. genavense*, *M. asiaticum*); b) Escotocromogênicas – grupo II de Runyon: produzem pigmentos (amarelo ou laranja) no escuro e no claro (*M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. flavescens*); c) Não-fotocromogênicas – grupo III de Runyon: não produzem pigmento em qualquer situação (Complexo *M. avium-intracellulare*, *M. paratuberculosis*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. shimoidae*); d) De crescimento rápido – grupo IV de Runyon (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. thermoresistibile*). Após a observação das características mencionadas, as colônias são submetidas a testes bioquímicos com a finalidade de diferenciar as espécies do gênero *Mycobacterium*. Os testes bioquímicos utilizados são: a) acúmulo de niacina; b)

redução de nitratos a nitritos; c) teste de inibição do ácido p-nitrobenzóico (PNB-500 µg/mL); d) teste de inibição da hidrazina do ácido tiofeno (TCH); e) teste de inibição da pirazinamida (PZA-100 µg/mL); f) teste da produção de catalase (à temperatura ambiente e 68°C); g) teste da uréia (produção de urease); h) teste do crescimento em ágar MacConkey sem cristal violeta; i) teste da arilsulfatase; j) teste da redução do telurito; k) teste da utilização do ferro; l) hidrólise de tween 80; m) teste do crescimento em NaCl a 5% (Koneman et al. 2001; ANVISA 2004).

1.4.2. IDENTIFICAÇÃO POR MÉTODOS MOLECULARES

O poder discriminatório dos testes bioquímicos pode ser limitado em algumas situações, sobretudo na identificação das MNT de crescimento rápido. Desse modo é ressaltada a importância dos métodos moleculares como ferramentas auxiliares na identificação das MNT, destacando-se ainda o potencial de reduzir para horas, ao invés de dias e até mesmo semanas, a identificação das espécies pelos métodos moleculares (Koneman et al. 2001; ANVISA 2004).

Telenti et al. (1993) publicaram um estudo pioneiro no qual foi proposto um método simples para a identificação rápida das espécies de micobactérias baseando-se na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene que codifica a proteína hsp (*heat shock protein*) de 65-kDa que contém regiões únicas e comuns para várias espécies de micobactérias. O método envolve a análise do produto da PCR do gene *hsp65* com enzimas de restrição. Utilizando duas enzimas, *BstEII* e *HaeIII*, espécies de micobactérias de importância médica

foram identificadas pela análise do padrão gerado pelo tratamento do produto de PCR com enzimas de restrição. O método, então denominado PRA-hsp65, foi aplicado a 330 micobactérias e como resultado os autores observaram que os membros do CMTB não foram diferenciados, entretanto, o método proposto mostrou-se eficiente na diferenciação de MNT de crescimento lento (*M. avium*, *M. intracellulare*) e MNT de crescimento rápido (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*).

A identificação das espécies de micobactérias pode ser considerada difícil em função da diversidade de técnicas disponíveis e do tempo necessário para a identificação completa. Na PRA-hsp65 uma sequência de aproximadamente 439-pb, situada na região gênica correspondente à porção amino-terminal do antígeno de 65-kDa, apresenta-se como uma região extremamente conservada nas micobactérias. Relatos baseados em amplificação por PCR e sequenciamento de DNA evidenciam polimorfismos espécie-específicos nos nucleotídeos dessa região. Em um estudo conduzido por Raman et al. no período compreendido entre agosto e dezembro de 1995, 45 pacientes de uma unidade cirúrgica pediátrica desenvolveram infecção pós-cirúrgica causada por *M. abscessus* em Nova Deli, Índia. O DNA cromossomal dos microrganismos recuperados de amostras clínicas foi extraído e submetido à análise por PRA-hsp65. Os resultados obtidos confirmaram que o microrganismo era *M. abscessus*. Esse relato enfatiza a importância dos métodos moleculares na identificação MNT envolvidas em surtos de infecções hospitalares. O método de PRA-hsp65 é rápido, econômico e universal de identificação de espécies de micobactérias (Raman et al. 2000).

Devallois et al. (1997) aplicaram o método de PRA-hsp65 em 108 isolados de micobactérias representando 34 espécies, no intuito de avaliar o potencial da técnica como método de referência. Um total de 49 padrões distintos foi obtido, 25 espécies foram caracterizadas por um único padrão de PRA-hsp65, enquanto nove espécies apresentaram mais que um padrão específico. Uma descrição algorítmica dessas 34 espécies (incluindo cinco espécies adicionais e novos subgrupos de *M. kansasii*, *M. abscessus* e *M. peregrinum*) foi proposta. PRA-hsp65 foi considerado um método relativamente simples, de fácil execução e de baixo custo. Outros métodos de PCR-PRA baseados na análise de produtos de digestão de genes específicos como 16S rRNA, utilizando de três a cinco diferentes enzimas de restrição tem sido relatados, mas continuam sendo menos vantajosos quando comparados com a PRA-hsp65, que requer apenas duas enzimas de restrição (*BstEII* e *HaeIII*).

No Brasil, no Estado do Rio de Janeiro, Rocha et al. (1999) evidenciaram que PRA-hsp65 é um método simples, rápido e de baixo custo para identificação de MNT ao identificar as espécies de 43 micobactérias isoladas a partir de amostras clínicas de 42 indivíduos com suspeita de infecção por micobactérias. Em São Paulo, Silva et al. (2001) utilizaram o método de PRA-hsp65 para identificar 103 isolados clínicos, obtendo resultados concordantes entre PRA-hsp65 e identificação bioquímica em 76 de 83 isolados (91,5%). Resultados de 20 isolados não puderam ser comparados por serem considerados inconclusivos por PRA-hsp65 ou identificação bioquímica. Os resultados deste estudo evidenciaram que PRA-hsp65 pode aprimorar a identificação de micobactérias na rotina laboratorial porque é uma

técnica acurada, rápida e de baixo custo em comparação à convencional identificação fenotípica.

A literatura tem enfatizado com notoriedade que a identificação das espécies de micobactérias recuperadas a partir de amostras clínicas é primordial para a escolha do tratamento adequado. No intuito de validar o método de PRA-hsp65, um estudo multicêntrico foi conduzido em oito laboratórios da Argentina, Brasil, Colômbia, Chile, Guadalupe e França. Cada laboratório recebeu 18 isolados da coleção do Instituto de Medicina Tropical da Bélgica, correspondentes a duplicatas de nove cepas: *M. terrae*, *M. scrofulaceum*, *M. flavescens*, *M. triviale*, *M. nonchromogenicum*, *M. chitae*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. peregrinum*. A identificação por PRA-hsp65 foi prontamente implantada em alguns laboratórios de micobactérias da América Latina e do Caribe, evidenciando que o método é bastante útil na identificação molecular destes patógenos (Leão et al. 2005).

Adékambi et al. (2006) publicaram um estudo que ressalta a importância do sequenciamento parcial do gene *rpoB* (que codifica a subunidade β da RNA polimerase) na identificação de cepas emergentes de MNT. Um segmento de DNA de 764-pb, correspondente ao gene *rpoB*, foi amplificado por PCR e posteriormente sequenciado com a finalidade de identificar uma coleção de isolados clínicos. A análise desse gene forneceu a base para a diferenciação das espécies do gênero *Mycobacterium*. As MNT foram facilmente distinguidas e cada espécie foi diferenciada como uma entidade distinta na árvore filogenética.

1.4.3. TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A avaliação do perfil de suscetibilidade das micobactérias é importante no manejo de pacientes com tuberculose e daqueles com infecções causadas por MNT. Para auxiliar na padronização dos métodos utilizados no laboratório de microbiologia clínica para estabelecer o perfil de suscetibilidade de micobactérias, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) – anteriormente denominado *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) – publicou o documento M24-A (NCCLS 2003), contendo protocolos revisados para realização de testes de suscetibilidade do complexo *M. tuberculosis* e uma nova padronização para testar algumas MNT, incluindo espécies de crescimento rápido (*M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*) e crescimento lento (*M. avium*, *M. kansasii* e *M. marinum*).

O CLSI recomenda como método padrão-ouro a microdiluição em caldo para a realização do teste de suscetibilidade do grupo *M. fortuitum* (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*), *M. chelonae* e *M. abscessus*. O teste de suscetibilidade pode ser aplicado em qualquer MCR com significado clínico (isolados de sangue, líquidos corporais estéreis, tecidos, e amostras oriundas de lesões de pele e tecidos moles). Os agentes antimicrobianos e as concentrações (diluições seriadas com fator dois) que devem ser testadas entre as MCR são: amicacina (1 - 128 µg/mL), cefoxitina (2 - 256 µg/mL), ciprofloxacina (0,125 - 16 µg/mL), claritromicina (0,06 - 64 µg/mL), doxiciclina (0,25 - 32 µg/mL), imipenem (1 - 64 µg/mL) e sulfametoxazol (1 - 64 µg/mL). Os resultados dos testes de suscetibilidade das MCR são obtidos entre três e quatro dias e os valores de CIM (concentração inibitória mínima), bem como a

interpretação dos resultados, são baseados em tabelas de ponto de corte propostas pelo CLSI. Os resultados de tobramicina não devem ser reportados para o grupo *M. fortuitum* ou *M. abscessus*, pois o tratamento com essa droga será superior à amicacina apenas nas infecções causadas por *M. chelonae*. Vários estudos evidenciam que virtualmente todos os isolados de *M. chelonae* e *M. abscessus* são resistentes ao sulfametoxazol (CIM > 64 µg/mL), enquanto todos do grupo *M. fortuitum* são sensíveis. A CIM do imipenem não é reprodutível para *M. chelonae* e *M. abscessus*, portanto o resultado não deverá ser reportado nesses casos (NCCLS 2003).

Park et al. (2008), em estudo realizado na Coreia, afirmaram que variações na suscetibilidade dos isolados de *M. abscessus* e espécies proximamente relacionadas sugerem que o perfil de suscetibilidade de cada isolado de MCR com significado clínico deveria ser avaliado individualmente. Os autores chegaram a essa conclusão após a análise de 74 isolados de *M. abscessus* recuperados a partir de amostras clínicas do trato respiratório. Os isolados foram avaliados quanto à suscetibilidade a oito agentes antimicrobianos pelo método da microdiluição em caldo, segundo as recomendações do CLSI. Foram avaliados os seguintes antibióticos parenterais: amicacina (99%, 73/74) e cefoxitina (99%, 73/74), ativos contra a maioria dos isolados; imipenem (55%, 36/66) e tobramicina (36%, 27/74) com atividade moderada. Em relação aos antibióticos orais, claritromicina (91%, 67/74) foi ativa contra a maioria dos isolados; moxifloxacina (73%, 54/74) e ciprofloxacina (57%, 42/74) tiveram atividade moderada; doxiciclina mostrou-se menos ativa contra a maioria dos isolados, inibindo apenas 7% (5/74). Diante dos resultados obtidos, os autores sugerem aos clínicos os seguintes agentes

antimicrobianos: amicacina, cefoxitina e claritromicina, para o tratamento empírico quando doença pulmonar por *M. abscessus* é diagnosticada e a suscetibilidade *in vitro* do microrganismo não foi investigada.

Biehle et al. (1995) realizaram testes de suscetibilidade *in vitro* pelo método de Etest em 100 isolados clínicos de MCR com a finalidade de avaliar a eficácia de seis agentes antimicrobianos: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina e imipenem. O Etest é uma tira plástica na qual o antimicrobiano encontra-se adsorvido em um gradiente de concentração que ocupa quase toda a extensão da tira. A difusão do antibiótico produz um gradiente de CIM contínuo no ágar, que pode ser interpretado por meio da leitura do menisco de inibição de crescimento contra a escala impressa na tira. Os autores do estudo concluíram que o Etest pode ser um método preciso e reprodutível para determinar o perfil de suscetibilidade de MNT.

Kim et al. (2007) descreveram um surto de infecção causado por *M. massiliense* associado a injeções intramusculares. A concentração inibitória mínima foi estabelecida utilizando fitas de Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) de 14 agentes antimicrobianos: amicacina, claritromicina, doxiciclina, imipenem, linezolida, sulfametoxazol-trimetoprim, tobramicina, azitromicina, cefotetan, colistina, gatifloxacina, minociclina, moxifloxacina e ticarcilina. Foram detectados valores baixos de CIM para claritromicina (0,125 µg/mL), corroborando com o estudo de Adékambi et al. (2004), no qual os autores descreveram pela primeira vez a espécie *M. massiliense*. Adicionalmente, os isolados obtidos durante o surto foram sensíveis a azitromicina (CIM = 2 µg/mL), minociclina (CIM = 1,5 a 6 µg/mL) e amicacina (CIM = 12 a 16 µg/mL); e apresentaram sensibilidade intermediária a doxiciclina (CIM = 4 µg/mL).

Kim et al. (2008) estabeleceram a CIM da claritromicina pelo método de microdiluição em caldo. Foram selecionadas de forma randômica nove cepas de *M. abscessus*, nove cepas de *M. massiliense* e duas de *M. bolletii*. Como controles foram utilizadas cepas padrão com perfil de suscetibilidade conhecido: *M. abscessus* ATCC19977, *M. massiliense* CIP108297 e *M. bolletii* CIP108541. Os autores observaram os valores de CIM da claritromicina variando de 0,25 a 64 µg/mL para as cepas de *M. abscessus*. De acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI, quatro cepas foram consideradas sensíveis, quatro resistentes e duas apresentaram sensibilidade intermediária à claritromicina. As três cepas de *M. bolletii* apresentaram resistência à claritromicina. Curiosamente as cepas de *M. massiliense* ou foram extremamente sensíveis à claritromicina (CIM variando de 0,125 a 0,5 µg/mL) ou apresentaram níveis extremamente elevados de resistência (CIM > 256 µg/mL), não ocorrendo um grupo com sensibilidade intermediária como observado em algumas cepas de *M. abscessus*. Os dados obtidos em relação ao *M. bolletii* corroboram com a publicação de Adékambi et al. (2006), ou seja, o microrganismo parece ser naturalmente resistente à claritromicina embora Kim et al. tenham demonstrado cautela ao generalizar essa afirmação, ressaltando que em função do perfil de suscetibilidade variar para cada cepa, todo isolado com significado clínico deveria ser submetido aos testes de suscetibilidade *in vitro*.

1.5. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Investigações epidemiológicas utilizando métodos moleculares como PCR por iniciação arbitrária (AP-PCR) e *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) sugerem uma variação genética entre as cepas de *M. abscessus*, porém, uma região polimórfica ainda não foi identificada. O foco principal da caracterização molecular têm sido genes que permitem identificação rápida dos isolados e genes que desempenham algum papel na resistência a drogas (Howard et al. 2002).

Zhang et al. (1997) aplicaram o método de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) em 118 cepas de *M. abscessus* previamente analisadas por PFGE, incluindo isolados de oito surtos de infecção hospitalar. RAPD é um método de análise molecular que tem sido utilizado para comparar cepas de vários microrganismos, incluindo algumas espécies de micobactérias, em função do potencial genérico do sistema de PCR e do custo relativamente baixo do equipamento de PCR (termociclador). Segundo os autores, o método é simples e rápido, quando comparado aos métodos de PFGE e *Southern hybridization*, e não requer conhecimento da sequência molde do DNA. Utilizando um oligonucleotídeo iniciador arbitrário, ocorre hibridização em ambas as fitas do molde de DNA. A ligação do oligonucleotídeo iniciador com a fita molde de DNA ocorre de forma completa ou parcial, resultando em um produto heterogêneo espécie-específico. Os autores avaliaram dez oligonucleotídeos iniciadores diferentes, uma vez que a comparação de cepas por RAPD requer o uso de múltiplos oligonucleotídeos. Algumas cepas de *M. abscessus* que não puderam ser avaliadas pelo método de PFGE porque

tiveram o DNA degradado originaram padrões avaliáveis quando submetidas ao RAPD. O estudo evidenciou que o método de RAPD pode ser usado para comparação genética de cepas de *M. abscessus*, sobretudo aquelas que não podem ser comparadas pelo PFGE por sofrer degradação do DNA (Zhang et al. 1997).

A análise de proteínas por SDS-PAGE é uma técnica que tem sido utilizada para tipagem epidemiológica de microrganismos como *Helicobacter pylori*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii* e *Moraxella catarrhalis*. Esteban & Cabria (2003) enfatizaram que no caso específico das MNT, SDS-PAGE é uma técnica usualmente empregada para caracterização, mas não para estudos epidemiológicos. Segundo os autores a similaridade inter-espécies sempre foi superior a 75% e a similaridade intra-espécie mostra coeficiente maior que 95%, ou seja, isolados de uma mesma espécie com origens diferentes (não relacionados epidemiologicamente) podem apresentar o mesmo perfil quando analisados por SDS-PAGE. Em função do exposto, os autores acreditam que SDS-PAGE não é uma técnica útil para determinar a isogenia dos isolados de MNT. Segundo os autores, outras técnicas como AP-PCR podem oferecer maior acurácia e êxito nos estudos epidemiológicos.

Em um estudo pioneiro no Brasil, Viana-Niero et al. (2008) relataram a ocorrência de um surto de infecção após diferentes procedimentos invasivos envolvendo 311 pacientes na cidade de Belém, no Estado do Pará, entre 2004 e 2005. Nesse trabalho foram estudados 67 isolados sendo 58 oriundos de pacientes submetidos à laparoscopia, um oriundo de um paciente com abscesso pós-injeção e oito recuperados de amostras de pacientes submetidos a mesoterapia. Os isolados foram inicialmente identificados como *M.*

abscessus tipo II por PRA-hsp65 e posteriormente discriminados pelo sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB* (*M. massiliense* ou *M. bolletii*). A tipagem molecular por PFGE agrupou todas as 58 cepas de *M. massiliense* isoladas de pacientes submetidos à laparoscopia (confirmando a relação epidemiológica e genética dessas cepas), enquanto que os isolados de pacientes submetidos a procedimento de mesoterapia (*M. bolletii*) apresentaram três diferentes padrões de PFGE e o isolado do paciente com abscesso pós-injeção (*M. massiliense*) apresentou um padrão de PFGE distinto de todos os outros. Os autores ressaltaram que as técnicas moleculares aplicadas para identificação e genotipagem foram essenciais para a discriminação de dois surtos concomitantes e um caso isolado de abscesso pós-injeção, não relacionado a nenhum dos dois surtos, sendo que anteriormente à análise molecular acreditava-se na hipótese de um único surto em que todos os casos seriam atribuídos a uma única cepa de *M. abscessus*.

1.6. TERAPÊUTICA ANTIMICROBIANA

As MNT são usualmente resistentes aos agentes antimicrobianos indicados para o tratamento da tuberculose, o que pode dificultar o tratamento dos pacientes acometidos por infecções causadas por esses microrganismos. Um estudo publicado por Eid et al. (2007) traz o relato de dois pacientes com infecção após implante de prótese articular no quadril, causada por *M. fortuitum*, que foram tratados com etambutol e isoniazida, antibióticos ineficazes contra MCR. Os pacientes supracitados apresentaram infecção persistente e desenvolvimento de fístulas enquanto que outros dois pacientes

tornaram-se assintomáticos enquanto recebiam tratamento com antibióticos efetivos. Os autores enfatizaram que esses quatro pacientes apresentavam infecção causada por *M. fortuitum*, que é considerada a espécie de MCR mais sensível aos antibióticos, e que teoricamente seria mais difícil obter sucesso no tratamento caso a infecção fosse causada por *M. abscessus*, espécie resistente à maioria dos antibióticos administrados por via oral. Ainda segundo os autores, os antibióticos de primeira linha indicados para o tratamento das infecções causadas por *M. tuberculosis*, como isoniazida, etambutol e rifampicina, não são ativos e não deveriam ser usados contra MCR. Portanto, se uma infecção por MNT for identificada e tratada precocemente de forma adequada, um resultado de sucesso pode ser alcançado (Pring et al. 1996).

Galil et al. (1999) ressaltaram a importância do diagnóstico das infecções não responsivas aos tratamentos rotineiros, considerando agentes infecciosos incomuns, como as MNT. Segundo Trupiano et al. (2001) o diagnóstico definitivo é importante e requer a identificação do microrganismo através de culturas em meios apropriados, testes fenotípicos e moleculares, sendo a claritromicina, considerada a droga de escolha para tratamento das infecções causadas por *M. abscessus*.

Sanguinetti et al. (2001) relataram na Itália o caso de um paciente de 20 anos com fibrose cística que desenvolveu uma infecção pulmonar fatal, causada por uma cepa de *M. abscessus* multirresistente. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo método de Etest, revelando um padrão de multirresistência, com valores elevados de CIM, sendo avaliados 14 agentes antimicrobianos, incluindo aqueles considerados de primeira linha para tratamento de MNT (estreptomicina, isoniazida, ceftazidima,

azitromicina, claritromicina, levofloxacina, vancomicina, imipenem, amoxicilina, etionamida, sulfametoxazol-trimetoprim, ofloxacina, amoxicilina-ácido clavulânico e rifampicina). Apesar da administração de terapia antimicrobiana incluindo a claritromicina, a infecção persistiu e o paciente foi a óbito. Os autores enfatizaram a importância do diagnóstico correto, uma vez que falhas no diagnóstico de micobacterioses podem conduzir a tratamentos errôneos e que o estudo traz a primeira evidência de resistência a claritromicina, que é considerada a droga mais ativa contra *M. abscessus*.

Scholze et al. (2005) relataram o caso de um paciente em uso de medicamentos imunossupressores, que adquiriu infecção cutânea por *M. abscessus*. Após diagnóstico o paciente foi tratado com sucesso durante oito meses com claritromicina e pirazinamida. Os autores ressaltaram a importância das infecções causadas por MNT em pacientes imunocomprometidos e/ou em estágio final de falência renal, cujas infecções podem ser diagnosticadas erroneamente como fúngicas ou por bactérias como *Staphylococcus* sp, enterobactérias ou *Pseudomonas* sp, dificultando o tratamento que deve ser instituído com o uso de um macrolídeo (preferencialmente claritromicina) por várias semanas com possibilidade de combinação com outra droga, como amicacina ou cefoxitina.

No período compreendido entre agosto e novembro de 2001, ocorreu a inoculação acidental de *M. abscessus* em 40 pacientes, durante procedimento de acupuntura em uma clínica de medicina oriental, na Coreia do Sul, levando ao desenvolvimento de infecção iatrogênica de pele com formação de abscessos e úlceras limitados a sítios-alvo da acupuntura. Os isolados clínicos foram identificados como *M. abscessus* por teste bioquímico (tolerância ao

NaCl a 5%) e por teste molecular (PRA-*rpoB*). Testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados com a finalidade de selecionar um antimicrobiano a ser administrado concomitantemente à claritromicina, considerada a primeira droga de escolha para tratamento das infecções causadas por *M. abscessus*. Houve sensibilidade a amicacina, pirazinamida, imipenem e canamicina; e resistência a eritromicina, ampicilina, cefalotina, cefotaxima, cefepima, ciprofloxacina, gentamicina, tobramicina, aztreonam, ceftazidima, piperacilina, rifampicina, estreptomicina, etambutol, cicloserina, ácido paraminosalicílico e ofloxacina. Em casos de infecção de pele causada por *M. abscessus*, os autores recomendam que os pacientes sejam submetidos ao tratamento - pelo período mínimo de três meses - com claritromicina associada a outro antibiótico cuja escolha seja baseada nos resultados dos testes de suscetibilidade (Ryu et al. 2005).

Baseando-se nos resultados obtidos por Kim et al. (2007) foi instituído um esquema de tratamento para todos os pacientes envolvidos em um surto de infecção associado a injeções intramusculares causado por *M. massiliense*. Os autores estabeleceram a CIM pelo método de Etest, verificando a atividade de 14 agentes antimicrobianos (amicacina, claritromicina, doxiciclina, imipenem, linezolida, sulfametoxazol-trimetoprim, tobramicina, azitromicina, cefotetan, colistina, gatifloxacina, minociclina, moxifloxacina e ticarcilina) frente aos isolados obtidos durante o surto. A claritromicina foi recomendada para tratamento e todos os pacientes evoluíram para a cura com ausência de relato de recidiva.

Nash et al. (2009) publicaram um estudo afirmando que as infecções causadas por *M. abscessus* tendem a responder de forma insuficiente ao

tratamento com macrolídeos, mesmo quando o microrganismo apresenta suscetibilidade *in vitro* à claritromicina. Algumas evidências sugerem que no mínimo alguns isolados de *M. abscessus* podem apresentar resistência induzível aos macrolídeos. Resistência induzível à claritromicina (CIM > 32 µg/mL) foi encontrada em sete dos 10 isolados clínicos de *M. abscessus* previamente considerados suscetíveis. A resistência induzível é conferida por um gene *erm* original (41) presente em todos os 10 isolados de *M. bolletii* em estudo. A expressão do gene *erm* em *M. abscessus* confere resistência a claritromicina e eritromicina. A exposição de *M. abscessus* a macrolídeos, lincosaminas ou estreptograminas aumenta os níveis de expressão do gene *erm* (41) em 24 horas. A indução do fenótipo de resistência em alguns isolados de *M. abscessus* poderia explicar o lapso na eficácia do tratamento monoterápico com macrolídeo.

Koh et al. (2009) relataram o primeiro caso de infecção disseminada causada por *M. bolletii* em um paciente adulto jovem previamente saudável, na Coreia do Sul. *M. bolletii*, reconhecido como espécie distinta do grupo *M. chelonae-abscessus* (Adékambi et al. 2006), foi recuperado de múltiplas amostras de escarro do referido paciente e após identificação por métodos moleculares, o microrganismo foi submetido aos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, revelando-se resistente ao imipenem, tobramicina, claritromicina, ciprofloxacina e doxiciclina; sensível à amicacina e com sensibilidade intermediária à cefoxitina e moxifloxacina. Os autores enfatizaram que o número limitado de relatos na literatura sobre infecções causadas por *M. bolletii* dificulta a busca por informações confiáveis sobre a terapêutica antimicrobiana e que o tratamento ótimo para pacientes com infecções

causadas por *M. bolletii* ainda não foi estabelecido. Devido às similaridades fenotípicas ao *M. abscessus*, uma terapêutica antimicrobiana similar seria razoável, entretanto, *M. bolletii* têm sido descrito como uma espécie altamente resistente aos agentes antimicrobianos, incluindo a claritromicina, diferentemente das outras espécies de MNT (Adékambi et al. 2006; Kim et al. 2008; Adékambi et al. 2009; Koh et al. 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos a literatura tem evidenciado um número expressivo de surtos e pseudo-surtos causados por MNT em várias regiões do mundo. No Brasil, surtos causados por MCR têm sido relatados desde 1998, nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Pará. Surtos após cirurgias a laser para correção de miopia, seções de mesoterapia (injeções intradérmicas), mamoplastia e laparoscopia foram descritos, a maioria deles associados a espécies do grupo *M. chelonae-abscessus* (Freitas et al. 2003; Sampaio et al. 2006; Viana-Niero et al. 2008). A Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia-GO registrou entre 2005 e 2007 vários casos de infecção após artroscopia e laparoscopia, justificando a realização deste estudo.

Considerando que a espécie *M. massiliense* figura-se como patógeno humano em potencial, portador de perfil característico de resistência aos antimicrobianos de escolha para o tratamento das infecções causadas pelo *M. tuberculosis* e outras espécies de MNT, torna-se imprescindível a padronização de protocolos de identificação molecular e determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados oriundos de pacientes com infecção após videoscopias em Goiás, para que o tratamento possa ser conduzido de forma adequada na vigência de novos casos.

As informações sobre a relação genética dos isolados clínicos de *M. massiliense* oriundos de diferentes hospitais de Goiânia-GO poderão prover oportunidades para intervenção eficiente. A genotipagem permitirá ainda a elucidação das possíveis cadeias de transmissão, apoiando ou descartando a hipótese de transmissão cruzada entre os pacientes e entre os hospitais, de forma a contribuir na prevenção e controle dessas infecções.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

- Análise molecular e determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de *M. massiliense* isoladas durante um surto de infecção após procedimentos de videoscopia, ocorrido em Goiânia-GO, entre agosto de 2005 e julho de 2007.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar genotipicamente os isolados clínicos por PCR seguida de análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (PRA-hsp65) e por sequenciamento parcial do gene *rpoB*.
- Caracterizar a similaridade genética dos isolados clínicos por eletroforese em gel em campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE).
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos frente aos antimicrobianos: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritomicina, doxiciclina, sulfametoxazol e tobramicina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. POPULAÇÃO EM ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS

De acordo com os dados obtidos na Coordenação Municipal de Controle de Infecção nos Estabelecimentos de Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia-GO (COMCIES), entre agosto/2005 e julho/2007 foram realizados 4.480 procedimentos de artroscopia e laparoscopia em Goiânia. Foram notificados à COMCIES 121 casos de infecção após videoscopia, sendo estes diagnosticados por critérios clínicos e epidemiológicos. Destes 121 casos, apenas 30 foram confirmados por critérios microbiológicos (cultura positiva para MNT), após coleta e transporte para o LACEN-GO de amostras de secreção de abscessos subcutâneos e realização das culturas de micobactérias. Chegando ao LACEN-GO, as amostras foram semeadas em ágar Lowenstein Jensen (LJ) e incubadas à temperatura de 35°C sob condições de aerobiose. Após período de cinco a sete dias, colônias não pigmentadas foram observadas em LJ. A baciloscopia das colônias após coloração de Ziehl-Neelsen evidenciou BAAR. Os testes bioquímicos de acúmulo de niacina (negativo) e inibição pelo ácido p-nitrobenzóico - PNB-500 µg/mL (negativo) foram realizados para a identificação presuntiva das MNT, descartando-se a possibilidade do envolvimento de espécies do CMTB. As culturas de MNT foram mantidas pelo armazenamento das mesmas à -80°C, no banco de cepas LACEN-GO.

4.2. ASPECTOS ÉTICO-LEGAIS, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E SELEÇÃO DAS CEPAS:

O projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás e recebeu parecer favorável (anexo 1).

Após contato telefônico, 18 dos 30 pacientes com cultura positiva para MNT (depositadas no banco de cepas do LACEN-GO) foram localizados e autorizaram o agendamento de uma visita, sendo então procurados em suas respectivas residências ou local de trabalho e convidados a assinar o TCLE aprovado pelo Comitê de Ética da UFG (anexo 2) e a responder ao questionário, após esclarecimento sobre a pesquisa (anexo 3).

Foram objeto deste estudo as culturas positivas para MNT, armazenadas no banco de cepas LACEN-GO, cujos pacientes assinaram o TCLE, totalizando 18 cepas.

Foram utilizadas como cepas controle: *M. bolletii* (CCUG 50184), *M. chelonae* (ATCC 35752), *M. abscessus* (ATCC 19977) e *M. massiliense* (CCUG 48898), oriundas do banco de cepas do Laboratório de Micobactérias da UNIFESP - Dra. Sylvia C. Leão.

4.3. OBTENÇÃO, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DAS CEPAS:

No LACEN-GO, as 18 culturas de MNT em estudo foram recuperadas do banco de cepas (-80°C) e cultivadas em tubos de ensaio com LJ, sob temperatura de 35°C, por um período de cinco a sete dias. Após o desenvolvimento das colônias, os tubos de LJ foram transportados para o Laboratório de Bacteriologia Molecular do IPTSP-UFG, acondicionados em

caixas térmicas lacradas, à temperatura ambiente, tendo sido observados os critérios de biossegurança para o transporte de microrganismos viáveis.

No Laboratório de Bacteriologia Molecular do IPTSP-UFG as culturas foram distribuídas em alíquotas e congeladas à temperatura de -80°C em caldo de soja tríptica (TSB) acrescido de 25% de glicerol. Para cada cultura foram armazenadas quatro alíquotas de 1,5mL em criotubos, devidamente identificados com um número sequencial e com as letras iniciais do nome de cada um dos pacientes.

4.4. EXTRAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO:

A partir das culturas em LJ procedeu-se a inativação bacteriana a 80°C durante 20 minutos e a extração do DNA de acordo com a técnica proposta por Van Soolingen (1994), no Laboratório de Bacteriologia Molecular do IPTSP-UFG.

O equivalente a duas alçadas de cada cultura foram ressuspensas em 400 µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) por agitação. À suspensão foram adicionados 50µl de lisozima (1mg/mL) (Sigma) com posterior incubação por um período de uma hora à temperatura de 37°C. Ao sistema de digestão foram adicionados 70 µL de SDS a 10% e 6 µL de proteinase K (Invitrogen) a 10 µg/mL e o sistema foi então incubado a 56°C por 10 min. Após incubação, 100 µL de NaCl a 5 M foram adicionados seguidos de 80 µL de solução CTAB/NaCl (10% CTAB, 0,73M NaCl), agitando até se tornar leitosa e então incubada por mais 10 min a 65°C. Foi adicionado um volume igual de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v) seguido de agitação por 30s e

centrifugação por 5 min a 12,000 g. O sobrenadante foi precipitado através da adição de 0,6 volumes de isopropanol seguido de uma incubação a -20°C por 30 min. O ácido nucléico foi coletado por centrifugação a 12,000g por 20 min e lavado com 1,0 mL de etanol a 70% gelado. Após secagem o DNA foi ressuspendido em 20uL de tampão TE e armazenado à temperatura de -20°C.

4.5. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS COLÔNIAS EM ÁGAR LOWENSTEIN JENSEN:

Uma distinção presuntiva inicial de *Mycobacterium tuberculosis* e micobactéria não-tuberculosa (MNT) foi obtida pela observação direta do aspecto da colônia em LJ (morfologia e pigmentação), tempo de crescimento (inferior a sete dias) e a presença de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) nos esfregaços confeccionados a partir das culturas e corados por Ziehl-Neelsen.

4.6. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR PCR SEGUIDA DE ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (PRA-hsp65):

A identificação molecular das MNT de crescimento rápido foi realizada por PCR seguida de análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (PRA-hsp65) do gene da proteína de choque térmico (*Heat Shock Protein* - HSP) de 65-kDa. Foram utilizados na PCR, os oligonucleotídeos iniciadores: A: 5'ACCAACGATGGTGTGTCCAT3' e B: 3'CTTGTCGAACCGCATACCCT5', para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 439bp do gene

hsp65, comum no gênero *Mycobacterium* (Telenti et al. 1993; Rodrigues et al. 2004).

Cada reação de PCR foi constituída por uma mistura de Tris 20 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 M, dNTP 200 μ M, 25 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de enzima Taq DNA polimerase (CENBIOT). O DNA foi submetido à desnaturação a 95°C por 5 min e em seguida a 45 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma etapa de extensão final a 72°C por 7 min.

Posteriormente, 10 μ L do produto amplificado foi digerido separadamente com as enzimas de restrição *HaeIII* (37°C por 2 h) e *BstEII* (55°C por 2 h) (Invitrogen), sendo o produto dessa digestão submetido à eletroforese em gel de agarose a 4% com brometo de etídio (0,5 mg/L), usando tampão tris-borato EDTA (TBE = Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM).

O gel foi analisado em um transiluminador (UV) e a determinação da espécie foi feita através da verificação e comparação do perfil de bandas obtido com os perfis esperados de acordo com Telenti et al. (1993) e Devallois et al. (1997), representados na Figura 2.

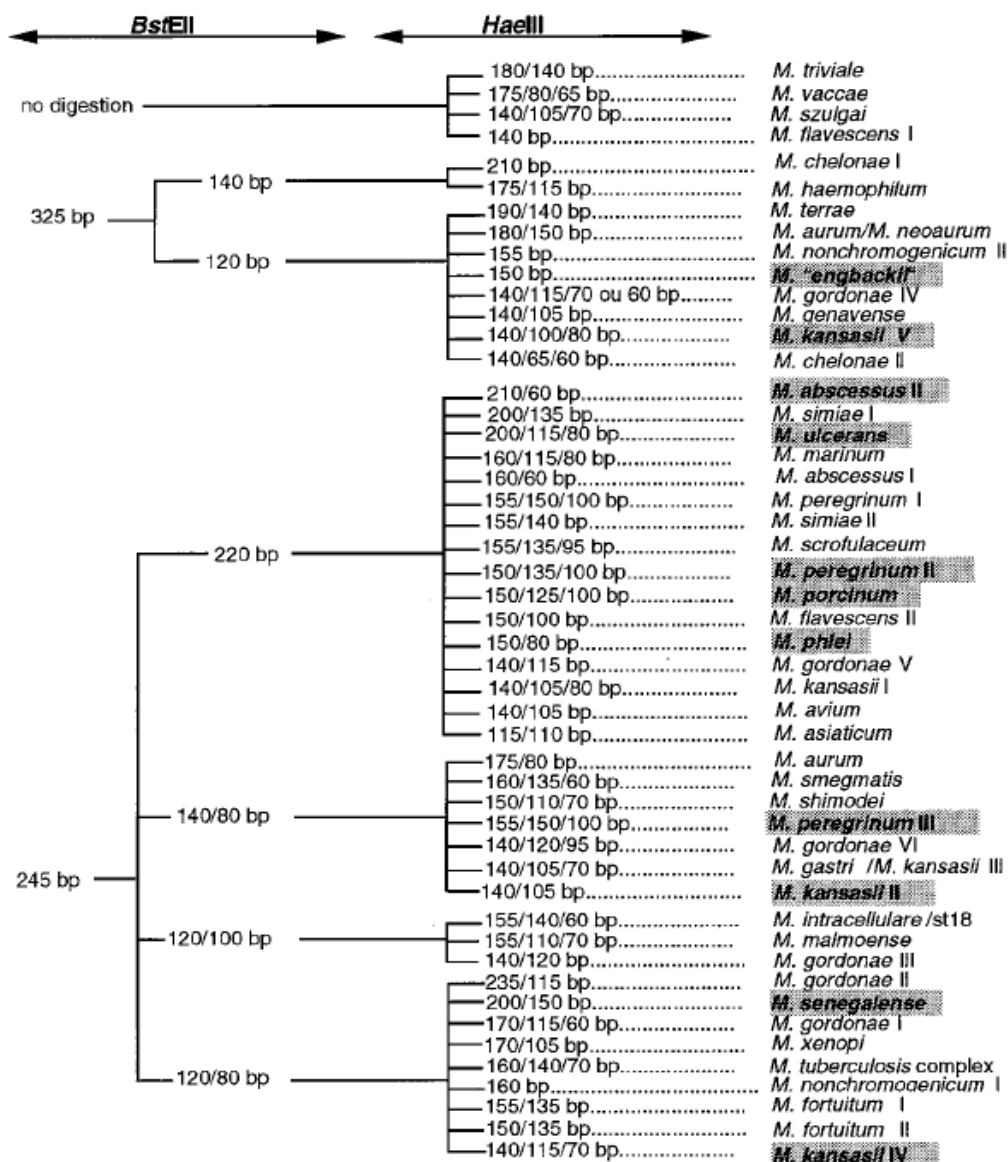


Figura 2 – Algoritmo de padrões de PRA-hsp65 de 34 espécies de micobactérias. As espécies sombreadas ilustram novos padrões de PRA-hsp65 que não haviam sido reportados previamente nos algoritmos de Telenti et al. 1993 e Taylor et al. 1997 (Devallois et al. 1997).

4.7. SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE *rpoB*:

Foi realizado o sequenciamento parcial do gene *rpoB* de duas das amostras em estudo, oriundas de dois hospitais diferentes, de acordo com o protocolo descrito por Viana-Niero et al. (2008). As amostras amplificadas por PCR com iniciadores específicos para um fragmento de 711bp do gene *rpoB*,

foram sequenciadas usando o sequenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências foram analisadas utilizando os programas PHRED, PHRAP e CONSED, sendo identificadas por análise de similaridade com sequências depositadas na base de dados do *GenBank* usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4.8. GENOTIPAGEM POR ELETROFORESE EM GEL EM CAMPO PULSADO (PFGE):

A genotipagem por PFGE foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Viana-Niero et al. (2008).

Preparação das células: uma colônia de cada micobactéria em estudo foi inoculada em recipientes contendo 40mL de caldo Mueller-Hinton suplementado com Tween 80 a 0,1% e incubada a 37°C sob agitação constante até que as culturas atingissem uma densidade óptica de 0.64 a 650 nm (tempo médio de crescimento equivalente a 72 h). As culturas foram então centrifugadas a 4°C por 20 min a 3.500 rpm e o sedimento congelado à -80°C por 1 h. Depois de descongelado, o sedimento celular foi ressuspendido em 400 µL de solução STE-Tween 80 a 0,1% (NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8.0, EDTA 50 mM, Tween 80 à 0,1%). Essa suspensão foi misturada a 400µL de agarose LMP - “*low melting point*” a 2% (Bio-Rad Laboratories) para a confecção dos “plugs”. A agarose foi preparada em EDTA 125mM = 2,5 mL EDTA 0,5M + 7,5 mL de água e utilizada em temperatura aproximada de 50°C.

Os blocos com os “plugs” foram incubados por 10 min à temperatura de 2 a 8°C.

Lise celular: as células nos “plugs” foram transferidas dos blocos para uma placa de cultura de células (24 poços) estéril contendo 2 mL da solução de lise (STE e lisozima 10 mg/mL) e incubadas a 37°C sob agitação durante uma noite. No outro dia os “plugs” foram incubados a 4°C por 1 h e depois retirados da solução de lise e incubados em 2 mL de EDTA a 0,5 M contendo sarcosil a 1% a 4°C por 1h. Posteriormente os “plugs” foram retirados dessa solução e incubados em uma solução contendo 1 mL de EDTA a 0,5 M/sarcosil e 40 µL de proteinase K a 50 mg/mL, a 55°C por 24 h sob agitação e depois a 4°C por 1 h. Os “plugs” foram lavados duas vezes com 2 mL de TE 1X por 30 min a 4°C. Depois os “plugs” foram incubados em 2 mL de TE 1X contendo 0,12 mg/mL de PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoreto - Sigma) por 1 h a 55°C. Os “plugs” foram lavados três vezes em 2 mL de TE 1X por 30 min à temperatura ambiente e depois lavados em 5 mL de Triton a 0,1% a 4°C por 90 min antes da digestão.

Digestão do DNA: metade dos “plugs” de cada amostra foi digerido com 30 U da enzima de restrição *Dra* I (Promega), a 37°C, por aproximadamente 18h.

Separação dos fragmentos de restrição: após a digestão, os “plugs” foram lavados em EDTA 0,05 M a 4°C por 15 min e aplicados em gel de agarose para PFGE (Bio-Rad) a 1% preparado com tampão TBE 0,5 X (Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM), e submetidos à eletroforese em tampão TBE 0,5X. A eletroforese em campo pulsado foi realizada em um aparelho CHEF-DR III (*BioRad*) nas seguintes condições: voltagem = 6V/cm,

tempo = 24 h, temperatura = 14°C, pulso inicial de 1,6 s e final de 21,3 s. Após a eletroforese, os géis foram corados por 10 min com brometo de etídio (0,5 mg/L) e fotografados em transiluminador sob luz UV. Um marcador “Lambda Ladder PFG Marker” (*NewEngland BioLabs*) foi incluído como padrão de massa molecular em 2 posições por gel (nas extremidades).

Interpretação dos resultados: a interpretação foi realizada visualmente de acordo com os parâmetros estabelecidos por Tenover *et al.* (1995) e por análise computadorizada (*BioNumerics*, v. 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

4.9. TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM):

Seguindo as recomendações do CLSI (NCCLS 2003) foi utilizado o método de microdiluição em caldo para realização dos testes de suscetibilidade das MNT de crescimento rápido em estudo.

Os antimicrobianos (Sigma) e as concentrações avaliadas foram: amicacina (2 a 128 µg/mL), cefoxitina (4 a 256 µg/mL), ciprofloxacina (0,25 a 16 µg/mL), claritromicina (1 a 64 µg/mL), doxiciclina (0,5 a 32 µg/mL), sulfametoxazol (2 a 128 µg/mL) e tobramicina (0,5 a 32 µg/mL), sendo o caldo Mueller-Hinton utilizado para preparar as referidas diluições.

Para estabelecer a CIM de cada agente antimicrobiano, foram utilizadas concentrações diferentes de uma mesma droga a partir das diluições seriadas com fator dois (por exemplo: 1, 2, 4, 8, 16, 32 µg/mL).

A suspensão bacteriana para a realização dos testes de suscetibilidade de cada uma das cepas em estudo foi preparada a partir das colônias jovens (semeaduras recentes) em ágar Mueller-Hinton, sendo estas transferidas com *swabs* estéreis para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de água estéril que foram posteriormente homogeneizados no vortex, observando-se um padrão de turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland.

Para preparar o inóculo final (com uma densidade de microrganismos aproximada de 5×10^5 UFC/mL) foi transferido o volume de 50µL da suspensão bacteriana para um tubo de ensaio contendo 10mL de caldo Mueller-Hinton cation suplementado, sendo o tubo invertido de oito a dez vezes para tornar a suspensão homogênea. O inóculo final foi transferido (volume = 100µL) para microplacas de plástico escavadas e estéreis (com tampa) já acrescidas dos antimicrobianos (volume = 100µL) nas diluições desejadas, sendo 200µL o volume final de cada poço.

A leitura das placas foi realizada após a incubação à temperatura de 35°C por 72h. Considerou-se leitura positiva quando observado crescimento bacteriano (turbidez ou formação de depósito de células no fundo da placa – “botão”) e leitura negativa quando não foi observado crescimento bacteriano. Adicionalmente foram realizadas leituras automatizadas em leitora de ELISA com obtenção da densidade óptica (DO) de cada poço das placas.

Cada teste de suscetibilidade foi realizado em duplicata em dias diferentes com a finalidade de garantir a qualidade e a reprodutibilidade dos testes.

O controle de qualidade foi realizado em todas as placas da seguinte forma: A) controle de crescimento do microrganismo (microrganismo e caldo

Mueller-Hinton: leitura positiva), B) controle da droga (droga e caldo Mueller-Hinton: leitura negativa) e C) controle do meio de cultura (caldo Mueller-Hinton: leitura negativa).

Ao final das leituras, após validação dos controles de qualidade (A, B e C), o valor de CIM (menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano) foi determinado para cada droga, frente a cada isolado micobacteriano, sendo o resultado reportado acompanhado da interpretação nas categorias: sensível, intermediário ou resistente (NCCLS 2003).

De acordo com o CLSI (NCCLS 2003), os critérios para interpretação da microdiluição em caldo para MCR a partir das leituras de CIM ($\mu\text{g/mL}$) são: amicacina (sensível ≤ 16 ; intermediário = 32; resistente ≥ 64), cefoxitina (sensível ≤ 16 ; intermediário: 32 - 64; resistente ≥ 128), ciprofloxacina (sensível ≤ 1 ; intermediário = 2; resistente ≥ 4), claritromicina (sensível ≤ 2 ; intermediário = 4; resistente ≥ 8), doxiciclina (sensível ≤ 1 ; intermediário: 2 – 8; resistente ≥ 16), sulfametoxazol (sensível ≤ 32 ; resistente ≥ 64) e tobramicina (sensível ≤ 4 ; intermediário = 8; resistente ≥ 16).

A partir dos resultados obtidos, foram determinados os valores de CIM₅₀ (CIM capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados) e CIM₉₀ (CIM capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados) dos agentes antimicrobianos avaliados.

5. RESULTADOS

Esta Tese de Doutorado resultou em dois manuscritos, sendo que o primeiro foi publicado e o segundo será submetido a uma revista científica, dentro do convênio com a OPAS/ANVISA (Termo de Cooperação 37 OPAS/OMS e ANVISA - Edital nº 13, de setembro de 2007).

- ✓ Cardoso AM et al. 2008. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. *Microbes and Infection* 10: 1552-1557 (anexo 4).
- ✓ Cardoso AM et al. Suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Mycobacterium massiliense* por microdiluição em caldo (anexo 5).

5.1. PERFIL CLÍNICO

Os dados oriundos da análise dos questionários encontram-se sumarizados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Características das lesões de 18 pacientes com infecção causada por *Mycobacterium massiliense* após videoscopia em Goiânia-GO, Brasil (2005 – 2007).

Características						N (18)	%		
Número de lesões									
Caso	Gênero	Única Múltiplas	Doença prévia ^a	Hospital	Sítio de infecção	Data da videoscopia ^b	Data da cultura ^c	Tempo de diagnóstico	Trata- mento ^e
1	F	Topografia	TG	B	Abdomen	02/06	11/06	09	CL
2	M	Joelho	NÃO	A	Joelho	03/06	05/07	14	CL
3	M	Joelho	NÃO	A	Joelho	01/06	08/06	07	CL, AM
4	M	Abdomem	NÃO	D	Abdomen	02/06	06/06	04	CL, AM
5	M	Sinais e sintomas (pré-tratamento)	NÃO	A	Joelho	04/06	05/06	01	CL, AM
6	M		NÃO	C	Joelho	04/06	07/06	03	CL, AM
7	M		NÃO	C	Joelho	03/06	07/06	04	CL, AM, CI, VA
8	F		NÃO	A	Abdomen	04/06	07/06	03	CL, AM
9	M		NÃO	C	Joelho	04/06	07/06	03	CL
10	M	Eritema local	NÃO	B	Joelho	04/06	08/06	04	CL
11	M	Calor local	NÃO	A	Joelho	04/06	05/06	01	CL, AM
12	F		HCV+	B	Abdomen	11/05	06/06	07	CL, AM
13	M		HSA	G	Joelho	03/06	05/06	02	CL, AM
14	M	71	HSA	E	Joelho	04/06	06/06	02	CL, AM
15	M	NR	NR	A	Joelho	NR/06	06/06	NR	CL, AM
16	F	60	HSA	B	Úmero	05/06	07/06	02	CL
17	M	21	HSA	A	Joelho	NR/06	06/06	NR	CL, AM
18	F	36	NÃO	F	Joelho	03/06	07/06	04	CL, AM

^a NÃO (ausência de doença prévia); NR (não relatado); TG (tumor gástrico); HCV+ (vírus da Hepatite C); HSA (hipertensão); ^b Mês/ano; ^c Data na qual a amostra foi coletada para a cultura (mês/ano); ^d Tempo entre a videoscopia e o diagnóstico microbiológico (meses); ^e CL (claritromicina), AM (amicacina), CI (ciprofloxacina), VA (vancomicina).

De acordo com os dados fornecidos pela COMCIES não houve relato de infecção generalizada ou óbito. A maioria dos casos ocorreu em pacientes do gênero masculino (72,2%), com idade entre 21 e 71 anos, sendo a média de 46 anos; 13 (72,2%) pacientes apresentaram idade inferior a 50 anos. Embora os pacientes fossem oriundos de sete hospitais privados da cidade de Goiânia-GO, um único hospital concentrou 38,9% dos casos. Os abscessos subcutâneos ficaram restritos aos sítios onde as videoscopias foram realizadas, sendo 14 (77,8%) artroscopias e quatro (22, 2%) laparoscopias. O tempo entre a realização da videoscopia e o diagnóstico microbiológico oscilou entre um e 14 meses. Em relação à terapêutica antimicrobiana, treze pacientes (72,2%) foram tratados com claritromicina associada à amicacina, e cinco pacientes foram tratados com claritromicina. Após a antibioticoterapia todos os casos progrediram para a cura. Alguns efeitos indesejáveis foram relatados pelos pacientes, como por exemplo, ototoxicidade, desconforto gástrico e depressão.

5.2. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

As colônias em LJ apresentaram crescimento rápido (cinco a sete dias) e ausência de pigmentação. A microscopia pós-cultura das colônias após coloração de Ziehl-Neelsen evidenciou a presença de BAAR, identificados presuntivamente como MNT de acordo com suas características de crescimento e coloração álcool-ácido-resistente.

5.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Dezoito cepas de *M. abscessus* tipo II foram isoladas de 18 pacientes envolvidos no surto de Goiânia-GO. As cepas de MNT foram identificadas por PCR seguida de análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (PRA-hsp65) como *Mycobacterium abscessus* tipo II – *BstEII*: 245pb e 220pb; *HaeIII*: 210pb e 60pb (Figura 2). A discriminação entre *Mycobacterium massiliense* e *Mycobacterium bolletii* foi realizada pelo sequenciamento parcial do gene *rpoB* que confirmou os isolados como sendo *M. massiliense*.

5.4. GENOTIPAGEM

A genotipagem por PFGE evidenciou um único *cluster* responsável pelo surto (Figura 3) e após comparação usando o programa *BioNumerics* foi evidenciado um perfil genético idêntico ao do surto ocorrido na cidade de Belém-PA (cepa B5, Figura 2) entre 2004 e 2005, descrito por Viana-Niero et al. (2008), levando-nos a inferir que a espécie responsável pelo surto em Goiânia é *M. massiliense*, hipótese confirmada pelo sequenciamento do gene *rpoB* com 100% de similaridade com o clone B5 do surto de Belém.

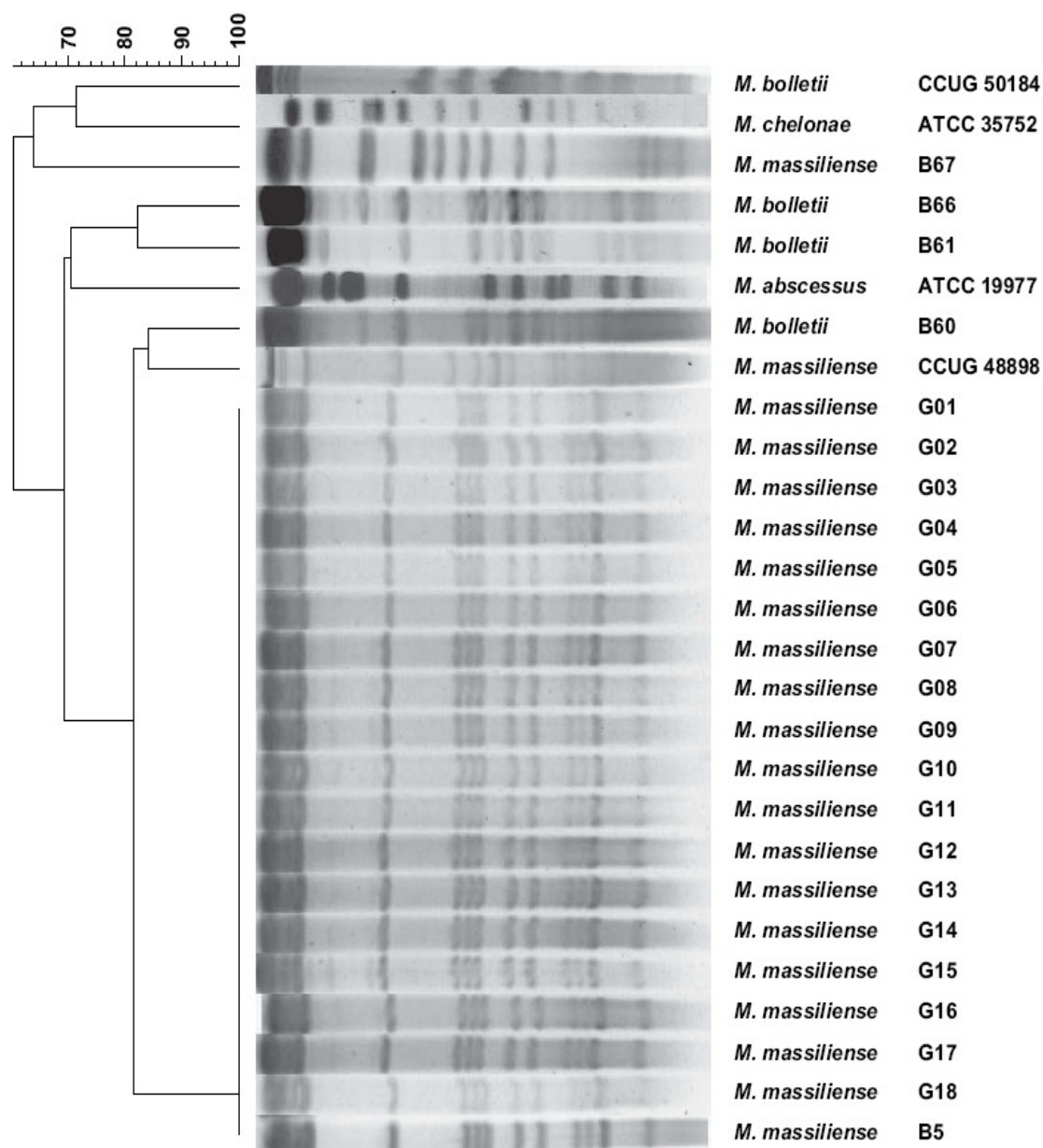


Figura 3 – Dendrograma baseado nos padrões de PFGE de isolados de *M. massiliense* de 18 pacientes. Padrões idênticos agrupados de G01 a G18 ilustram os isolados do surto de Goiânia-GO, bem como o isolado B5 do surto de Belém-PA. Cepas não relacionadas ao surto de Belém: *M. massiliense* (B67) e *M. bolletii* (B60, B61 e B66). Como controles foram incluídas cepas padrão de *M. bolletii* (CCUG 50184), *M. chelonae* (ATCC 35752), *M. abscessus* (ATCC 19977) e *M. massiliense* (CCUG 48898).

5.5. SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Os 18 isolados foram sensíveis a amicacina (CIM < 2 ou = 4 µg/mL) e claritromicina (CIM < 1 µg/mL), porém resistentes a ciprofloxacina (CIM > 16

µg/mL), doxiciclina (CIM > 32 µg/mL), sulfametoxazol (CIM > 128 µg/mL) e tobramicina (CIM = 16 ou 32 µg/mL), com sensibilidade intermediária a cefoxitina (CIM = 32 ou 64 µg/mL) (Tabela 3). Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos apresentaram resultados idênticos após a execução em duplicata e a interpretação nas categorias: sensível, intermediário ou resistente, foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI (2003).

Tabela 3 – Suscetibilidade antimicrobiana de 18 cepas de *Mycobacterium massiliense* isoladas de pacientes com infecção após videoscopia em Goiânia-GO, Brasil (2005 – 2007).

ANTIMICROBIANO	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Suscetibilidade	(%)
Amicacina	<2	4	S	100
Cefoxitina	32	64	I	100
Ciprofloxacina	>16	>16	R	100
Claritromicina	<1	<1	S	100
Doxiciclina	>32	>32	R	100
Sulfametoxazol	>128	>128	R	100
Tobramicina	32	32	R	100

CIM₅₀, a CIM capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados; CIM₉₀, a CIM capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados; S= Sensível; I= Intermediário; R= Resistente.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo realizou-se a análise molecular e a determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Mycobacterium massiliense* recuperadas durante um surto de infecção após videoscopias em Goiânia-GO. Segundo Hinrichsen (2007) as videoscopias incrementaram

inúmeras vantagens aos procedimentos cirúrgicos convencionais, por representarem uma técnica geralmente mais segura e com rápida recuperação dos pacientes, possibilitando breve alta hospitalar e menos dor no pós-operatório. Entretanto existem riscos de infecção que são inerentes aos procedimentos invasivos, em função da ruptura de uma barreira natural de proteção como a pele, possibilitando a invasão de microrganismos patogênicos nos tecidos de hospedeiros suscetíveis.

Infecções de feridas cirúrgicas causadas por MNT usualmente se manifestam várias semanas ou meses após o procedimento ao qual o indivíduo foi submetido. Neste estudo o tempo decorrido entre a videoscopia e o diagnóstico microbiológico oscilou entre um a 14 meses. Sampaio et al. (2006) observaram um período de tempo semelhante (um a 16 meses) para casos de infecção após mamoplastia causados por *M. fortuitum*; Carbonne et al. (2009) relataram um período de incubação compreendido entre sete e 152 dias ao publicar um surto de infecção subcutânea causado por *M. chelonae* após múltiplas injeções de mesoterapia. Em um estudo sobre infecções relacionadas a implante de próteses articulares causadas por MCR publicado por Eid et al. (2007) o tempo decorrido entre o implante da prótese e o desenvolvimento de sintomas variou de uma a 720 semanas. Levando-se em consideração que o tratamento empírico utilizado rotineiramente para o tratamento de infecções de feridas cirúrgicas não é efetivo contra MNT, a suspeita clínica precoce e a excelência do diagnóstico microbiológico, representam fatores primordiais na redução da morbidade e mortalidade dos indivíduos envolvidos.

As manifestações clínicas características estendem-se a partir do sítio de infecção com eritema e enduração para doenças disseminadas com

múltiplos nódulos subcutâneos, com drenagem de secreção, formação de abscessos, envolvimento visceral, infecção de corrente sanguínea e de medula óssea. As evidências clínicas de uma infecção disseminada são incomuns, embora possam ocorrer, preferencialmente, em pacientes imunossuprimidos (Fox et al. 2004). Neste estudo não houve relato de infecção disseminada ou óbito.

A identificação da espécie de micobactéria envolvida é uma etapa crítica no manejo dos pacientes, pois o resultado emitido pelo laboratório de microbiologia pode influenciar na seleção do tratamento adequado. O método molecular de PRA-hsp65 foi eleito para essa investigação em razão de sua facilidade e rapidez, bem como do seu potencial para auxiliar na identificação de numerosas espécies de micobactérias (Figura 1) com um único experimento (Devallois et al. 1997). Em nossa investigação os isolados foram preliminarmente identificados como *M. abscessus* tipo II por PRA-hsp65. Todavia, após comparação dos padrões de PFGE obtidos a partir dos isolados do surto de Goiânia-GO com os perfis de PFGE gerados a partir dos isolados recuperados durante um surto ocorrido recentemente em Belém-PA concluímos que os perfis eram idênticos, portanto, tratava-se do mesmo microrganismo, ou seja, *M. massiliense*, validada no ano de 2004 como uma espécie distinta do grupo *M. chelonae-abscessus* (Adékambi et al. 2004), sendo filogeneticamente próxima a *M. abscessus*, razão pela qual havia sido identificada de forma equivocada inicialmente.

No presente estudo, o sequenciamento parcial do gene *rpoB* de dois isolados confirmou a identificação da espécie, bem como a similaridade dos isolados de Goiânia-GO, com os isolados do surto de Belém-PA. Esses

resultados sugerem uma fonte comum de infecção para os pacientes e que o surto de Goiânia foi causado por um único clone de *M. massiliense*.

Esse é o primeiro relato na região centro-oeste do Brasil de um surto no qual a referida espécie foi isolada de amostras clínicas oriundas de pacientes com infecção após videoscopias (artroscopia e laparoscopia). Nossos achados estão em acordo com aqueles obtidos em 2008 por Viana-Niero et al. que descrevem o primeiro surto ocorrido no Brasil, na região norte, em Belém-PA, no período compreendido entre 2004 e 2005. Apesar da literatura escassa sobre o isolamento de cepas de *M. massiliense* no Brasil, os dados disponíveis a respeito do perfil genético deste microrganismo nos leva a especular se existe uma única cepa de *M. massiliense* causando infecções em diferentes regiões do país. Se este for o caso, essa cepa seria mais virulenta, mais patogênica ou mais adaptada ao ambiente devido à sua habilidade em formar biofilmes? Alguns isolados de MNT têm se mostrado resistentes ao glutaraldeído a 2% (Griffiths et al. 2007; Duarte et al. 2009), seria o caso dos isolados desse estudo? As respostas para essas perguntas certamente contribuirão para o controle das infecções causadas por MNT e são perspectivas para futuras pesquisas no Laboratório de Bacteriologia Molecular do IPTSP/UFG.

Pacientes acometidos por infecções causadas por *M. abscessus* são rotineiramente tratados com claritromicina durante várias semanas, sendo indicado como alternativa de tratamento a combinação deste fármaco com amicacina ou cefoxitina (Scholze et al. 2005). Segundo Eid et al. (2007) a duração ótima da antibioticoterapia é uma questão ainda não resolvida. No grupo de oito pacientes estudados por esses autores, o tratamento durou de 16

a 55 semanas, embora tenham encontrado na literatura a descrição de tratamento por um período de três a 112 semanas, sendo todos os casos de infecção por MCR após implante de prótese articular. Para o tratamento dos pacientes envolvidos no surto de Goiânia-GO, a terapêutica antimicrobiana foi recomendada pela Secretaria Municipal de Saúde, em 03 de novembro de 2006, no documento intitulado: “Alterações na orientação terapêutica dos casos de infecção por micobactérias de crescimento rápido - MCR (não tuberculosas), pós-artroscopia ou videolaparoscopia, após 3 meses da recomendação inicial”, distribuído para todos os hospitais, ambulatorios, postos de saúde, unidades de saúde da família, clínicas de estética, serviços de urgência, laboratórios de microbiologia, entidades representativas de profissionais como a Sociedade Goiana para Estudos e Controle de Infecção Hospitalar (AGECIH), Sociedade Goiana de Infectologia (SGI) e Regional de Goiás da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia (SBOT). Esta recomendação foi elaborada por uma equipe de infectologistas, representando as seguintes Instituições: CECIH (Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar), Departamento de Epidemiologia/COMCIES (Coordenação Municipal de Controle de infecção em Estabelecimentos de Saúde), AGECIH (Associação Goiana de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar) e da SGI (Sociedade Goiana de Infectologia), e representa uma reavaliação da conduta terapêutica inicial encaminhada aos estabelecimentos e profissionais de saúde em 05 de julho de 2006, considerando os resultados das culturas e dos testes de suscetibilidade, além de extensa revisão da literatura. O referido documento sugere que a terapia antimicrobiana seja prescrita e acompanhada por um médico infectologista. Os pacientes apresentaram sucesso na terapia realizada com claritromicina e na

terapia combinada de claritromicina com amicacina, durante várias semanas (a maioria por período superior a 24 semanas) e todos os casos apresentaram remissão do quadro clínico e cura, embora o aparecimento de alguns efeitos adversos tenha sido relatado como, por exemplo, ototoxicidade, desconforto gástrico e depressão. Contudo não foi possível no presente estudo estabelecer uma relação direta entre a antibioticoterapia e os efeitos indesejáveis, apesar da reconhecida toxicidade da amicacina bem como de outros antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos, que se manifesta por neurotoxicidade, ototoxicidade e nefrotoxicidade. A ototoxicidade dos aminoglicosídeos tem sido referida em 0,5% a 25% dos pacientes. Essa ampla variação é explicada por diferenças na dose utilizada, idade dos pacientes tratados e uso concomitante ou prévio de drogas ototóxicas. Mesmo os diferentes trabalhos que analisam os fatores envolvidos na toxicidade do 8º par craniano apresentam resultados conflitantes. A lesão no 8º par craniano pode afetar a função vestibular ou a função auditiva, ou ambas. Mais frequentemente, gentamicina, tobramicina, netilmicina e estreptomicina causam alterações do equilíbrio, enquanto amicacina causa alterações auditivas. Um aspecto de particular gravidade nessa toxicidade é que ela pode ter início após a droga ter sido suspensa, ou progredir apesar da retirada do medicamento (Tavares 2007).

A claritromicina tem sido recomendada como o antimicrobiano de primeira linha para o tratamento de infecções causadas por MCR (Brown-Elliott & Wallace 2002; Griffith et al. 2007). Óbitos (Sanguinetti et al. 2001; Tortoli et al. 2008) têm sido associados a cepas resistentes à claritromicina, sendo o risco de aquisição de resistência secundária durante a monoterapia com claritromicina estimado em mais de 10% (Wallace et al. 1996). Ao contrário de

outras espécies do complexo *Mycobacterium chelonae-abscessus*, cepas de *M. bolletii* têm exibido um perfil de elevada resistência à claritromicina (Adékambi et al. 2006; Kim et al. 2008; Adékambi et al. 2009; Koh et al. 2009). Adékambi & Drancourt (2009) ressaltam que as orientações para tratamento das infecções causadas por *M. abscessus* com claritromicina foram feitas antes da descoberta de *M. bolletii*, uma espécie multirresistente proximamente relacionada ao *M. abscessus*, que eventualmente pode ser identificada erroneamente, enfatizando a necessidade da realização dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos *in vitro* das cepas de MCR com significado clínico.

Estudos de sequenciamento do gene 23S rRNA revelaram que 94% das cepas de *M. abscessus* resistentes à claritromicina apresentam uma mutação envolvendo a adenina na posição 2058 ou 2059. Cepas mutantes de *M. abscessus* resistentes à claritromicina apresentam as mesmas mutações que outras bactérias e espécies de micobactérias resistentes à claritromicina (Brown-Elliott & Wallace 2001). Ressalta-se que neste estudo cinco (27,8%) pacientes foram tratados com claritromicina em regime de monoterapia, situação de risco para a aquisição de resistência secundária, embora não tenha ocorrido relato de falha terapêutica no grupo de pacientes envolvidos no surto de Goiânia-GO.

Nesse estudo as cepas de *M. massiliense* foram submetidas aos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos por microdiluição em caldo, considerado pelo CLSI o método padrão-ouro para realização de testes de suscetibilidade *in vitro* de MCR. Todos os isolados foram sensíveis a amicacina e claritromicina, porém resistentes ciprofloxacina, doxiciclina, sulfametoxazol e tobramicina.

Somente a cefoxitina apresentou resultado de sensibilidade intermediária. Esses resultados estão de acordo com aqueles relatados por Adékambi et al. (2004), exceto que os isolados do presente estudo apresentaram valores elevados de CIM para doxiciclina. Contrariando Adékambi et al. o achado de resistência frente à doxiciclina é corroborado pelos estudos publicados por Simmon et al. (2007), Viana-Niero et al. (2008) e Duarte et al. (2009). De acordo com Duarte et al. essa evidência reforça que a suscetibilidade a doxiciclina não pode ser usada como um marcador para a diferenciação entre *M. abscessus* e *M. massiliense*.

De acordo com o CLSI os resultados da tobramicina não devem ser reportados para o grupo *M. fortuitum* ou *M. abscessus*, uma vez que o tratamento com esse fármaco será superior à amicacina apenas nas infecções por causadas por *M. chelonae*. O CLSI enfatiza também que vários estudos evidenciam que virtualmente todos os isolados de *M. chelonae* e *M. abscessus* são resistentes ao sulfametoxazol, enquanto os isolados de *M. fortuitum* são sensíveis, dados que corroboram com os achados deste estudo (NCCLS 2003).

No presente estudo ficou evidente que os padrões de PFGE gerados a partir da análise do DNA genômico podem ser utilizados para a avaliação de isolados de *M. massiliense* e outras MNT epidemiologicamente relacionadas. Adicionalmente, comparações com cepas controle demonstraram o elevado poder discriminatório do método de PFGE para identificar origem clonal. Carbonne et al. (2009) descreveram um surto de infecção subcutânea após mesoterapia causado por *M. chelonae* no qual comparações por PFGE entre onze cepas isoladas de diferentes pacientes e uma cepa isolada do ambiente

(água de torneira) evidenciaram 100% de similaridade entre os microrganismos, sendo considerados portanto, indistinguíveis. A partir das análises epidemiológicas, microbiológicas e moleculares os autores encontraram uma forte evidência de que a água contaminada de torneira representa uma importante fonte de infecção por MNT. Griffiths et al. (2007) recomendam que a água de torneira ou fluidos derivados de água de torneira usados durante implante de próteses sejam evitados no centro cirúrgico e na limpeza de instrumentos médicos e cirúrgicos. Infelizmente no presente estudo o acesso aos hospitais foi restrito, fato que impossibilitou uma investigação microbiológica detalhada sobre possíveis fontes de contaminação. Diante do exposto, amostras ambientais não foram coletadas e as cepas de *M. massiliense* estudadas foram recuperadas exclusivamente a partir de amostras clínicas.

Em observância ao elevado nível de similaridade dos isolados, podemos considerar a possibilidade de uma fonte única de infecção bem como a existência de procedimentos inapropriados durante as videoscopias e uma possível contaminação ambiental, representando esse conjunto uma das causas mais prováveis para a ocorrência do surto. A desinfecção e/ou esterilização dos instrumentos utilizados em cirurgias é sem dúvida uma etapa crítica. No caso específico das videoscopias - laparoscopia, artroscopia e outras - recomenda-se a esterilização de todas as partes dos equipamentos consideradas críticas, ou seja, artigos que penetram tecidos estéreis ou sistema vascular (Hinrichsen 2007).

Duarte et al. (2009), em um estudo desenvolvido no Rio de Janeiro/RJ, registraram a maior epidemia de infecção pós-cirúrgica causada por MNT já

documentada no Brasil, e afirmam que existe um clone epidêmico de *M. massiliense* circulando no país, o então designado clone BRA100, de modo que as cepas oriundas de Belém, Goiás e Rio de Janeiro têm perfil de PFGE idêntico. Segundo os autores, 38 hospitais do Rio de Janeiro tiveram casos confirmados por culturas microbiológicas, totalizando 148 isolados de *M. massiliense* tolerantes ao glutaraldeído a 2%. O número crescente de casos de infecção por MNT após procedimentos por vídeo pode ser justificado, em parte, pela tolerância ao glutaraldeído entre isolados do grupo *M. chelonae-abscessus* e uma baixa suscetibilidade a níveis elevados de desinfetantes (Manzoor et al. 1999; Nomura et al. 2004; van Klingeren et al. 1993).

Considerada uma importante medida para a redução da ocorrência de infecções causadas por MCR nos serviços de saúde do nosso país, a Resolução N°8 da ANVISA, de 27 de Fevereiro de 2009, publicada no DOU em 02/03/2009, determinou a suspensão da esterilização química por imersão, utilizando agentes esterilizantes líquidos, para os artigos invasivos, usados em cirurgias abdominais e pélvicas convencionais, laparoscopias, mamoplastias e cirurgias plásticas como a lipoaspiração.

7. CONCLUSÕES

- Os microrganismos envolvidos no surto de infecção após videoscopias em Goiânia-GO foram identificados como *Mycobacterium massiliense* por PRA-hsp65 e sequenciamento parcial do gene *rpoB*.

- O perfil de suscetibilidade dos isolados evidenciou sensibilidade a amicacina e claritromicina, resistência a ciprofloxacina, doxiciclina, sulfametoxazol, tobramicina e sensibilidade intermediária a cefoxitina.
- A genotipagem das cepas por PFGE evidenciou perfil genético idêntico sugerindo a possibilidade de fonte comum de infecção nos diferentes hospitais e que técnicas inadequadas de assepsia durante as videoscopias e/ou processamento inadequado de artigos e/ou a contaminação ambiental contribuíram de alguma forma para a ocorrência do surto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, La Scola B, Raoult D, Drancourt M 2004. Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. J. Clin. Microbiol. 42: 5493-5501.

Adékambi T, Drancourt M 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2095-2105.

Adékambi T, Salah SB, Khlif M, Raoult D, Drancourt M 2006. Survival of Environmental Mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 5974-5981.

Adékambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M 2006. *RpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 133-143.

Adékambi T, Drancourt M 2009. *Mycobacterium bolletii* respiratory infections. Emerg. Infect. Dis. 15: 302-305.

Alfa MJ, Sisler JJ, Harding GKM 1995. *Mycobacterium abscessus* infection of a norplant contraceptive implant site. Can. Med. Assoc. J. 153(9): 1293-1296.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004. Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica - Módulo VI.

Barrow WW, Brennan PJ 1982. Isolation in high frequency of rough variants of *Mycobacterium intracellulare* lacking C-mycoside glycopeptidolipid antigens. J. Bacteriol. 150: 381-384.

Belisle JT, McNeil MR, Chatterjee D, Inamine JM, Brennan PJ 1993. Expression of the core lipopeptide of the glycopeptidolipid surface antigens in rough mutants of *Mycobacterium avium*. J. Biol. Chem. 268: 10510-10516.

Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ 1995. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 33: 760-764.

Brown-Elliott BA, Wallace Jr. RJ 2001. Clarithromycin Resistance in *Mycobacterium abscessus*. J. Clin. Microbiol. 39(7): 2745-2746.

Brown-Elliott BA, Wallace Jr. RJ 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 15: 716-746.

Brown-Elliott BA, Griffith DE, Wallace RJ 2002. Newly described emerging human species of nontuberculous mycobacteria. Infect. Dis. Clin. North Am. 16(1): 187-220.

Carbonne A, Brossier F, Arnaud I, Bougmiza I, Caumes E, Meningaud JP, Dubrou S, Jarlier V, Cambau E, Astagneau P 2009. Outbreak of nontuberculous

Mycobacterial subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections. J. Clin. Microbiol. 47(6): 1961-1964.

Catherinot E, Clarissou J, Etienne G, Ripoll F, Emile JF, Daffé M, Perronne C, Soudais C, Gaillard JL, Rottman M 2007. Hypervirulence of a Rough Variant of the *Mycobacterium abscessus* Type Strain. Infect. Immun. 75(2): 1055-1058.

Chadha R, Grover M, Sharma A, Lakshmy A, Deb M, Kumar A, Mehta G 1998. An outbreak of post-surgical wound infections due to *Mycobacterium abscessus*. Pediatr. Surg. Int. 13: 406-410.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. J. Exp. Med. 178(6): 2243-2247.

Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM 2002. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. J. Immunol. 168(3): 1322-1327.

Coros A, DeConno E, Derbyshire KM 2008. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among *Mycobacterial* species. J. Bacteriol. 190(9): 3408-3410.

Davey ME, O'toole GA 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(4): 847-867.

Devallois A, Goh KS, Rastogi N 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J. Clin. Microbiol. 35: 2969-2973.

Duarte RS, Lourenço MCS, Fonseca LS, Leão SC, Amorim ELT, Rocha ILL, Coelho FS, Viana-Niero C, Gomes KM, Silva MG, Lorena NSO, Pitombo MB, Ferreira RMC, Garcia MHO, Oliveira GP, Lupi O, Vilaça BR, Serradas LR, Chebabo A, Marques EA, Teixeira LM, Dalcolmo M, Senna SG, Sampaio JLM 2009. An epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. J. Clin. Microbiol. 47(7): 2149-2155.

Eid AJ, Berbari EF, Sia IG, Wengenack NL, Osmon DR, Razonable RR 2007. Prosthetic joint infection due to rapidly growing mycobacteria: report of 8 cases and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 45: 687-694.

Esteban J, Cabria F 2003. Outbreak of Infection with *Mycobacterium abscessus*: Is Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis a Useful Technique for Epidemiological Typing? J. Clin. Microbiol. 41: 915.

Esteban J, Martín-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Ayala G, Fernández-Roblas R, Gadea I 2008. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. BMC Microbiology 8:184.

Etienne G, Villeneuve C, Billman-Jacobe H, Astarie-Dequeker C, Dupont, MA, Daffé M 2002. The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. Microbiology 148: 3089–3100.

Fairhurst RM, Kubak BM, Shpiner RB, Levine MS, Pegues DA, Ardehali A 2002. *Mycobacterium abscessus* empyema in a lung transplant recipient. J. Heart Lung Transplant. 21: 391-394.

Falkinham JO, 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 9(2): 177-215.

Flynn JL, Chan J 2001. Immunology of tuberculosis. Annu. Rev. Immunol. 19(1): 93-129.

Fox LP, Geyer AS, Husain S, Della-Latta P, Grossman ME 2004. *Mycobacterium abscessus* cellulitis and multifocal abscesses of the breasts in a transsexual from illicit intramammary injections of silicone. J. Am. Acad. Dermatol. 50: 450-454.

Freitas D, Alvarenga L, Sampaio J, Mannis M, Sato E, Sousa L, Vieira L, Yu MC, Martins MC, Hoffling-Lima A, Belfort Jr R 2003. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. Ophthalmology 110: 276-285.

Galil K, Miller LA, Yakrus MA, Wallace Jr. RJ, Mosley DG, England B, Huitt G, McNeil MM, Perkins BA 1999. Abscesses due to *Mycobacterium abscessus* linked to injection of unapproved alternative medication. Emerg. Infect. Dis. 5: 681-687.

Griffiths PA, Babb JR, Bradley CR, Fraise AP 1997. Glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. J. Appl. Microbiol. 82: 519-526.

Griffiths DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 175: 367-416.

Hinrichsen SL 2007. Micobactéria de crescimento rápido - MCR. Prática Hospitalar 53: 106-111.

Howard ST, Byrd TF, Lyons CR 2002. A polymorphic region in *Mycobacterium abscessus* contains a novel insertion sequence element. Microbiology 148: 2987-2996.

Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsup A, Kolter R, Lyons CR, Byrd TF 2006. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* 152: 1581-1590.

Jordan PW, Stanley T, Donnelly FM, Elborn JS, McClurg RB, Millar BC, Goldsmith CE, Moore JE 2007. Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. *Letters in Applied Microbiology* 44(5): 459-466.

Kawamura I 2008. Advances in understanding of the virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi* 77(3): 219-224.

Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH 1999. Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.* 37(6): 1714-1720.

Kim HY, Yun YJ, Park CG, Lee DH, Cho YK, Park BJ, Joo SI, Kim EC, Hur YJ, Kim BJ, Kook YH 2007. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. *J. Clin. Microbiol.* 45(9): 3127-3130.

Kim HY, Kook Y, Yun YJ, Park CG, Lee NY, Shim TS, Kim BJ, Kook YH 2008. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains

among Korean *Mycobacterium chelonae*-*Mycobacterium abscessus* group isolates. J. Clin. Microbiol. 46(10): 3384-3390.

Koh W-J, Kwon OJ, Lee NY, Kook YH, Lee H-K, Kim BJ 2009. First case of disseminated *Mycobacterium bolletii* infection in a young adult patient. J. Clin. Microbiol. 47(10): 3362-3366.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC 2001. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido, 5ª ed. Editora Medsi, Rio de Janeiro, p. 903-963.

Kusunoki S, Ezaki T 1992. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 240-245.

Leão SC, Bernardelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, Mejía GI, Telles MAS, Chimara E, Velazco M, Fernandez J, Rodrigues PA, Guerrero MI, León CI, Porras TB, Rastogi N, Goh KS, Suffys P, Rocha AS, Netto DS, Ritacco V, López B, Barrera L, Palomino JC, Martin A, Portaels F 2005. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. J. Microbiol. Methods 61: 193-199.

Leão SC, Tortoli E, Viana-Niero C, Ueki SY, Lima KV, Lopes ML, Yubero J, Menendez MC, Garcia MJ 2009. Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests a revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group. J. Clin. Microbiol. 47(9): 2691-2698.

Manzoor SE, Lambert PA, Griffiths PA, Gill MJ, Fraise AP 1999. Reduced glutaraldehyde susceptibility in *Mycobacterium chelonae* associated with altered cell wall polysaccharides. J. Antimicrob. Chemother. 43: 759-765.

Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr 2009. A novel gene, *erm*(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. Antimicrob. Agents Chemother. 53(4): 1367-1376.

National Committee for Clinical Laboratory Standards 2003. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. NCCLS document M24-A 23(18): 25-32.

Nomura K, Ogawa M, Miyamoto H, Muratani T, Taniguchi H 2004. Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant *Mycobacterium chelonae* from 24 bronchoscope washing machines. Am. J. Infect. Control. 32: 185-188.

Ozluer SM, De'Ambrosis BJ 2001. *Mycobacterium abscessus* wound infection. Australas. J. Dermatol. 42: 26-29.

Park S, Kim S, Park EM, Kim H, Kwon OJ, Chang CL, Lew WJ, Park YK, Koh WJ 2008. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* in Korea. J. Korean. Med. Sci. 23: 49-52.

Pitulle C, Dorsch M, Kazda J, Wolters J, Stackebrandt E 1992. Phylogeny of rapidly growing members of the genus *Mycobacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 337-343.

Pring M, Eckhoff DG 1996. *Mycobacterium chelonae* Infection following a total knee arthroplasty. J. Arthroplast. 11: 115-116.

Raman LA, Siddiqi N, Shamim M, Deb M, Mehta G, Hasnain SE 2000. Molecular characterization of *Mycobacterium abscessus* strains isolated from a hospital outbreak. Emerg. Infect. Dis. 6(5): 561-562.

Ramos MC, Moraes MJ, Calisni AL, Roscani GN, Picolli EA 2000. A retrospective bacteriological study of mycobacterial infections in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). [Braz. J. Infect. Dis.](#) 4(2): 86-90.

Rocha AS, Leite CC, Torres HM, Miranda AB, Lopes MQP, Degraive WM, Suffys PN 1999. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. J. Microbiol. Methods 37: 223-229.

Rodrigues MAV, Serafini AB, Pereira MS, Silva TD, Rabahi MF, Alves SL, Kipnis A 2004. Standardization of in-house Polymerase Chain Reaction for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* at the Reference Tropical Disease Hospital in the state of Goiás, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99(4): 415-419.

Ryu HJ, Kim WJ, Oh CH, Song HJ 2005. Iatrogenic *Mycobacterium abscessus* infection associated with acupuncture: clinical manifestations and its treatment. Int. J. Dermatol. 44: 846-850.

Sampaio JL, Viana-Niero C, De Freitas D, Hofling-Lima AL, Leão SC 2006. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 55: 107-118.

Sampaio JLM, Chimara E, Ferrazoli L, Telles MAS, Del Guercio VMF, Jericó ZVN, Miyashiro K, Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Leão SC 2006. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing postmammaplasty infections. Clin. Microbiol. Infect. 12: 142-149.

Sanguinetti M, Ardito F, Fiscarelli E, La Sorda M, D'Argenio P, Ricciotti G, Fadda G 2001. Fatal pulmonary infection due to multidrug-resistant *Mycobacterium abscessus* in a patient with Cystic Fibrosis. J. Clin. Microbiol. 39(2): 816-819.

Scholze A, Loddenkemper C, Grünbaum M, Moosmayer I, Offermann G, Tepel M 2005. Cutaneous *Mycobacterium abscessus* infection after kidney transplantation. Nephrol. Dial. Transplant. 20: 1764-1765.

Silva CF, Ueki SYM, Geiger DCP, Leão SC 2001. hsp65 PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. Rev. Inst. Med. Trop. 43: 25-28.

Simmon KE, Pounder JI, Greene JN, Walsh F, Anderson CM, Cohen S, Petti CA 2007. Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* sequencing of clinical isolates collected in the United States. J. Clin. Microbiol. 45: 1978-1980.

Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russel DG 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science 263(5147): 678-681.

Tavares W 2007. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico, 1ª ed. Editora Atheneu, São Paulo, p. 213-240.

Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW 1997. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J. Clin. Microbiol. 35: 79-85.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 31: 175-178.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33: 2233-2239.

Thomssen H, Ivanyi J, Espitia C, Arya A, Londei M 1995. Human CD4-CD8-alpha beta + T-cell receptor T cells recognize different mycobacteria strains in the context of CD1b. Immunology 85(1): 33-40.

Tiwari TS, Ray B, Jost Jr. KC, Rathod MK, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Hendricks K, Wallace Jr. RJ 2003. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. Clin. Infect. Dis. 36: 954-962.

Tortoli E, Gabini R, Galanti I, Mariottini A 2008. Lethal *Mycobacterium massiliense* Sepsis, Italy. Emerg. Infect. Dis. 14: 984.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL 2000. Microbiologia, 6^a ed. Editora Artmed, Porto Alegre, p. 311.

Trupiano JK, Sebek BA, Goldfarb J, Levy LR, Hall GS, Procop GW 2001. Mastitis due to *Mycobacterium abscessus* after body piercing. Clin. Infect. Dis. 33: 131-134.

Uslan DZ, Kowalski TJ, Wengenack NL, Virk A, Wilson JW 2006. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria. Arch. Dermatol. 142: 1287-1292.

Van Klingeren B, Pullen W 1993. Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers. J. Hosp. Infect. 25: 147-149.

Van Soolingen D, De Haas, PE, Hermans PW, Van Embden JD 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. Methods Enzymol. 235: 196-205.

Viana-Niero C, Lima KVB, Lopes ML, Rabello MCS, Marsola LR, Brilhante VCR, Durham AM, Leão SC 2008. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. J. Clin. Microbiol. 46: 850-855.

Wallace Jr. RJ, Meier A, Brown BA, Zhang Y, Sander P, Onyi GO 1996. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1676-1681.

Wallace Jr. RJ, Brown BA, Griffith DE 1998. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 453-490.

Wilson RW, Steingrube VA, Bottger EC, Springer B, Brown-Elliott BA, Vincent V, Jost Jr. KC, Zhang Y, Garcia MJ, Chiu SH, Onyi GO, Rossmore H, Nash DR, Wallace Jr. RJ 2001. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1751-1764.

Woods GL 2000. Susceptibility Testing for Mycobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 31: 1209-1215.

Yakrus MA, Hernandez SM, Floyd MM 2001. Comparison of methods for identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4103-4110.

Zhang Y, Rajagopalan M, Brown BA, Wallace Jr. RJ 1997. Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3132-3139.

Zhibang Y, BiXia Z, Qishan L, Lihao C, Xiangquan L, Huaping L 2002. Large-Scale outbreak of infection with *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* after penicillin injection. *J. Clin. Microbiol.* 40(7): 2626-2628.

ANEXO 1

ANEXO 2

ANEXO 3

ANEXO 4

ANEXO 5